

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-504048

(P2015-504048A)

(43) 公表日 平成27年2月5日(2015.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4C084
C07K 5/023 (2006.01)	C07K 5/023 ZNA	4H045
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08	
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-548945 (P2014-548945)	(71) 出願人	511060836 ニューヨーク・ユニバーシティ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー ヨーク ワシントン スクエア サウス 70
(86) (22) 出願日	平成24年12月21日 (2012.12.21)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月7日 (2014.8.7)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/071223	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02013/096755	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成25年6月27日 (2013.6.27)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/578,652		
(32) 優先日	平成23年12月21日 (2011.12.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/578,646		
(32) 優先日	平成23年12月21日 (2011.12.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 タンパク質分解抵抗性水素結合サロゲートヘリックス

(57) 【要約】

本発明は、安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体に関し、本ペプチド模倣体は、内部拘束中の水素結合サロゲート、および少なくとも1つのペータミノ酸を含有する。p53/hDM2を阻害するペプチド模倣体を用いた細胞死を促進するための方法もまた、開示される。

【選択図】 図1

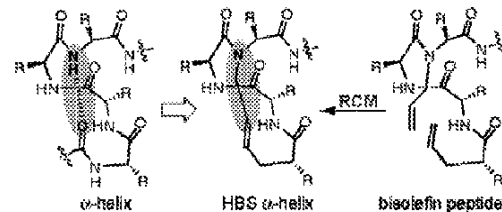
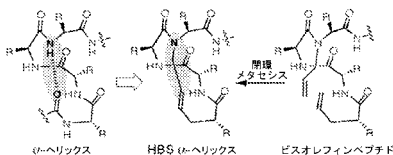
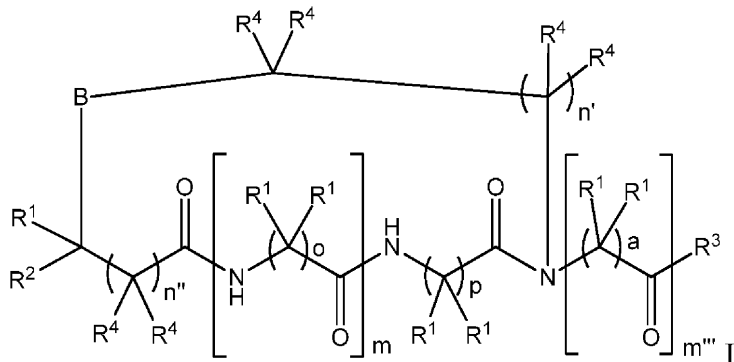


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体であって、前記ペプチド模倣体が、式 I の化合物：



10

であり、

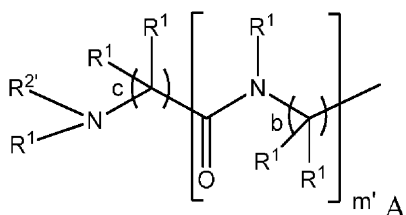
式中、

B が、 $C(R^1)_2$ 、O、S、または NR^1 であり、

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

20

R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ （式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、 $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ （式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または式 A の部分：



30

であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ （式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ （式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）であり、

40

m' が 0 または任意の数であり、

各 b が独立して、1 または 2 であり、

c が 1 または 2 であり、

R^3 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ （式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル

50

$$\left[\begin{array}{c} \text{R}^1 \quad \text{R}^1 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{R}^1 \quad \text{O} \quad \text{R}^{3'} \end{array} \right]_{m''} \text{B}$$

式中、

m'' が 0 または任意の数であり、

各 d が独立して、1 または 2 であり、

各 R⁴ が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

m、n'、および n'' がそれぞれ独立して、0、1、2、3、または 4 であり、m、n'、および n'' の合計が 2 ~ 6 であり、

m''' が 0 または 1 であり、

a が 1 または 2 であり、

各 θ_i が独立して、1 または 2 であり、

p が 1 または 2 であり、

以下の条件

(i) m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 である、

(i i) p が 2 である、

(i i i) m ' ' ' が 1 であり、 a が 2 である、

(i v) R^2 がベータアミノ酸である、

(v) R^2 が式 A の部分であり、式中、 m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、

(v i) R^2 が式 A の部分であり、式中、 c が 2 である、

(vii) R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である

(v i i i) R ³ がベータアミノ酸である、

(ix) R^3 が式 B の部分であり、式中、 m'' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの d が 2 である、および

(x) R^3 が式 B の部分であり、式中、 R^3 がベータアミノ酸である、

のうちの少なくとも1つが満たされる、ペプチド模倣体。

【請求項2】

B が $C(R^1)$ である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項3】

B が 0 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 4】

B が S である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 5】

B が NR^1 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 6】

前記化合物の大環状部分には 9 ~ 12 個の原子がある、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 7】

前記化合物の大環状部分には 11 個の原子がある、請求項 6 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 8】

前記化合物の大環状部分には 12 ~ 15 個の原子がある、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 9】

前記化合物の大環状部分には 14 個の原子がある、請求項 8 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 10】

前記化合物の大環状部分には 15 ~ 18 個の原子がある、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 11】

前記化合物の大環状部分には 17 個の原子がある、請求項 10 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 12】

前記化合物の大環状部分には 20 ~ 24 個の原子がある、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 13】

前記化合物の大環状部分には 22 個の原子がある、請求項 12 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 14】

m が、1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 15】

p が 2 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 16】

m' が 1 であり、a が 2 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 17】

R^2 がベータアミノ酸である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 18】

R^2 が式 A の部分であり、式中、m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 19】

R^2 が式 A の部分であり、式中、c が 2 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 20】

R^2 が式 A の部分であり、式中、 $\text{R}^{2'}$ がベータアミノ酸である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 21】

R^3 がベータアミノ酸である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 22】

R^3 が式 B の部分であり、式中、m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの d が 2 である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 23】

R^3 が式 B の部分であり、式中、 $\text{R}^{3'}$ がベータアミノ酸である、請求項 1 に記載のペ

10

20

30

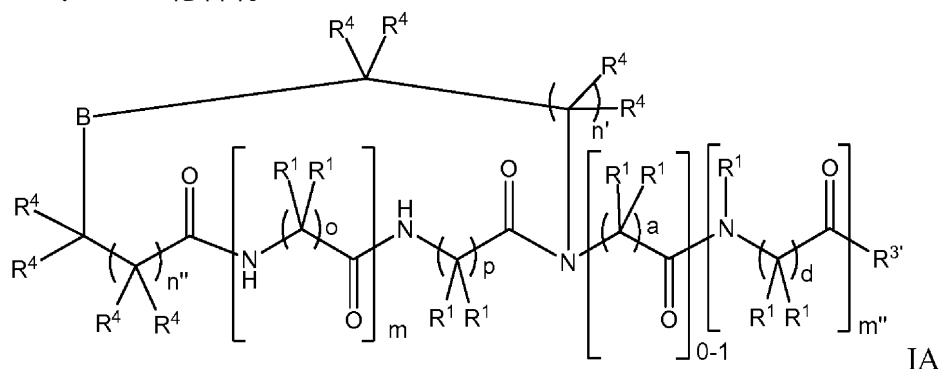
40

50

プチド模倣体。

【請求項 2 4】

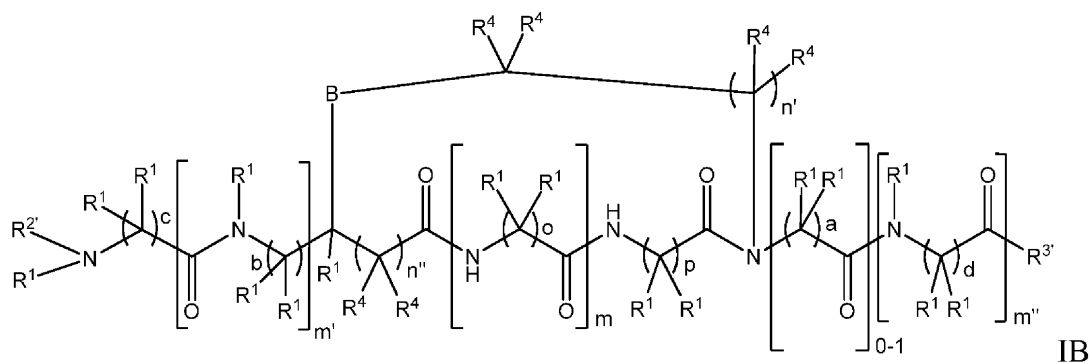
式 I A の化合物：



である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 2 5】

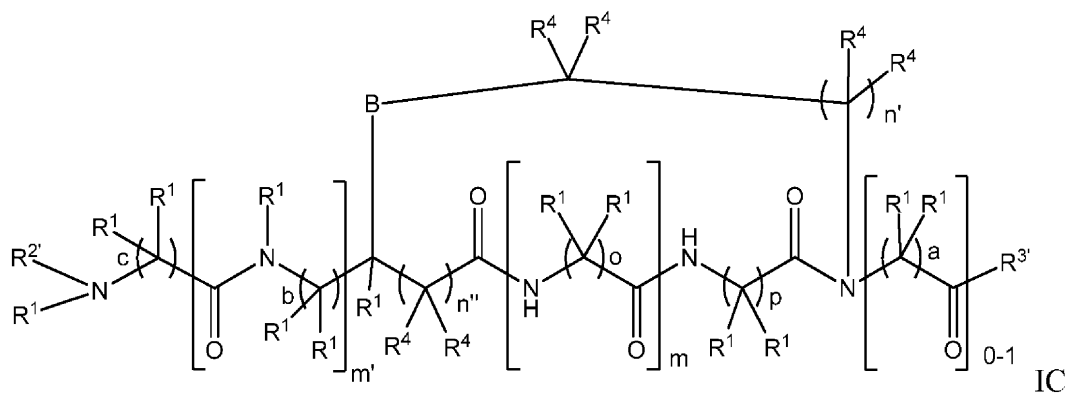
式 I B の化合物：



である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 2 6】

式 I C の化合物：

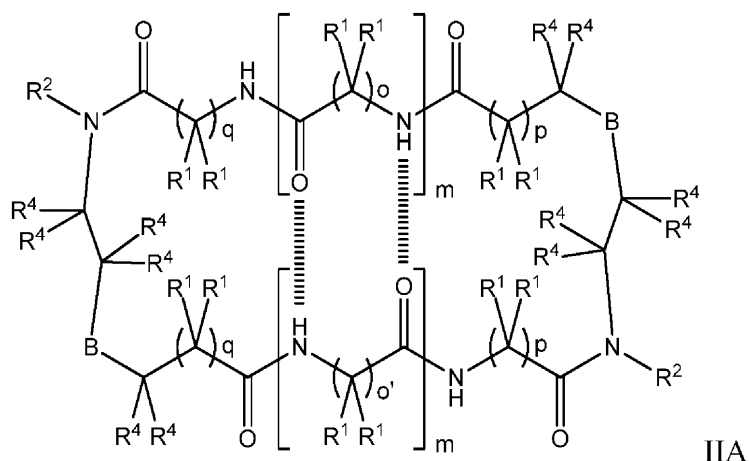


である、請求項 1 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 2 7】

安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体であって、前記ペプチド模倣体が、式 I I A の化合物：

40



10

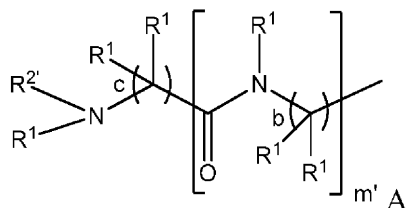
であり、
式中、

各 B が独立して、 $C(R^1)_2$ 、O、S、または NR^1 であり、

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

各 R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 A の部分：

20



30

であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである) であり、

40

m' が 0 または任意の数であり、

各 b が独立して、1 または 2 であり、

c が 1 または 2 であり、

各 R^4 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

m が 1、2、3、または 4 であり、

各 o および各 o' が独立して、1 または 2 であるが、但し、それぞれの対応する o および o' が同じであるものとし、

50

p が 1 または 2 であり、
 q が 1 または 2 であり、
 以下の条件

(i) m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 であり、
 少なくとも 1 つの o' が 2 である、

(i i) p が 2 である、

(i i i) q が 2 である、

(i v) 少なくとも 1 つの R^2 がベータアミノ酸である、

(v) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、m' が少なくとも
 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、

10

(v i) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、c が 2 である、
 および

(v i i) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である、

のうちの少なくとも 1 つが満たされる、ペプチド模倣体。

【請求項 28】

B が $C(R^1)_2$ である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 29】

B が O である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 30】

B が S である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

20

【請求項 31】

B が NR^1 である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 32】

m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 であり、少なくとも 1 つの
 o' が 2 である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 33】

p が 2 である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 34】

q が 2 である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

30

【請求項 35】

少なくとも 1 つの R^2 がベータアミノ酸である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 36】

少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、m' が少なくとも 1 であり、少なく
 とも 1 つの b が 2 である、請求項 27 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 37】

少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、c が 2 である、請求項 27 に記載の
 ペプチド模倣体。

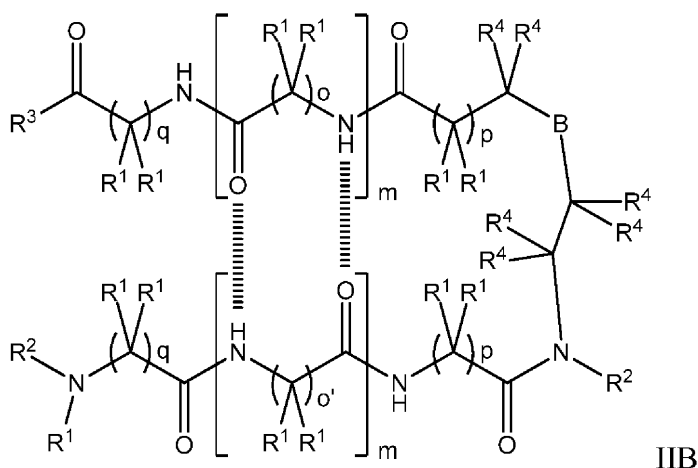
【請求項 38】

少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である、請
 求項 27 に記載のペプチド模倣体。

40

【請求項 39】

安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体であって、前記ペプチ
 ド模倣体が、式 I I B の化合物：



10

であり、

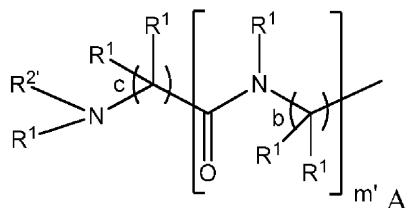
式中、

各 B が独立して、 $C(R^1)_2$ 、O、S、または NR^1 であり、

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

各 R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 A の部分：

20



30

であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである) であり、

40

m' が 0 または任意の数であり、

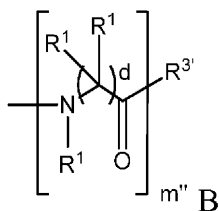
各 b が独立して、1 または 2 であり、

c が 1 または 2 であり、

R^3 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-N(R^5)_2$ (式中

50

、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または式 B の部分：



であり、

10

式中、

$R^{3'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ （式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または $-N(R^5)_2$ （式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）であり、

m'' が 0 または任意の数であり、

20

各 d が独立して、1 または 2 であり、

各 R^4 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

m が 1、2、3、または 4 であり、

各 o および各 o' が独立して、1 または 2 であるが、但し、それぞれの対応する o および o' が同じであるものとし、

p が 1 または 2 であり、

q が 1 または 2 であり、

以下の条件

(i) m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 であり、
少なくとも 1 つの o' が 2 である、

30

(ii) p が 2 である、

(iii) q が 2 である、

(iv) 少なくとも 1 つの R^2 がベータアミノ酸である、

(v) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、

(vi) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 c が 2 である、

(vii) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である、

(viii) R^3 がベータアミノ酸である、

40

(ix) R^3 が式 B の部分であり、式中、 m'' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの d が 2 である、および

(x) R^3 が式 B の部分であり、式中、 $R^{3'}$ がベータアミノ酸である、

のうちの少なくとも 1 つが満たされる、ペプチド模倣体。

【請求項 40】

B が $C(R^1)_2$ である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 41】

B が O である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 42】

B が S である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

50

【請求項 43】

B が NR^1 である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 44】

m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 であり、少なくとも 1 つの o' が 2 である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 45】

p が 2 である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 46】

q が 2 である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 47】

少なくとも 1 つの R^2 がベータアミノ酸である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 48】

少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 49】

少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、c が 2 である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 50】

少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 51】

R^3 がベータアミノ酸である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 52】

R^3 が式 B の部分であり、式中、m'' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの d が 2 である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 53】

R^3 が式 B の部分であり、式中、 $R^{3'}$ がベータアミノ酸である、請求項 39 に記載のペプチド模倣体。

【請求項 54】

細胞死を促進するための方法であって、

前記細胞を、p53 / hDM2 を阻害する請求項 1 に記載の 1 つ以上の化合物と、前記 1 つ以上の化合物が細胞死を促進するのに有効な条件下で接触させることを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2011年12月21日出願の米国特許仮出願第61/578,646号、および2011年12月21日出願の第61/578,652号の利益を主張し、これらの出願のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号GM073943の下、政府の支援を得て行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、概して、安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体を対象とし、本ペプチド模倣体は、内部拘束中の水素結合サロゲート、および少なくとも 1 つのベータアミノ酸を含有する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

10

20

30

40

50

ペプチドのインビボ有効性は、しばしば、それらの低い細胞透過性に加えて、それらの立体配座およびタンパク質分解の不安定性によって損なわれる。修飾ペプチドは、これらの欠点の幾つかまたはすべてを克服することが示されている (Moellering et al., Nature 462:182 (2009) (非特許文献1)、Horne et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 106:14751 (2009) (非特許文献2))。所望のヘリックス立体配座においてペプチドを安定化させるための合成方法が導入されている (Patgiri et al., Acc. Chem. Res. 41:1289 (2008) (非特許文献3)、Liu et al., J. Am. Chem. Soc'y 130:4334-37 (2008) (非特許文献4)、Chapman et al., Biochemistry 47:4189-95 (2008) (非特許文献5))。水素結合サロゲート (HBS) アプローチと称されるこの戦略では、図1に示されるように、主鎖水素結合が、ヘリックス立体配座を安定化させるために共有結合と置き換えられる。HBS - ヘリックスは、高親和性および特異性でそれらの同族タンパク質受容体を標的とすることが示されている (Patgiri et al., Nat. Chem. Biol. 7:585 (2011) (非特許文献6)、Henchey et al., J. Am. Chem. Soc'y 132:941 (2010) (非特許文献7)、Henchey et al., ChemBioChem 11:2104 (2010) (非特許文献8)、Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 47:1879 (2008) (非特許文献9)、Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 44:6525 (2005) (非特許文献10))。安定化されたヘリックスは、選択された細胞内タンパク質 - タンパク質相互作用を調節することができるが、一方、それらの非拘束の等価物は無効な状態のままである (Patgiri et al., Nat. Chem. Biol. 7:585 (2011) (非特許文献6)、Henchey et al., J. Am. Chem. Soc'y 132:941 (2010) (非特許文献7))。

【0005】

アミノ酸からなるHBSヘリックスのタンパク質分解安定性は、初期に調査され、プロテアーゼが、拡張された立体配座にあるペプチドに結合し切断するため、らせん構造とタンパク質分解安定性との間に直接的な相関関係があることが見出された (Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 44:6525 (2005) (非特許文献10)、Tyndall et al., Chem. Rev. 105:973 (2005) (非特許文献11))。しかしながら、HBSヘリックスのタンパク質分解安定性の程度は、配列依存性であることが見出された。

【0006】

ペプチドおよびキメラ / ペプチドは、分解に抵抗することが知られている (Hook et al., Chem. Biodivers. 2:591 (2005) (非特許文献12)、Seebach & Gardiner, Acc. Chem. Res. 41:1366 (2008) (非特許文献13)、Horne & Gellman, Acc. Chem. Res. 41:1399 (2008) (非特許文献14)、Sadowsky et al., ChemBioChem 8:903 (2007) (非特許文献15))。³残基ならびに³残基の混合物からなるオリゴマーは、典型的には、側鎖 - 側鎖接触 (Arvidsson et al., Chem. Commun. 649 (2001) (非特許文献16)、Kritzer et al., J. Am. Chem. Soc'y 127:167 (2005) (非特許文献17)、Hart et al., J. Am. Chem. Soc'y 125:4022 (2003) (非特許文献18)、Cheng & DeGrado, J. Am. Chem. Soc'y 123:5162 (2001) (非特許文献19))、または所定の二面角、を有する環状アミノ酸類似体の使用 (Horne & Gellman, Acc. Chem. Res. 41:1399 (2008) (非特許文献14)、Appella et al., Nature 387:381 (1997) (非特許文献20)、Vaz et al., Chem

BioChem 9:2254(2008)(非特許文献21))によって予め組織化される。大環状環のHBSヘリックス内の³残基の挿入が、それらの官能性も保持する、より安定なHBSヘリックスをもたらすかどうか、また、結合したペプチドを含有するHBSヘリックスの安定性が、HBSヘリックスの官能性を含まずに、結合したペプチド中のアミノ酸残基を³残基と置き換えることによって改善され得るかどうかも知られていなかった。

【0007】

本発明は、当技術分野におけるこれらおよび他の欠点を克服することを対象とする。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0008】

【非特許文献1】Moellering et al., Nature 462:182 (2009)

【非特許文献2】Horne et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 106:14751(2009)

【非特許文献3】Patgiri et al., Acc. Chem. Res. 41:1289(2008)

【非特許文献4】Liu et al., J. Am. Chem. Soc'y 130:4334-37(2008)

【非特許文献5】Chapman et al., Biochemistry 47:4189-95(2008)

20

【非特許文献6】Patgiri et al., Nat. Chem. Biol. 7:585(2011)

【非特許文献7】Henchey et al., J. Am. Chem. Soc'y 132:941(2010)

【非特許文献8】Henchey et al., ChemBioChem 11:2104(2010)

【非特許文献9】Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 47:1879(2008)

【非特許文献10】Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 44:6525(2005)(非特許文献10)

30

【非特許文献11】Tyndall et al., Chem. Rev. 105:973(2005)

【非特許文献12】Hook et al., Chem. Biodivers. 2:591(2005)

【非特許文献13】Seebach & Gardiner, Acc. Chem. Res. 41:1366(2008)

【非特許文献14】Horne & Gellman, Acc. Chem. Res. 41:1399(2008)

【非特許文献15】Sadowsky et al., ChemBioChem 8:903(2007)

40

【非特許文献16】Arvidsson et al., Chem. Commun. 649(2001)

【非特許文献17】Kritzer et al., J. Am. Chem. Soc'y 127:167(2005)

【非特許文献18】Hart et al., J. Am. Chem. Soc'y 125:4022(2003)

【非特許文献19】Cheng & DeGrado, J. Am. Chem. Soc'y 123:5162(2001)

【非特許文献20】Appella et al., Nature 387:381(1

50

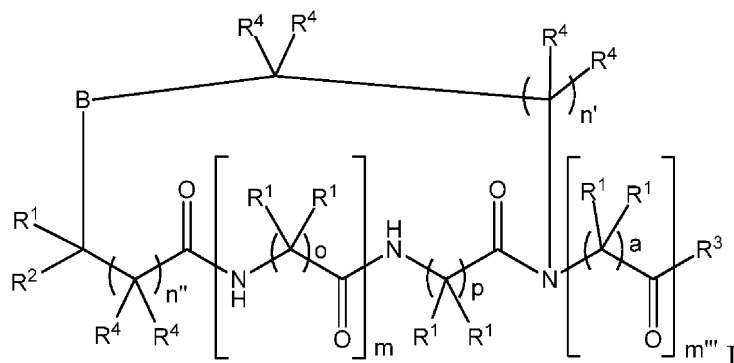
997)

【非特許文献21】Vaz et al., ChemBioChem 9:2254 (2008)

【発明の概要】

【0009】

本発明の一態様は、安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体に関し、本ペプチド模倣体は、式Iの化合物：



10

であり、

式中、

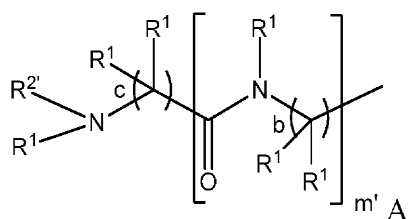
Bが、 $C(R^1)_2$ 、O、S、または NR^1 であり、

20

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ （式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、 $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ （式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または式Aの部分：

30



であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ （式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ （式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）であり、

40

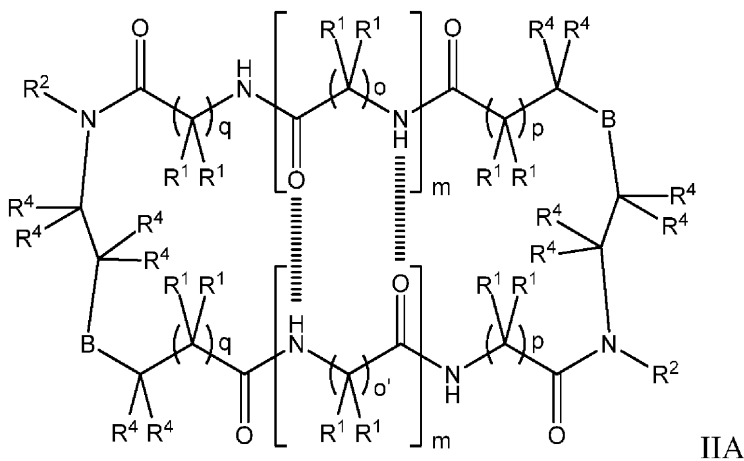
m' が0または任意の数であり、

各 b が独立して、1または2であり、

c が1または2であり、

50

本発明の別の態様は、安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体に関し、本ペプチド模倣体は、式 I I A の化合物：



10

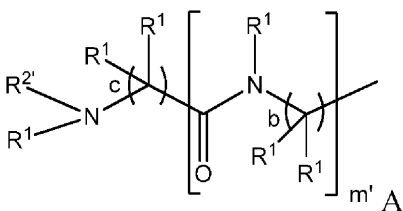
であり、
式中、

各 B が独立して、 $C(R^1)_2$ 、O、S、または NR^1 であり、

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

20

各 R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-(CH_2)_{0-1}$ $N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 A の部分：



30

であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-(CH_2)_{0-1} N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである) であり、

40

m' が 0 または任意の数であり、

各 b が独立して、1 または 2 であり、

c が 1 または 2 であり、

各 R^4 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

m が 1、2、3、または 4 であり、

50

各 α および各 α' が独立して、1 または 2 であるが、但し、それぞれの対応する α および α' が同じであるものとし、

p が 1 または 2 であり、

q が 1 または 2 であり、

以下の条件

(i) m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの α が 2 であり、少なくとも 1 つの α' が 2 である、

(i i) p が 2 である、

(i i i) q が 2 である、

(i v) 少なくとも 1 つの R^2 がベータアミノ酸である、

10

(v) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、

(v i) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 c が 2 である、および

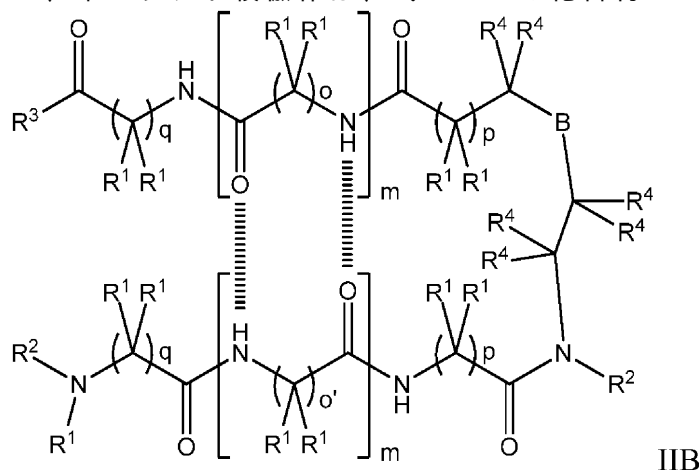
(v i i) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である、

のうちの少なくとも 1 つが満たされる。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の態様は、安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体に関し、本ペプチド模倣体は、式 I I B の化合物：

20



30

であり、

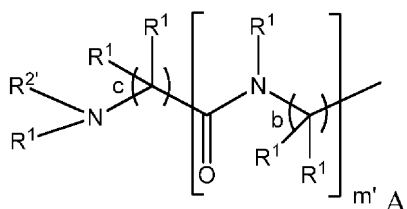
式中、

各 B が独立して、 $C(R^1)_2$ 、 O 、 S 、または NR^1 であり、

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

各 R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 A の部分：

40



であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである) であり、

10

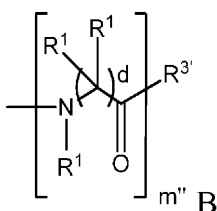
m' が 0 または任意の数であり、

各 b が独立して、1 または 2 であり、

c が 1 または 2 であり、

R^3 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 B の部分：

20



30

であり、

式中、

$R^{3'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである) であり、

40

m'' が 0 または任意の数であり、

各 d が独立して、1 または 2 であり、

各 R^4 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

m が 1、2、3、または 4 であり、

各 o および各 o' が独立して、1 または 2 であるが、但し、それぞれの対応する o および o' が同じであるものとし、

50

p が 1 または 2 であり、
q が 1 または 2 であり、
以下の条件

- (i) m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 であり、
少なくとも 1 つの o' が 2 である、
- (i i) p が 2 である、
- (i i i) q が 2 である、
- (i v) 少なくとも 1 つの R^2 がベータアミノ酸である、
- (v) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、m' が少なくとも
1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、
- (v i) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、c が 2 である、
- (v i i) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータ
アミノ酸である、
- (v i i i) R^3 がベータアミノ酸である、
- (i x) R^3 が式 B の部分であり、式中、m'' が少なくとも 1 であり、少な
くとも 1 つの d が 2 である、および
- (x) R^3 が式 B の部分であり、式中、 $R^{3'}$ がベータアミノ酸である、
のうちの少なくとも 1 つが満たされる。

10

【 0 0 1 2 】

本発明のなお別の態様は、細胞死を促進するための方法に関する。本方法は、細胞を、
p 5 3 / h D M 2 を阻害する式 I の 1 つ以上の化合物と、1 つ以上の化合物が細胞死を促
進するのに有効な条件下で接触させることを含む。

20

【 0 0 1 3 】

水素結合サロゲートヘリックスは、高親和性および特異性で細胞内のタンパク質 - タン
パク質相互作用を標的とすることがすでに示されている。タンパク質分解への抵抗性を増
加させる H B S ヘリックスの設計が本明細書に概説される。拘束された ペプチドヘリッ
クスにおける 3 アミノ酸残基の慎重な挿入が、H B S 配列の細胞透過性、または高親和
性でタンパク質受容体を標的とするそれらの能力を害することなく、所望のタンパク質分
解安定性を提供することが見出されている。有意には、これは、H B S アプローチが異種
配列内のヘリックス立体配座を予め組織化することができることを示す。拘束された ペ
プチドヘリックスの結合したペプチドにおける 3 アミノ酸残基の慎重な挿入はまた、所
望のタンパク質分解安定性を提供することも見出されている。これは、H B S 配列の細胞
透過性、または高親和性でタンパク質受容体を標的とするそれらの能力を害することなく
行うことができることが期待される。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】N 末端主鎖 (i、i + 4) H 結合と、炭素 - 炭素結合との置き換えを示す、従来
の H B S ヘリックス設計の略図である。

【図 2】ペプチド模倣体の設計への 3 / H B S アプローチを示す。図 2 A は、エネル
ギー最小化した 2 / ペプチド (左) および 3 / ペプチド (右) 構造ならびに基準
のヘリックスのオーバーレイを示す。分子モデリング研究は、マクロモデル内の A m b
e r 力場を用いて行われた (M o h a m a d i e t a l . , J . C o m p . C h e m
. 1 1 : 4 4 0 (1 9 9 0)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

40

3 残基を黄色で示す。 - H B S および 3 / - H B S 拘束されたペプチドの比較を
図 2 B に示す。

【図 3】ペプチド 1 (3 / - H B S ペプチド、左上)、2 (- H B S、右上)、3
(非拘束 3 /、左中央)、4 (非拘束 3 / 環状、右中央)、5 (3 / - H B
S 変異、左下)、および 6 (非拘束、右下) の一連の分析 H P L C パターンである。

【図 4】ペプチド F l u - 1 (左) および F l u - 3 (右) の一対の分析 H P L C パター
ンである。

50

【図5】ペプチド1～4の円二色性スペクトルである。CDスペクトルが、10% TFE / PBS中で得られた。

【図6】PBS中10% TFE中のペプチド5およびペプチド6の円二色性スペクトルである。

【図7】900MHzのNMR分光計における293KでのPBS中20% TFE-d₃中のペプチド1の¹H NMRである。NHプロトンの帰属を差し込み図で示す。³アミノ酸残基を、小文字の青色文字で示す。

【図8】PBS中20% TFE-d₃中のペプチド1の900MHzのDQF-COSYスペクトル(293K)の指紋領域である。主鎖アミドプロトンおよびC^αプロトンの接触を、矢印で示す。³アミノ酸残基を、小文字の青色文字で示す。

【図9】PBS中20% TFE-d₃中のペプチド1の900MHzのTOCSYスペクトル(293K)のNH-C^α領域である。³アミノ酸残基を、小文字の青色文字で表す。

【図10】PBS中20% TFE-d₃中のペプチド1のNOESYスペクトル(900MHz、293K)の領域である。³アミノ酸残基を、小文字の青色文字で示す。

【図11】PBS中20% TFE-d₃中のペプチド1のNOESYスペクトル(900MHz、293K)である。³アミノ酸残基を、小文字の青色文字で示す。

【図12】25℃でPBS緩衝液中のFlu-p53のMdm2による飽和結合曲線である。 $K_D = 137 \pm 57 \text{ nM}$ 。

【図13】ペプチド1の安定性における温度の影響を示すペプチド1の円二色性スペクトルである。CDスペクトルが、10% TFE / PBS中で得られた。

【図14】ペプチド1に対するNOESYスペクトルの断面図(図14A)およびNOESY相関図(図14B)である。NMRスペクトルが、20% TFE / PBS中で得られた。小文字は³残基を表す。

【図15】ペプチド1における主鎖アミドプロトン化学シフトの温度依存性を示すスペクトル(図15A)およびプロット(図15B)である。NMRスペクトルが、20% TFE / PBS中で得られた。小文字は³残基を表す。

【図16】ペプチド1における主鎖アミドプロトンについての水素重水素交換スペクトル(図16A)およびプロット(図16B)である。NMRスペクトルが、20% TFE / PBS中で得られた。小文字は³残基を表す。

【図17】蛍光偏光アッセイによって決定されたHis₆をタグ付けしたMdm2に対するペプチド結合のグラフである。

【図18】トリプシン(図18A)および血清(図18B)の存在下、ペプチド2および6ならびに / ペプチド1および3のタンパク質分解のグラフである。タンパク質分解の初期速度を、LCMSアッセイを用いて測定した。

【図19】指示されたペプチドによる2時間のインキュベーション後、共焦点顕微鏡によって視覚化された生HeLa細胞へのフルオレセイン標識³/ - HBSペプチド1(Flu-1)および非拘束ペプチド3(Flu-3)の細胞取り込みを示す一連の画像である。

【図20】ペプチド4-2(上)およびペプチド4-7(下)の配列を示す。結合のために重要な残基を、アスタリスクを用いて印付けする。³-ホモアミノ酸残基を「³」で印付けする。

【図21】ペプチド4-7および4-9についての分析HPLCパターンを示す。

【図22】PBS中10% TFE中の、ペプチド4-7、ペプチド4-8(4-7の非拘束類似体)、およびペプチド4-9(F4およびL11の代わりにアラニンを有するペプチド4-7の陰性対照)の円二色性スペクトルである。

【図23】PBS中20% TFE-d₃中のペプチド4-7の500MHzのTOCSYスペクトル(293K)のNH-C^α領域である。³-アミノ酸残基(7および11)を、小文字の青色文字で表す。

【図24】PBS中20% TFE-d₃中のペプチド4-7のNOESYスペクトル(

10

20

30

40

50

500 MHz、293 K) の断面図である。³ アミノ酸残基 (7 および 11) を、小文字の青色文字で示す。

【図 25】PBS 中 20% TFE - d₃ 中のペプチド 4 - 7 の NOESY スペクトル (500 MHz、293 K) の断面図である。³ アミノ酸残基 (7 および 11) を、小文字の青色文字で示す。

【図 26】PBS 中 20% TFE - d₃ 中のペプチド 4 - 7 の NOESY スペクトル (500 MHz、293 K) である。³ アミノ酸残基 (7 および 11) を、小文字の青色文字で示す。

【図 27】ペプチドの安定性における温度の影響を示す、様々な温度でのペプチド 4 - 7 の円二色性スペクトルである。CD スペクトルが、10% TFE / PBS 中で得られた。

【図 28】ペプチド 4 - 7 についての NOESY 相関図である。NMR スペクトルが、20% TFE / PBS 中で得られた。³ アミノ酸残基 (3、7、および 11) を、小文字の青文字で示す。

【図 29】蛍光偏光アッセイによる His₆ をタグ付けした Mdm2 に対するペプチド 4 - 7、4 - 8、および 4 - 9 の結合の決定を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

タンパク質二次構造は、様々な主鎖アミド基間で観察される水素結合パターンによって画定される。ペプチドにおけるヘリックス - コイル転移の分析は、ヘリックス形成における低速工程として、ヘリックス配向に 3 つの連続するアミノ酸のエネルギーを必要とする組織化について強調する (Qian & Schellman, J. Chem. Phys., 96:3987 - 3994 (1992)、Lifson & Roig, J. Chem. Phys., 34:1963 - 1974 (1961)、Zimm & Bragg, J. Chem. Phys., 31:526 - 535 (1959)、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。これらのアミノ酸残基を予め組織化することにより、固有の核形成傾向を圧倒し、ヘリックス形成を開始させることが期待される (Austin et al., J. Am. Chem. Soc., 119:6461 - 6472 (1997)、Kemp et al., J. Org. Chem., 56:6672 - 6682 (1991)、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。ヘリックスでは、例えば、i 番目のアミノ酸残基の C=O と i + 4 番目のアミノ酸残基の NH の間の水素結合が、ヘリックス構造を安定化し、核を形成する。同様の相互作用が、他のヘリックス、シート / ヘアピン、および他のペプチド二次構造を安定化し、核を形成する。

【0016】

C=O - - H - N 水素結合を模倣するために、C₁₋₅ - B - C₁₋₅ - N 型 (HBS ヘリックスと称される) の共有結合を組み込む内部拘束ペプチド模倣体は、以前にも開発されている (Arora & Chapman の米国特許第 7,202,332 号 (B が炭素である HBS ヘリックス)、Arora & Mahon の米国特許仮出願公開第 61-529,414 号 (B が硫黄、酸素、または窒素である HBS ヘリックス)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。HBS アプローチは、ヘリックス、₃₁₀ヘリックス、ヘリックス、グラミシジンヘリックス、ターン、およびシート類似体を含む、広範囲の立体配座的に安定したタンパク質二次構造を提供する (Chapman et al., J. Am. Chem. Soc'y 126:12252 - 53 (2004)、Wang et al., J. Am. Chem. Soc'y 128:9248 - 56 (2006)、Liu et al., J. Am. Chem. Soc'y 130:4334 - 37 (2008)、Chapman et al., Biochemistry 47:4189 - 95 (2008)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。架橋部の内部配置は、曝露された表面のいずれもが、拘束する元素によって遮断されないようなタンパク質二次構造の発生を可能とす

10

20

30

40

50

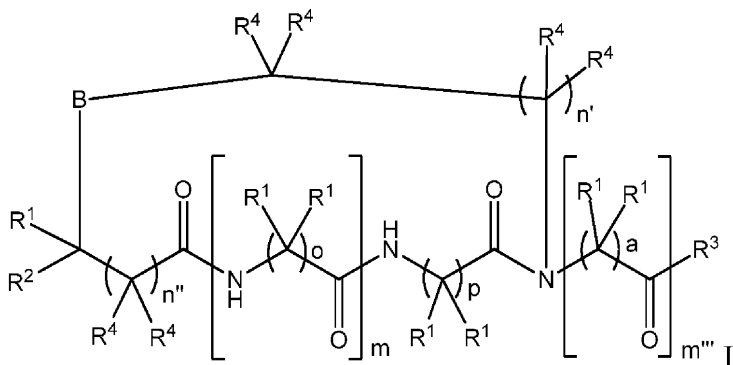
る。即ち、タンパク質二次構造の内側の架橋部の配置は、側鎖官能性を変化させないし、分子の、溶媒に曝露される分子認識表面も遮断しない (Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 44: 6525 (2005)、Sia et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99: 14664 - 14669 (2002)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。HBSヘリックスは、高親和性および特異性でそれらのタンパク質受容体を標的とすることができ (Henchey et al., ChemBioChem 11: 2104 (2010)、Henchey et al., J. Am. Chem. Soc'y 132: 941 - 43 (2010)、Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 47: 1879 - 82 (2008)、Wang et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 44: 6525 - 29 (2005)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、それらの非拘束類似体と比較して細胞透過性である (Henchey et al., J. Am. Chem. Soc'y 132: 941 - 43 (2010)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。さらに、極めて短いペプチド (即ち、10個未満のアミノ酸残基のペプチド) であっても拘束され得、非常に安定したタンパク質二次構造になる。

【0017】

タンパク質分解に抵抗する新しい種類のHBSヘリックス (/ HBSヘリックスと称される) の設計および評価が、本明細書に記載されている。従来のHBSヘリックスへのベータアミノ酸残基の慎重な挿入は、高親和性でタンパク質受容体を標的とするそれらの細胞透過性またはそれらの能力に障害を来たすことなく分解に対する合成ヘリックスの安定性を増加させる。結合したペプチドを含有する従来のHBSヘリックスへのベータアミノ酸残基の慎重な挿入は、高親和性でタンパク質受容体を標的とするそれらの細胞透過性またはそれらの能力に障害を来たすことなく分解に対する合成ヘリックスの安定性を増加させることが予想される。図2A~Bは、例として大環状環中のベータアミノ酸を有する 3 / 1 ペプチドを用いて、ペプチド模倣体の設計への / HBSアプローチを示す。

【0018】

本発明の一態様は、安定な内部拘束タンパク質二次構造を有するペプチド模倣体に関し、本ペプチド模倣体は、式Iの化合物：



であり、

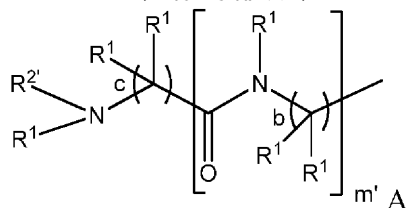
式中、

Bが、 $C(R^1)_2$ 、O、S、または NR^1 であり、

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリール

アルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 A の部分:



10

であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)であり、

20

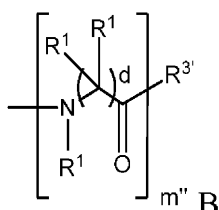
m' が 0 または任意の数であり、

各 b が独立して、1 または 2 であり、

c が 1 または 2 であり、

R^3 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 B の部分:

30



であり、

式中、

$R^{3'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)であり、

40

m'' が 0 または任意の数であり、

各 d が独立して、1 または 2 であり、

各 R^4 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、

50

ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

m 、 n' 、および n'' がそれぞれ独立して、0、1、2、3、または4であり、 m 、 n' 、および n'' の合計が2～6であり、

m''' が0または1であり、

a が1または2であり、

各 o が独立して、1または2であり、

p が1または2であり、

以下の条件

(i) m が1、2、3、または4であり、少なくとも1つの o が2である、

(ii) p が2である、

(iii) m''' が1であり、 a が2である、

(iv) R^2 がベータアミノ酸である、

(v) R^2 が式Aの部分であり、式中、 m' が少なくとも1であり、少なくとも1つの b が2である、

(vi) R^2 が式Aの部分であり、式中、 c が2である、

(vii) R^2 が式Aの部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である

、

(viii) R^3 がベータアミノ酸である、

(ix) R^3 が式Bの部分であり、式中、 m'' が少なくとも1であり、少なくとも1つの d が2である、および

(x) R^3 が式Bの部分であり、式中、 $R^{3'}$ がベータアミノ酸である、

のうちの少なくとも1つが満たされる。

【0019】

本発明のこの態様およびすべての態様によるアミノ酸側鎖は、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ガンマアミノ酸、Lアミノ酸、およびDアミノ酸を含む、天然または非天然アミノ酸由来の任意のアミノ酸側鎖であり得る。

【0020】

本明細書に使用される、「アルキル」という用語は、直鎖であっても分岐であってもよく、鎖中に約1～約6個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を意味する。分岐とは、メチル、エチル、またはプロピルなどの1つ以上の低級アルキル基が、直鎖アルキル鎖に結合していることを意味する。例示的なアルキル基には、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 n -ブチル、 t -ブチル、 n -ペンチル、および3-ペンチルが含まれる。

【0021】

「アルケニル」という用語は、炭素-炭素二重結合を含有し、直鎖であっても分岐であってもよく、鎖中に約2～約6個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を意味する。好ましいアルケニル基は、鎖中に2～約4個の炭素原子を有する。例示的なアルケニル基には、エテニル、プロペニル、 n -ブテニル、および i -ブテニルが含まれる。

【0022】

「アルキニル」という用語は、炭素-炭素三重結合を含有し、直鎖であっても分岐であってもよく、鎖中に約2～約6個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基を意味する。好ましいアルキニル基は、鎖中に2～約4個の炭素原子を有する。例示的なアルキニル基には、エチニル、プロピニル、 n -ブチニル、2-ブチニル、3-メチルブチニル、および n -ペンチニルが含まれる。

【0023】

本明細書に使用される、「シクロアルキル」という用語は、3～6個の炭素原子を含有し得、かつ少なくとも1つの二重結合を含み得る非芳香族飽和または不飽和の単環式または多環式環系を指す。例示的なシクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、抗ビシクロプロパン、または合成ビスシクロプロパンが挙げら

10

20

30

40

50

れるが、これらに限定されない。

【0024】

本明細書に使用される、「ヘテロシクリル」という用語は、炭素原子と、窒素、酸素、および硫黄からなる群から選択される1～5個のヘテロ原子とからなる安定した3～18員の環系を指す。ヘテロシクリルは、単環式であっても多環式環系であってもよく、縮合、架橋、またはスピロ環系を含み得、ヘテロシクリル中の窒素、炭素、または硫黄原子は、任意に酸化され得、窒素原子は、任意に四級化され得、環は、部分的または完全に飽和され得る。代表的な単環式ヘテロシクリルには、ピペリジン、ピペラジン、ピリミジン、モルホリン、チオモルホリン、ピロリジン、テトラヒドロフラン、ピラン、テトラヒドロピラン、オキセタンなどが含まれる。代表的な多環式ヘテロシクリルには、インドール、

10

【0025】

本明細書に使用される、「アリール」という用語は、6～19個の炭素原子を含有する芳香族単環式または多環式環系を指し、この環系は、任意に置換され得る。本発明のアリール基としては、フェニル、ナフチル、アズレニル、フェナントレニル、アントラセニル、フルオレニル、ピレニル、トリフェニレニル、クリセニル、およびナフタセニルなどの基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0026】

本明細書に使用される、「ヘテロアリール」とは、炭素原子と、窒素、酸素、および硫黄からなる群から選択される1～5個のヘテロ原子とからなる芳香族環系を指す。ヘテロアリール基の例としては、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、トリアゾリル、フリル、チオフェニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、トリアジニル、チエノピロリル、フロピロリル、インドリル、アザインドリル、イソインドリル、インドリニル、インドリジニル、インダゾリル、ベンゾイミダゾリル、イミダゾピリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾキサゾリル、ベンゾキサジアゾリル、ベンゾチアゾリル、ピラゾロピリジニル、トリアゾロピリジニル、チエノピリジニル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチオフェニル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、シンノリニル、キナゾリニル、キノリジリニル、フタラジニル、ベンゾトリアジニル、クロメニル、ナフチリジニル、アクリジニル、フェナンジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、プテリジニル、およびプリニルが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0027】

「アリールアルキル」という用語は、式 - R^a R^b (式中、R^a が上記に定義されるアルキルまたはシクロアルキルであり、R^b が上記に定義されるアリールまたはヘテロアリールである) の部分を指す。

【0028】

本明細書に使用される、「アシル」という用語は、式 R - カルボニル (式中、R が上記に定義されるアルキル、シクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールである) の部分を意味する。例示的なアシル基には、ホルミル、アセチル、プロパニル、ベンゾイル、およびプロペノイルが含まれる。

40

【0029】

本発明のこの態様およびすべての態様によるアミノ酸は、任意の天然または非天然アミノ酸であり得る。

【0030】

本明細書に使用される、「ペプチド」は、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ガンマアミノ酸、Lアミノ酸、Dアミノ酸、およびこれらの組み合わせを含む2つ以上の天然または非天然アミノ酸の任意のオリゴマーである。好ましい実施形態において、ペプチドは、約5～約30 (例えば、約5～約10、約5～約17、約10～約17、約10～約3

50

0、または約18～約30)アミノ酸長である。典型的には、ペプチドは、10～17アミノ酸長である。好ましい実施形態において、ペプチドは、パターン 3 / 1 (これは、具体的には、ヘリックス模倣体と称される)においてアルファおよびベータアミノ酸の混合物を含有する。

【0031】

本明細書に使用される、「タグ」には、本発明の化合物の検出、定量化、分離、および/または生成を促進する任意の標識部分が含まれる。好適なタグには、精製タグ、放射性または蛍光標識、および酵素タグが含まれる。

【0032】

ポリヒスチジン(His₆)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、またはマルトース結合タンパク質(MBP)などの精製タグは、化合物の精製または分離に役立ち得るが、後に除去される、即ち、回収後、化合物から切断することができる。プロテアーゼに特異的な切断部位を使用して、精製タグの除去を促進することができる。所望の生成物をさらに精製して、切断された精製タグを除去することができる。

10

【0033】

他の好適なタグには、¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In、または⁹⁹Tcなどの放射性標識が含まれる。化合物の放射性標識の方法は、当技術分野において公知であり、Srinivasanらの米国特許第5,830,431号に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。シンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィを用いて、放射能が検出され、定量化される。代替として、化合物は、蛍光タグに複合され得る。好適な蛍光タグとしては、キレート(ユウロピウムキレート)、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、およびテキサスレッドが挙げられるが、これらに限定されない。蛍光標識は、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan et al., eds., 1991、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示される技術を用いて化合物に複合させ得る。蛍光光度計を用いて、蛍光発光が検出され、定量化され得る。

20

【0034】

酵素タグは、概して、様々な技術を用いて測定され得る発色性基質の化学的变化を触媒する。例えば、酵素は、分光光度法で測定され得る基質の色変化を触媒し得る。代替として、酵素は、基質の蛍光発光または化学発光を変化させ得る。好適な酵素タグの例には、ルシフェラーゼ(例えば、蛍光ルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ、例えば、Wengらの米国特許第4,737,456号を参照のこと、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素)、複素環オキシダーゼ(例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。酵素をタンパク質およびペプチドに複合させるための技術は、O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay, in METHODS IN ENZYMOLOGY 147-66 (Langone et al., eds., 1981)に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0035】

本発明による標的部分は、(i)化合物の細胞取り込みを促進するための機能、(ii)化合物が特定の細胞または組織型(例えば、シグナル伝達ペプチド配列)を標的とするための機能、または(iii)化合物が細胞取り込み後の特異的な細胞内局在(例えば、

50

輸送ペプチド配列) するのを標的とするための機能を果たす。

【0036】

本発明の化合物の細胞取り込みを促進するために、標的部分は、細胞透過性ペプチド(CPP)であり得る。CPPは、見かけ上エネルギー非依存性経路によって真核細胞の細胞膜を通過して移動し、それら自体よりも数倍大きい分子量を有する抗体、ペプチド、タンパク質、および核酸を含む巨大分子の細胞内送達のために首尾よく使用されている。ポリアルギニン、トランスポータント、プロタミン、マウロカルシン、およびM918を含むいくつかの一般に使用されるCPPは、本発明で用いる好適な標的部分であり、当技術分野において公知である(Stewart et al., "Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vehicles for Biology and Medicine," Organic Biomolecular Chem., 6: 2242-2255 (2008)を参照のこと、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。さらに、CPPの作製方法は、Hallbrinkらの米国特許出願公開第20080234183号に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0037】

化合物の細胞取り込みを増強するために有用な別の好適な標的部分は、Linらの米国特許第6,043,339号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)によって開示されるように、「移入適格(importation competent)」シグナルペプチドである。移入適格シグナルペプチドは、概して、化合物を、細胞の外側から細胞の内部へ細胞膜を通過して透過可能な状態にする、約10~約50アミノ酸残基(典型的には、疎水性残基)長である。例示的な移入適格シグナルペプチドには、カボジ線維芽細胞増殖因子由来のシグナルペプチドが含まれる(Linらの米国特許第6,043,339号を参照のこと、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。他の好適なペプチド配列は、SIGPEPデータベースから選択され得る(von Heijne G., "SIGPEP: A Sequence Database for Secretory Signal Peptides," Protein Seq. Data Anal., 1(1): 41-42 (1987)を参照のこと、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

20

【0038】

別の好適な標的部分は、本発明の化合物が特定の組織または細胞型を標的にすることができるシグナルペプチド配列である。シグナル伝達ペプチドは、リガンド結合タンパク質の少なくとも一部分を含むことができる。好適なリガンド結合タンパク質には、高親和性抗体フラグメント(例えば、Fab、Fab'、およびF(ab')₂、一本鎖Fv抗体フラグメント)、ナノボディもしくはナノボディフラグメント、フルオロボディ、またはアプタマーが含まれる。他のリガンド結合タンパク質には、ビオチン結合タンパク質、脂質結合タンパク質、ペリプラズム結合タンパク質、レクチン、血清アルブミン、酵素、リン酸塩および硫酸塩結合タンパク質、イムノフィリン、メタロチオネイン、または様々な他の受容体タンパク質が含まれる。細胞特異的標的化について、シグナル伝達ペプチドは、好ましくは、細胞特異的な膜受容体のリガンド結合ドメインである。したがって、修飾化合物が静脈内に送達されるか、または血液もしくはリンパ液に導入される場合、この化合物は標的化細胞に吸着し、標的化細胞が化合物を内在化させると考えられる。例えば、標的細胞が癌細胞である場合、化合物は、Taylorらの米国特許第6,572,856号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)によって開示されるように、抗C3B(I)抗体に複合され得る。代替として、化合物は、Morroの米国特許第6,514,685号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)によって開示されるアルファフェトタンパク質受容体、またはHosokawaの米国特許第5,837,845号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)によって開示されるモノクローナルGAH抗体に複合され得る。化合物が心臓細胞を標的とするためには、化合物は、エラスチンミクロフィブリルインターフェイス(EMILIN2)(Van Hoof et

30

40

50

al., "Identification of Cell Surface for Antibody - Based Selection of Human Embryonic Stem Cell - Derived Cardiomyocytes," J Proteom Res 9:1610-18 (2010)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、心臓トロポニンI、コネキシン-43、または当技術分野において知られている任意の心臓細胞表面膜受容体を認識する抗体と複合化され得る。化合物が肝細胞を標的とするためには、シグナル伝達ペプチドには、肝細胞特異的なアシアロ糖タンパク受容体に特異的なリガンドドメインが含まれ得る。このようなキメラタンパク質およびペプチドの調製方法は、Heartleinらの米国特許第5,817,789号に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0039】

別の好適な標的部分は、標的細胞または組織によって内在化される場合に化合物の細胞内区画化を誘導する輸送ペプチドである。小胞体(ER)への輸送のために、例えば、化合物は、ER輸送ペプチド配列に複合され得る。シグナルペプチド

MMSFVSLLLVGILFYATEAEQLTKCEVFQ (SEQ ID NO: 1)

を含む、多くのこのようなシグナルペプチドが当技術分野において知られている。他の好適なERシグナルペプチドには、酵素17-ヒドロキシステロイド脱水素酵素11型のN末端の、小胞体を標的とする配列(Horiguchi et al., "Identification and Characterization of the ER/Lipid Droplet-Targeting Sequence in 17-hydroxysteroid Dehydrogenase Type 11," Arch. Biochem. Biophys. 479(2):121-30 (2008)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、またはReedらの米国特許出願公開第20080250515号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示されるERシグナル伝達ペプチド(ERシグナルペプチドをコードする核酸配列を含む)のいずれかが含まれる。さらに、本発明の化合物は、保持シグナルKEDL(配列番号2)などのER保持シグナルを含有し得る。ERへの化合物の局在化のために輸送ペプチドを組み込むための本発明の化合物の修飾方法は、Reedらの米国特許出願公開第20080250515号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように実施され得る。

20

30

【0040】

核への輸送のために、本発明の化合物は、核局在化輸送シグナルを含むことができる。核輸送ペプチドPPKKKRKV(配列番号3)を含む好適な核輸送ペプチド配列が、当技術分野において知られている。他の核局在化輸送シグナルには、例えば、Linらの米国特許第6,043,339号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)によって開示される、酸性線維芽細胞成長因子の核局在化配列および転写因子NF- κ B p50の核局在化配列が含まれる。当技術分野において知られている他の核局在化ペプチド配列はまた、本発明の化合物で用いるのに適している。

【0041】

ミトコンドリアを標的とするための好適な輸送ペプチド配列には、

MLSLRQSIRFFKPATRTLCSRYLL (SEQ ID NO: 4)

が含まれる。本発明の化合物がミトコンドリアを選択的に標的とするために好適な他の好適な輸送ペプチド配列は、Wipfの米国特許出願公開第20070161544号に開示され、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0042】

当業者には明らかであるように、 R^2 および/または R^3 が、列挙される式の部分である場合、式Iの化合物の全体の大きさは、 m' および/または m'' の値(独立して、0または任意の数である)を変化させることによって調節することができる。典型的には、 m' および m'' は独立して、0~約30(例えば、0~約18、0~約10、0~約5、約5~約30、約5~約18、約5~約10、約8~約30、約8~約18、約8~約10

50

、約 10 ~ 約 18、または約 10 ~ 約 30) である。一実施形態において、 m' および m'' は独立して、4 ~ 10 である。別の実施形態において、 m' および m'' は独立して、5 ~ 6 である。

【0043】

当業者には明らかであるように、式 I の化合物には、様々なヘリックス立体配座が含まれ、ヘリックス大環状環の主鎖内の原子数によって異なる (m 、 n' 、 n'' 、 o 、および p の値を調節することによって制御され得る)。3₁₀ヘリックスを模倣するヘリックス立体配座については、式 I の化合物は、大環状環の主鎖内に合計 9 ~ 12 個の原子 (好ましくは、11 個の原子) を有する。ヘリックスを模倣するヘリックス立体配座については、式 I の化合物は、大環状環の主鎖内に合計 12 ~ 15 個の原子 (好ましくは、14 個の原子) を有する。ヘリックスを模倣するヘリックス立体配座については、式 I の化合物は、大環状環の主鎖内に合計 15 ~ 18 個の原子 (好ましくは、17 個の原子) を有する。グラミシジンヘリックスを模倣するヘリックス立体配座については、式 I の化合物は、大環状環の主鎖内に合計 20 ~ 24 個の原子 (好ましくは、22 個の原子) を有する。

【0044】

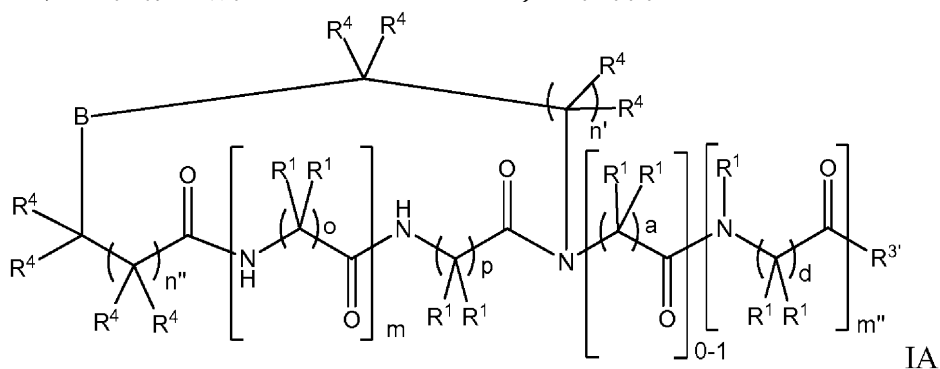
少なくとも 1 つの実施形態において、 m は 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o は 2 である。少なくとも 1 つの実施形態において、 p は 2 である。少なくとも 1 つの実施形態において、 m'' は 1 であり、 a は 2 である。少なくとも 1 つの実施形態において、 R^2 は、ベータアミノ酸、式 A (式中、 m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である) の部分、式 A (式中、 c が 2 である) の部分、または式 A ($R^{2'}$ がベータアミノ酸である) の部分である。少なくとも 1 つの実施形態において、 R^3 は、ベータアミノ酸、式 B (式中、 m'' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの d が 2 である) の部分、または式 B (式中、 $R^{3'}$ がベータアミノ酸である) の部分である。これらの実施形態の組み合わせもまた、企図される。

【0045】

R^2 が式 A の部分である場合、 m' は、好ましくは、1 ~ 19 のうちの任意の数である。 R^3 が式 B の部分である場合、 m'' は、好ましくは、1 ~ 9 のうちの任意の数である。

【0046】

好ましい実施形態において、式 I の化合物は、式 I A (即ち、N 末端で環化されたヘリックス)、式 I B (即ち、中間のペプチドで環化されたヘリックス)、または式 I C (即ち、C 末端で環化されたヘリックス) の化合物：

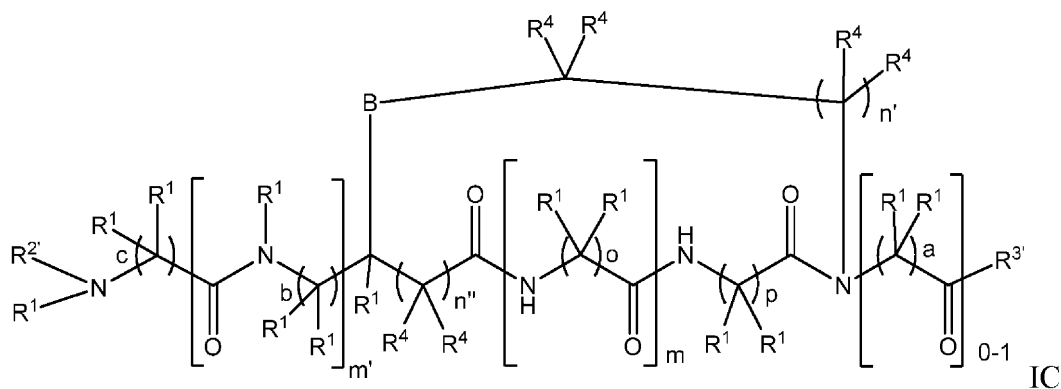
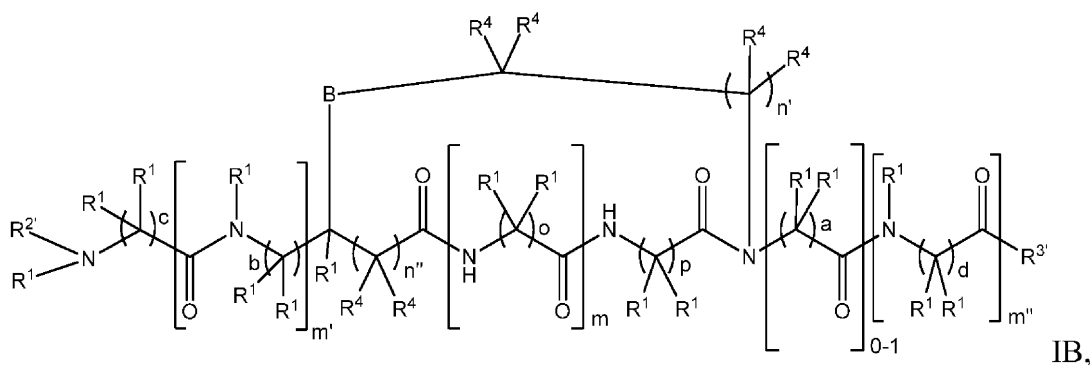


10

20

30

40



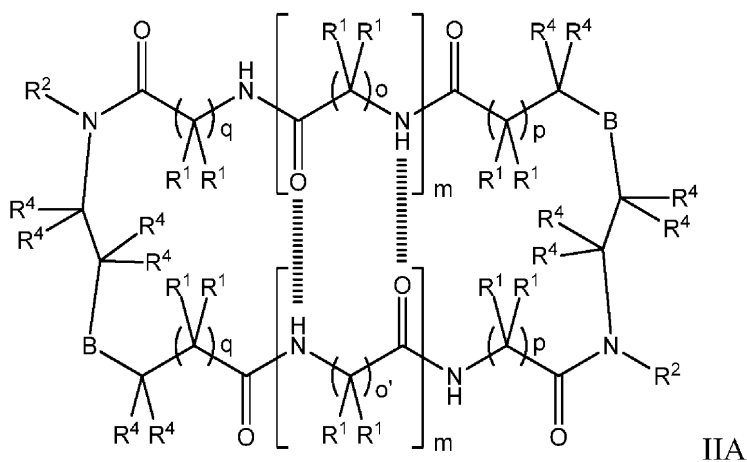
である。

【 0 0 4 7 】

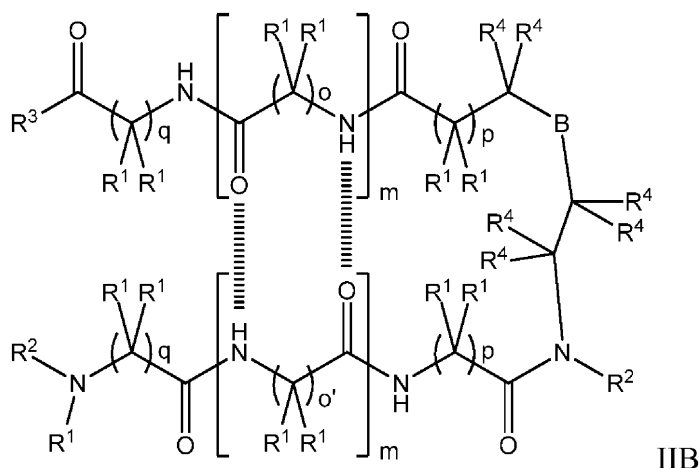
当業者には明らかであるように、式 I のペプチド模倣体における 置換のパターンは、 m および o 、 m' および a 、 n' 、 n'' 、および p 、ならびに m' 、 b 、および c (R^2 が式 A の部分である場合)、ならびに m'' および d (R^3 が式 B の部分である場合) の値を調節することによって制御され得る。式 I A、I B、および I C のペプチド模倣体の置換は、当業者には明らかであるようにさらに制御され得る。好ましい実施形態において、ペプチド模倣体が ヘリックス二次構造を含有する場合、ペプチド模倣体は、式 3 / 1 からなる。

【 0 0 4 8 】

本発明の別の態様は、式 I I A (即ち、 シートの大環状環) :



または式 I I B (即ち、 ヘアピン) :



10

の化合物に関し、

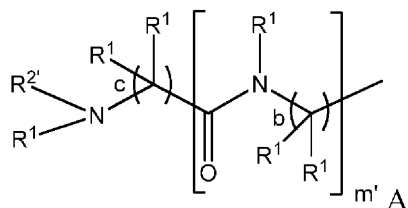
式中、

各 B が独立して、 $C(R^1)_2$ 、O、S、または NR^1 であり、

各 R^1 が独立して、水素、アミノ酸側鎖、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

各 R^2 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または式 A の部分：

20



30

であり、

式中、

$R^{2'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、または $-(CH_2)_{0-1}N(R^5)_2$ (式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである) であり、

40

m' が 0 または任意の数であり、

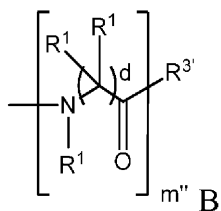
各 b が独立して、1 または 2 であり、

c が 1 または 2 であり、

R^3 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ (式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである)、 $-N(R^5)_2$ (式中

50

、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または式 B の部分：



であり、

10

式中、

$R^{3'}$ が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アルファアミノ酸、ベータアミノ酸、ペプチド、標的部分、タグ、 $-OR^5$ （式中、 R^5 が、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）、または $-N(R^5)_2$ （式中、各 R^5 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アシル、ペプチド、標的部分、もしくはタグである）であり、

m'' が 0 または任意の数であり、

20

各 d が独立して、1 または 2 であり、

各 R^4 が独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはアリールアルキルであり、

m が 1、2、3、または 4 であり、

各 o および各 o' が独立して、1 または 2 であるが、但し、それぞれの対応する o および o' が同じであるものとし、

p が 1 または 2 であり、

q が 1 または 2 であり、

以下の条件

(i) m が 1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o が 2 であり、
少なくとも 1 つの o' が 2 である、

30

(ii) p が 2 である、

(iii) q が 2 である、

(iv) 少なくとも 1 つの R^2 がベータアミノ酸である、

(v) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 m' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの b が 2 である、

(vi) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 c が 2 である、

(vii) 少なくとも 1 つの R^2 が式 A の部分であり、式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である、

(viii) R^3 がベータアミノ酸である、

40

(ix) R^3 が式 B の部分であり、式中、 m'' が少なくとも 1 であり、少なくとも 1 つの d が 2 である、および

(x) R^3 が式 B の部分であり、式中、 $R^{3'}$ がベータアミノ酸である、

のうちの少なくとも 1 つが満たされる。

【0049】

本発明のこの態様のうちの少なくとも 1 つの実施形態において、 m は、1、2、3、または 4 であり、少なくとも 1 つの o は 2 であり、少なくとも 1 つの o' は 2 である。本発明のこの態様のうちの少なくとも 1 つの実施形態において、 p は 2 である。本発明のこの態様のうちの少なくとも 1 つの実施形態において、 q は 2 である。

【0050】

50

少なくとも1つの実施形態において、本化合物は、式 I I A の化合物であり、 R^2 は、ベータアミノ酸、式 A (式中、 m' が少なくとも1であり、少なくとも1つの b が2である)の部分、式 A (式中、 c が2である)の部分、または式 A (式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である)の部分である。

【0051】

本化合物が式 I I B の化合物である少なくとも1つの実施形態において、 R^2 は、ベータアミノ酸、式 A (式中、 m' が少なくとも1であり、少なくとも1つの b が2である)の部分、式 A (式中、 c が2である)の部分、または式 A (式中、 $R^{2'}$ がベータアミノ酸である)の部分である。本化合物が式 I I B の化合物である少なくとも1つの実施形態において、 R^3 は、ベータアミノ酸、式 B (式中、 m'' が少なくとも1であり、少なくとも1つの d が2である)の部分、または式 B (式中、 $R^{3'}$ がベータアミノ酸である)の部分である。これらの実施形態の組み合わせもまた、企図される。

10

【0052】

当業者には明らかであるように、式 I I A および I I B のペプチド模倣体における置換のパターンは、 m および o 、 p 、および q 、ならびに m' 、 b 、および c (R^2 が式 A の部分である場合)ならびに m'' および d (R^3 が式 B の部分である場合)の値を調節することによって制御され得る。

【0053】

本発明のすべての態様による化合物は、Arora & Chapman の米国特許第 7,202,332 号 (B が炭素である場合)および Arora & Mahon の米国特許仮出願第 61-529,414 号 (B が S、O、または N である場合)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示される方法を用いるが、必要に応じて、アルファアミノ酸の代わりにベータアミノ酸を用いて調製され得る。

20

【0054】

本発明のなお別の態様は、細胞死を促進するための方法に関する。本方法は、細胞を、p53/hDM2 を阻害する式 I の1つ以上の化合物と、1つ以上の化合物が細胞死を促進するのに有効な条件下で接触させることを含む。

【0055】

好適な p53/hDM2 阻害剤には、以下に記載される、ペプチド1が含まれる。

【0056】

p53/hDM2 の相互作用は、アポトーシスを停止させ、制御されていない増殖 (癌の特徴)をもたらすことが知られている。ペプチド1は、hDM2 に結合する p53 タンパク質の一部を模倣し、hDM2 に結合する p53 タンパク質の一部を模倣するペプチドが、p53/hDM2 の相互作用を遮断し、癌細胞内のアポトーシス活性を誘発することが予想される (Chene, P, "Inhibiting the p53-MDM2 Interaction: An Important Target For Cancer Therapy," Nat. Rev. Cancer 3:102-109 (2003)、Chene et al., "Study of the Cytotoxic Effect of a Peptidic Inhibitor of the p53-HDN2 Interaction in Tumor Cells," F EBS Lett. 529:293-297 (2002)、Garcia-Echeverria et al., "Discovery of Potent Antagonists of the Interaction between Human Double Minute 2 and Tumor Suppressor p53," J. Medicinal Chemistry 43:3205-3208 (2000)、Kritzer et al., "Helical - Peptide Inhibitors of the p53-hDM2 Interaction," J. Am. Chem. Soc. 126:9468-9469 (2004)、Kussie et al., "Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transact

30

40

50

ivation Domain, "Science 274:948-953 (1996)、Vassilev et al. "In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-molecule Antagonists of MDM2, "Science 303:844-848 (2004)、Yin et al., "Terphenyl-based Helical Mimetics That Disrupt the p53/HDM2 Interaction, "Angew Chem. Int. Ed. 44:2704-2707 (2005)、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

【0057】

細胞を、本発明のこの態様による1つ以上の化合物と接触させることは、インビトロまたはインビボで実行され得る。

【0058】

接触がインビボで実行される場合、接触は、対象に、1つ以上の本発明の化合物を含む化合物を投与することを含み得る。本発明の化合物は、経口、非経口、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内滴注によって、または鼻、喉、および気管支の粘膜などの粘膜への適用によって投与され得る。それらは、単独でまたは好適な薬学的担体と共に投与され得、例えば、錠剤、カプセル剤、粉末、溶剤、懸濁剤、または乳剤などの固体または液体の形態であり得る。

【0059】

本発明の活性化合物を、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な可食担体と共に経口投与してもよく、あるいはそれらをハードまたはソフトシェルカプセルに封入してもよく、あるいはそれらを錠剤に圧縮してもよく、あるいは直接食物と混合してもよい。経口治療のための投与に関しては、これらの活性化合物が賦形剤と共に組み込まれ、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤などの形態で使用され得る。このような組成物および調製物は、少なくとも0.1%の活性化合物を含有すべきである。これらの組成物中の化合物の割合は、もちろん変えることができ、好都合にはその単位の重量の約2%~約60%の間であることができる。このような治療的に有用な組成物中の活性化合物の量は、好適な用量が得られるような量である。本発明による好ましい組成物は、経口用量単位が活性化合物の約1~250mgを含有するように調製される。

【0060】

錠剤、カプセル剤などはまた、トラガントゴム、アラビアゴム、コーンスターチ、またはゼラチンなどの結合剤、リン酸二カルシウムなどの賦形剤、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、スクロース、ラクトース、またはサッカリンなどの甘味剤を含有してもよい。用量単位の形態がカプセル剤である場合、上記種類の材料に加えて、脂肪油などの液体担体を含有してもよい。

【0061】

様々な他の材料は、コーティングとして、または用量単位の物理的形態を改変するため、存在し得る。例えば、錠剤を、セラック、糖、またはその両方でコーティングしてもよい。シロップ剤は、活性成分に加えて、甘味剤としてスクロース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、染料、サクラソミまたはオレンジ風味などの香味剤を含有してもよい。

【0062】

これらの活性化合物はまた、非経口投与してもよい。これらの活性化合物の溶剤または懸濁剤は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合した水中で調製することができる。分散液もまた、油中のグリセロール、液体ポリエチレングリコール、またはそれらの混合物中に調製することができる。例示的な油は、石油、動物、植物、または合成の起源のもの、例えば、落花生油、大豆油、または鉱油である。一般に、水、生理的食塩水、水性デキストロース、および関連した糖溶液、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールは、特に、注射剤にとって好ましい液体担体で

10

20

30

40

50

ある。貯蔵および使用の通常の条件下において、これらの調製物は、微生物の成長を防ぐために保存剤を含有する。

【0063】

注射可能な使用に適した薬学的形態には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射液または分散液を即時調製用の滅菌粉末が含まれる。いかなる場合でも、その形態は滅菌でなければならず、容易な注射可能性 (syringability) が存在する程度まで流体でなければならない。また、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対抗するように保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール)、これらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。

10

【0064】

本発明の化合物はまた、エアロゾルの形態で気道へ直接投与することもできる。エアロゾルとして使用する場合、溶液または懸濁液の状態の本発明の化合物を、好適な噴霧剤、例えば、プロパン、ブタン、またはイソブタンのような炭化水素噴霧剤と一緒に、通常のアジバントと共に加圧エアロゾル容器に詰めることができる。本発明の材料はまた、例えばネブライザーまたはアトマイザーなどの非加圧形態で投与することもできる。

【0065】

対象を治療するために本方法を使用する場合、投与の上述のモードおよび形態を使用して、細胞を1つ以上の式Iの化合物と接触させる。

20

【0066】

本発明は、以下の実施例を参照することによりさらに例示され得る。

【実施例】

【0067】

実施例1 - 一般的記述

示される場合を除いて、商用グレードの試薬および溶媒をさらに精製せずに用いた。メタセシス反応で使用する前に、ジクロロエタンを蒸留した。すべての反応物を、磁気的または機械的に振とうして攪拌し、感湿反応を、窒素またはアルゴン雰囲気下で実行した。逆相HPLC実験は、System Gold 168ダイオードアレイ検出器を装備したBeckman Coulter HPLCを用いて、C₁₈逆相カラム上で、溶離剤として0.1% トリフルオロ酢酸溶液およびアセトニトリル緩衝剤中0.1% トリフルオロ酢酸を用いて実行した。Agilent 1100シリーズLC/MSD (XCT) エレクトロスプレートラップにおいてESI/MSデータが得られた。制御された電力、温度、および時間設定で、CEM Discover単一モード反応器においてマイクロ波反応が行われた。HBSペプチドのプロトンNMRスペクトルがBruker AVANCE 900 MHzの分光計により記録された。

30

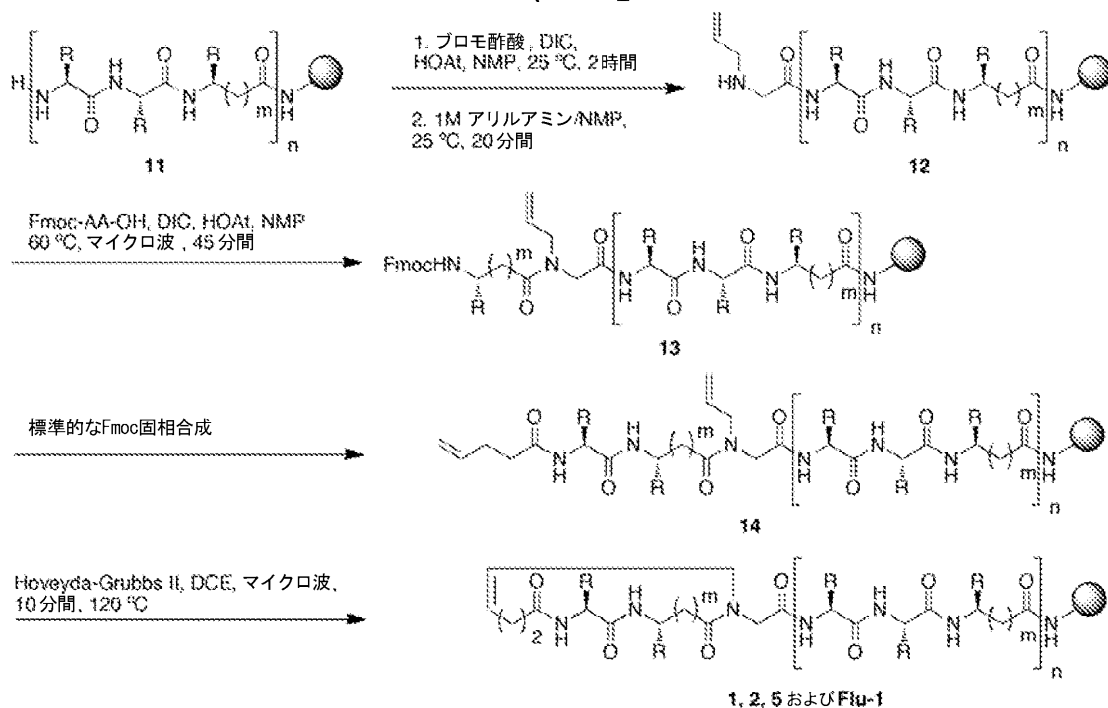
【0068】

実施例2 - 大環状環における アミノ酸 (複数可) によるHBSヘリックスの合成

HBSペプチド1、2、5、およびFlu-1を、スキーム1に示され、Arora & Chapmanの米国特許第7,202,332号、Chapman & Arora, Org. Lett. 8:5825-28 (2006)、Dimartino et al., Org. Lett. 7:2389-92 (2005)、Patgiri et al., Nat. Protoc. 5:1857-65 (2010)、およびPatgiri et al., Org. Biomol. Chem. 8:1773-76 (2010) (これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるように合成した。

40

スキーム 1



α アミノ酸残基の場合 $m=0$ 、 β^3 アミノ酸残基の場合 $m=1$

【0069】

簡潔に述べると、推定ヘリックスの $i + 5$ 番目までの残基のペプチド配列（スキーム 1 ではペプチド 11）を、CEM Liberty Series マイクロ波ペプチド合成装置において、Rink アミド樹脂上で Fmoc 固相化学を用いて合成した。

【0070】

$i + 4$ 番目の残基（スキーム 1 ではペプチド 12）の N - アリル化は、ブロモ酢酸のカップリング、続いて、アリルアミン置換反応による 2 つの工程で達成された。樹脂に結合したペプチド 11 を、DMF 中ブロモ酢酸（20 当量）、DIC（20 当量）、および HOAt（10 当量）の溶液で処理し、この混合物を室温で 2 時間振とうした。樹脂を、DMF（3 回）、DCM（3 回）、および DMF（3 回）で順次洗浄し、DMF 中の 1 M アリルアミン（20 当量）中に懸濁させ、20 分間振とうした。

【0071】

次の 2 つの Fmoc アミノ酸残基のカップリング、続いて、4 - ペンテン酸の添加によりビスオレフィンペプチドを得た（Patgiri et al., Nat. Protoc. 5: 1857 (2010)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。樹脂を含有するペプチド 12 を、DMF（3 回）、メタノール（3 回）、および DCM（3 回）で洗浄し、60 °C で 45 分間のマイクロ波照射下、DMF 中の所望の Fmoc アミノ酸（20 当量）、DIC（20 当量）、および HOAt（10 当量）で処理した。次いで、樹脂を含有するペプチド 13 を、DMF（3 回）、DCM（3 回）、および DMF（3 回）で洗浄し、NMP 中の HBTU（4.95 当量）および DIEA（10 当量）を用いて所望の Fmoc アミノ酸残基（5 当量）および 4 - ペンテン酸（5 当量）と結合した。

【0072】

ビスオレフィンペプチド 14 の閉環メタセシスを、120 °C で 10 分間のマイクロ波照射下、ジクロロエタン中の Hoveyda - Grubbs II 触媒（20 モル%）で行った（Arora & Chapman の米国特許第 7,202,332 号、Chapman & Arora, Org. Lett. 8: 5825 - 28 (2006)、Patgiri et al., Nat. Protoc. 5: 1857 - 65 (2010)、Patgiri et al., Org. Biomol. Chem. 8: 1773 - 76 (2010)）。

010)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。メタセシス化ペプチドを、TFA: TIS: 水(95: 2.5: 2.5)を用いて、樹脂から切断した。

【0073】

直鎖状ペプチドを、Coin et al., Nat. Protocols 2: 3247-56 (2007) および Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (W. C. Chan & P. D. White eds., 2000) (これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように調製した。

【0074】

すべてのペプチドは、逆相HPLC(C₁₈カラム)(図3)によって精製され、ESI-MSによって特徴付けられた(表1)。

【0075】

(表1) HBSヘリックスおよび非拘束ペプチドの質量分光の特徴付け

ペプチド	配列 ^a	計算値 [M+H] ⁺	観察値 [M+H] ⁺
1	XQeG*FSdLWKILS-NH ₂	1557.8	1558.7
2	XQEG*FSDLWKLLS-NH ₂	1514.7	1515.0
3	Ac-QeGFSdLWKILS-NH ₂	1505.7	1505.2
4	Ac-Q(ACPC)GFS(ACPC)LWK(ACPC)LS-NH ₂	1438.8	1439.9
5	XQeG*ASdLWKILS-NH ₂	1438.8	1439.0
6	Ac-QEGFSDLWKLLS-NH ₂	1462.8	1463.0
Flu-1	XQeG*FSdLWKILSC ^{Flu} -NH ₂	2048.2	2048.8
Flu-3	Ac-QeGFSdLWKILSC ^{Flu} -NH ₂	1996.2	1996.7
Flu-p53	Ac-EAFSDLWKLLPENNVSC ^{Flu} -NH ₂	2305.0	1153.0*

^a 小文字太字は³残基を示し、Xはペンテン酸であり、G*はN-アシルグリシンであり、ACPCは環状残基(1S, 2S)-2-アミノシクロペンタンカルボン酸であり、Fluは5-アセトアミドフルオレセインである。*(M+2)²⁺

【0076】

実施例3 - 5-カルボキシフルオレセイン標識ペプチドの合成

C末端Cys残基を含有するHBSヘリックスおよび非拘束ペプチドを、上記の実施例2に記載されるように合成した。切断および精製後、ペプチドを、10mM PBS(pH7.4)中の5-ヨードアセトアミドフルオレセイン(5-IAF、5当量)で、室温で2時間処理した。フルオレセイン複合体を逆相HPLC(C₁₈カラム)によって精製した(図4)。ペプチドの同一性および純度を、ESI-MSによって確認した(表1、上記参照)。

【0077】

実施例4 - 円二色性分光法

CDスペクトルを、1mm長のセルを使用する温度調節器を装備したAVIV 202 SF CD分光計、および0.5nm/分の走査速度により記録した。スペクトルを、試料についての条件と類似した条件から差し引かれた基線を用いて10回の走査を平均化した。試料は、100μMの最終ペプチド濃度で、10%トリフルオロエタノールを含有する0.1Xリン酸緩衝生理食塩水(13.7mM NaCl、1mM リン酸塩、0.27mM KCl、pH7.4)中で調製した。ペプチド濃度は、280nmにおけるトリプトファン残基の紫外線吸収により決定した。それぞれのペプチドのヘリックス含量は、アミノ酸の数について補正された222nmにおける平均残基CD、[θ]₂₂₂(deg cm² dmol⁻¹)から決定した。らせん度の割合(%)は、比[θ]₂₂₂/[θ]_{max}(式中、[θ]_{max}=(−44000+250T)(1−k/n)であり、k=4.0であり、n=残基の数)から計算した(Wang et al., J. Am. Chem. Soc. 128: 9248-56 (2006)、これは参照により

10

20

30

40

50

その全体が本明細書に組み込まれる)。図5は、ペプチド1、ペプチド2、および直鎖状3 / ペプチド3および4のCDスペクトルを示す。ペプチド5およびペプチド6のCDスペクトルを、図6中に示す。

【0078】

実施例5 - アミドプロトン化学シフトの温度依存性

すべての実験は、冷凍器および3D勾配制御を装備したBruker AVANCE 900 MHzの分光計により実行された。試料を、450 μ LのPBS緩衝液(137 mM NaCl、10 mM リン酸塩、2.7 mM KCl、pH 7.4)および120 μ LのTFE-d₃中に2 mgのペプチドを溶解することによって調製した。1Dプロトンスペクトルまたは2D TOCSYスペクトル(重複が重度であった場合)を使用して、アミドプロトンの化学シフトを識別した。3919 Watergateパルスシーケンスを用いて溶媒を非標示とした。それぞれの温度で、この試料を15分間平衡化した。

【0079】

実施例6 - 2D NMR分光法

ペプチド1(上記のように調製された試料)のスペクトルを、20 でBruker AVANCE 900により記録した。すべての2Dスペクトルを、States-TPPIモードでt₁ドメイン内の64の走査および128の増分を平均化することによってt₂ドメイン内の4092の複合データ点を収集することによって記録した。すべてのTOCSY実験は、80 msの混合時間で行い、200 msの混合時間でNOESYを行った。Bruker TOPSPINプログラムを用いて、データを処理し、分析した。元来の自由誘導減衰(FID)をゼロで埋め、2048の実在するデータ点によって2048の最終マトリックスを得た。90°のサイン二乗ウインドウ機能が、両方の次元に適用された。

【0080】

PBS中20% TFE-d₃中のペプチド1(293 K)に対する¹H NMR帰属および化学シフト(、ppm)を、表2中に示す。図7~11を参照のこと。

【0081】

(表2) ペプチド1に対する¹H NMR帰属および化学シフト

残基 ^a	NH	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ
Q1	8.983	5.012	3.118	2.881	該当なし	該当なし
e2	8.176	5.249	3.623	3.107 3.053	2.612	該当なし
G3	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
F4	8.316	3.774	2.472	該当なし	該当なし	該当なし
S5	9.102	5.130	3.817 3.742	該当なし	該当なし	該当なし
d6	8.983	4.958	4.667	2.687	該当なし	該当なし
L7	8.693	4.657	2.612	2.321	--	該当なし
W8	9.317	5.033	4.043 3.957	該当なし	該当なし	該当なし
K9	8.305	4.624	2.676	2.354	2.159	---
I10	8.499	4.969	3.398	2.924	2.321	1.235 1.934
L11	9.306	4.657	2.44	2.074	---	該当なし
S12	8.488	4.915	4.657 4.377	該当なし	該当なし	該当なし

^a 小文字太字は ³ 残基を示す。

【0082】

実施例7 - アミド水素の重水素との交換実験

上記の実験からのペプチド1の凍結乾燥試料を、600 μ LのD₂O / TFE-d₃混

合物 (8 0 / 2 0) 中に溶解して、H / D 交換を開始した。溶液の pH が確認された。スペクトルは、予めシムを調整した B r u k e r A V A N C E 9 0 0 M H z の分光計により記録した。記録された温度は、プローブの内側および外側の両方で 2 0 であつた。待ち時間は、約 2 分間であつた。それぞれのアミドプロトンに対する強度変化は、1 D スペクトルにおける H N ピーク、または重複が重なり度であつた場合、2 D T O C S Y スペクトルにおける H N と H R との間の交差ピークのいずれかをモニタリングすることによって決定された。ピーク高データを、単相指数方程式に当てはめて、G r a p h P a d P r i s m 4 . 0 プログラムを用いて交換速度定数を得た。

【 0 0 8 3 】

実施例 8 - H i s ₆ - M d m 2 の発現および精製

コンピテント B L 2 1 D E 3 p L y S S 大腸菌 (E . c o l i) 細胞は、H i s ₆ をタグ付けした M d m 2 (2 5 - 1 1 7) 融合タンパク質を含有する p E T - 1 4 B ベクターを含有する培地内で、この細菌を 4 2 で 1 分間熱ショックすることによって形質転換した。細胞を、アンピシリン含有寒天プレート (5 0 m g / m L) 上で増殖させ、単一の培養物を使用して、アンピシリン (5 0 m g / m L) を含有する L B 培地 1 0 0 m L に接種し一晩培養した。5 0 0 m L の T e r r i f i c B r o t h (4 L のフラスコ) に 5 0 m L の一晩培養物を播種し、培地の 6 0 0 n m での光学密度が 1 になるまで、3 0 でインキュベートした。0 . 4 m M I P T G (N o v a g e n) によるタンパク質発現の誘発が、3 0 でさらに 4 . 5 時間フラスコをインキュベートすることによって行われた。細胞を、6 0 0 0 g で 2 0 分間遠心分離によって収集し、上清を廃棄した。細胞を、1 0 m L の結合緩衝液 (5 0 m M N a H ₂ P O ₄ (p H 8) 、3 0 0 m M N a C l 、1 0 m M イミダゾール、2 m M - メルカプトエタノール、およびプロテアーゼ阻害剤 (R o c h e)) 中に再懸濁し、水中で超音波処理することによって溶解した (1 5 × 7 秒パルス) 。細胞を再度 1 5 , 0 0 0 g で 2 0 分間遠心分離処理し、所望の M d m 2 融合タンパク質を含有する得られた上清を、N i - N T A ビーズ (N o v a g e n) で、4 で 2 時間インキュベートした。ビーズを 1 0 m L の洗浄緩衝液 (5 0 m M N a H ₂ P O ₄ (p H 8) 、3 0 0 m M N a C l 、2 5 m M イミダゾール、2 m M - メルカプトエタノール) で 5 回洗浄し、タンパク質を溶出緩衝液 (5 0 m M N a H ₂ P O ₄ 、3 0 0 m M N a C l 、2 5 0 m M イミダゾール、2 m M - メルカプトエタノール、p H 8) で溶出した。得られたタンパク質を 5 m M E D T A および 0 . 5 m M D T T を含む 1 0 m M P B S (p H 7 . 5) 中で透析し、3 k D M W カットオフの A m i c o n 濃縮チューブ (M i l l i p o r e) で濃縮した。精製した M d m 2 は、S D S - P A G E 分析によって特徴付けられ、液体 N ₂ で瞬間凍結され、さらなる使用まで - 8 0 で保存された。

【 0 0 8 4 】

実施例 9 - H i s ₆ - M d m 2 の結合研究

N 末端に H i s ₆ をタグ付けした M d m 2 (2 5 - 1 1 7) に対するペプチドの相対的親和性を、フルオレセイン標識 p 5 3 ペプチド (F l u - p 5 3) による蛍光偏光に基づく競合的結合アッセイを使用して決定した。この偏光実験は、それぞれ、4 8 5 n m および 5 3 5 n m の励起波長および発光波長で、D T X 8 8 0 M u l t i m o d e D e t e c t o r (B e c k m a n) を用いて 2 5 で行われた。すべての試料は 9 6 ウェルプレートで、0 . 1 % プルロニック F - 6 8 (S i g m a) 中で調製した。それぞれのペプチドについて報告されている結合親和性 (K _D) 値は、3 ~ 5 個の個別の実験の平均値であり、実験データを、G r a p h P a d P r i s m 4 . 0 上のシグモイド用量反応非線形回帰モデルに当てはめることによって決定した。M d m 2 タンパク質の濃度は、B r a d f o r d A s s a y (B i o R a d) によって決定した。

【 0 0 8 5 】

競合的実験前に、M d m 2 (2 5 - 1 1 7) に対するペプチド F l u - p 5 3 の親和性を、M d m 2 (2 5 - 1 1 7) との結合の際の、蛍光プローブの偏光をモニタリングすることによって決定した。M d m 2 (2 5 - 1 1 7) 透析緩衝液 (1 0 m M P B S (p H

10

20

30

40

50

7.4)、5 mM EDTA、および0.5 mM DTT)および0.1% ブロニク酸中のFlu-p53の15 nM 溶液に対し、増加する濃度(0 nM ~ 50 μM)のMdm2(25-117)タンパク質を添加することにより、図12に示される飽和結合曲線を得た。この結合曲線から得られたIC₅₀値を、方程式(1)に当てはめて、p53/Mdm2複合体についての解離定数(K_{D1})を計算した(Roehrle et al., Biochemistry 43:16056-66(2004)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。ペプチドFlu-p53のK_{D1}は、137 ± 57 nMであると決定した。

$$K_{D1} = (R_T * (1 - F_{SB}) + L_{ST} * F_{SB}^2) / F_{SB} - L_{ST} \quad (1)$$

10

式中、

R_T = Mdm2タンパク質の総濃度

L_{ST} = p53蛍光ペプチドの総濃度

F_{SB} = 結合したp53蛍光ペプチドの画分

【0086】

競合的結合実験のために、300 nM Mdm2、およびMdm2透析緩衝液(1X PBS(pH 7.4)、5 mM EDTA、および0.5 mM DTT)および0.1% ブロニク酸中の15 nM Flu-p53の溶液を、25 にて96ウェルプレートでインキュベートした。1時間後、適切な濃度のHBSまたは直鎖状ペプチド(1 nM ~ 100 μM)を、Mdm2-Flu-p53溶液に添加し、得られた混合物を、偏光によってFlu-p53の解離度を測定する前に25 で1時間インキュベートした。IC₅₀を方程式(2)に当てはめて、HBSまたは直鎖状ペプチドのK_{D2}値を計算した。

20

$$K_{D2} = K_{D1} * F_{SB} * ((L_T / (L_{ST} * F_{SB}^2 - (K_{D1} + L_{ST} + R_T) * F_{SB} + R_T)) - 1 / (1 - F_{SB})) \quad (2)$$

式中、

K_{D1} = 蛍光プローブFlu-p53のK_D

R_T = Mdm2タンパク質の総濃度

L_T = HBSまたは直鎖状ペプチドの総濃度

L_{ST} = p53蛍光ペプチドの総濃度

F_{SB} = 結合したp53蛍光ペプチドの画分

30

【0087】

それぞれのペプチドについて報告された結合親和性(K_D)値(表3)は、3~5個の個別の実験の平均値であり、実験データを、GraphPad Prism 4.0上のシグモイド用量反応非線形回帰モデルに当てはめることによって決定した(Roehrle et al., Biochemistry 43:16056(2004)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0088】

(表3) Mdm2に対するp53類似体の親和性

ペプチド	配列 ^a	主鎖	K _D (nM) ^b
1	XQEG*FSdLWKILS-NH ₂	HBS α3/β	80 ± 21
2	XQEG*FSDLWKLLS-NH ₂	HBS α	71 ± 16
3	Ac-QeGFSDLWKILS-NH ₂	非拘束 α3/β	102 ± 39
4	Ac-Q(ACPC)GFS(ACPC)LWK(ACPC)LS-NH ₂	α3/環状β	430 ± 86
5	XQEG*ASdLWKIAS-NH ₂	HBS α3/β	>> 1,000,000

40

^a 小文字太字は 3 残基を示し、Xはペンテン酸であり、G*はN-アリルグリシンであり、ACPCは、環状 残基(1S, 2S) - 2 - アミノシクロペンタンカルボン酸である。

^b His₆ - Mdm2に対する結合定数

【0089】

50

実施例 10 - トリプシン消化アッセイ

PBS中に500 μMのトリプトファン、1 ng / μLのトリプシン、および500 μMのペプチドを含有する溶液を、4 でインキュベートした。指示された時間間隔で、100 μLの本溶液を、100 μLの2 % TFA溶液で反応停止処理し、次いで逆相HPLCに注入して、内部対照の領域(トリプトファン)と比較してペプチドピークの領域の変化を分析した。

【0090】

実施例 11 - 血清安定性アッセイ

RPMI中のペプチドおよび50 % ヒト血清(Sigma, St Louis, MO, USA、製品番号S7023)を、実験前に37 で15分間、温度の平衡化を行った。150 μLのペプチド(500 μM)を、150 μLの50 % ヒト血清液に添加し(25 % 最終血清濃度)、37 で0 ~ 24時間置いた。0、2、5、10、および24時間後、それぞれのペプチドの3つの試料(50 μL)を採取し、100 μLの6 % トリクロロ酢酸溶液を添加することによって沈殿させた。これらの試料を4 に20分間冷却し、遠心分離した(14000 rpmで5分間)。上清をドライアイスで直ちに冷凍し、100 μLのそれぞれを、水中の0.1 % ギ酸(溶離液A)およびアセトニトリル中の0.1 % ギ酸(溶離液B)を用いてAgilent LCMSで分析した。無傷ペプチドのレベルは、異なる時点におけるペプチドピークのLC面積の割合(%)を0時間ピークの面積の割合(%)と比較することによって決定した。

【0091】

実施例 12 - 細胞取り込みアッセイ

10 % (v/v) ウシ胎仔血清(FBS)を補充したDMEM(Invitrogen)中、HeLa細胞を、37 で、5 % CO₂を含有する加湿インキュベーター中でサブコンフルエントまで培養した。10 % FBSを補充したDMEM中の細胞(約1 × 10⁴ 細胞/mL)を、顕微鏡スライドガラスを備える24ウェル培養プレート上で平面培養した。一晚インキュベートした後、細胞を1 mLのHBSS(Invitrogen)で3回洗浄し、総量が500 μLになるまで1 mM PBS(pH 7.4)中の15 μM フルオレセインタグ付けペプチドを補充した。ペプチドで処理した細胞を、37 でさらに2時間インキュベートし、500 μLのHBSSで5回洗浄し、Leica TSC SP 2共焦点レーザー走査顕微鏡上で直接画像化した。細胞の中央部を通る20枚連続の1 μm Zセクション画像を収集し、分析した。

【0092】

実施例 1 ~ 12 の結果および考察

タンパク質分解に対抗する新世代のHBSヘリックスが、ペプチド中の³アミノ酸残基の慎重な組み込みによって開発されている。ヘリックス模倣体のすべてのターンが1つの残基を特徴付けるように、3 : 1の残基 : 残基の比が選択された。HBSアプローチの主要な利点は、側鎖官能基を使用することなく、立体配座の剛性を提供するその能力である。この研究は、HBS方法が、好ましくは、および残基からなるオリゴマーを安定化させる際の以前のアプローチに匹敵することを示す(Horne & Gellman, Acc. Chem. Res. 41 : 1399 (2008)、Arvidsson et al., Chem. Commun. 649 (2001)、Kritzer et al., J. Am. Chem. Soc'y 127 : 167 (2005)、Hart et al., J. Am. Chem. Soc'y 125 : 4022 (2003)、Cheng & DeGrado, J. Am. Chem. Soc'y 123 : 5162 (2001)、Appella et al., Nature 387 : 381 (1997)、Vaz et al., ChemBioChem 9 : 2254 (2008)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。3 / - HBS p53ヘリックス模倣体(ペプチド1)は、高親和性でその同族タンパク質受容体を標的とすることが見出された。顕微鏡研究は、拘束されたフルオレセイン複合体がHeLa細胞に侵入することができるが、一方、非拘束誘導体が低い細胞透過性を示すことを示唆し

ている。p 5 3 経路を活性化させるこの p 5 3 模倣体の可能性を評価する研究が進行中である。過剰なタンパク質 - タンパク質相互作用における ヘリックスドメインの重要性を考えると (Bullock et al., J. Am. Chem. Soc'y 133: 14220 (2011)、Jochim & Arora, ACS Chem. Biol. 5: 919 (2010)、Jochim & Arora, Mol. Biosyst. 5: 924 (2009)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、これらのタンパク質分解的および立体配座的に安定した細胞透過性分子が、生物学的研究のための試薬および創薬のための手がかりとして魅力的であることが期待されている。

【0093】

ペプチド設計

キメラHBS / ヘリックスの設計は、得られた化合物が基準のヘリックスに近い模倣体であり得るように、残基対 残基の好適な比を試験することによって開始された。モデリング研究は、3:1の : 比は、ほぼ一致を示すが、一方、2:1の比は、ヘリックスで観察されたものよりも若干大きなヘリックスピッチをもたらし得ることを示した(図2A)。1つのヘリクスターン当たり少なくとも1つの 残基の挿入がプロテアーゼに対して最高の保護をもたらすと考えられたため、4:1の : の比は試験されなかった。 / キメラヘリックスに関する3:1の比は、ヘリックス模倣体に対してGellmanらによって使用されたものと一致する(Horne et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 106:14751 (2009)、Horne et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 105: 9151 (2008)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0094】

p 5 3 活性化ドメインを模倣するHBS 3 / 配列(ペプチド1)が設計された(表4)。p 5 3 活性化ヘリックスとMdm2との相互作用は、アポトーシスの調整に重要である(Joerger & Fersht, Annu. Rev. Biochem. 77: 557 (2008)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。この複合体は、いくつかの異なる種類の合成阻害剤で標的とされており(Lee et al., J. Am. Chem. Soc'y 133: 676 (2011)、Murray & Gellman, Biopolymers 88: 657 (2007)、Gempelli et al., J. Am. Chem. Soc'y 127: 1596 (2005)、Bernal et al., J. Am. Chem. Soc'y 129: 2456 (2007)、Shangary & Wang, Clin. Cancer Res. 14: 5318 (2008)、Campbell et al., Org. Biomol. Chem. 8: 2344 (2010)、Yin et al., Angew. Chem. Int'l Ed. 44: 2704 (2005)、Bernal et al., Cancer Cell 18: 411 (2010)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、阻害剤の設計のためのタンパク質 - タンパク質相互作用のモデルとなっている。p 5 3 配列のHBS ヘリックス模倣体(ペプチド2)のタンパク質結合特性が、すでに報告されている(Henchey et al., ChemBioChem 11: 2104 (2010)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。結合アッセイにおけるペプチド1(3 / - HBS)およびペプチド2(- HBS)の比較は、 / ヘリックス設計の直接評価を提供する。2つの非拘束 3 / ペプチド類似体(ペプチド3および4)はまた、HBS拘束の効果を評価するために設計された。ペプチド4は、ペプチド3の非環状 残基の代わりに、環状 残基(トランス-2-アミノシクロペンタンカルボン酸(ACPC)残基)を含有する。ACPC残基は、および / ペプチドのヘリックス立体配座を安定化させることがすでに示されている(Horne & Gellman, Acc. Chem. Res. 41: 1399 (2008)、Appella et al., Nature 387: 381 (1997)、

10

20

30

40

50

これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0095】

(表4) および 3 / ペプチドの設計

ペプチド	配列 ^a	主鎖
1	XQeG*FSdLWKILS-NH ₂	$\alpha 3/\beta$
2	XQEG*FSDLWKLLS-NH ₂	α
3	AcQeGFSdLWKILS-NH ₂	$\alpha 3/\beta$
4	AcQ(ACPC)GFS(ACPC)LWK(ACPC)LS-NH ₂	$\alpha 3/\beta^{\text{環状}}$

^a 小文字太字は ³ 残基を示し、Xはペンテン酸であり、G*はN-アリルグリシンであり、ACPCは、環状残基(1S, 2S)-2-アミノシクロペンタンカルボン酸である。

【0096】

合成

HBSヘリックスは、主鎖 i $i + 4$ の水素結合の代わりに炭素-炭素結合を含有する。炭化水素ブリッジは、2つの適切に置換されたアルケン基間の閉環メタセシスを用いて挿入される(図1)(Grubbs, Angew. Chem. Int'l Ed. 45: 3760 (2006)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。HBSヘリックスの合成のための詳細なプロトコルは、すでに報告されている(Arora & Chapmanの米国特許第7,202,332号、Chapman & Arora, Org. Lett. 8: 5825 (2006)、Dimartino et al., Org. Lett. 7: 2389 (2005)、Patgiri et al., Nat. Protoc. 5: 1857 (2010)、Patgiri et al., Org. Biomol. Chem. 8: 1773 (2010)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0097】

円二色性による構造的特徴付け

ペプチドのらせん構造は、円二色性分光法によって試験された。CD研究は、それらのヘリックス含量の測定を得るために、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中10%トリフルオロエタノール(TFE)中で行われた。図5に示されるように、ペプチド2は、ほぼ206および222nmの二重極小および190nmの最大値である、基準のヘリックスの特徴であるCD特徴を得る(Henche et al., ChemBioChem 11: 2104 (2010)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。ペプチド1に関して得られたパターンは、より弱い222nmの帯域を有することを除いて、ヘリックスに対して観察されたものに類似している。非拘束ペプチド3は、ペプチド1と比較してより弱い信号を提供し、HBS拘束によって与えられた立体配座の剛性を強調する。ペプチド4のCDスペクトルは、すでに報告されている およびキメラ / ペプチドのスペクトルと一致する(Sawada & Gellman, J. Am. Chem. Soc'y 133: 7336 (2011)、Price et al., J. Am. Chem. Soc'y 132: 12378 (2010)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。ペプチド1および4のCDスペクトルの比較は、これらの分子が溶液中では異なる立体配座を潜在的にとることを示唆している。

【0098】

HBS1の熱安定性

ペプチド1の熱安定性は、次に、そのCDスペクトルの温度依存性変化をモニタリングすることによって調査された(図13)。異なる温度で得られたスペクトル間での差は無視できる程度であったため、この研究はペプチド1の立体配座の安定性を強調する(Wang et al., Org. Biomolec. Chem. 4: 4074 (2006)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0099】

NMRによる構造的な特徴付け

1Dおよび2D NMR実験の組み合わせを利用して、ペプチド1の立体配座をさらに構築した。NMR研究が、PBS (pH 3.5) 中20% d_3 -TFE中で、Bruker 900MHzの分光計により行われた。ヘリックス立体配座を支持する主要な中期および長期NOEが観察された。このデータの分析は、ペプチド1における単一の主要なヘリックス立体配座の存在を示唆している (Schmitt et al., J. Am. Chem. Soc. 128: 4538 (2006)、Hayen et al., Angew. Chem. Int'l Ed. Engl. 43: 505 (2004)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

10

【0100】

ペプチド1の立体配座の安定性および動態を評価するために、アミドプロトンの温度係数およびアミドプロトンH/Dの交換速度を得た。これらの実験の組み合わせは、特定の主鎖プロトンが分子内の水素結合に関与する程度について説得力のある測定値を提供する。NMR研究は共に、この拘束されたオリゴマーにおける安定したヘリックス立体配座の説得力のある証拠を提供する。

【0101】

2D NMR分光法

一組の2D TOCSY、DQF-COSY、およびNOESY分光法を用いて、ペプチド1の 1H NMR共鳴を割り当てた。図14Aに示されるように、順次的なNH-NH (i および $i+1$) NOESYの交差ピーク、つまりヘリックス構造の特徴が、NOE相関図 (図14B) に示されるように、ペプチド1に関して観察された。NOESYスペクトルは、ペプチド1におけるヘリックス様立体配座を支持するいくつかの中度~弱度の (i 、 $i+3$) および (i 、 $i+4$) NH-CH の交差ピークをさらに示す。

20

【0102】

アミドプロトン温度係数

アミドプロトンは、特定のアミドプロトンが水素結合である程度に関する測定値である、温度依存性の共鳴シフトを示す。ヘリックス曲率の変動が解析を複雑にするが、 -4.5 ppb/Kよりも正の温度係数を有するゆっくり交換する任意のアミドプロトンは、強く水素結合していると考えられる (Baxter & Williamson, J. Biomol. NMR 9: 359 (1997)、Cierpicki & Otlewski, J. Biomol. NMR 21: 249 (2001)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。図15A~Bは、ペプチド1内の主鎖アミドプロトンに対する温度依存性化学シフトを示す。表5は、ペプチド1に対する温度係数を列挙する。ほとんどのNHに関しては、これらの温度係数は、水素結合したアミドプロトンを示すと考えられる範囲内にある。主な例外は、ヘリックスのN末端で大環状環内に存在するe2であり、分子内の水素結合に関与するとは予測されない。

30

【0103】

(表5) ペプチド1に対するアミドプロトンの温度係数および重水素交換データの要約

残基 ^a	Q1	e2	F4	S5	d6	L7	W8	K9	I10	L11	S12
温度係数 (ppb/ΔK)	-5.4	0.8	-2.9	-5.5	-5.0	-4.0	-7.8	-3.1	-6.9	-8.1	-0.4
H/D速度定数 $\times 10^{-5} (s^{-1})$	14.0	16.6	1.1	27.6	14.0	1.7	4.1	1.1	2.5	7.5	8.8
保護因子 ($\log k_{ch}/k_{ex}$)	1.0	1.45	2.16	1.26	2.01	1.96	1.06	2.07	1.42	-0.3	1.81
安定化 $-\Delta G$ (kcal/mol)	1.28	1.93	2.89	1.66	2.69	2.62	1.37	2.77	1.88	--	2.42

40

^a 小文字太字は ³ 残基を示し、Xはペンテン酸であり、G*はN-アシルグリシンであ

50

り、ACPCは、環状 残基 (1S, 2S) - 2 - アミノシクロペンタンカルボン酸である。

【0104】

アミドH/D交換速度

主鎖アミドの水素 - 重水素交換が、タンパク質の構造的安定性および動態の感度の高い測定を提供する (Connelly et al., Proteins 17:87 (1993)、Bai et al., Proteins 17:75 (1993)、Englander & Kallenbach, Quart. Rev. Biophys. 16:521 (1983)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。構造化されたタンパク質アミドプロトンは、主鎖水素結合に関与しており、非構造化タンパク質アミドプロトンと比較してそれらの遅いH/D交換速度論をもたらす溶媒から遮蔽される。図16A~Bは、ペプチド1に関するH/D交換速度を示し、表集計した交換値を、上記の表5に示す。このオリゴマーの立体配座の安定性を示す、短ペプチドに対して一般的には不可能であるこのヘリックスにおける個々の水素 - 重水素交換速度が、精密に決定され得る。測定した交換速度 k_{ex} を、同じ配列の非構造化 - ペプチドに対して予測された固有の化学交換速度 k_{ch} と比較し、個々の保護係数 ($\log k_{ch} / k_{ex}$) および保護の対応する自由エネルギーを評価した ($-G$) (Bai et al., Methods Enzymol. 259:344 (1995)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。予測された固有の化学交換速度、保護係数、および保護の自由エネルギーを、<http://hx2.med.upenn.edu> のスプレッドシートを用いて計算し、上記の表5内にも示す。(このワークシートは、異種配列のためではなく ペプチドのために開発されたが、その使用は、決定的な洞察力を提供すると考えられる。) このデータは、ペプチド1が高度に安定した水素結合ネットワークを含み、有意な保護係数および保護の関連した自由エネルギー ($1.3 \sim 2.9 \text{ kcal/mol}$) を有することを示す。このような安定化度は、典型的には、短ペプチドではなく、タンパク質の埋没したアミドプロトンに対して観察される (Wang et al., J. Am. Chem. Soc'y 128:9248-56 (2006)、Zhou et al., J. Am. Chem. Soc'y 116:6482 (1994)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0105】

ヘリックスを認識するタンパク質受容体を標的とする可能性

円二色性およびNMR研究は、ペプチド1がヘリックスの立体配座と同様の立体配座をとるという有力な証拠を提供する。ヘリックスを認識するタンパク質を標的とするHBS 3 / ヘリックスの潜在性を評価するために、Mdm2に対するペプチド1、2、および4の親和性が測定された。蛍光偏光に基づく競合的結合実験が行われ、ペプチド1が、最適化されたHBS p53 ヘリックス類似体ペプチド2 (図17および上記の表3) に関してすでに報告されているものに匹敵する、高親和性 ($K_D = 80 \pm 21 \text{ nM}$) でMdm2に結合することが見出された (Henchey et al., Chem BioChem 11:2104 (2010)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。この結果は、HBSヘリックス中の 残基による 残基の置換が、それらの結合親和性を損なう構造的攪乱を導入しないことを明白に示す。Mdm2に対するペプチド1の特異性を評価するために、陰性対照 (ペプチド5 (XQeG*ASdLWK1AS-NH₂)) が、Phe19およびLeu26 (結合のために重要であるペプチド1の残基のうちの2つ) をアラニンに突然変異させることによって設計された。図17に示されるように、予想通りに、ペプチド5は、測定可能な親和性でMdm2に結合しない。ペプチド4は、ペプチド1と比較して、およそ5倍低い親和性 ($K_D = 430 \pm 86 \text{ nM}$) でMdm2と結合する。

【0106】

HBS 3 / ヘリックスのタンパク質分解安定性

ペプチド1への - アミノ酸残基の組み込みが、そのタンパク質分解安定性を強化する

かどうかを評価するために、トリプシンおよび血清の存在下、その分解速度が測定され、ペプチド 2、3、および 6 の分解速度と比較された。これらの実験の両方とも、3 / ペプチドが加水分解および血清プロテアーゼの両方に耐性があるという明確な証拠を提供する。

【0107】

トリプシンは、p53 活性化ドメインがこの酵素に対して切断部位を提供する C 末端付近のリジン基を含有するため、タンパク質分解酵素のモデルとして選択された。重要なことには、リジン残基は、ペプチド 1 および 2 中の HBS 拘束から離れた、1 つを超えるヘリックスターンであり、大環状環からの潜在的干渉なく、それらのタンパク質分解安定性の評価を可能にする。ペプチド消化の速度は、内部対照としてトリプトファンを用いた LCMS アッセイを使用して測定された。ペプチド 1 のおよそ 20 % が、24 時間後に切断されることが見出された (図 18 A)。対照的に、ペプチド 2 は、1 時間で完全に分解され、HBS ペプチド中の残基の組み込みがそれらのタンパク質分解安定性を著しく改善することを示した。直鎖状 3 / ペプチド 3 もまた、すでに報告されている観察と合わせて、分解に対して安定である (Hook et al., Chem. Biodivers. 2: 591 (2005)、Seebach & Gardiner, Acc. Chem. Res. 41: 1366 (2008)、Horne & Gellman, Acc. Chem. Res. 41: 1399 (2008)、Sadowsky et al., ChemBioChem 8: 903 (2007)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

10

20

【0108】

トリプシン消化アッセイは、3 / ペプチドが消化プロテアーゼについて安定であるという有力な証拠を与える。これらのペプチドの安定性は、血清プロテアーゼの存在下、さらに評価された (図 18 B)。ヒト血清は、無数のプロテアーゼを含有し、生理的条件下で、化合物の安定性に対する測定の基準を提供する。ペプチドを、37 °C で、RPMI 培地中の 25 % ヒト血清中でインキュベートし、LCMS によってモニタリングした。ペプチド 2 の大部分は、24 時間後、アッセイ条件下で分解したが、一方、ペプチド 1 は、攪乱されることなく維持され、これによりトリプシン消化アッセイからの結果を裏付けた。

30

【0109】

細胞取り込み

安定化したヘリックスの注目すべき特徴は、細胞に侵入し、細胞内のタンパク質 - タンパク質相互作用を調節するそれらの能力である (Moellering et al., Nature 462: 182 (2009)、(Patgiri et al., Nat. Chem. Biol. 7: 585 (2011)、Henchey et al., J. Am. Chem. Soc. 132: 941 (2010)、Bernal et al., J. Am. Chem. Soc. 129: 2456 (2007)、Bernal et al., Cancer Cell 18: 411 (2010)、Walensky et al., Science 305: 1466 (2004)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。HBS 拘束が 3 / ペプチドを透過させることができるかどうかを試験するために、HeLa 細胞を、3 / ペプチド 1 および 3 の蛍光標識類似体 (それぞれ、Flu-1 および Flu-3) で 2 時間インキュベートし、生細胞を共焦点顕微鏡で画像化した。図 19 に示されるように、Flu-1 は、非拘束類似体 Flu-3 と比較して、強力な細胞内蛍光を示した。以前の研究は拘束されたペプチドに対してエネルギー依存性の取り込み機構を示唆しているが、HBS ペプチドが細胞に内在化される機構は、現在調査中である (Patgiri et al., Nat. Chem. Biol. 7: 585 (2011)、Walensky et al., Science 305: 1466 (2004)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。HBS ヘリックスの細胞取り込みが配列依存性を有する可能性があるが、正電荷がしばしば、ペプチドの増強した細胞取り込みと関連があるため

40

50

(Henchey et al., J. Am. Chem. Soc'y 132:941 (2010)、Bernal et al., J. Am. Chem. Soc'y 129:2456 (2007)、Wender et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:13003 (2000)、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、全体的に負に荷電したペプチドが内在化されることは注目に値する(Patgiri et al., Nat. Chem. Biol. 7:585 (2011)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0110】

実施例 13 - 一般的記述

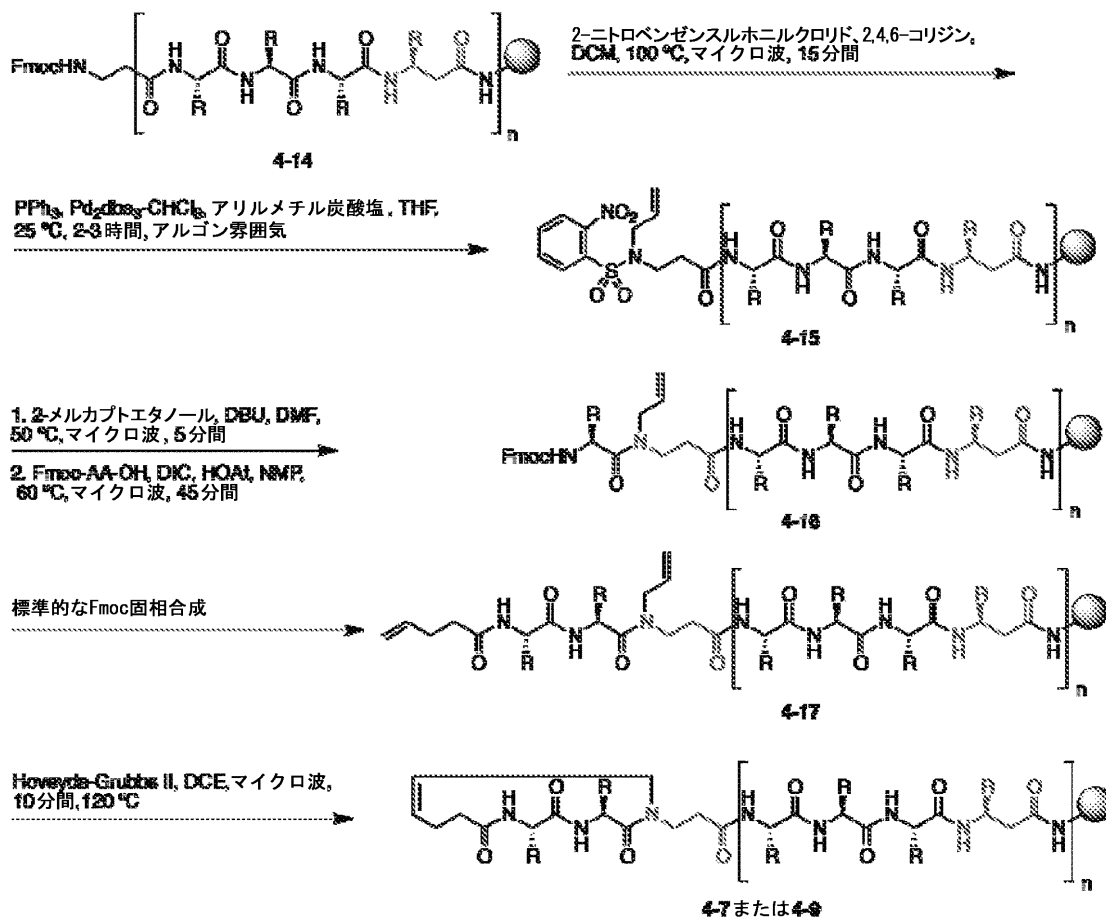
示される場合を除いて、商用グレードの試薬および溶媒をさらに精製することなく用いた。メタセシス反応で使用する前に、ジクロロエタンを蒸留した。すべての反応物を、磁氣的または機械的に振とうして攪拌し、感湿反応を、窒素またはアルゴン雰囲気下で実行した。逆相 HPLC 実験は、System Gold 168 ダイオードアレイ検出器を装備した Beckman Coulter HPLC を用いて、C₁₈ 逆相カラム上で、溶離剤として 0.1% トリフルオロ酢酸溶液およびアセトニトリル緩衝剤中 0.1% トリフルオロ酢酸を用いて実行した。Agilent 1100 シリーズ LC/MSD (XCT) エレクトロスプレータップにおいて ESI/MS データが得られた。制御された電力、温度、および時間設定で、CEM Discover 単一モード反応器においてマイクロ波反応が行われた。HBS ペプチドのプロトン NMR スペクトルが Bruker AVANCE 900 MHz の分光計により記録された。

【0111】

実施例 14 - 結合ペプチドにおける アミノ酸 (複数可) による HBS ヘリックスの合成

ペプチド 4 - 7 (図 20 を参照のこと) および 4 - 9 を、スキーム 2 に示され、Arora & Chapman の米国特許第 7,202,332 号、Chapman & Arora, Org. Lett. 8:5825-28 (2006)、Dimartino et al., Org. Lett. 7:2389-92 (2005)、Patgiri et al., Nat. Protoc. 5:1857-65 (2010)、および Patgiri et al., Org. Biomol. Chem. 8:1773-76 (2010) (これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるように合成した。

スキーム2



10

20

【 0 1 1 2 】

簡潔に言えば、推定ヘリックスの $i + 4$ 番目までの残基のペプチド配列（スキーム 2 中の 4 - 14）を、CEM Liberty Series マイクロ波ペプチド合成装置において固相上で合成した。DCM 中 2 - ニトロベンゼンスルホニルクロリド（3 当量）および 2, 4, 6 - コリジン（5 当量）の溶液を、予め膨張させた樹脂に添加し、この混合物を、100 で 15 分間のマイクロ波（CEM discover）下で照射した。次いで、この樹脂を DMF（3 回）および DCM（3 回）で洗浄し、真空下で乾燥させた。次に、トリフェニルホスフィン（0.8 当量）をこの樹脂に添加し、アルゴンを 30 分間通気した。次いで、無水 THF をこの樹脂に添加し、 $\text{Pd}_2\text{dba}_3 \cdot \text{CHCl}_3$ （0.1 当量）およびアシルメチル炭酸塩（15 当量）を添加する前に、この樹脂を 2 分間膨張させた。得られた反応混合物を、アルゴン雰囲気下で、室温で 2 ~ 3 時間振とうさせて、4 - 15 を得た。

30

【 0 1 1 3 】

4 - 16 を生成するために、樹脂を含有する 4 - 15 を、DCM（3 回）、DMF（3 回）、0.02 M ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム / NMP（3 回）、DMF（3 回）、DCM（3 回）で洗浄し、真空下で乾燥させた。DBU（5 当量）および 2 - メルカプトエタノール（10 当量）を、窒素雰囲気下で、DMF 中の予め膨張させた樹脂に結合した 4 - 15 に添加した。次いで、反応混合物を、50 で 5 分間のマイクロ波照射に供した。樹脂（を含有する 4 - 15）を、DMF（3 回）および DCM（3 回）で洗浄し、真空下で乾燥させ、60 で 45 分間のマイクロ波照射下、NMP 中の所望の Fmoc アミノ酸（20 当量）、DIC（20 当量）、および HOAt（10 当量）で処理した。

40

【 0 1 1 4 】

4 - 17 を生成するために、樹脂を含有する 4 - 16 を、DMF（3 回）、DCM（3

50

回)、およびDMF(3回)を洗浄し、Fmoc基を、NMP中の20%ピペリジンで除去した。次いで、所望のFmocアミノ酸残基(5当量)および4-ペンテン酸(5当量)を、NMP中のHBTU(4.95当量)およびDIEA(10当量)を用いた標準的なペプチド合成手法を用いて、樹脂を含有する4-16と結合した。

【0115】

Arora & Chapmanの米国特許第7,202,332号、Chapman & Arora, Org. Lett. 8:5825-28(2006)、Dimartino et al., Org. Lett. 7:2389-92(2005)、Patgiri et al., Nat. Protoc. 5:1857-65(2010)、およびPatgiri et al., Org. Biomol. Chem. 8:1773-76(2010)(これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように、ビスオレフィン4-17における閉環メタセシスを、120℃で10分間のマイクロ波照射下、ジクロロエタン中のHoveyda-Grubbs II触媒(20モル%)で行った。メタセシス化ペプチドを、TFA:TIS:水(95:2.5:2.5)を用いて、樹脂から切断した。

10

【0116】

直鎖状ペプチドを、Coin et al., Nat. Protocols 2:3247-56(2007)およびFMOC SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH(W.C.Chan & P.D.White eds., 2000)(これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように調製した。

20

【0117】

すべてのペプチドは、逆相HPLC(C₁₈カラム)(図21)によって精製され、ESI-MS(表6)に特徴付けられた。

【0118】

(表6)ペプチド4-2、4-7、4-8、4-9、およびFlu-p53の質量分光の特徴付け

ペプチド	配列 ^a	計算値 [M+H] ⁺	観察値 [M+H] ⁺
4-2	XQEG*FSDLWKLLS-NH ₂	1514.7	1515.0
4-7	XQEG*FSDIWKLIS-NH ₂	1557.7	1558.6
4-8	AcQEg*FSDIWKLIS-NH ₂	1505.7	1506.4
4-9	XQEg*ASDIWKLAS-NH ₂	1439.6	1440.1
Flu-p53	Ac-EAFSDLWKLLPENNVCF ^{Flu} -NH ₂	2305.0	1153.0*

30

^a 小文字太字は³残基を示し、Xはペンテン酸であり、G*はN-アリルグリシンであり、Fluは5-アセトアミドフルオレセインである。*(M+2)²⁺

【0119】

実施例15 - 5-カルボキシフルオレセイン標識ペプチドの合成

5-カルボキシフルオレセイン標識ペプチドを、上記の実施例3に記載されるように調製した。

40

【0120】

実施例16 - 円二色性分光法

CD分光法を、上記の実施例4に記載されるように実行した。図22は、ペプチド4-7、ペプチド4-8、およびペプチド4-9のCDスペクトルを示す。

【0121】

実施例17 - 2D NMR分光法

2D NMR分光法を、上記の実施例6に記載されるように実行した。PBS中20%TFE-d₃中のペプチド4-7(293K)に対する¹H NMR帰属および化学シフト(、ppm)を、表7中に示す。図23~26を参照のこと。

【0122】

50

(表7) ペプチド4-7に対する¹H NMR帰属および化学シフト

残基 ^a	NH	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ
Q1	7.838	4.238	2.217	1.906 1.777	該当なし	該当なし
E2	8.048	4.477	2.209	1.899 1.775	該当なし	該当なし
g3	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし
F4	8.164	4.238	2.848 3.001	該当なし	該当なし	該当なし
S5	8.202	4.18	3.860 3.792	該当なし	該当なし	該当なし
D6	7.946	4.173	2.632	該当なし	該当なし	該当なし
I7	7.331 7.343	4.076	2.247	1.991	1.319	1.02 0.648
W8	7.88	4.176	3.179	該当なし	該当なし	該当なし
K9	7.649	3.751	1.66	1.465	1.182 1.046	3.179
L10	7.777	4.05	1.561	1.45	0.664	該当なし
I11	7.57 7.588	4.105	2.303	2.142	1.402	1.019 0.645
S12	7.951	4.07	3.717 3.612	該当なし	該当なし	該当なし

10

20

^a 小文字太字は³残基を示す。

【0123】

実施例18 - His₆-Mdm2の発現および精製

His₆-Mdm2の発現および精製は、上記の実施例8に記載されるように実行した。

【0124】

実施例19 - His₆-Mdm2結合研究

上記の実施例9に記載されるように、N末端にHis₆をタグ付けしたMdm2(25-117)に対するペプチドの相対的親和性を、フルオレセイン標識p53ペプチド(Flu-p53)による蛍光偏光に基づく競合的結合アッセイを使用して決定した。それぞれのペプチドについて報告された結合親和性(K_D)値は(表8)、3~5個の個別の実験の平均値であり、実験データを、GraphPad Prism 4.0上のシグモイド用量反応非線形回帰モデルに当てはめることによって決定した(Roehrle et al., Biochemistry 43:16056(2004)、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

30

【0125】

(表8) Mdm2に対するp53類似体の親和性

ペプチド	配列 ^a	主鎖	K _D (μM) ^b
4-7	XQEG*FSDIWKLIS-NH ₂	HBS	12.6 ± 4.4
4-8	Ac-QEGFSDIWKLIS-NH ₂	非拘束	82.7 ± 58.8
4-9	XQEG*ASDIWKLIS-NH ₂	HBS	>>1000

40

^a 小文字太字は³残基を示し、Xはペンテン酸であり、G*はN-アシルグリシンである。

^b His₆-Mdm2に対する結合定数

【0126】

実施例13~19の結果および考察

13員のHBS環が、3 / ペプチドの個別の折り畳みを誘発し得るかどうかを調査

50

した。ペプチド 4 - 2 は、アミノ酸からなる 13 員の HBS ヘリックスである (図 20)。結合した 3 / ペプチド鎖を含有する、ペプチド 4 - 2 の類似体であるペプチド 4 - 7 (図 20)、ペプチド 4 - 7 の非拘束類似体であるペプチド 4 - 8 を合成した。ペプチド 4 - 7 の CD スペクトルは、ペプチド 4 - 1 (ヘリックスと同様の構造的特徴を有する 14 員の HBS 大環状環) の CD スペクトルと同様のパターンを示し、一方、その非拘束類似体、ペプチド 4 - 8 は、ランダム構造を示す (図 22)。CD 熱変性研究は、ペプチド 4 - 7 が溶液中で安定した構造を形成することを示す (図 27)。

【0127】

次に、2D NOESY および TOCSY 実験が、ペプチド 4 - 7 の溶液中構造へのさらなる見識を得るために行われた (図 23 ~ 26)。この帰属および化学シフト (PBS 中 20% TFE - d₃ 中で 293 K) を、上記の表 7 に示す。NOE 相関図 (図 28) に示されるように、NOESY スペクトルは、順次的な NH - NH (*i* および *i* + 1) NOESY の交差ピーク、ヘリックス構造の特徴を示す。NOESY スペクトルは、ペプチド 4 - 7 におけるヘリックス様立体配座を支持するいくつかの中度 ~ 弱度の (*i*, *i* + 3) および (*i*, *i* + 4) NH - CH の交差ピークをさらに示す。これらの研究は、HBS 3 / ヘリックスが適切に設置された 13 員の大環状環で核を形成して、同様の構造を生じ得ることを示唆している。

10

【0128】

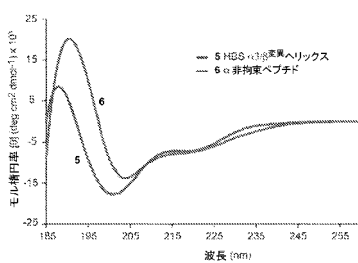
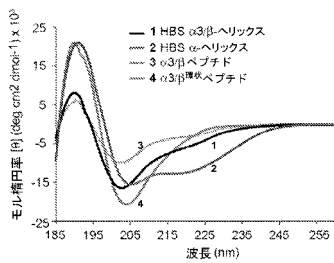
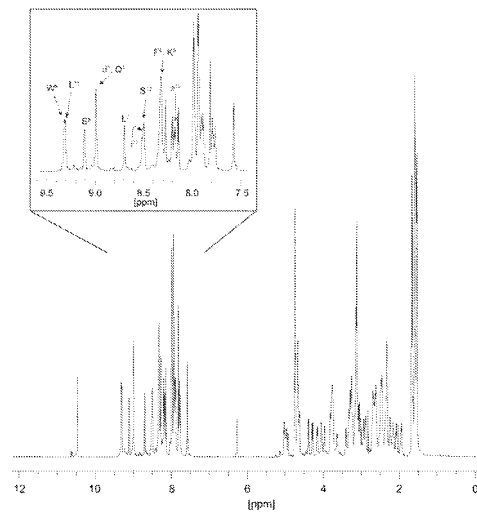
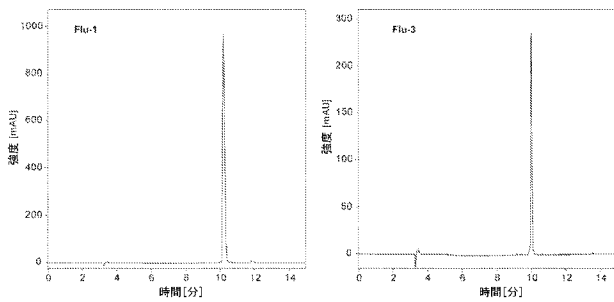
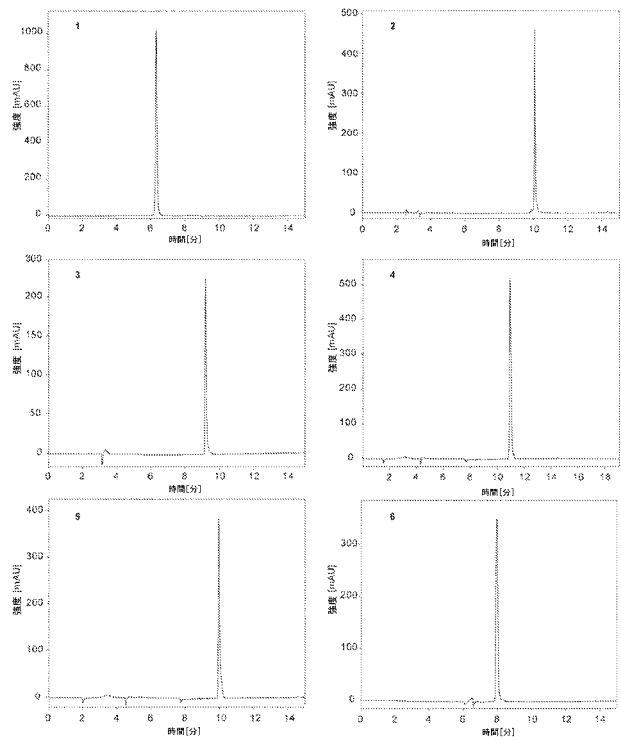
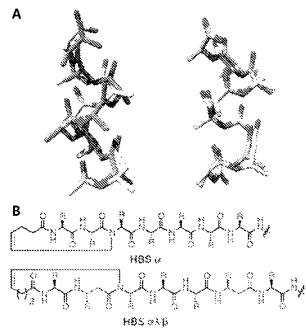
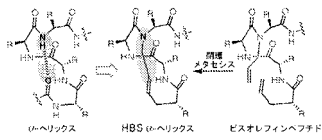
次に、蛍光偏光に基づく競合的結合アッセイを使用して、ペプチド 4 - 7 が Mdm2 に結合するかどうかを調査した。図 29 に示されるように、ペプチド 4 - 7 は、Mdm2 ($K_D = 12.6 \pm 4.4 \mu M$) に結合することが見出された。非拘束ペプチド 4 - 8 は、 $K_D = 82.7 \pm 58.8 \mu M$ で Mdm2 に結合する。重要なアミノ酸残基のうちの 2 つ (F4 および L11) をアラニンに突然変異させた、ペプチド 4 - 7 の陰性対照であるペプチド 4 - 9 は、容易に感知できる結合親和性では結合しない (上記の表 8 を参照のこと)。ペプチド 4 - 7 の弱結合親和性は、その重要な残基 L11 の ³-Leu による突然変異、ならびに重要な残基 F4 および W8 に隣接して位置する G3 および L7 の、³-Gly および ³-Leu による突然変異によるものであると予想される。(図 20 を参照のこと)。したがって、重要でないアミノ酸残基の代わりに - アミノ酸を有する HBS ペプチドが結合親和性の低下を示さないことが予測される。

20

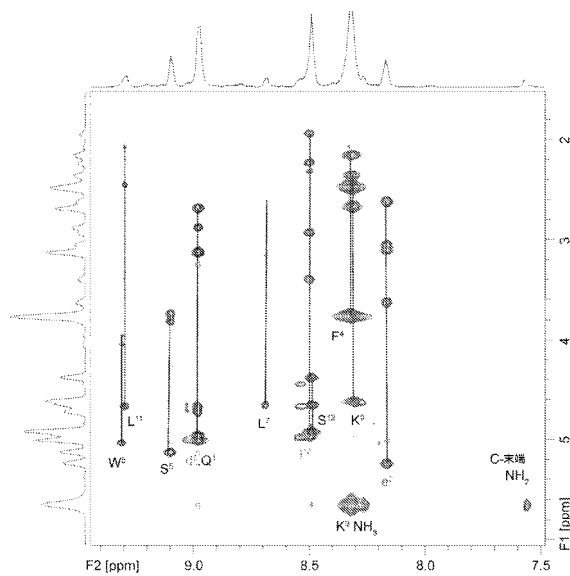
【0129】

好ましい実施形態を本明細書に詳細に示し記載してきたが、様々な改変、添加、置換などが本発明の精神から逸脱することなくなされ得ることが当業者には明らかであり、これらはしたがって、続く特許請求の範囲内に定義されるように、本発明の範囲内であることが考慮される。

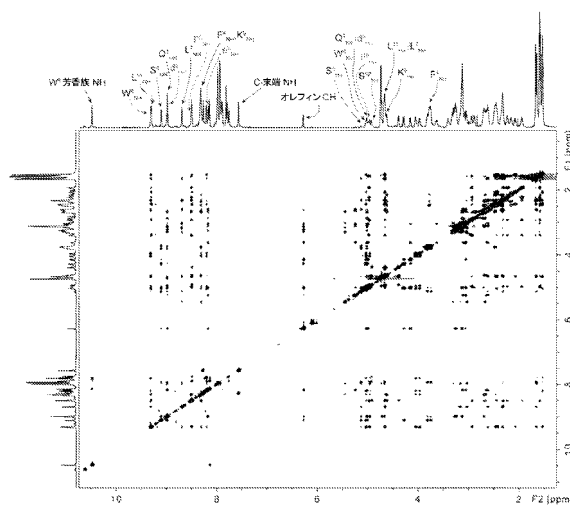
30



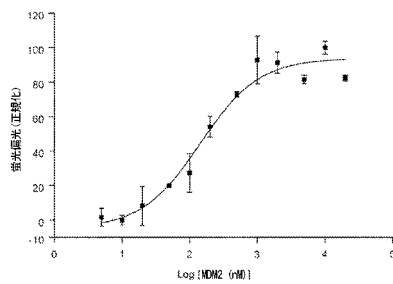
【 図 9 】



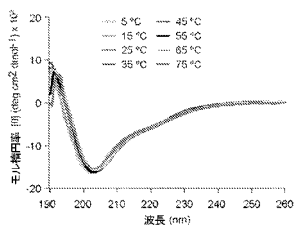
【 図 1 1 】



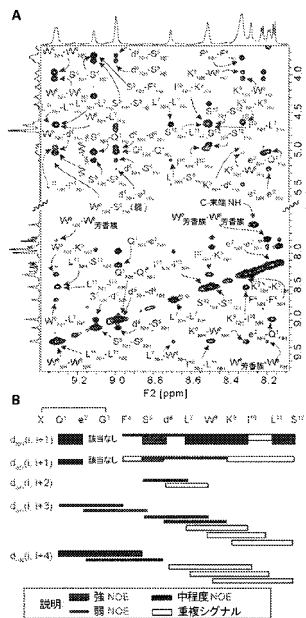
【 図 1 2 】



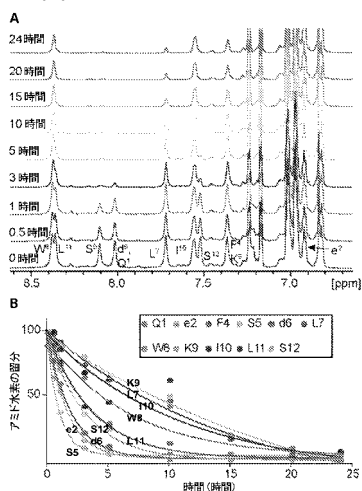
【図 13】



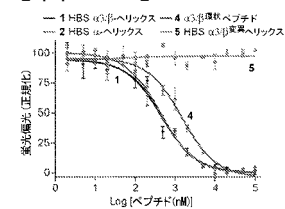
【図 14】



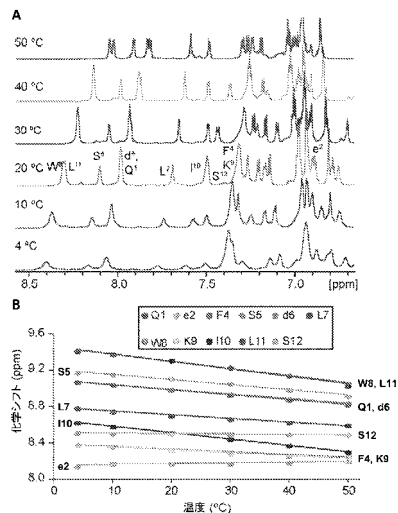
【図 16】



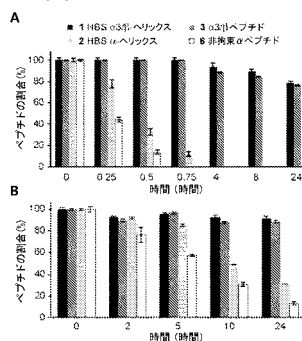
【図 17】



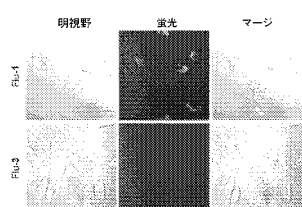
【図 15】



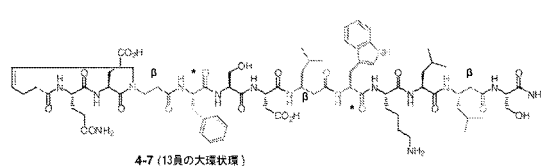
【図 18】



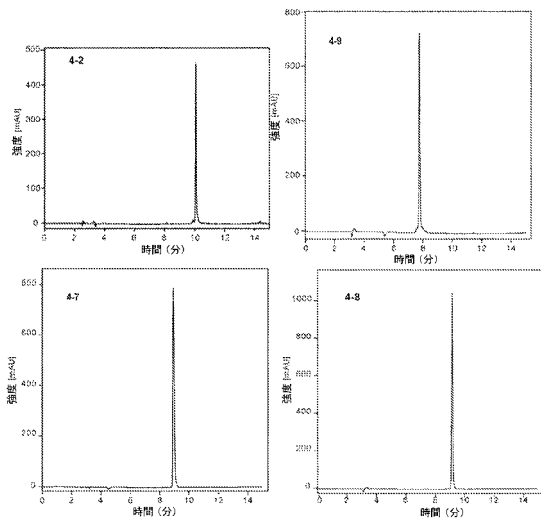
【図 19】



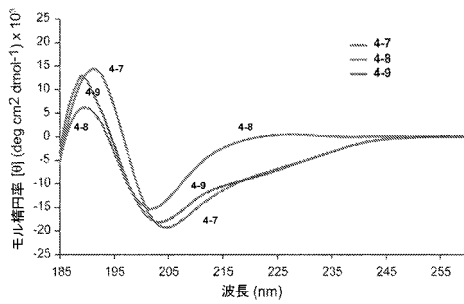
【図 20】



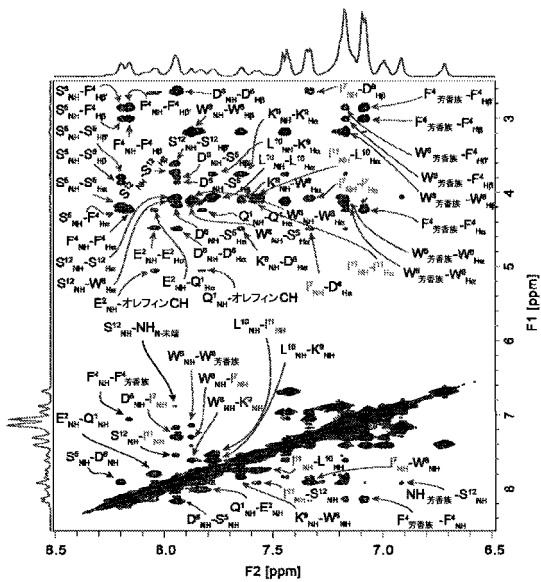
【図 2 1】



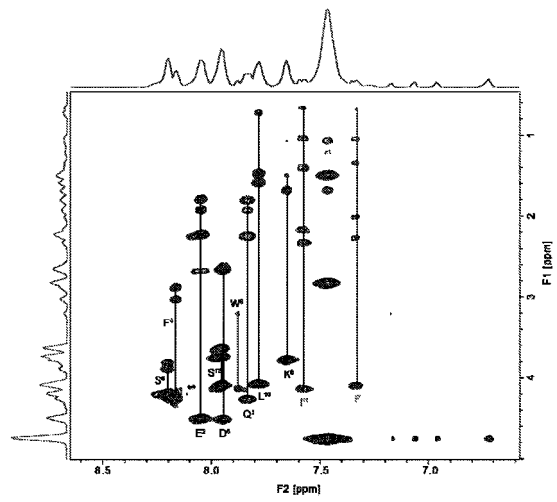
【図 2 2】



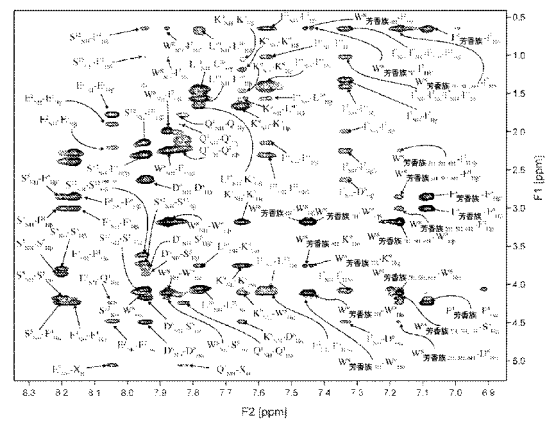
【図 2 4】



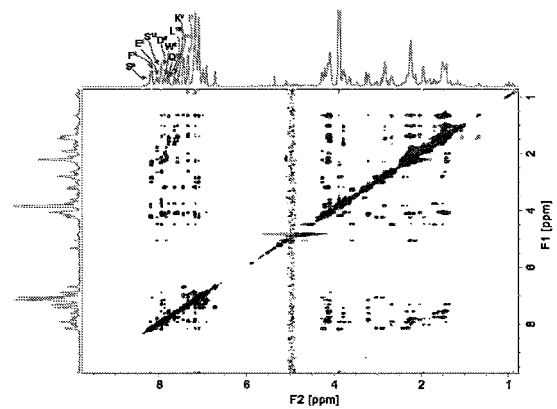
【図 2 3】



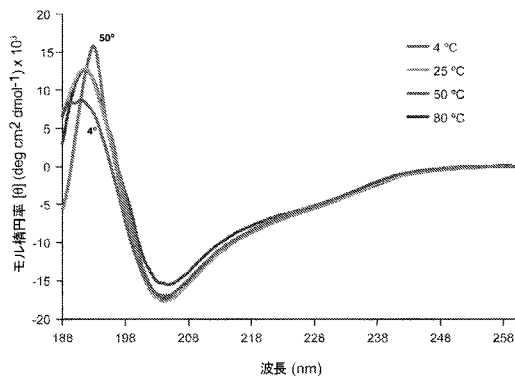
【図 2 5】



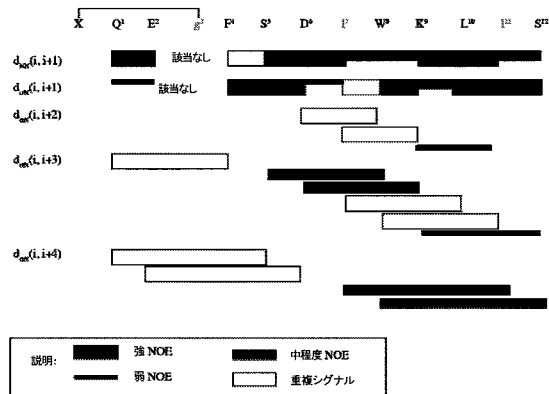
【図 2 6】



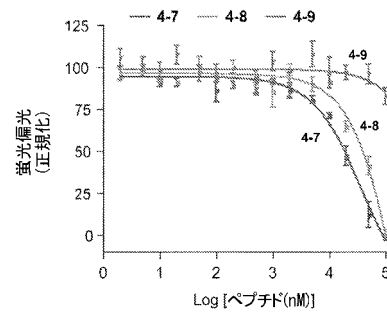
【図 27】



【図 28】



【図 29】



【手続補正書】

【提出日】平成26年9月29日(2014.9.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2015504048000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/71223												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/04, C07K 1/107, C07K 5/12 (2013.01) USPC - 514/1.1; 530/317 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 38/04, C07K 1/107, C07K 5/12 (2013.01) USPC - 514/1.1; 530/317 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 514/1.1; 530/317 (see search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) *** Databases: WEST; Patbase; Google *** Search Terms Used: peptide, peptidomimetic, constrained, internally, macrocycle,														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2010/0234563 A1 (Arora et al.) 16 September 2010 (16.09.2010), especially para [0008] and [0010]</td> <td>1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011/0059161 A1 (Templeton) 10 March 2011 (10.03.2011), entire document</td> <td>1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010/0228004 A1 (Prabhakaran) 09 September 2010 (09.09.2010), entire document</td> <td>1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2010/0234563 A1 (Arora et al.) 16 September 2010 (16.09.2010), especially para [0008] and [0010]	1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54	A	US 2011/0059161 A1 (Templeton) 10 March 2011 (10.03.2011), entire document	1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54	A	US 2010/0228004 A1 (Prabhakaran) 09 September 2010 (09.09.2010), entire document	1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 2010/0234563 A1 (Arora et al.) 16 September 2010 (16.09.2010), especially para [0008] and [0010]	1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54												
A	US 2011/0059161 A1 (Templeton) 10 March 2011 (10.03.2011), entire document	1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54												
A	US 2010/0228004 A1 (Prabhakaran) 09 September 2010 (09.09.2010), entire document	1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
* 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 15 April 2013 (15.04.2013)		Date of mailing of the international search report 03 MAY 2013												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/71223

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

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

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:

*** Please see extra sheet ***

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.:
Claims 1-26 and 54; limited to where B is C(R1)2; to where p, o, m, n', and n" combine to provide a peptidomimetic wherein there are 9 to 12 atoms in the macro cycle portion of the compound; to where R2 is a beta amino acid; and to where R3 is a beta amino acid; thus comprising claims 1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54.

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

International application No.

PCT/US 12/71223

Box III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-26 and 54 directed to a peptidomimetic having a stable, internally constrained protein secondary structure, wherein the peptidomimetic is a compound of Formula (I) [see claim 1 for structure, wherein the structure of formula (I) comprises a single -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moiety linked to a single peptide chain]. The first invention of Group I+ is limited to where B is C(R1)2; to where p, o, m, n', and n" combine to provide a peptidomimetic wherein there are 9 to 12 atoms in the macro cycle portion of the compound; to where R2 is a beta amino acid; and to where R3 is a beta amino acid; thus comprising claims 1-2, 6-8, 15-17, 21, 24 and 54. Applicants may opt for additional groups to be searched by specifying the specific groups and paying an additional invention fee for each elected group. For example, applicant may elect to search wherein B is O, S or NR1; or where p, o, m, n', and n" combine to provide a peptidomimetic wherein there are more than 12 atoms in the macro cycle portion of the compound; or wherein R2 is a moiety of Formula A; or wherein R3 is a moiety of Formula B.

Group II+: Claims 27-38 directed to a peptidomimetic having a stable, internally constrained protein secondary structure, wherein the peptidomimetic is a compound of Formula (IIA) [see claim 27 for structure, wherein the structure of formula (IIA) comprises two -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moieties linking two main peptide chains]. The first invention of Group II+ is limited to where B is C(R1)2; and to where R2 is a beta amino acid; thus comprising claims 27-28 and 32-35. Applicants may opt for additional groups to be searched, including the first invention in this group, by specifying the specific groups and paying an additional invention fee for each elected group. For example, applicant may elect to search the first invention in this group; or wherein B is O, S or NR1; or wherein R2 is a moiety of Formula A.

Group III+: Claims 39-53 directed to a peptidomimetic having a stable, internally constrained protein secondary structure, wherein the peptidomimetic is a compound of Formula (IIB) [see claim 39 for structure, wherein the structure of formula (IIB) comprises a single -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moiety linking two main peptide chains]. The first invention of Group III+ is limited to where B is C(R1)2; to where R2 is a beta amino acid; and to where R3 is a beta amino acid; thus comprising claims 39-40, 44-47, and 51. Applicants may opt for additional groups to be searched, including the first invention in this group, by specifying the specific groups and paying an additional invention fee for each elected group. For example, applicant may elect to search the first invention in this group; or wherein B is O, S or NR1; or wherein R2 is a moiety of Formula A; or wherein R3 is a moiety of Formula B.

The inventions listed as Groups I+, II+ and III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I+ does not include the inventive concept of a peptidomimetic structure having more than one peptide chain linked by one or more -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moieties, as required by Groups II+ and III+. Group I+ also does not include the inventive concept of a peptidomimetic structure constrained by carboxyl/amine hydrogen bonding, as required by Groups II+ and III+.

Group II+ includes peptidomimetics having two -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moieties linking two main peptide chains; wherein Groups I+ and III+ include peptidomimetics having a single -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moiety linked to one or more main peptide chains.

Group III+ includes peptidomimetics having a single -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moiety linking two main peptide chains; wherein Group I+ includes peptidomimetics having a single -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moiety linked to a single peptide chain; and wherein Group II+ includes peptidomimetics having two -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moieties linked to two main peptide chains.

Groups I+, II+ and III+ all share the technical features of being related to a peptidomimetic having a stable, internally constrained protein secondary structure as seen in formulas (I), (IIA) and (IIB), including -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moieties. However, the shared technical features fail to make a contribution over the prior art US 2010/0234563 A1 to Arora et al. (hereinafter 'Arora'), which discloses a peptidomimetic having a stable, internally constrained protein secondary structure (para [0008] and [0010]), wherein the peptidomimetic is a compound of Formula (I) constrained by a -B-C(R4)(R4)-C(R4)(R4)- moiety (para [0008] and [0010]). As peptidomimetics having a stable, internally constrained protein secondary structure were known in the art, as evidenced by the disclosure of Arora, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups II+ and III+ also share the technical features of being related to a peptidomimetic compound having more than one peptide chain linked by one or more linker moieties. However, the shared technical features fail to make a contribution over the prior art US 2011/0059161 A1 (Templeton), which shows the formation of 'A-scaffold-A' compounds comprising two peptidomimetic chains linked by a scaffold linker moiety (para [0007]). As peptidomimetics having more than one peptide chain linked by one or more linker moieties were known in the art, as evidenced by the disclosure of Templeton, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups II+ and III+ also share the technical features of being related to a peptidomimetic having a stable, internally constrained protein secondary structure constrained by carboxyl/amine hydrogen bonding. However, the shared technical features fail to make a contribution over Arora, which shows the use of carboxyl/amine hydrogen bonding to constrain protein secondary structure in peptidomimetic compounds as being known and routine to those with ordinary skill in the art (para [0018] and [0037]). As peptidomimetics having a stable, internally constrained protein secondary structure constrained by carboxyl/amine hydrogen bonding were known in the art, as evidenced by the disclosure of Arora, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I+, II+ and III+ therefore lack unity under PCT Rule 13.1 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
		A 6 1 P 43/00	1 1 1	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 アロラ パラムジット エス .
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ハンティントン アムハースト コート 2 9

(72) 発明者 バッジーリ アヌパム
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク ワシントン プレイス 2 9 ニューヨーク
ユニバーシティ ブラウン ビルディング 3 階

(72) 発明者 ジョイ スティーブン
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク ワシントン プレイス 2 9 ニューヨーク
ユニバーシティ ブラウン ビルディング 3 階

F ターム (参考) 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA17 BA18 BA19 BA25 DC32 NA14
ZB211 ZB261 ZC201
4H045 AA10 AA30 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA31
CA40 EA20 FA33 FA34 GA25 HA03