

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5711128号
(P5711128)

(45) 発行日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)

(24) 登録日 平成27年3月13日 (2015. 3. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/02

C O 7 K 7/50 (2006. 01)

C O 7 K 7/50 Z N A

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47

請求項の数 26 (全 84 頁)

(21) 出願番号 特願2011-528084 (P2011-528084)
 (86) (22) 出願日 平成21年9月22日 (2009. 9. 22)
 (65) 公表番号 特表2012-503026 (P2012-503026A)
 (43) 公表日 平成24年2月2日 (2012. 2. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/057934
 (87) 国際公開番号 W02010/034034
 (87) 国際公開日 平成22年3月25日 (2010. 3. 25)
 審査請求日 平成24年3月28日 (2012. 3. 28)
 (31) 優先権主張番号 61/099, 063
 (32) 優先日 平成20年9月22日 (2008. 9. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 507272957
 エルロン・セラピューティクス・インコー
 ポレイテッド
 AILERON THERAPEUTIC
 S, INC.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, アルバニー ス
 トリート 281
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド模倣大環状分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトの全血において増強された細胞効力を有する増強された ラセンポリペプチドをスクリーニングする方法であって、該増強された ラセンポリペプチドは、該増強された ラセンポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含み、ここで、該方法は、

(a) 親 ラセンポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含む親 ラセンポリペプチドの配列を提供する工程；

(b) 標的に結合するのに必須ではない少なくとも1つのアミノ酸側鎖が、該親 ラセンポリペプチドの配列と比較して異なること以外は該親 ラセンポリペプチドの配列と同じ配列を有する改変された ラセンポリペプチドを産生する工程であって、ここで、該改変された ラセンポリペプチドは、該改変された ラセンポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含む、工程と；

(c) ヒト血清の存在および非存在において、全細胞アッセイにおいて該改変された ラセンポリペプチドのインビトロの効力 (EC₅₀) を測定する工程であって、ここで活性が標的への結合によって媒介される、工程と；

(d) ヒト血清タンパク質に対する該改変された ラセンポリペプチドの見かけの親和性 (K_d^{*}) を決定する工程と；

(e) 該改変された ラセンポリペプチドが1~700マイクロモル濃度のK_d^{*}を有する場合、該改変された ラセンポリペプチドを増強された ラセンポリペプチドとして選

10

20

択する工程と、
を包含する、方法。

【請求項 2】

前記増強された ラセンポリペプチドが 70 マイクロモル濃度未満の K_d^* を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記増強された ラセンポリペプチドが 1 ~ 10 マイクロモル濃度の K_d^* を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記増強された ラセンポリペプチドが 0.1 ~ 50 % というヒト血液中の推定遊離画分を保有し、ここで該推定遊離画分が式

【化 45】

$$\text{遊離画分} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [HSA]_{\text{総}}}$$

によって規定され、かつ $[HSA]_{\text{総}}$ が 700 マイクロモル濃度である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記増強された ラセンポリペプチドが 0.5 ~ 10 % というヒト血液中の推定遊離画分を保有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記増強された ラセンポリペプチドの前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸のうちの少なくとも 1 つが , - 二置換アミノ酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記増強された ラセンポリペプチドの前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸の両方が , - 二置換されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸が、3 つまたは 6 つのアミノ酸で隔てられている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記架橋剤が - ラセンの 1 ターンまたは 2 ターンに架かる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記架橋剤の長さが - ラセンの 1 ターンあたり 5 ~ 9 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記増強された ラセンポリペプチドが pH 7.4 で正味の正の電荷を担持する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記増強された ラセンポリペプチドが治療効果を提供する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記増強された ラセンポリペプチドが、1 マイクロモル濃度以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記増強された ラセンポリペプチドが、3 マイクロモル濃度以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記増強された ラセンポリペプチドが、10 マイクロモル濃度以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで K_d^* が式
【化 4 6】

$$EC'_{50} = EC_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{EC_{50}}} \right)$$

10

によって規定され、

ここで n が 1 であり、かつ EC_{50} がヒト血清の非存在下での全細胞アッセイで測定されるインビトロの効力であり、かつ EC'_{50} が $N\%$ のヒト血清における全細胞アッセイで測定されたインビトロの効力であり、 P が $(N/100) \times (700)$ マイクロモル濃度である、方法。

【請求項 17】

前記増強された ラセンポリペプチドが、ハロゲン、アルキル基、蛍光性部分、親和性標識、標的部分、または放射性同位元素のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

20

前記増強された ラセンポリペプチドの前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸が、3 つのアミノ酸で隔てられている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記増強された ラセンポリペプチドの前記架橋剤が、6 と 14 との間の連続した結合を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記増強された ラセンポリペプチドの前記架橋剤が、8 と 12 との間の連続した結合を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記増強された ラセンポリペプチドが 18 原子 ~ 26 原子の環を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記増強された ラセンポリペプチドの前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸が、6 つのアミノ酸で隔てられている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記増強された ラセンポリペプチドの架橋剤が 8 と 16 との間の連続した結合を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記増強された ラセンポリペプチドの架橋剤が 10 と 13 との間の連続した結合を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 25】

前記増強された ラセンポリペプチドが 29 原子 ~ 37 原子の環を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記増強された ラセンポリペプチドの架橋剤が - ラセンの 1 ターン ~ 5 ターンまでの間に架かる、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

50

この出願は、2008年9月22日に出願された表題「Organic Compounds」の米国仮出願第61/099,063号(代理人整理番号35224-742,102)の利益を主張する。この仮出願は、参考としてその全体が本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

組み換えまたは合成的に産生したペプチドは、医薬として重要な適用を有する。しかしペプチドは、代謝安定性が劣り、細胞透過性が劣り、かつ高次構造の可塑性に起因して乱雑な(promiscuous)結合を受ける場合が多い。これらのペプチドを安定化するための1つのアプローチは、アミノ酸側鎖を連結するために、例えば、ジスルフィド結合、アミド結合または炭素-炭素の結合を用いて所望の立体配置でペプチドを維持するための分子内架橋の使用である。例えば、非特許文献1;非特許文献2;非特許文献3;非特許文献4;非特許文献5;非特許文献6;非特許文献7;非特許文献8;非特許文献9;特許文献1(Verdineら)(ペプチドがC-C結合形成反応を受けることができる少なくとも2つの反応性部分を含む、天然および非天然のアミノ酸を含む架橋された安定化らせんペプチドを記載している);および特許文献2(Grubbsら)(2つ以上の不飽和C-C結合を含む前駆体からの高次構造的に制限され/環状の安定化したペプチドおよびペプチド模倣物の合成を記載している)(これらの特許および刊行物の内容は参照によって本明細書に援用される)を参照のこと。分子内架橋によって高次構造的に安定化されるこのようなポリペプチドは、時には、「ステーブルされた(stapled)」ポリペプチドと呼ばれる。

【0003】

これらの架橋ポリペプチドの主な利点は、それらの「ステーブルされていない(non-stapled)」対応物(counterpart)に対して細胞膜を透過する能力が増強されているということである。この細胞取り込みは、エンドサイトーシスを利用する活性な輸送機構によって媒介されると考えられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許第7,192,713号明細書

【特許文献2】米国特許第5,811,515号明細書

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Jacksonら、J. Am. Chem. Soc. (1991) 113: 9391~9392

【非特許文献2】Phelanら、J. Am. Chem. Soc. (1997) 119: 455~460

【非特許文献3】Taylor、Biopolymers (2002) 66: 49~75

【非特許文献4】Brunelら、Chem. Commun. (2005) (20): 2552~2554

【非特許文献5】Hiroshigeら、J. Am. Chem. Soc. (1995) 117: 11590~11591

【非特許文献6】Blackwellら、Angew. Chem. Int. Ed. (1998) 37: 3281~3284

【非特許文献7】Schafmeisterら、J. Am. Chem. Soc. (2000) 122: 5891~5892

【非特許文献8】Walenskyら、Science (2004) 305: 1466~1470

【非特許文献9】Bernalら、J. Am. Chem. Soc. (2007) 129: 2456~2457

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

細胞へのペプチドの進入を容易にする物理的な特徴のいくつかによって、アルブミンのような血清タンパク質への架橋されたペプチドの親和性が増大される傾向である。結果として、多くの極めて有望なリード類 (leads) で、顕著な「血清シフト」が示され、ここでは、血清なしの媒体を用いるアッセイでの活性に比較して、インビボでは、または血清ベースの媒体を有するアッセイでは、活性の大きい低下があり、治療適用もしくは診断適用のために最適ではないペプチドがもたらされる。しかし、血清結合が低レベルである架橋されたポリペプチドは、細胞透過が劣り、同様に、薬物動態も劣る (例えば、急速な腎臓クリアランスまたは初回通過クリアランス)。本発明はこの問題および他の問題に取り組む。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の要旨

本発明は、血清の存在下で良好な活性を可能にするように、血清タンパク質に対して親和性が低下しており、一方で細胞内へ容易に輸送されるように細胞膜に対する十分な親和性を維持したままであり、受容可能な薬物動態を有するように血清タンパク質に対する十分な親和性を維持しており、かつ細胞内の標的レセプター (単数または複数) に対する高い親和性結合を保持している、架橋ポリペプチドの特定および最適化のための方法を開示する。本発明者らは、これらの目的を達成するためには架橋ポリペプチドへの血清タンパク質結合の最適範囲があることを発見した。本発明はさらに、血清の存在下での優れた細胞透過および生物学的活性、ならびに改善された治療効力または診断活性を有する架橋ポリペプチドの最適化を可能にする構造 - 活性相関を有する最適化合物を提供する。

20

【0008】

一実施形態では、本発明は、ヒト全血において有効性が改善された架橋ポリペプチドを特定する方法を提供し、この方法は、親の架橋ポリペプチドのアナログを合成する工程と、ヒト血清タンパク質の非存在下で、また1つ以上の濃度のヒト血清の存在下で細胞アッセイを行い、それによってヒト血清タンパク質に対する各々の架橋ポリペプチドのみかけの親和性を決定する工程とを包含する。

30

【0009】

別の実施形態では、本発明は、ヒト全血で細胞効力 (cellular efficacy) が最適であるポリペプチドを調製する方法を提供し、この方法は、a) このポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含む親ポリペプチドを提供する工程であって、ここでこの親ポリペプチドがエネルギー依存性プロセスによって細胞膜を透過し、細胞内標的に結合する工程と； b) 疎水性が高い側鎖に隣接した酸性の側鎖からなるこの親ポリペプチド中の1つ以上のジペプチドモチーフを特定する工程であって、この酸性の側鎖が標的に結合するのに必須ではない工程と； c) このモチーフ中の酸性の側鎖を中性の側鎖で置き換えて改変された親ポリペプチドを調製する工程と； d) 全細胞アッセイ中の改変された親ポリペプチド (単数および複数) のインビトロの効力を測定する工程であって、ここで活性が、ヒト血清の有無において、細胞内標的に結合することによって媒介される工程と； e) ヒト血清タンパク質に対するこの改変されたポリペプチドの見かけの親和性 (K_d^*) およびその EC_{50} を算出する工程と； f) 上記改変された親ポリペプチドがより高い K_d^* およびこの親ポリペプチド以下の EC_{50} を有する場合、この改変された親ポリペプチドを最適化ポリペプチドとして選択する工程と、を包含する。いくつかの実施形態では、 K_d^* は式

40

【0010】

【化 1】

$$EC'_{50} = EC_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{EC_{50}}} \right)$$

であって、

ここで n が 1 であり、 EC_{50} がヒト血清の非存在下での全細胞アッセイで測定されるインビトロの効力であり、かつ EC'_{50} が $N\%$ のヒト血清における全細胞アッセイで測定されたインビトロの効力であり、ここで P が $(N/100) \times (700)$ マイクロモルである式によって規定される。

【0011】

この方法のいくつかの実施形態では、このジペプチドモチーフ中の酸性および疎水性が高い側鎖の両方とも標的に結合するのに必須ではなく、かつそれぞれ中性および疎水性のより低い側鎖で置換されている。

【0012】

例えば、本発明は、上記ポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含むポリペプチドであって、エネルギー依存性のプロセスによって細胞膜を透過し、かつ細胞内標的に結合する、ポリペプチドをスクリーニングする方法を提供し、この方法は、ヒト血清の有無において全細胞アッセイでこのポリペプチドのインビトロ効力を測定する工程と；ヒト血清タンパク質に対するこのポリペプチドのみかけの親和性 (K_d^*) を算出する工程とであって、ここで K_d^* は式

【0013】

【化 2】

$$EC'_{50} = EC_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{EC_{50}}} \right)$$

で、ここで n が 1 であり、 EC_{50} がヒト血清の非存在下での全細胞アッセイで測定されるインビトロの効力であり、 EC'_{50} が $N\%$ のヒト血清における全細胞アッセイで測定されたインビトロの効力であり、ここで P が $(N/100) \times (700)$ マイクロモル (micromolar) である式によって規定される、工程と；1～700 マイクロモル、例えば、1～70 マイクロモル、例えば、10～70 マイクロモルの K_d^* を有する化合物を選択する工程とを包含する。例えば、選択される化合物は、0.1～50%、例えば、0.5～10% というヒト血液中の推定遊離画分を保有し得、ここでこの推定遊離画分が式

【0014】

【化 3】

$$\text{遊離画分} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [HSA]_{\text{総}}}$$

によって規定され、かつ $[HSA]_{\text{総}}$ は 700 マイクロモルである。

10

20

30

40

50

【0015】

本方法のいくつかの実施形態では、生物学的活性（EC50）は、培養細胞がこのポリペプチドの有効濃度に曝されるインビトロアッセイで死滅させられた細胞数の割合として測定される。

【0016】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、架橋ポリペプチドの見かけの血清結合親和性（ K_d^* ）が1、3、10、70マイクロモル以上であるように選択される。他の実施形態では、架橋ポリペプチドの K_d^* は、1～10、70または700マイクロモルである。他の実施形態では、この架橋ポリペプチドは、0.1～50%または0.15～10%というヒト血液中の推定遊離画分を有するように選択される。

10

【0017】

本発明はさらに、本発明の方法を用いるか、または別の方法で本発明の基準を満たす、選択されたポリペプチドを提供する。例えば、いくつかの実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、1マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、3マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、10マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、70マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、1～70マイクロモルというヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、1～700マイクロモルというヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。いくつかの実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、0.1～50%という全血中の推定遊離画分を有する。別の実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、0.5～10%という全血中の推定遊離画分を有する。

20

【0018】

本方法のいくつかの実施形態では、上記ポリペプチドは、1つの架橋を含む。本発明の他の実施形態では、上記ポリペプチドは2つの架橋を含む。

【0019】

本方法のいくつかの実施形態では、1つの架橋が2つの炭素原子を接続する。本方法の他の実施形態では、1つの架橋が結合される1つの炭素原子を式R-の置換基で置換する。本方法の別の実施形態では、1つの架橋が連結されている2つの炭素原子が式R-の独立した置換基で置き換えられる。

30

【0020】

本発明の方法の一実施形態では、R-はアルキルである。例えば、R-はメチルである。あるいは、R-および1つの架橋の任意の部分は一緒になって、環状構造を形成し得る。本方法の別の実施形態では、1つの架橋は、連続した炭素-炭素結合から形成される。例えば、1つの架橋は、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続した結合を含んでもよい。他の実施形態では、1つの架橋は、少なくとも7、8、9、10または11個の炭素原子を含んでもよい。

40

【0021】

この方法のいくつかの実施形態では、この架橋ポリペプチドは、エネルギー依存性のプロセスによって細胞膜を透過し、かつ細胞内標的に結合する。

【0022】

別の実施形態では、改善された架橋ポリペプチドは、BCL-2ファミリーメンバーのらせんドメインを含む。例えば、架橋ポリペプチドは、BH3ドメインを含む。他の実施形態では、この架橋ポリペプチドは、例えば、BLASTアルゴリズムで測定した場合、表1、2、3および4の任意の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%または95%の配列同一性を有する。

【0023】

50

本発明はさらに、障害のリスクがある（または罹りやすい）か、または異常（例えば、不十分または過剰な）BCL-2ファミリーメンバーの発現または活性に関連する障害（例えば、外因性または内因性のアポトーシス経路異常）を有する、被験体を処置する予防方法および治療方法において本発明の改善された架橋ポリペプチドを用いる；ならびに過剰増殖性細胞、例えば腫瘍細胞におけるp53とMDM2との間の相互作用または結合を妨害することによって過剰増殖性疾患を処置または予防するための方法を提供する。

【0024】

本発明のさらなる局面は、下の詳細な説明、実施例、図面および特許請求の範囲から明らかである。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

10

（項目1）

ヒトの全血において最適化された細胞効力を有するポリペプチドを調製する方法であって：

（a）該ポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含む親ポリペプチドを提供する工程であって、ここで該親ポリペプチドがエネルギー依存性プロセスによって細胞膜を透過して、かつ細胞内標的に結合する工程と；

（b）疎水性が高い側鎖に隣接した酸性の側鎖からなる該親ポリペプチド中の1つ以上のジペプチドモチーフを特定する工程であって、該酸性の側鎖が該標的に結合するのに必須ではない工程と；

（c）該モチーフ中の該酸性の側鎖を中性の側鎖で置き換えて改変された親ポリペプチドを調製する工程と；

20

（d）全細胞アッセイ中の該改変された親ポリペプチドポリペプチドのインビトロの効力を測定する工程であって、ここで活性が、ヒト血清の存在および非存在において、該細胞内標的に結合することによって媒介される工程と；

（e）ヒト血清タンパク質に対する該改変されたポリペプチドの見かけの親和性（ K_d^* ）およびその EC_{50} を算出する工程と；

（f）該改変された親ポリペプチドが、該親ポリペプチドの K_d^* よりも高い K_d^* および該親ポリペプチドの EC_{50} 以下の EC_{50} を有する場合、該改変された親ポリペプチドを最適化ポリペプチドとして選択する工程と、

を包含する、方法。

30

（項目2）

ポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含むポリペプチドをスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドが、エネルギー依存性のプロセスによって細胞膜を透過して、かつ細胞内標的に結合する方法であって、

（a）全細胞アッセイ中の該ポリペプチドのインビトロの効力を測定する工程であって、ここで活性が、ヒト血清の存在および非存在において、該細胞内標的に結合することによって媒介される工程と；

（b）ヒト血清タンパク質に対する該ポリペプチドの見かけの親和性（ K_d^* ）およびその EC_{50} を算出する工程と；

（c）1～700マイクロモル濃度の K_d^* を有する化合物を選択する工程と、

40

を包含する、方法。

（項目3）

前記選択されたポリペプチドが70マイクロモル濃度未満の K_d^* を有する、項目1または2に記載の方法。

（項目4）

前記選択されたポリペプチドが約1～10マイクロモル濃度の K_d^* を有する、項目1または2に記載の方法。

（項目5）

前記選択されたポリペプチドが約0.1～50%というヒト血液中の推定遊離画分を保有し、ここで該推定遊離画分が式

50

【化 4 5】

$$\text{遊離画分} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [HSA]_{\text{総}}}$$

によって規定され、かつ [HSA]_総 が 700 マイクロモル濃度である、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 6)

前記選択されたポリペプチドが約 0.5 ~ 10 % というヒト血液中の推定遊離画分を保有する、項目 1 または 2 に記載の方法。

10

(項目 7)

前記エネルギー依存性の細胞透過機構がエンドサイトーシスである、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 8)

前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸のうちの少なくとも 1 つが , - 二置換アミノ酸である、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 9)

前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸の両方が , - 二置換されている、項目 1 または 2 に記載の方法。

20

(項目 10)

前記選択されたポリペプチドがらせんを含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 11)

前記選択されたポリペプチドが らせんを含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 12)

前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸が、3つのアミノ酸で隔てられている、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 13)

前記架橋剤が、6と14との間の連続した結合を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 14)

前記架橋剤が、8と12との間の連続した結合を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

30

(項目 15)

前記選択されたポリペプチドが約 18 原子 ~ 26 原子の環を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 16)

前記第一のアミノ酸および前記第二のアミノ酸が、6つのアミノ酸で隔てられている、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 17)

前記架橋剤が、8と16との間の連続した結合を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 18)

前記架橋剤が、10と13との間の連続した結合を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

40

(項目 19)

前記選択されたポリペプチドが約 29 原子 ~ 37 原子の環を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 20)

前記架橋剤が - らせんの 1 ターン ~ 5 ターンまでの間に架かる、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 21)

前記架橋剤が - らせんの 1 ターンに架かる、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 22)

50

前記架橋剤が - らせんの 2 ターンに架かる、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記架橋剤の長さが - らせんの 1 ターンあたり約 5 ~ 約 9 である、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記選択されたポリペプチドが pH 7 . 4 で正味の正の電荷を担持する、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記選択されたポリペプチドが、1 つ以上のハロゲン、アルキル基、蛍光性部分、親和性標識、標的部分または放射性同位元素のうちの 1 つ以上を含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

10

(項目 2 6)

前記選択されたポリペプチドが治療効果を提供する、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記選択されたポリペプチドが、約 1 マイクロモル濃度以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記選択されたポリペプチドが、約 3 マイクロモル濃度以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記選択されたポリペプチドが、約 1 0 マイクロモル濃度以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する、項目 1 または 2 に記載の方法。

20

(項目 3 0)

前記選択されたポリペプチドが、対応する非架橋ポリペプチドに比べて、エネルギー依存性のプロセスによって細胞膜を透過する能力が改善されている、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記ジペプチドモチーフ中の前記酸性側鎖および前記疎水性が高い側鎖が前記標的に結合するのに必須ではなく、それぞれ中性または疎水性がより低い側鎖で置換されている、項目 1 に記載の方法。

30

(項目 3 2)

前記ポリペプチドの第一のアミノ酸および第二のアミノ酸を接続する架橋剤を含むポリペプチドであって、エネルギー依存性のプロセスによって細胞膜を透過し、かつ細胞内標的に結合する、項目 1 または 2 に記載の方法によって選択される、ポリペプチド。

(項目 3 3)

異常な BCL - 2 ファミリーメンバーの発現または活性に関連する障害を処置または制御する方法であって、該処置または制御の必要な被験体に対して項目 1 ~ 3 2 のいずれかに記載のポリペプチドの有効量を投与する工程を包含する、方法。

(項目 3 4)

過剰増殖性細胞において、MAM L タンパク質と Not c h タンパク質または C S L タンパク質との間の相互作用または結合によって媒介される過剰増殖性の疾患または状態を処置または制御する方法であって、該処置または制御の必要な被験体に対して、項目 1 ~ 3 3 のいずれかに記載のポリペプチドの有効量を投与する工程を包含する、方法。

40

(項目 3 5)

異常な BCL - 2 ファミリーメンバーの発現もしくは活性に関連する障害を処置または制御するため、または過剰増殖性細胞において、MAM L タンパク質と Not c h タンパク質または C S L タンパク質との間の相互作用もしくは結合によって媒介される過剰増殖性の疾患または状態を処置または制御するための医薬の製造における項目 1 ~ 3 4 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

(項目 3 6)

50

項目 1 または 2 に記載の方法であって、ここで K_d^* が式
【化 4 6】

$$EC'_{50} = EC_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{EC_{50}}} \right)$$

10

によって規定され、

ここで n が 1 であり、かつ EC_{50} が任意のヒト血清の非存在下での全細胞アッセイで測定されるインビトロの効力であり、かつ EC'_{50} が $N\%$ のヒト血清における全細胞アッセイで測定されたインビトロの効力であり、 P が $(N/100) \times (700)$ マイクロモル濃度である、方法。

【0025】

文献の引用

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個々の刊行物、特許、または特許出願が、具体的にかつ個々に参照により組み込まれて示されるのと同程度まで、参照により本明細書に援用される。

20

【0026】

本特許または出願は、色つきで作成した少なくとも 1 つの図面を含む。本特許または特許出願公開の色つきの図面（単数または複数）を伴うコピーは、要求および必要な費用の支払いがあれば官庁から提供される。

【0027】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲で詳細に説明される。本発明の特徴および利点は、本発明の原理を利用し、図面を伴った例示的な実施形態を説明する、以下の詳細な説明を参照することにより、さらに十分に理解される。

【図面の簡単な説明】

30

【0028】

【図 1】図 1 は、ヒト血清の種々の濃度の存在下でのペプチド模倣大環状分子（化合物 1）の用量反応曲線を示す。

【図 2】図 2 は、特性が改善されているペプチド模倣大環状分子アナログについての細胞 EC_{50} 対ヒト血清濃度のプロットを示す。

【図 3】図 3 は、特性が改善されているペプチド模倣大環状分子アナログについての細胞 EC_{50} 対ヒト血清濃度のプロットを示す。

【図 4】図 4 は、改善されたペプチド模倣大環状分子アナログのらせんホイールの描写を示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0029】

本明細書において用いる場合、「大環状分子（macrocycle）」という用語は、少なくとも 9 個の共有結合された原子によって形成されるリングまたはサイクルを含む化学構造を有する分子を指す。

【0030】

本明細書において用いる場合、「ステーブル・ポリペプチド（stapled polypeptide）」または「架橋ポリペプチド」という用語は、同じ分子内の第一の天然に存在するアミノ酸残基、または天然に存在しないアミノ酸残基（またはアナログ）および第二の天然に存在するアミノ酸残基、または天然に存在しないアミノ酸残基（またはアナログ）の間で大環状分子を形成する、複数のペプチド結合および少なくとも 1 つの大

50

環状分子形成リンカーによって結合された複数のアミノ酸残基を含む化合物を指す。架橋ポリペプチドは、大環状分子形成リンカーが、第一のアミノ酸残基（またはアナログ）の炭素を第二のアミノ酸残基（またはアナログ）の炭素に連結する実施形態を含む。架橋ポリペプチドは必要に応じて、1つ以上のアミノ酸残基および/またはアミノ酸アナログ残基の間の1つ以上の非ペプチド結合を含み、そして必要に応じて、1つ以上の天然に存在しないアミノ酸残基またはアミノ酸アナログ残基を、大環状分子を形成する任意のものに加えて、含む。

【0031】

本明細書において用いる場合、「安定性」という用語は、円二色性、NMR、または別の生物物理学的手段によって測定される、本発明の架橋されたポリペプチドによって溶液中で規定される二次構造の維持、またはインビトロもしくはインビボにおけるタンパク質分解性の分解に対する抵抗性を指す。本発明において企図される二次構造の非限定的な例は、 α -らせん、 β -ターン、および β -ブリーツシートである。

【0032】

本明細書において用いる場合、「らせん(helical)安定性」という用語は、円二色性またはNMRによって測定される、本発明の架橋ポリペプチドによるらせん構造の維持を指す。例えば、いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドは、R-置換基を欠いている対応する大環状分子と比較して、円二色性によって決定される α -らせん度において、少なくとも1.25、1.5、1.75、または2倍の増大を示す。

【0033】

「 α -アミノ酸」または単に「アミノ酸」という用語は、 α -炭素と呼ばれる炭素に結合したアミノ基およびカルボキシル基の両方を含有する分子を指す。適切なアミノ酸としては、限定するものではないが、天然に存在するアミノ酸のD-異性体およびL-異性体の両方、ならびに有機合成または他の代謝経路によって調製される天然に存在しないアミノ酸が挙げられる。文脈が具体的に別のことを示さない限り、本明細書において使用されるアミノ酸という用語は、アミノ酸アナログを含むものとする。

【0034】

「天然に存在するアミノ酸」という用語は、自然界において合成されるペプチドにおいて一般に見つけれ、一文字の略語、A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、およびVによって公知の20個のアミノ酸のうちのいずれか1つを指す。

【0035】

「アミノ酸アナログ」または「非天然アミノ酸」という用語は、アミノ酸に構造的に類似しており、かつ架橋ポリペプチドの形成においてアミノ酸の代わりに用いることができる分子を指す。アミノ酸アナログとしては、限定するものではないが、アミノ基とカルボキシル基の間に1つ以上の追加のメチレン基を包含すること（例えば ω -アミノ α -カルボキシ酸）を除いて、または同様に反応性の基によってアミノ基もしくはカルボキシ基が置換されること（例えば第二級もしくは第三級アミンでの第一級アミンの置換またはエステルでのカルボキシ基の置換）を除いて、本明細書において規定されるアミノ酸と構造的に同一である化合物が挙げられる。

【0036】

「非必須」アミノ酸残基は、その必須の生物学的または生化学的活性（例えばレセプター結合または活性化）を消失すること、実質的に改変することなく、ポリペプチドの野生型配列から改変することができる残基である（例えば、BH3ドメインまたはp53MDM2結合ドメイン）。「必須」アミノ酸残基とは、ポリペプチドの野生型配列から改変された場合に、結果として、ポリペプチドの必須の生物学的または生化学的活性を消失し、または実質的に消失することになる残基である。

【0037】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似した側鎖を有するアミノ酸残基と交換される置換である。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野に

10

20

30

40

50

において規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば K、R、H）、酸性の側鎖（例えば、D、E）、非荷電極性側鎖（例えば、G、N、Q、S、T、Y、C）、非極性側鎖（例えば、A、V、L、I、P、F、M、W）、分枝側鎖（例えば、T、V、I）、および芳香族側鎖（例えば、Y、F、W、H）を有するアミノ酸が挙げられる。従って、BH3ポリペプチドにおける、予測される非必須アミノ酸残基は、例えば、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基と交換される。許容できる置換の他の例は、等比体積の（i s o s t e r i c）考慮（例えば、メチオニンに対するノルロイシン）または他の特性（例えば、フェニルアラニンに対する2-チエニルアラニン）に基づく置換である。

【0038】

10

大環状分子または大環状分子形成リンカーと組み合わせて、本明細書において用いられる「メンバー」という用語は、大環状分子を形成し、または大環状分子を形成することができる原子を指し、そして置換基または側鎖の原子を除外する。類推によって、シクロデカン、1,2-ジフルオロ-デカン、および1,3-ジメチルシクロデカンは全て、水素またはフルオロ置換基またはメチル側鎖が大環状分子の形成に参加しないので、10員の大環状分子と考えられる。

【0039】

記号

【0040】

【化4】

20



は、分子構造の一部として用いられる場合、単結合またはトランスもしくはシス二重結合を指す。

【0041】

「アミノ酸側鎖」という用語は、アミノ酸における - 炭素に結合した部分を指す。例えば、アラニンについてのアミノ酸側鎖は、メチルであり、フェニルアラニンについてのアミノ酸側鎖は、フェニルメチルであり、システインについてのアミノ酸側鎖は、チオメチルであり、アスパルテートについてのアミノ酸側鎖は、カルボキシメチルであり、チロシンについてのアミノ酸側鎖は、4-ヒドロキシフェニルメチルであるなどである。他の天然に存在しないアミノ酸側鎖、例えば、自然界において生じるもの（例えば、アミノ酸代謝物）または合成的に作製されるもの（例えば、二置換アミノ酸）もまた含まれる。

30

【0042】

用語「二置換アミノ」酸という用語は、2つの天然または非天然アミノ酸側鎖に結合した炭素（-炭素）に結合したアミノ基およびカルボキシル基の両方を含有する分子または部分を指す。

【0043】

40

「ポリペプチド」という用語は、共有結合（例えば、アミド結合）によって結合した、2個以上の天然に存在するアミノ酸、または天然に存在しないアミノ酸を包含する。本明細書において記載されるポリペプチドとしては、完全長タンパク質（例えば、完全に処理された（p r o c e s s e d）タンパク質）およびより短いアミノ酸配列（例えば、天然に存在するタンパク質の断片または合成ポリペプチド断片）が挙げられる。

【0044】

本明細書において使用される場合、「大環状分子化試薬（m a c r o c y c l i z a t i o n r e a g e n t）」または「大環状分子形成試薬」という用語は、2つの反応基の間の反応を媒介することによって、本発明の架橋ポリペプチドを調製するために用いられ得る任意の試薬を指す。反応性の基は、例えば、アジドおよびアルキンであってもよく

50

、この場合には、大環状分子化試薬としては、限定するものではないが、 CuBr 、 CuI 、または CuOTf などの反応性 Cu(I) 種、ならびにアスコルビン酸またはアスコルビン酸ナトリウムなどの還元剤の添加によってインサイチュにおいて活性 Cu(I) 試薬に変換することができる、 $\text{Cu(CO}_2\text{CH}_3)_2$ 、 CuSO_4 、および CuCl_2 などの Cu(I) 塩を提供する試薬などの Cu 試薬が挙げられる。大環状分子化試薬としては、例えば、 $\text{Cp}^*\text{RuCl(PPh}_3)_2$ 、 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ 、または反応性 Ru(II) 種を提供し得る他の Ru 試薬などの、当該分野において公知の Ru 試薬をさらに挙げることができる。他の場合において、反応基は、末端のオレフィンである。そのような実施形態において、大環状分子化試薬または大環状分子形成試薬は、第VIII族遷移金属カルベン触媒などの、安定した後遷移金属カルベン錯体触媒を含むが、これらに限定されないメタセシス(metathesis)触媒である。例えば、そのような触媒は、+2酸化状態を有し、16の電子数を有し、かつ五配位の Ru および Os 金属中心である。追加の触媒は、Grubbsら、「Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis」Acc.Chem.Res.1995、28、446~452頁および米国特許第5,811,515号において開示される。さらに他の場合において、反応基は、チオール基である。そのような実施形態において、大環状分子化試薬は、例えば、ハロゲン基などの2つのチオール反応性基で官能化されたリンカーである。

【0045】

「ハロ」または「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素、もしくはヨウ素またはその基を指す。

【0046】

「アルキル」という用語は、示された数の炭素原子を含有する、直鎖または分枝鎖である炭化水素鎖を指す。例えば、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ は、基が、その中に1~10個(両端を含む)の炭素原子を有することを示す。いかなる数の指示もない場合、「アルキル」とは、その中に1~20個(両端を含む)の炭素原子を有する鎖(直鎖または分枝鎖)である。

【0047】

「アルキレン」という用語は、二価アルキル(つまり-R-)を指す。

【0048】

「アルケニル」という用語は、1つ以上の炭素-炭素二重結合を有する直鎖または分枝鎖である炭化水素鎖を指す。アルケニル部分は、示された数の炭素原子を含有する。例えば、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ は、その基が、その中に2~10個(両端を含む)の炭素原子を有することを示す。「低級アルケニル」という用語は、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルケニル鎖を指す。いかなる数の指示もない場合、「アルケニル」とは、その中に2~20個(両端を含む)の炭素原子を有する鎖(直鎖または分枝鎖)である。

【0049】

「アルキニル」という用語は、1つ以上の炭素-炭素三重結合を有する直鎖または分枝鎖である炭化水素鎖を指す。アルキニル部分は、示された数の炭素原子を含有する。例えば、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ は、その基が、その中に2~10個(両端を含む)の炭素原子を有することを示す。「低級アルキニル」という用語は、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルキニル鎖を指す。いかなる数の指示もない場合、「アルキニル」とは、その中に2~20個(両端を含む)の炭素原子を有する鎖(直鎖または分枝鎖)である。

【0050】

「アリール」という用語は、6個の炭素の単環式または10個の炭素の二環式芳香族環系を指し、ここで各々の環の0、1、2、3、または4個の原子は、置換基によって置換される。アリール基の例としては、フェニル、ナフチルなどが挙げられる。「アリールアルキル」という用語または「アラルキル」という用語は、アリールで置換されたアルキルを指す。「アリールアルコキシ(aryloxy)」という用語は、アリールで置換されたアルコキシを指す。

【0051】

10

20

30

40

50

10

「アリールアミド」とは、上記に規定されるアリール基であって、そのアリール基の水素原子のうちの1つが、1つ以上の $-C(O)NH_2$ 基で置き換えられているものを指す。アリールアミド基の代表的な例としては、2- $C(O)NH_2$ -フェニル、3- $C(O)NH_2$ -フェニル、4- $C(O)NH_2$ -フェニル、2- $C(O)NH_2$ -ピリジル、3- $C(O)NH_2$ -ピリジル、および4- $C(O)NH_2$ -ピリジルが挙げられる。

20

30

40

50

【0057】

「シクロアルキル」という用語は、本明細書において用いる場合、3～12個の炭素、好ましくは3～8個の炭素、およびより好ましくは3～6個の炭素有する飽和環式炭化水素基および部分的に不飽和の環式炭化水素基であって、ここでそのシクロアルキル基が、必要に応じてさらに置換されている環式炭化水素基を包含する。いくつかのシクロアルキル基としては、限定するものではないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。

【0058】

「ヘテロアリール」という用語は、単環式である場合、1～3個のヘテロ原子、二環式である場合、1～6個のヘテロ原子、または三環式である場合、1～9個のヘテロ原子を有する芳香族の5～8員の単環式、8～12員の二環式、または11～14員の三環式環系を指し、このようなヘテロ原子は、O、N、またはSから選択され（例えば、炭素原子と、単環式、二環式、または三環式である場合、それぞれ、1～3、1～6、または1～9個のO、N、またはSのヘテロ原子）、ここで各々の環の0、1、2、3、または4個の原子が、置換基によって置換されている。ヘテロアリール基の例としては、ピリジル、フリル、またはフラニル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チオフェニル、またはチエニル、キノリニル、インドリル、チアゾリルなどが挙げられる。

【0059】

「ヘテロアリーラルキル」という用語または「ヘテロアラルキル」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルキルを指す。「ヘテロアリーラルコキシ」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルコキシを指す。

【0060】

「ヘテロアリーラルキル」という用語または「ヘテロアラルキル」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルキルを指す。「ヘテロアリーラルコキシ」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルコキシを指す。

【0061】

「ヘテロシクリル」という用語は、単環式である場合、1～3個のヘテロ原子、二環式である場合、1～6個のヘテロ原子、または三環式である場合、1～9個のヘテロ原子を有する非芳香族の5～8員の単環式、8～12員の二環式、または11～14員の三環式環系を指し、このようなヘテロ原子は、O、N、またはSから選択され（例えば、炭素原子と、単環式、二環式、または三環式である場合、それぞれ、1～3、1～6、または1～9個のO、N、またはSのヘテロ原子）、各々の環の0、1、2、または3個の原子は、置換基によって置換される。ヘテロシクリル基の例としては、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル(dioxanyl)、モルホリニル、テトラヒドロフラニルなどが挙げられる。

【0062】

「置換基」という用語は、任意の分子、化合物、または部分の上の水素原子などの第2の原子または基を交換する基を指す。適切な置換基としては、限定するものではないが、ハロ、ヒドロキシ、メルカプト、オキソ、ニトロ、ハロアルキル、アルキル、アルカリル、アリール、アラルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、アリールオキシ、アミノ、アルコキシカルボニル、アミド、カルボキシ、アルカンシルホニル、アルキルカルボニル、およびシアノ基が挙げられる。

【0063】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、1つ以上の不斉中心を含有し、従ってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一の鏡像異性体、個々のジアステレオマー、ならびにジアステレオマー混合物として存在する。これらの化合物の全てのそのような異性体形態は、別段明確に規定されない限り、本発明に含まれる。いくつかの実施形態において、本発明の化合物はまた、複数の互変異性形態で表され、そのような事例において、本発明は、本明細書において記載される化合物の全ての互変異性形態を含む（例えば、環系の

10

20

30

40

50

アルキル化が、複数の部位でアルキル化をもたらす場合、本発明は、全てのそのような反応産物を含む)。そのような化合物の全てのそのような異性体形態は、別段明確に規定されない限り、本発明に含まれる。本明細書において記載される化合物の全ての結晶形態は、明確に規定されない限り、本発明に含まれる。

【0064】

本明細書において用いる場合、「増加」および「減少」という用語は、統計的に有意に(すなわち、 $p < 0.1$)、それぞれ、少なくとも5%の増加または減少を引き起こすことを意味する。

【0065】

本明細書において用いる場合、変数についての数値的な範囲の記述は、本発明が、その範囲内の値のうちのいずれかに等しい変数で実行されてもよいことを伝えるように意図される。従って、本質的に不連続の変数については、変数は、その範囲の終点を含む数値的な範囲内の任意の整数値と等しい。同様に、本質的に連続の変数については、変数は、その範囲の終点を含む数値的な範囲内の任意の実際の値と等しい。例として、限定するものではないが、0および2の間の値を有するとして記載される変数は、その変数が本質的に不連続の場合、値0、1、または2をとり、その変数が本質的に連続の場合、値0.0、0.1、0.01、0.001、または任意の他の実際の値0かつ2をとる。

【0066】

本明細書において用いる場合、具体的に別のことを示されない限り、「または(あるいは、もしくは)」という単語は、「いずれか/または」の排他的な意味ではなく、「および/または」の包括的な意味で用いられる。

【0067】

「平均して」という用語は、各データポイントについての、少なくとも3回の独立した反復の実行に由来する平均値を表す。

【0068】

「生物学的活性」という用語は、本発明の大環状分子の構造的および機能的特性を包含する。生物学的活性は、例えば、構造的安定性、らせん度、標的に対する親和性、タンパク質分解性の分解に対する抵抗性、細胞透過性、細胞内安定性、インビボ安定性、またはその任意の組合せである。

【0069】

本発明の1つ以上の特定の実施形態の詳細は、添付の図面および下記の説明において記載される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、本明細書本文および図面からならびに本特許請求の範囲から明白となる。

【0070】

本発明の架橋ポリペプチドの生物学的特性

一実施形態では、本発明は、ヒト全血において効力が改善された架橋ポリペプチドを特定する方法を提供し、この方法は、親架橋ポリペプチドのアナログを合成する工程と、ヒト血清タンパク質の非存在下で、およびヒト血清についての2つ以上の濃度の存在下でも細胞アッセイを行って、ヒト血清タンパク質の各々の架橋ポリペプチドの見かけの親和性を決定し、かつ数学的外挿によって全血中のEC50を算出する工程とを包含する。

【0071】

いくつかの実施形態では、上記ポリペプチドは、上記架橋ポリペプチドのみかけの結合親和性(K_d^*)が1、3、10、70マイクロモル以上であるように選択される。他の実施形態では、上記架橋ポリペプチドの K_d^* は1~10、70または700マイクロモルである。他の実施形態では、この架橋ポリペプチドは、0.1~50%、または0.15~10%というヒト血液中の推定遊離画分を保有するように選択される。

【0072】

いくつかの実施形態では、EC50シフト分析による血清タンパク質についてのみかけの K_d 値を用いて、HSAおよび他の血清タンパク質に結合する実験的化合物の傾向(propensity)を定量する簡易かつ迅速な手段が得られる。血清タンパク質の存在

10

20

30

40

50

下におけるみかけの EC_{50} (EC'_{50}) とインビトロアッセイに添加された血清タンパク質の量との間には線形の関係が存在する。この関係は、 K_d^* として表される血清タンパク質についての化合物の結合親和性によって規定される。この用語は、複数の実験的に識別不能な結合事象の累積効果から生じ得る、実験的に決定されるみかけの解離定数である。この関係の形態はここでは式 0.1 に示しており、その導出は、その内容が本明細書において参照によって援用される Copelandら、Bjorg. Med. Chem. Lett., 2004, 14: 2309~2312 に見出され得る。

【0073】

【化5】

$$(0.1) \quad EC'_{50} = EC_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{EC_{50}}} \right)$$

10

血清タンパク質結合のかなりの割合が、血清中で HSA が極めて高濃度であることに起因する ($35 \sim 50 \text{ g/L}$ または $530 \sim 758 \mu\text{M}$)、この HSA との薬物相互作用に帰せられ得る。これらの化合物の K_d 値を算出するために、本発明者らは、タンパク質添加の際の EC_{50} におけるシフトが、添加された血清に存在する HSA に完全に帰せられ得ると仮定しており、ここで P は 100% の血清について $700 \mu\text{M}$ であり、 P は 10% の血清について $70 \mu\text{M}$ であるなどである。本発明者らは、さらに、上記化合物の全てが 1:1 の化学量論で HSA に結合し、そのため式 (0.1) の項 n は一致して固定されるという簡易な仮定を行う。これらのパラメーターを適切な位置において、本発明者らは、Mathematica 4.1 (Wolfram Research, Inc., www.wolfram.com) を用いて式 1.1 の非線形回帰分析によって、漸増する血清 (および血清タンパク質) 濃度で、 EC_{50} 値における変化から各々のステープルペプチドについての K_d^* 値を算出する。血中の遊離画分は、参照によってその内容が本明細書に援用される Trainor, Expert Opin. Drug Disc., 2007, 2(1): 51~64 から誘導されるように、以下の式 (ここで $[HSA]_{\text{総}}$ は $700 \mu\text{M}$ に設定される) によって概算する。

20

30

【0074】

【化6】

$$(0.2) \quad \text{遊離画分} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [HSA]_{\text{総}}}$$

40

一実施形態では、改善された生物学的活性を、細胞透過性の増大またはアポトーシスを誘導する能力の増大として測定する。さらに他の実施形態では、生物学的活性を、培養された細胞をこのようなポリペプチドの有効濃度に曝すインビトロアッセイで死滅させられた細胞の数の割合として測定する。

【0075】

いくつかの実施形態では、この改善された架橋ポリペプチドは、1 マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋されたポリペプチドは、3 マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋されたポリペプチドは、10 マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。

50

別の実施形態では、この改善された架橋されたポリペプチドは、70マイクロモル以下というヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋されたポリペプチドは、1～70マイクロモルというヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。別の実施形態では、この改善された架橋されたポリペプチドは、1～700マイクロモルというヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性を有する。

【0076】

いくつかの実施形態では、この改善された架橋されたポリペプチドは、0.1～50%という全血中の推定遊離画分を有する。別の実施形態では、この改善された架橋されたポリペプチドは、0.5～10%という全血中の推定遊離画分を有する。

【0077】

本発明の架橋ポリペプチド

細胞内タンパク質、タンパク質ドメインまたは核酸標的(単数または複数)との相互作用によって生物学的活性を付与すると考えられる、二次構造を含む公知の一次アミノ酸配列を有する任意のタンパク質またはポリペプチドが、本発明の主題である。例えば、ポリペプチドの配列は、分析することが可能で、大環状分子化(macrocyclization)試薬と反応性の基を含有するアミノ酸アナログは、適切な位置で置換することができる。適切な位置は、二次構造のどの分子表面(単数または複数)が、生物学的活性に必要とされ、従って、どの他の表面(単数または複数)を介して、本発明の大環状分子形成リンカーが、生物学的活性に必要とされる表面(単数または複数)を立体的にブロックすることなく、大環状分子を形成することができるかを確認することによって決定される。そのような決定は、活性にとって重要な残基(および表面)を可視化するための、二次構造と天然の結合パートナーとの間の複合体のX線結晶解析などの方法を用いるか；活性にとって重要な残基(および表面)を機能的に同定するための、二次構造における残基の配列の変異誘発によるか；または他の方法によって行われる。そのような決定によって、適切なアミノ酸は、本発明のアミノ酸アナログおよび大環状分子形成リンカーで置換される。例えば、らせん二次構造については、らせんの1つの表面(例えば、らせんの軸に沿って縦方向にかつらせんの軸のまわりで45～135°で放射状にわたる分子表面)は、生物学的活性のために、インビボまたはインビトロにおいて、別の生体分子と接触するために必要とされる場合がある。そのような場合において、大環状分子形成リンカーは、活性に直接必要とされないその表面の部分におけるらせんの表面に沿って縦方向にのびながら、らせんの2つの炭素を連結するように設計される。

【0078】

本発明のいくつかの実施形態において、ペプチド配列は、タンパク質のBCL-2ファミリーに由来する。BCL-2ファミリーは、BH1、BH2、BH3、およびBH4と呼ばれる、最大4つまでの保存BCL-2相同性(BH)ドメインの存在によって規定され、これらのすべては、らせんセグメントを含む(Chittendenら(1995), EMBO 14:5589; Wangら(1996), Genes Dev. 10:2859)。BCL-2およびBCL-X_Lなどの抗アポトーシスタンパク質は、すべてのBHドメインにおいて配列保存を示す。プロアポトーシスタンパク質は、BH1、BH2、およびBH3ドメインにおいて相同性を有する「多重ドメイン(multidomain)」ファミリーメンバー(例えばBAK、BAX)、ならびにBH3両親媒性らせんセグメントにおいて排他的に配列相同性を含有する「BH3ドメインのみの」ファミリーメンバー(例えばBID、BAD、BIM、BIK、NOXA、PUMA)に分類される。BCL-2ファミリーメンバーは、ホモ二量体およびヘテロ二量体を形成するための能力を有し、このことは、プロアポトーシスタンパク質と抗アポトーシスタンパク質とのレベルの間の競合的な結合および比率が、死刺激に対する感受性を決定する(dictate)ことを示唆している。抗アポトーシスタンパク質は、プロアポトーシス過剰、つまり過剰なプログラム細胞死から細胞を保護するように機能する。追加の「防衛」手段としては、プロアポトーシスタンパク質の転写を調節すること、および、プロアポトーシ

10

20

30

40

50

スタンパク質を不活性なコンフォーマーとして維持することが挙げられる。死促進 (pro-death) 機能を活性化するために、タンパク質分解性の活性化、脱リン酸化、またはリガンド誘導性コンホメーション変化のいずれかが必要である。ある種の細胞型において、原形質膜で受け取られた死シグナルは、ミトコンドリア経路を介してアポトーシスを引き起こす。ミトコンドリアは、カスパーゼ9を活性化する、細胞質ゾル複合体の重要な成分であるシトクロムcを隔離することにより、細胞死の門番 (gatekeeper) としての役割を担うことができ、これによって下流における致死的なタンパク質分解事象が生じる。BCL-2/BCL-X_L および BAK/BAK などの多重ドメインタンパク質は、ミトコンドリア膜で保護者および実行者といった対立する (dueling) 役割を果たし、それらの活性は、BCL-2ファミリーの上流のBH3のみのメンバーによってさらに調節される。例えば、BIDは、プロアポトーシスのタンパク質のBH3ドメインのみのファミリーのメンバーであり、原形質膜で受け取られる死シグナルを、ミトコンドリア膜のエフェクタープロアポトーシスタンパク質に伝達する。BIDは、プロアポトーシスタンパク質および抗アポトーシスタンパク質の両方と相互作用する能力を有し、カスパーゼ8による活性化に際して、シトクロムc放出およびミトコンドリアのアポトーシスを引き起こす。欠失および変異誘発の研究により、プロアポトーシスファミリーメンバーの両親媒性 - らせんBH3セグメントが、死ドメインとして機能する場合があります、従って、多重ドメインアポトーシスタンパク質と相互作用するための重要な構造的モチーフに相当する (represent) 場合があることが確認された。構造的研究によって、BH3らせんが、BH1、2、および3のドメインのインターフェースにより形成される疎水性の溝の中に挿入することによって、抗アポトーシスタンパク質と相互作用することができることが示された。活性化BIDは、抗アポトーシスタンパク質 (例えばBCL-2およびBCL-X_L) によって結合され、それらによって隔離され、そして、プロアポトーシスタンパク質BAKおよびBAKの活性化を引き起こすことができ、シトクロムc放出およびミトコンドリアアポトーシスプログラムをもたらす。BADもまた、その発現がBAK/BAKの活性化を引き起こすBH3ドメインのみのプロアポトーシスファミリーメンバーである。しかしながら、BIDとは対照的に、BADは、抗アポトーシスファミリーメンバーBCL-2およびBCL-X_L に対して優先的な結合を示す。BAD BH3ドメインは、BCL-2に対して高い親和性結合を示すが、BAD BH3ペプチドは、ミトコンドリアからのシトクロムc放出をインビトロにおいて活性化することができず、このことは、BADが、BAK/BAKの直接の活性化因子ではないことを示唆している。BCL-2を過剰発現するミトコンドリアは、BID誘導性シトクロムc放出に対して抵抗性であるが、BADを用いる同時処理は、BID感度を回復することができる。BADによるミトコンドリアアポトーシスの誘発は：(1) BCL-2/BCL-X_L 結合ポケットからの、BIDおよびBID様タンパク質などのBAK/BAK活性化因子の置き換えまたは(2) 抗アポトーシスタンパク質によるBID様タンパク質の隔離を予防するための、BADによる、BCL-2/BCL-X_L 結合ポケットの選択的な占有、のいずれかに起因するように見える。従って、2つのクラスのBH3ドメインのみのタンパク質、すなわち、ミトコンドリアアポトーシスを直接活性化するBID様タンパク質、および、多重ドメイン抗アポトーシスタンパク質の結合ポケットを占有することによって、BID様プロアポトーシスに対する感受性をミトコンドリアに与えるための能力を有するBAD様タンパク質の2つが、明らかになっている。本明細書において開示される方法論に改めることのできるBCL-2ファミリーメンバータンパク質の種々の - らせんドメインは開示されている (Walenskyら (2004), Science 305: 1466; およびWalenskyら、米国特許出願公開第2005/0250680号、これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0079】

他の実施形態では、ペプチド配列は癌遺伝子タンパク質MDM2に結合する腫瘍サプレッサーp53タンパク質に由来する。MDM2結合部位は、 - らせんを形成するp53腫瘍サプレッサーの領域内に位置する。米国特許第7,083,983号 (その内容全体が

10

20

30

40

50

参照によって本明細書に援用される)では、Laneらが、MDM2に対する結合を担うp53の領域が、成熟ヒトp53タンパク質のアミノ酸13~31(PLSQETFSDLWKLLPENNV)によってほぼ示されることを開示する。Laneによって開示される他の改変された配列も本発明で意図される。さらに、p53およびMDM2の相互作用は、Shairら、(1997), Chem. & Biol. 4: 791 (その内容全体が参照によって本明細書に援用される)によって考察されており、かつp53遺伝子における変異は、全ての報告された癌症例の実質半分で特定されている。細胞にストレスが課されるので、p53は、細胞周期停止およびDNA修復、またはプログラミングされた細胞死のいずれかをもたらす応答を組織化すると考えられる。p53タンパク質の機能を直接変更するp53遺伝子の変異と同様、p53は、MDM2における変化によっても変更され得る。MDM2タンパク質は、p53に結合して、p53のトランス活性化ドメインと結合する(associating)ことによって転写活性化を破壊することが示されている。例えば、p53のトランス活性化ドメイン由来の11アミノ酸のペプチドは、MDM2の割れ目に挿入する2.5ターンの両親媒性らせんを形成する。従って、いくつかの実施形態では、本発明の方法によって生成される新規ならせん構造を操作して、らせんアクセプターに緊密に結合し、かつ天然のタンパク質-タンパク質相互作用を破壊する構造を生成する。次いで、これらの構造を、ハイスループットの技術を用いてスクリーニングして、最適な低分子ペプチドを特定する。MDM2相互作用を破壊するこの新規な構造は、多くの適用に有用であり、この適用としては限定するものではないが、軟部組織の肉腫(野性型p53の存在下でMDM2を過剰発現する)の制御が挙げられる。次いで、これらの癌は、いくつかの実施形態では、MDM2を遮断する低分子を用いて防止され、それによってp53の抑制が防止される。さらに、いくつかの実施形態では、MDM2-p53相互作用の低分子破壊因子(disrupter)は、従来の化学療法でp53依存性アポトーシス応答の程度を制御および調節することを補助するアジュバント療法として用いられる。

10

20

【0080】

本発明による最適化のための出発点としての使用のための適切なペプチド配列の非限定的な例示のリストを下記に示す:

【0081】

【表 1 - 1】

表 1

名称	配列 (太字=重要な残基)	架橋配列 (X = x 連結残基)
BH3 ペプチド		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLA QVGD SMDRSIPP	QEDIIRNIARHLA XVGDX SMDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIG DEFN AYYAR	DNRPEIWIAQELR XIGDX FNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRRMS DEFV DSFKK	NLWAAQRYGREL RXMSDX FVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREIGAQLR XMADXL NAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAAR LKALG DELHQRTM	RSSAAQLTAAR LKXLGDXL HQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRKIGDKVYCTW	AELPPEFAAQLR XIGDX VYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIGDKVNLRQKL	VPADLKDECAQLR XIGDX VNLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARK LQCIAD QFHRLHT	QHRAEVQIARK LQXIADX FHRLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAAR LKALG DELHQRT	SSAAQLTAAR LKXLGDXL HQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIG DEMD VSLRA	CMEGSDALALRLA XIGDX MDVSLRA
Snip3	DIERRKEVESILK NSDW IWDWSS	DIERRKEVESIL KXNSDX IWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL GDE LEMIRP	GRLAEVCAVLL XLGD XLEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIG DEL DSNMEL	PQDASTKKSECL XIGDX LDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLA IIGD INRR	PSSTMGQVGRQLA XIGDX INRR
BCL2L1-BH3	KQALREAG DEF ELR	KQALR XAGDX FELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAG DD FSRR	LSPPVVHLALALR XAGDX FSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG DEF ELRY	EVIPMAAVKQALR XAGDX FELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG DEF ETRF	PADPLHQAMR XAGDX FETRF

10

20

30

【 0 0 8 2 】

【表 1 - 2】

名称	配列 (太字=重要な残基)	架橋配列 (X = x 連結残基)
MCL1-BH3	ATSRKLET LRVGD GVQRNHETA	ATSRKLET LRXVGDX GVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL GDE LEQIR	LAEVCTVLL XLGD XLEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRA LGH ENGLDP	MTVGELSRA LGX ENGLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEAL KKSAD WVSDWS	VVEGEKEVEAL KXSAD XVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLVIQ GDD RMKL	SMARDPQRYLV XQGD XRMKL

40

表 1 は、B H 3 結合部位を標的とし、癌、自己免疫障害、代謝性疾患および他のヒト疾患状態に係るヒト配列を挙げている。

【 0 0 8 3 】

【表 2 - 1】

表 2

名称	配列 (太字=重要な残基)	架橋配列 (X = x 連結残基)
BH3 ペプチド		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQV GD SMDRSIPP	QEDIIRNI X RHL X QV GD SMDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIGDEFNAYYAR	DNRPEIWI X QEL X RIGDEFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	NLWAAQRY X REL X RRMSDEFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREI X AQL X RMADDLNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL GDEL HQRTM	RSSAAQLT X ARL X AL GDEL HQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRKIGDKVYCTW	AELPPEF X AQL X KIGDKVYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIGDKVNLQKQL	VPADLKDE X AQL X RIGDKVNLQKQL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQFHLHT	QHRAEVQI X RKL X CIADQFHLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL GDEL HQRT	SSAAQLT X ARL X AL GDEL HQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIGDEMDSVSLRA	CMEGSDAL X LRL X CIGDEMDSVSLRA
Snip3	DIERRKEVESILKKN SD WIWDWSS	DIERRKEV X SIL X KN SD WIWDWSS

10

20

【 0 0 8 4 】

【表 2 - 2】

名称	配列 (太字=重要な残基)	架橋配列 (X = x 連結残基)
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL GDE LEMIRP	GRLAEV X AVL X RL GDE LEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIGDELDNLMEL	PQDASTKK X ECL X RIGDELDNLMEL
BAK-BH3	PSSTMGVGRQLAI IGD DINRR	PSSTMGV X RQL X I IGD DINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAGDEFELR	X QAL X EAGDEFELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAGDDFSRR	LSPPVVHL X LAL X QAGDDFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAGDEFELRY	EVIPMAAV X QAL X EAGDEFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAGDEFETRF	PADPL X QAM X AAGDEFETRF
MCL1-BH3	ATSRKLETLLRRV GD GVQRNHETA	ATSRK X ETL X RV GD GVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL GDE LEQIR	LAEV X TVL X RL GDE LEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGSLDP	MTVGEL X RAL X HENGSLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKE X EAL X KSADWVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLVIQ GDD RMKL	SMARDP X RYL X IQ GDD RMKL

30

40

表 2 は、B H 3 結合部位を標的とし、癌、自己免疫障害、代謝性疾患および他のヒト疾患状態に係るヒト配列を挙げている。

【 0 0 8 5 】

【表 3】

表 3

名称	配列 (太字=重要な残基)	架橋配列 (X = x 連結残基)
P53 ペプチド		
hp53 ペプチド 1	LSQETFS DL WKLLPEN	LSQETFS D <u>X</u> WKLLPE <u>X</u>
hp53 ペプチド 2	LSQETFS DL WKLLPEN	LSQ <u>E</u> X FS D LWK <u>X</u> LPEN
hp53 ペプチド 3	LSQETFS DL WKLLPEN	LSQ <u>X</u> TF S DLW <u>X</u> LLPEN
hp53 ペプチド 4	LSQETFS DL WKLLPEN	LSQETF <u>X</u> D LWKLL <u>X</u> EN
hp53 ペプチド 5	LSQETFS DL WKLLPEN	QSQQTF <u>X</u> N LWRL <u>L</u> X QN

表 3 は、MDM2 / X の p53 結合部位を標的とし、癌に関係するヒト配列を挙げている。

【0086】

【表 4】

表 4

名称	配列 (太字=重要な残基)	架橋配列 (X = x 連結残基)
GPCR ペプチドリガンド		
アンジオテンシン II	DRVYI H PF	DR <u>X</u> Y <u>X</u> HPF
ボンベシン	EQRLGNQWAVGHLM	EQRLGN <u>X</u> WAVGH <u>L</u> <u>X</u>
ブラジキニン	RPPGF S PFR	RPP <u>X</u> FSPFR <u>X</u>
C5a	ISHKDMQLGR	ISHKDM <u>X</u> LGR <u>X</u>
C3a	ARASHLGLAR	ARASHL <u>X</u> LAR <u>X</u>
α -メラニン細胞刺激ホルモン	SYSME H FRWGKPV	SYSM <u>X</u> HFRW <u>X</u> KPV

表 4 は、ヒト G タンパク質共役レセプターを標的とし、かつ多くのヒト疾患状態に関係する配列を挙げている (Tyndall ら (2005)、Chem. Rev. 105:793~826)。

【0087】

本発明の架橋ポリペプチド

この方法のいくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、1つの架橋を含む

。この方法の他の実施形態において、上記ポリペプチドは、2つの架橋を含む。この方法のいくつかの実施形態において、1つの架橋は、2つの - 炭素原子を連結する。この方法の他の実施形態において、1つの架橋が結合した1つの - 炭素原子は、式 R - の置換基で置換されている。この方法の別の実施形態において、1つの架橋が結合している2つの - 炭素原子は、式 R - の独立した置換基で置換される。本発明の方法の一実施形態において、R - は、アルキルである。例えば、R - は、メチルである。あるいは、R - と1つの架橋の任意の部分は一緒になって環状構造を形成することができる。この方法の別の実施形態において、1つの架橋は、連続した炭素 - 炭素結合から形成される。例えば、1つの架橋は、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続した結合を含んでもよい。他の実施形態において、1つの架橋は、少なくとも7、8、9、10、または11個の炭素原子を含んでもよい。

10

【0088】

この方法の別の実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、BCL - 2ファミリーメンバーの - ラセンドメインを含む。例えば、上記架橋ポリペプチドは、BH3ドメインを含む。他の実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、表1、2、3、および4における任意の配列のうち少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、または95%を含む。この方法のいくつかの実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、エネルギー依存性のプロセスによって細胞膜を透過し、細胞内標的に結合する。

【0089】

いくつかの実施形態において、上記ラセンポリペプチドは、1つの架橋を含む。他の実施形態において、上記ラセンポリペプチドは、2つの架橋を含む。

20

【0090】

いくつかの実施形態において、1つの架橋は、2つの - 炭素原子を連結する。他の実施形態において、1つの架橋が結合した1つの - 炭素原子は、式 R - の置換基で置換されている。別の実施形態において、1つの架橋が結合されている2つの - 炭素原子は、式 R - の独立した置換基で置換される。本発明の一実施形態において、R - は、アルキルである。例えば、R - は、メチルである。あるいは、R - と1つの架橋の任意の部分は一緒になって環状構造を形成することができる。別の実施形態において、1つの架橋は、連続した炭素 - 炭素結合から形成される。例えば、1つの架橋は、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続した結合を含んでもよい。他の実施形態において、1つの架橋は、少なくとも7、8、9、10、または11個の炭素原子を含んでもよい。

30

【0091】

別の実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、BCL - 2ファミリーメンバーの - ラセンドメインを含む。例えば、上記架橋ポリペプチドは、BH3ドメインを含む。他の実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、表1、2、3、および4における任意の配列のうち少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、または95%を含む。いくつかの実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、エネルギー依存性のプロセスによって細胞膜を透過し、細胞内標的に結合する。

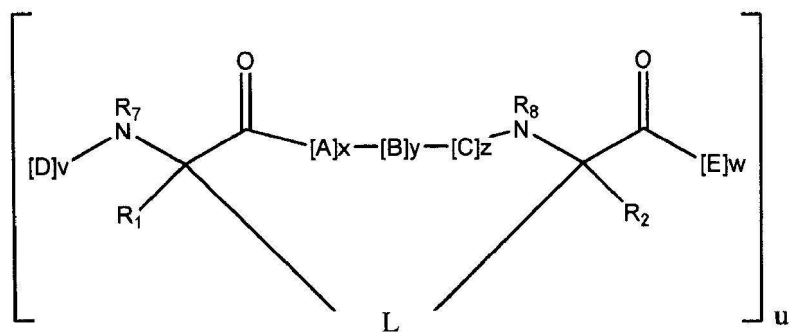
【0092】

いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドは、式 (I) :

40

【0093】

【化 7】



式 I

式 (I)

を有し、

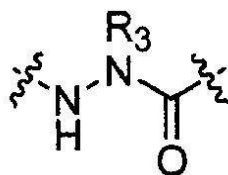
式中：

A、C、D、およびEはそれぞれ独立して、天然または非天然のアミノ酸であり；

Bは、天然もしくは非天然アミノ酸、アミノ酸アナログ、

【 0 0 9 4 】

【化 8】



、[- NH - L₃ - CO -]、[- NH - L₃ - SO₂ -]、または[- NH - L₃ -]
であり；

R₁ および R₂ は独立して、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、またはヘテロシクロアルキルであり；

R₃ は、必要に応じてR₅ で置換される、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルキルアルキル、シクロアリール、またはヘテロシクロアリールであり；

L は、式 - L₁ - L₂ - の大環状分子形成リンカーであり；

L₁ および L₂ は独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、シクロアリーレン、ヘテロシクロアリーレン、または[- R₄ - K - R₄ -]_nであり、それぞれ、必要に応じてR₅ で置換され；

R₄ はそれぞれ、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、またはヘテロアリーレンであり；

Kはそれぞれ、O、S、SO、SO₂、CO、CO₂、またはCONR₃であり；

R₅ はそれぞれ独立して、ハロゲン、アルキル、- OR₆、- N(R₆)₂、- SR₆、- SOR₆、- SO₂R₆、- CO₂R₆、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R₆ はそれぞれ独立して、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R₇ は、必要に応じてR₅ で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、もしくはヘテロシクロアリール、またはD残基を有する

環状構造の一部であり；

R_8 は、必要に応じて R_5 で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、もしくはヘテロシクロアリール、または E 残基を有する環状構造の一部であり；

u は 0 ~ 10 の整数であり；

v は 1 ~ 1000 の整数であり；

w は 1 ~ 1000 の整数であり；

x は 0 ~ 10 の整数であり；

y は 0 ~ 10 の整数であり；

z は 0 ~ 10 の整数であり；かつ

n は 1 ~ 5 の整数である。

【0095】

一例において、 R_1 および R_2 の少なくとも 1 つは、非置換であるかまたはハロ - で置換されるアルキルである。別の例において、 R_1 および R_2 の両方は、独立して、非置換であるかまたはハロ - で置換されるアルキルである。いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも 1 つは、メチルである。他の実施形態において、 R_1 および R_2 は、メチルである。

【0096】

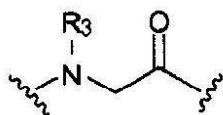
本発明のいくつかの実施形態において、 $x + y + z$ は、少なくとも 3 である。本発明の他の実施形態において、 $x + y + z$ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である。本発明の大環状分子または大環状分子前駆体における、A、B、C、D、または E の各出現 (occurrence) は、独立して選択される。例えば、式 $[A]_x$ によって表される配列は、x が 3 である場合、アミノ酸が同一でない、例えば Glu - Asp - Ala である実施形態、および、アミノ酸が同一である、例えば Glu - Glu - Glu である実施形態を包含する。これは、示される範囲における x、y、または z の任意の値に適用される。

【0097】

いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドは、 α - ラセンである二次構造を含み、 R_8 は、- H であり、ラセン内水素結合を可能にする。いくつかの実施形態において、A、B、C、D、または E の少なくとも 1 つは、 β - 二置換アミノ酸である。一例において、B は、 β - 二置換アミノ酸である。例えば、A、B、C、D、または E の少なくとも 1 つは、2 - アミノイソ酪酸である。他の実施形態において、A、B、C、D、または E の少なくとも 1 つは、

【0098】

【化 9】



である。

【0099】

他の実施形態において、第 1 の C から第 2 の C まで測定される大環状分子形成リンカー L の長さは、第 1 の C から第 2 の C までの間のものを含むが、必ずしもこれらに限定されない、上記架橋ポリペプチドの残基によって形成される α - ラセンなどの所望の二次ペプチド構造を安定させるために選択される。

【0100】

一実施形態において、式 (I) の架橋ポリペプチドは：

【0101】

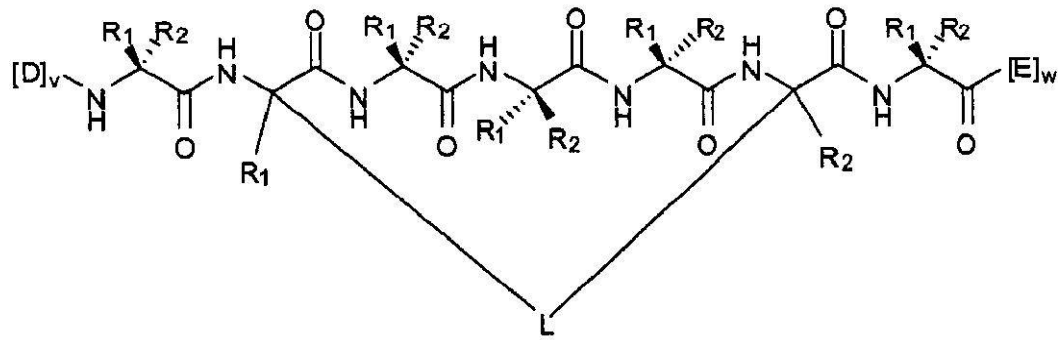
10

20

30

40

【化 1 0】



10

である。

【 0 1 0 2】

ここで、 R_1 および R_2 は各々独立して、独立して、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、もしくはヘテロシクロアルキルである。

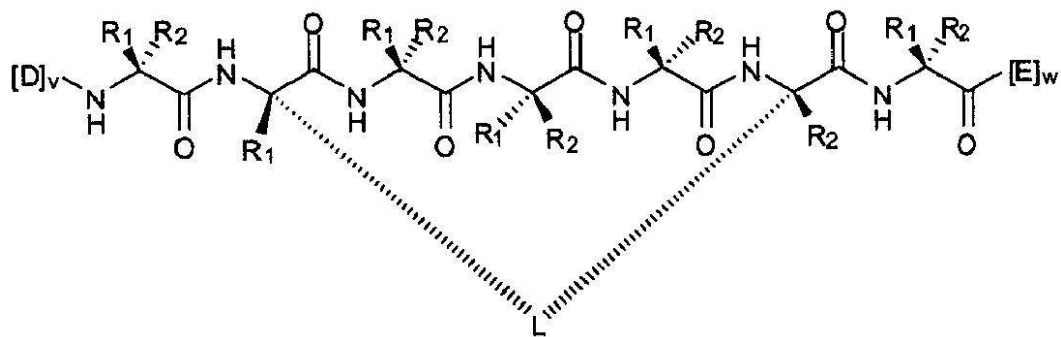
【 0 1 0 3】

関連する実施形態において、式 (I) の架橋ポリペプチドは：

【 0 1 0 4】

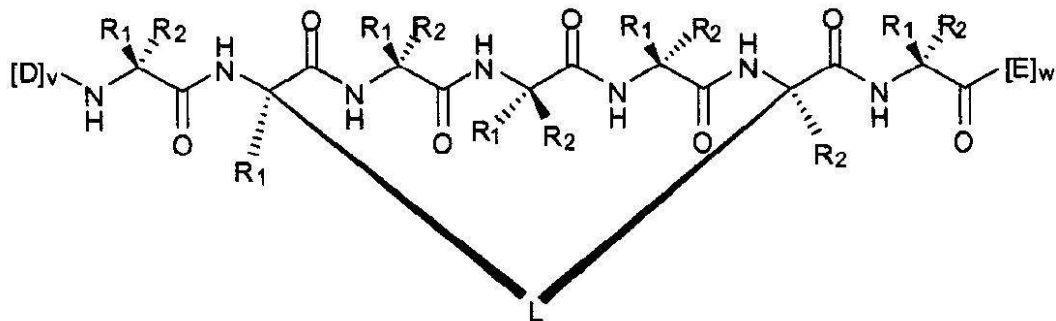
20

【化 1 1】



30

または



40

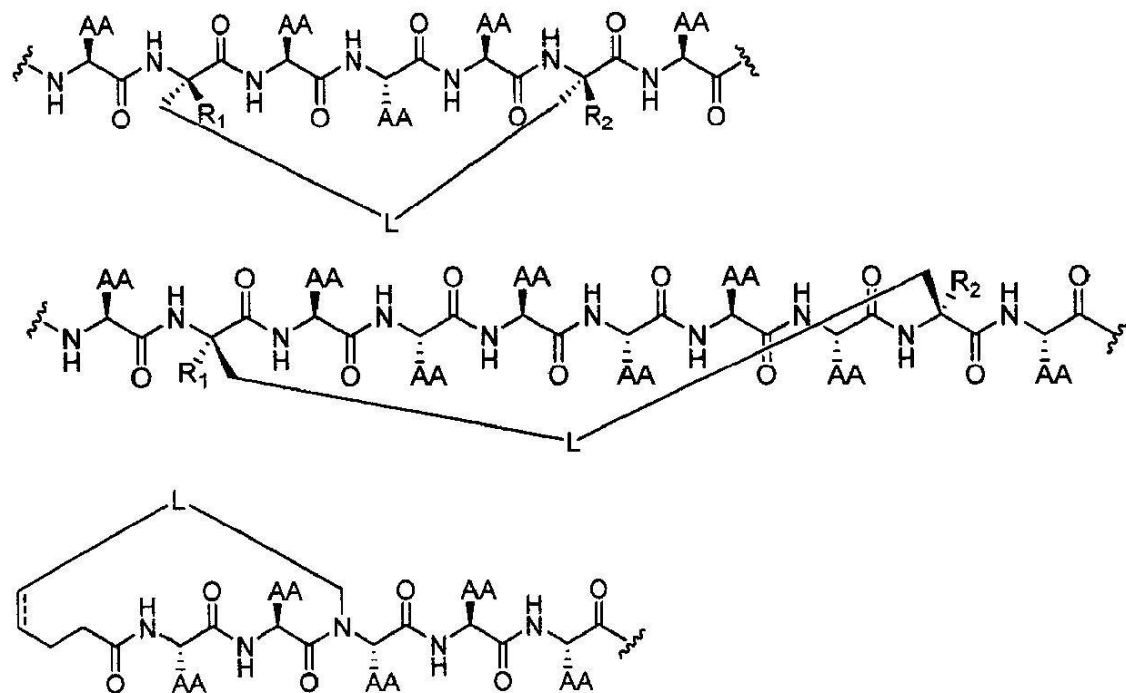
である。

【 0 1 0 5】

他の実施形態において、式 (I) のペプチド模倣大環状分子は、下記に示される任意の式の化合物：

【 0 1 0 6】

【化 1 2】

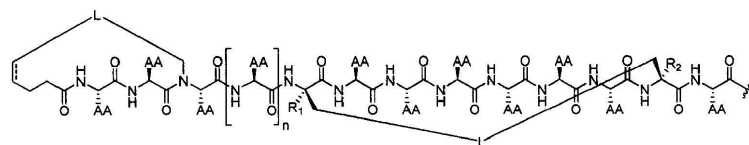
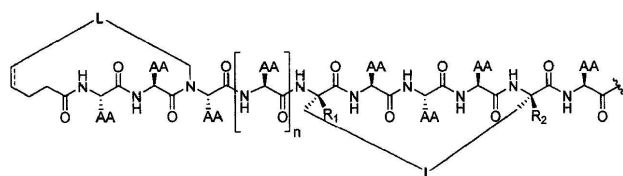


10

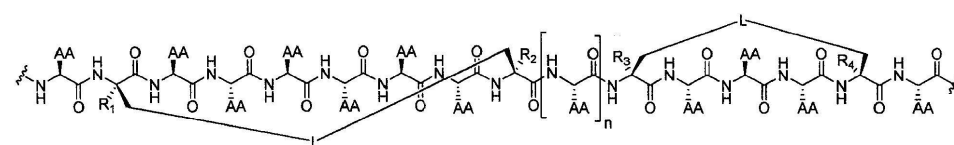
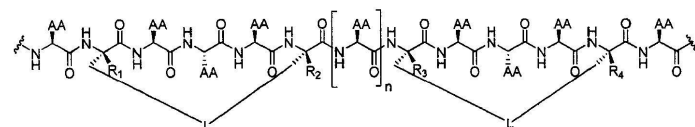
【 0 1 0 7 】

20

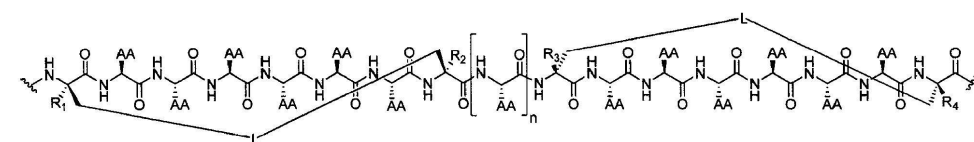
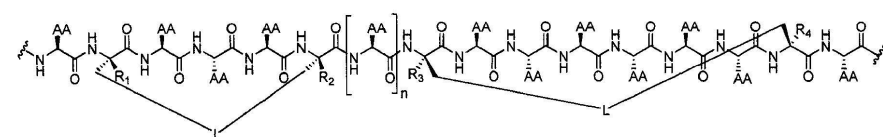
【化 1 3】



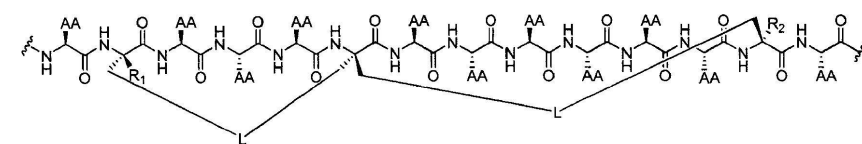
10



20

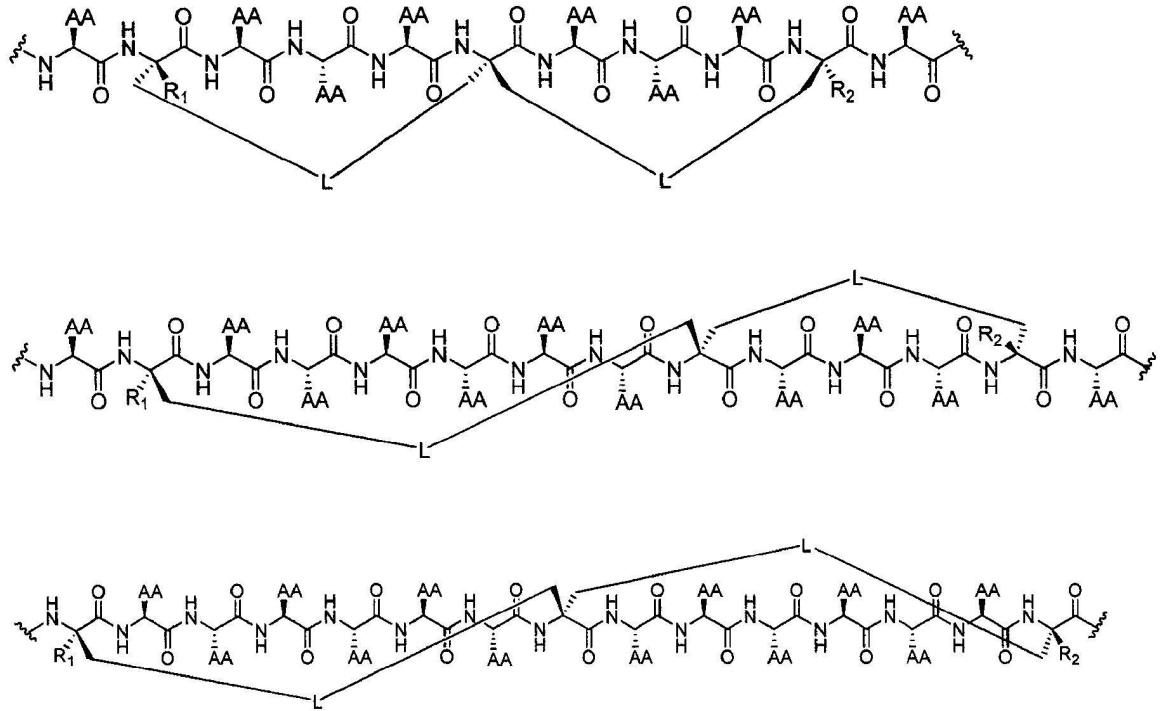


30



【 0 1 0 8 】

【化 1 4】

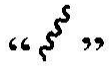


であり、

式中、「AA」は、任意の天然または非天然アミノ酸側鎖を表し、かつ

【 0 1 0 9 】

【化 1 5】



は、上記で定義した [D]_v、[E]_w であり、n は、0 および 20、50、100、200、300、400、または 500 の間の整数である。いくつかの実施形態において、n は、0 である。他の実施形態において、n は、50 未満である。

【 0 1 1 0 】

大環状分子形成リンカー L の例示的な実施形態は、下記に示される。

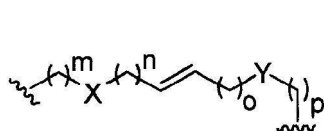
【 0 1 1 1 】

10

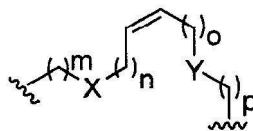
20

30

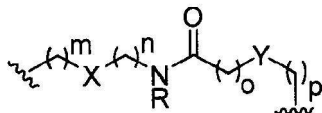
【化 1 6】



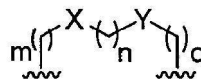
ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o, p = 0-10



ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o, p = 0-10



ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o, p = 0-10
R = H, アルキル、他の置換基

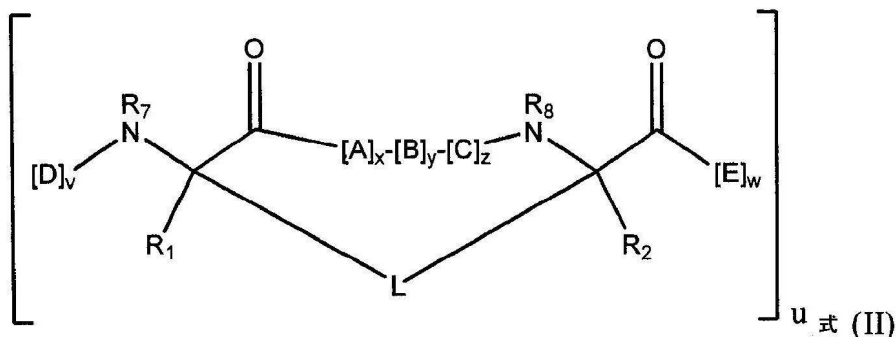


ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o = 0-10

いくつかの実施形態では、本発明の架橋ポリペプチドは、式 (II) :

【 0 1 1 2】

【化 1 7】



を有しており、

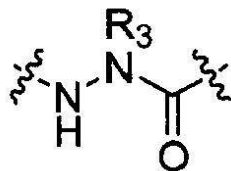
式中：

A、C、DおよびEはそれぞれ独立して、天然または非天然のアミノ酸であり；

Bは、天然もしくは非天然のアミノ酸、アミノ酸アナログ、

【 0 1 1 3】

【化 1 8】



、[- NH - L₃ - CO -]、[- NH - L₃ - SO₂ -]、または[- NH - L₃ -]
であり；

R₁ および R₂ は独立して、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、またはヘテロシクロアルキルであり；

R₃ は、必要に応じて R₅ で置換される、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルキルアルキル、シクロアリール、またはヘテロシクロアリールであり；

L は、式

10

20

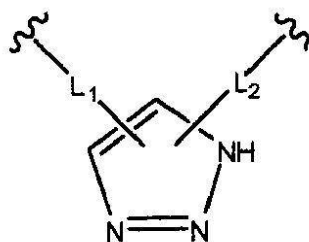
30

40

50

【 0 1 1 4 】

【 化 1 9 】



10

の大環状分子形成リンカーであり；

L_1 、 L_2 、および L_3 は独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、シクロアリーレン、ヘテロシクロアリーレン、または $[-R_4-K-R_4-]_n$ であり、それぞれ、必要に応じて R_5 で置換され；

R_4 はそれぞれ、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、またはヘテロアリーレンであり；

K はそれぞれ、O、S、SO、SO₂、CO、CO₂、またはCONR₃であり；

R_5 はそれぞれ、独立して、ハロゲン、アルキル、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤

20

であり；
 R_6 はそれぞれ、独立して、-H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R_7 は、必要に応じて R_5 で置換される、-H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、もしくはヘテロシクロアリール、またはD残基を有する環状構造の一部であり；

R_8 は、必要に応じて R_5 で置換される、-H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、もしくはヘテロシクロアリールまたはE残基を有する環状構造の一部であり；

30

u は0～10の整数であり；

v は1～1000の整数であり；

w は1～1000の整数であり；

x は0～10の整数であり；

y は0～10の整数であり；

z は0～10の整数であり；かつ

n は1～5の整数である。

【 0 1 1 5 】

40

一例では、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、非置換であるかまたはハロ-で置換されるアルキルである。別の例において、 R_1 および R_2 の両方とも、独立して、非置換であるかまたはハロ-で置換されるアルキルである。いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、メチルである。他の実施形態において、 R_1 および R_2 は、メチルである。

【 0 1 1 6 】

本発明のいくつかの実施形態において、 $x+y+z$ は、少なくとも3である。本発明の他の実施形態において、 $x+y+z$ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。本発明の大環状分子または大環状分子前駆体における、A、B、C、D、またはEの各出現は、独立して選択される。例えば、式 $[A]_x$ によって表される配列は、 x

50

が3である場合、アミノ酸が同一でない、例えばGln - Asp - Alaである実施形態、および、アミノ酸が同一である、例えばGln - Gln - Glnである実施形態を包含する。これは、示される範囲におけるx、y、またはzの任意の値に適用される。

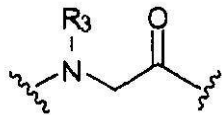
【0117】

いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドは、 β -ラセンである二次構造を含み、R₈は、-Hであり、これによってラセン内水素結合が可能になる。いくつかの実施形態において、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、 β -二置換アミノ酸である。一例において、Bは、 β -二置換アミノ酸である。例えば、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、2-アミノイソ酪酸である。他の実施形態において、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、

10

【0118】

【化20】



である。

【0119】

他の実施形態において、第1のCから第2のCまで測定される大環状分子形成リンカーLの長さは、第1のCから第2のCまでの間のものを含むが、必ずしもこれらに限定されない、上記架橋ポリペプチドの残基によって形成される β -ラセンなどの所望の二次ペプチド構造を安定させるために選択される。

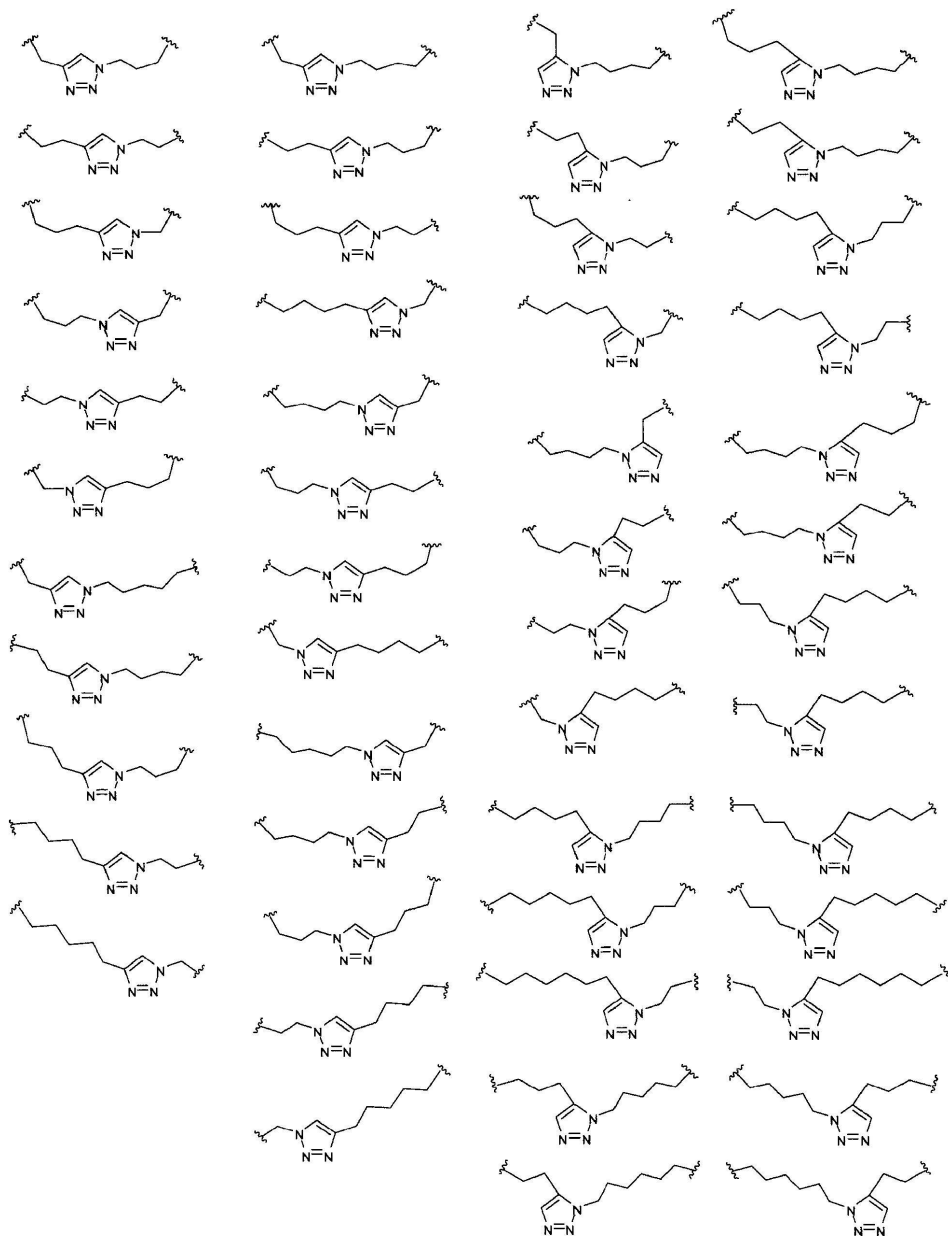
20

【0120】

大環状分子形成リンカーLの例示的な実施形態は、下記に示される。

【0121】

【化 2 1】



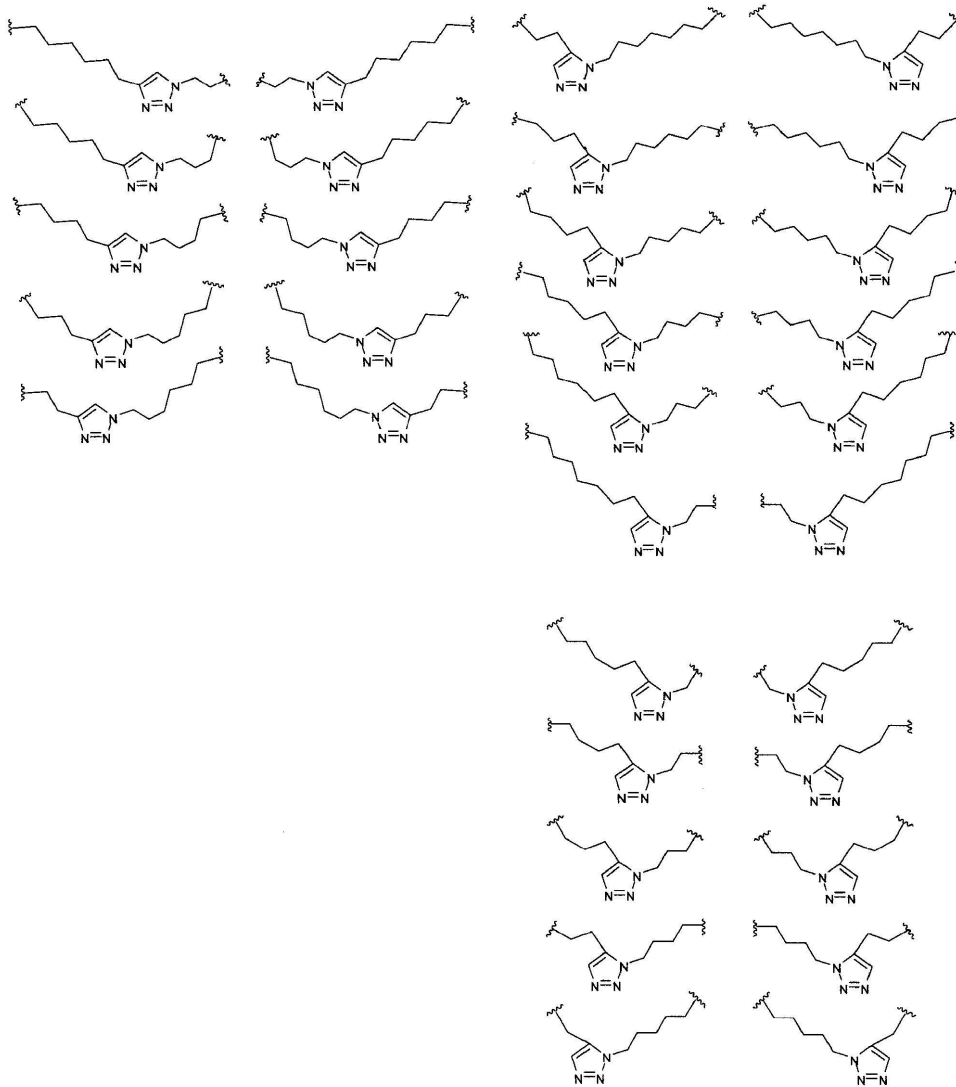
10

20

30

【 0 1 2 2 】

【化 2 2】



10

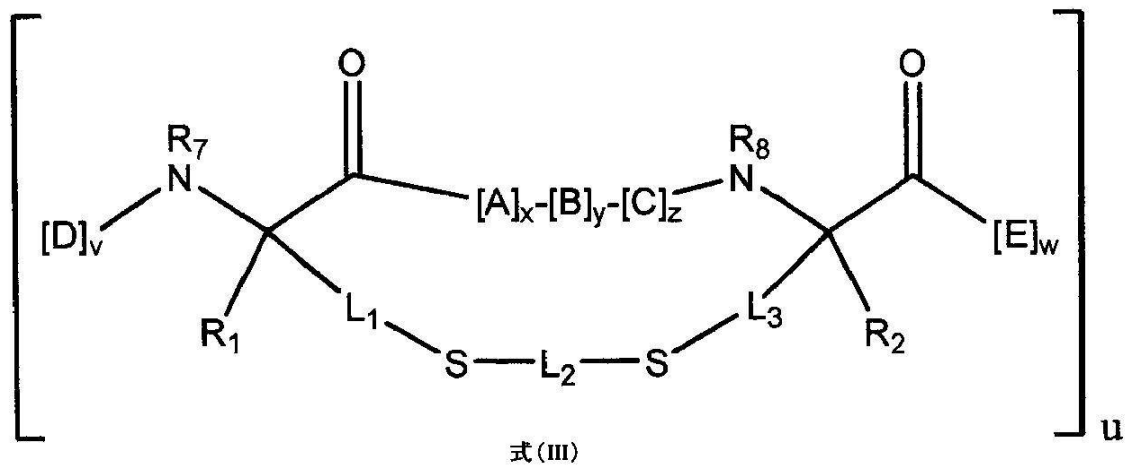
20

30

他の実施形態において、本発明は、式（Ⅲ）の架橋ポリペプチド：

【 0 1 2 3】

【化 2 3】



40

を提供し、

式中：

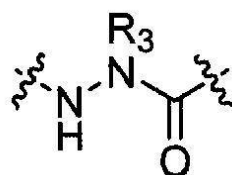
A、C、D、およびEはそれぞれ独立して、天然または非天然アミノ酸であり；

Bは、天然もしくは非天然アミノ酸、アミノ酸アナログ、

50

【 0 1 2 4 】

【 化 2 4 】



、 $[-NH-L_4-CO-]$ 、 $[-NH-L_4-SO_2-]$ 、または $[-NH-L_4-]$ であり；

10

R_1 および R_2 は独立して、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、またはヘテロシクロアルキルであり；

R_3 は、非置換であるかもしくは R_5 で置換される、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルキルアルキル、シクロアリール、またはヘテロシクロアリールであり；

L_1 、 L_2 、 L_3 、および L_4 は、独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、シクロアリーレン、ヘテロシクロアリーレン、または $[-R_4-K-R_4-]_n$ であって、それぞれ、非置換であるかまたは R_5 で置換され；

20

K は、O、S、SO、 SO_2 、CO、 CO_2 、またはCONR₃であり；

R_4 はそれぞれ、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、またはヘテロアリーレンであり；

R_5 はそれぞれ、独立して、ハロゲン、アルキル、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R_6 はそれぞれ、独立して、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R_7 は、非置換であるかもしくは R_5 で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、もしくはヘテロシクロアリールまたはD残基を有する環状構造の一部であり；

30

R_8 は、非置換であるかもしくは R_5 で置換される、- H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、もしくはヘテロシクロアリールまたはE残基を有する環状構造の一部であり；

u は0 ~ 10の整数であり；

v は1 ~ 1000の整数であり；

w は1 ~ 1000の整数であり；

40

x は0 ~ 10の整数であり；

y は0 ~ 10の整数であり；

z は0 ~ 10の整数であり；かつ

n は1 ~ 5の整数である。

【 0 1 2 5 】

一例において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、非置換であるかまたはハロ - で置換されるアルキルである。別の例において、 R_1 および R_2 の両方は、独立して、非置換であるかまたはハロ - で置換されるアルキルである。いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、メチルである。他の実施形態において、 R_1 および R_2 は、メチルである。

50

【 0 1 2 6 】

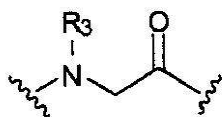
本発明のいくつかの実施形態において、 $x + y + z$ は、少なくとも3である。本発明の他の実施形態において、 $x + y + z$ は、3、4、5、6、7、8、9、または10である。本発明の大環状分子または大環状分子前駆体における、A、B、C、D、またはEの各々の出現は、独立して選択される。例えば、式 $[A]_x$ によって表される配列は、 x が3である場合、アミノ酸が同一でない、例えばGln - Asp - Alaである実施形態、および、アミノ酸が同一である、例えばGln - Gln - Glnである実施形態を包含する。これは、示される範囲における x 、 y 、または z の任意の値に適用される。

【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドは、 α -ラセンである二次構造を含み、 R_3 は、 $-H$ であり、これによってラセン内水素結合が可能になる。いくつかの実施形態において、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、 β -二置換アミノ酸である。一例において、Bは、 β -二置換アミノ酸である。例えば、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、2-アミノイソ酪酸である。他の実施形態において、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、

【 0 1 2 8 】

【 化 2 5 】



である。

【 0 1 2 9 】

他の実施形態において、第1のC から第2のC まで測定される大環状分子形成リンカー $[-L_1 - S - L_2 - S - L_3 -]$ の長さは、第1のC から第2のC までの間のものを含むが、必ずしもこれらに限定されない、上記架橋ポリペプチドの残基によって形成される α -ラセンなどの所望の二次ペプチド構造を安定させるために選択される。

【 0 1 3 0 】

大環状分子または大環状分子前駆体は、例えば液相法または固相法によって合成され、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸の両方を含むことができる。例えばChemistry and Biochemistry of the Amino Acids、G. C. Barrett 編、Chapman and Hall、1985の中のHunt、「The Non-Protein Amino Acids」を参照のこと。いくつかの実施形態では、チオール部分は、アミノ酸残基L-システイン、D-システイン、 β -メチル-Lシステイン、 β -メチル-D-システイン、L-ホモシステイン、D-ホモシステイン、 β -メチル-L-ホモシステイン、または β -メチル-D-ホモシステインの側鎖である。ビスアルキル化試薬は、一般式 $X - L_2 - Y$ で表されるものであり、式中、 L_2 は、リンカー部分であり、XおよびYは、 L_2 との結合を形成するために $-SH$ 部分によって置き換えられる脱離基である。いくつかの実施形態において、XおよびYは、I、Br、またはClなどのハロゲンである。

【 0 1 3 1 】

他の実施形態において、式I、II、またはIIIの化合物におけるDおよび/またはEは、細胞の取り込みを促進するためにさらに改変される。いくつかの実施形態において、架橋ポリペプチドの脂質付加 (lipidating) またはペグ化 (PEGylation) は、細胞の取り込みを促進し、バイオアベイラビリティを増大させ、血液循環を増加させ、薬物動態を改変し、免疫原性を低下させ、および/または必要とされる投与の頻度を減少させる。

【 0 1 3 2 】

他の実施形態において、式I、II、またはIIIの化合物における、[D]および[E]の少なくとも1つは、上記架橋ポリペプチドが、少なくとも2つの大環状分子形成

10

20

30

40

50

ンカーを含むような、追加の大環状分子形成リンカーを含む部分を表す。特定の実施形態において、架橋ポリペプチドは、2つの大環状分子形成リンカーを含む。

【0133】

本発明の架橋ポリペプチドでは、本明細書に記載されている任意の大環状分子形成リンカーは、表1～4に示される任意の配列との任意の組み合わせで、および本明細書において示される任意のR-置換基との任意の組合せでも、用いられてもよい。

【0134】

いくつかの実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、少なくとも1つの -らせんモチーフを含む。例えば、式I、II、またはIIIの化合物におけるA、B、および/またはCは、1つ以上の -らせんを含む。一般的な問題として、 -らせんは、1ター

ンあたり3～4個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、上記架橋ポリペ

プチドの -らせんは、1～5個のターン、および従って3～20個のアミノ酸残基を含む。特定の実施形態において、 -らせんは、1個のターン、2個のターン、3個のター

ン、4個のターン、または5個のターンを含む。いくつかの実施形態において、大環状分子形成リンカーは、上記架橋ポリペプチド内に含まれる -らせんモチーフを安定化させる。従って、いくつかの実施形態において、第1のC から第2のC までの大環状分子形成リンカーLの長さは、 -らせんの安定性を増加させるために選択される。いくつかの実施形態において、大環状分子形成リンカーは、 -らせんの1ターン～5ターンまでの間に架かる (span) 。いくつかの実施形態において、大環状分子形成リンカーは、 -らせんの約1ターン、2ターン、3ターン、4ターン、または5ターンに架かる。いく

つかの実施形態において、大環状分子形成リンカーの長さは、 -らせんの1ターンあたり約5 ～9 または -らせんの1ターンあたり約6 ～8 である。大環状分子形成リンカーが、 -らせんの約1ターンに架かる場合、その長さは、約5個の炭素-炭素結合～13個の炭素-炭素結合、約7個の炭素-炭素結合～11個の炭素-炭素結合、または約9個の炭素-炭素結合に等しい。大環状分子形成リンカーが、 -らせんの約2ター

ンに架かる場合、その長さは、約8個の炭素-炭素結合～16個の炭素-炭素結合、約10個の炭素-炭素結合～14個の炭素-炭素結合、または約12個の炭素-炭素結合に等しい。大環状分子形成リンカーが、 -らせんの約3ターンに架かる場合、その長さは、約14個の炭素-炭素結合～22個の炭素-炭素結合、約16個の炭素-炭素結合～20個の炭素-炭素結合、または約18個の炭素-炭素結合に等しい。大環状分子形成リン

カーが、 -らせんの約4ターンに架かる場合、その長さは、約20個の炭素-炭素結合～28個の炭素-炭素結合、約22個の炭素-炭素結合～26個の炭素-炭素結合、または約24個の炭素-炭素結合に等しい。大環状分子形成リンカーが、 -らせんの約5ター

ンに架かる場合、その長さは、約26個の炭素-炭素結合～34個の炭素-炭素結合、約28個の炭素-炭素結合～32個の炭素-炭素結合、または約30個の炭素-炭素結合に等しい。大環状分子形成リンカーが、 -らせんの約1ターンに架かる場合、その連結は、約4個の原子～12個の原子、約6個の原子～10個の原子、または約8個の原子を含む。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約2ターンに架かる場合、その連結は、約7個の原子～15個の原子、約9個の原子～13個の原子、または約11個の原子を含む。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約3ターンに架かる場合、その連結は、約13個の原子～21個の原子、約15個の原子～19個の原子、または約17個の原子を含む。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約4ターンに架かる場合、その連結は、約19個の原子～27個の原子、約21個の原子～25個の原子、または約23個の原子を含む。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約5ターンに架かる場合、その連結は、約25個の原子～33個の原子、約27個の原子～31個の原子、または約29個の原子を含む。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約1ターンに架かる場合、得られる大環状分子は、約17員～25員、約19員～23員、または約21員を含有する環を形成する。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約2ターンに架かる場合、得られる大環状分子は、約29員～37員、約31員～35員、または約33員を含有する環を形成する。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約3ター

10

20

30

40

50

ンに架かる場合、得られる大環状分子は、約 44 員～52 員、約 46 員～50 員、または約 48 員を含有する環を形成する。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約 4 ターンに架かる場合、得られる大環状分子は、約 59 員～67 員、約 61 員～65 員、または約 63 員を含有する環を形成する。大環状分子形成リンカーが、上記 -らせんの約 5 ターンに架かる場合、得られる大環状分子は、約 74 員～82 員、約 76 員～80 員、または約 78 員を含有する環を形成する。

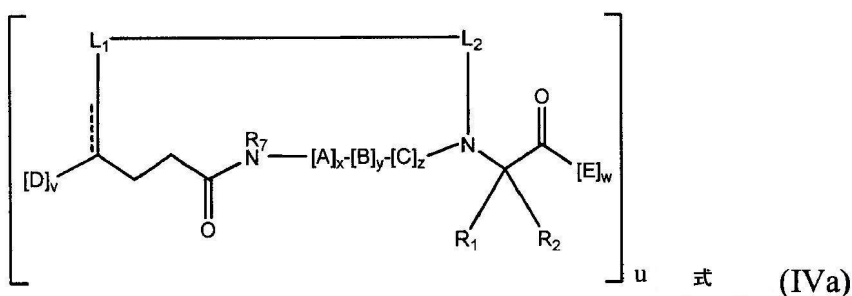
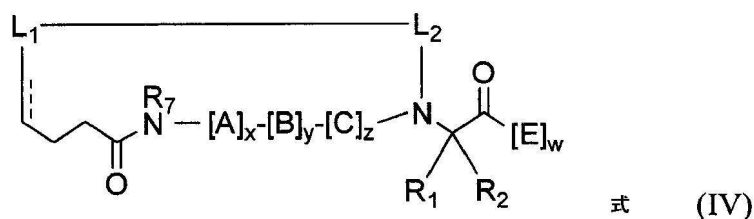
【0135】

他の実施形態において、本発明は、式 (IV) または (IVa) の架橋ポリペプチドを提供し、

【0136】

10

【化26】



20

式中、

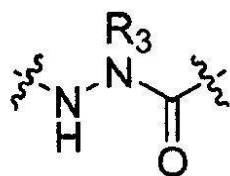
A、C、D、およびEはそれぞれ独立して、天然または非天然アミノ酸であり；

Bは、天然もしくは非天然アミノ酸、アミノ酸アナログ、

【0137】

30

【化27】



、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 、または $[-NH-L_3-]$ であり；

R_1 および R_2 は独立して、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、-H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、もしくはヘテロシクロアルキル、またはE残基を有する環状構造の一部であり；

40

R_3 は、必要に応じて R_5 で置換される、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルキルアルキル、シクロアリール、またはヘテロシクロアリールであり；

Lは、式 $-L_1-L_2-$ の大環状分子形成リンカーであり；

L_1 および L_2 は独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、シクロアリーレン、ヘテロシクロアリーレン、または $[-R_4-K-R_4-]_n$ であり、それぞれ、必要に応じて R_5 で置換さ

50

れ；

R_4 はそれぞれ、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、またはヘテロアリーレンであり；

K はそれぞれ、 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 CO 、 CO_2 、または $CONR_3$ であり；

R_5 はそれぞれ、独立して、ハロゲン、アルキル、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R_6 はそれぞれ、独立して、 $-H$ 、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R_7 は、必要に応じて R_5 で置換される、 $-H$ 、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、またはヘテロシクロアリールであり；

u は $0 \sim 10$ の整数であり；

v は $1 \sim 1000$ の整数であり；

w は $1 \sim 1000$ の整数であり；

x は $0 \sim 10$ の整数であり；

y は $0 \sim 10$ の整数であり；

z は $0 \sim 10$ の整数であり；かつ

n は $1 \sim 5$ の整数である。

【0138】

一例において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、非置換であるかまたはハロ - で置換されるアルキルである。別の例において、 R_1 および R_2 の両方は、独立して、非置換であるかまたはハロ - で置換されるアルキルである。いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、メチルである。他の実施形態において、 R_1 および R_2 は、メチルである。

【0139】

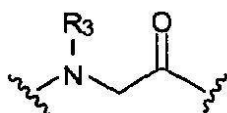
本発明のいくつかの実施形態において、 $x + y + z$ は、少なくとも1である。本発明のいくつかの実施形態において、 $x + y + z$ は、少なくとも2である。本発明の他の実施形態において、 $x + y + z$ は、3、4、5、6、7、8、9、または10である。本発明の大環状分子または大環状分子前駆体における、A、B、C、D、またはEの各々の出現は、独立して選択される。例えば、式 $[A]_x$ によって表される配列は、 x が3である場合、アミノ酸が同一でない、例えば $Gln - Asp - Ala$ である実施形態、および、アミノ酸が同一である、例えば $Gln - Gln - Gln$ である実施形態を包含する。これは、示される範囲における x 、 y 、または z の任意の値に適用される。

【0140】

いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドは、 $-$ らせんである二次構造を含み、かつ R_8 は、 $-H$ であり、これによってらせん内水素結合が可能になる。いくつかの実施形態において、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、 $-$ 二置換アミノ酸である。一例において、Bは、 $-$ 二置換アミノ酸である。例えば、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、2 - アミノイソ酪酸である。他の実施形態において、A、B、C、D、またはEの少なくとも1つは、

【0141】

【化28】



である。

【0142】

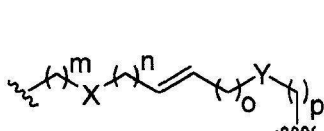
他の実施形態において、第 1 の C から第 2 の C まで測定される大環状分子形成リンカー L の長さは、第 1 の C から第 2 の C までの間のものを含むが、必ずしもこれらに限定されない、上記架橋ポリペプチドの残基によって形成される - らせんなどの所望の二次ペプチド構造を安定させるために選択される。

【 0 1 4 3 】

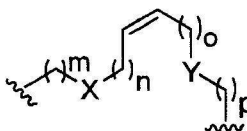
大環状分子形成リンカー L の例示的な実施形態は、下記に示される。

【 0 1 4 4 】

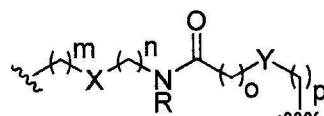
【 化 2 9 】



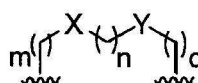
ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o, p = 0-10



ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o, p = 0-10



ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o, p = 0-10
R = H, アルキル、他の置換基



ここで X, Y = -CH₂-, O, S, または NH
m, n, o = 0-10

架橋ポリペプチドの調製

本発明の架橋ポリペプチドは、当技術分野において公知の任意の種々の方法によって調製され得る。例えば、表 1、2、3 または 4 において「X」で示される任意の残基が、同じ分子中の第 2 の残基またはそのような残基の前駆体と架橋剤を形成し得る残基で置換されてもよい。

【 0 1 4 5 】

架橋ポリペプチドの形成をもたらすための種々の方法が、当技術分野において公知である。例えば、式 I の架橋ポリペプチドの調製は、Schafmeisterら、J. Am. Chem. Soc. 122: 5891 ~ 5892 (2000); Schafmeister & Verdine、J. Am. Chem. Soc. 122: 5891 (2005); Walenskyら、Science 305: 1466 ~ 1470 (2004); および米国特許第 7,192,713 号; ならびに PCT 出願 WO 2008/121767 において記載されている。引用文献において開示されている、- 二置換アミノ酸およびアミノ酸前駆体を、架橋ポリペプチド前駆体ポリペプチドの合成において使用してもよい。このようなアミノ酸を前駆体ポリペプチド中に組み込んだ後、末端オレフィンにメタセシス触媒と反応させ、これによって上記架橋ポリペプチドの形成をもたらす。

【 0 1 4 6 】

他の実施形態において、本発明のペプチド模倣大環状分子は、式 IV または IV a である。このような大環状分子の調製のための方法は、例えば、米国特許第 7,202,332 号において記載されている。

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態において、これらの架橋ポリペプチドの合成は、アジド部分およびアルキン部分を含有するペプチド模倣物前駆体の合成; その後ペプチド模倣物前駆体を大環状分子化試薬と接触させて、トリアゾール結合架橋ポリペプチドを生成させることを特徴とする複数段階工程を含む。大環状分子または大環状分子前駆体は、例えば、液相法または固相法によって合成され、天然に存在するおよび天然に存在しないアミノ酸の両方を

10

20

30

40

50

含有することができる。例えば、Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids、G. C. Barrett 編、Chapman and Hall、1985 年の中、Hunt、「The Non-Protein Amino Acids」を参照のこと。

【0148】

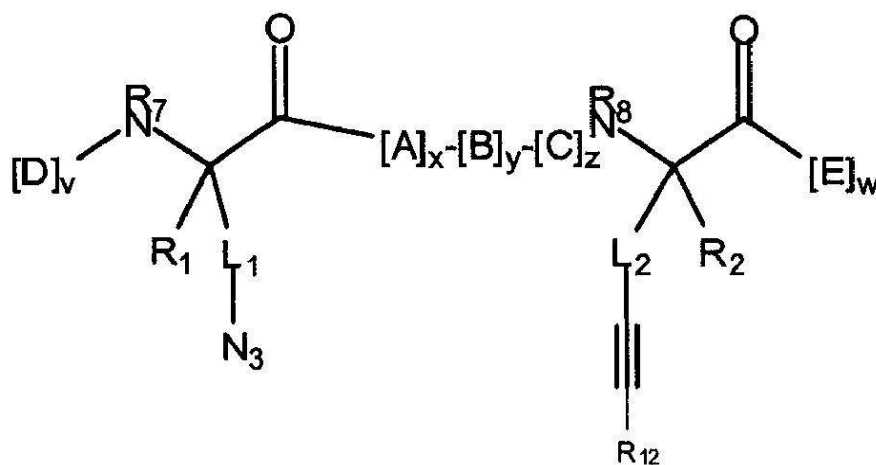
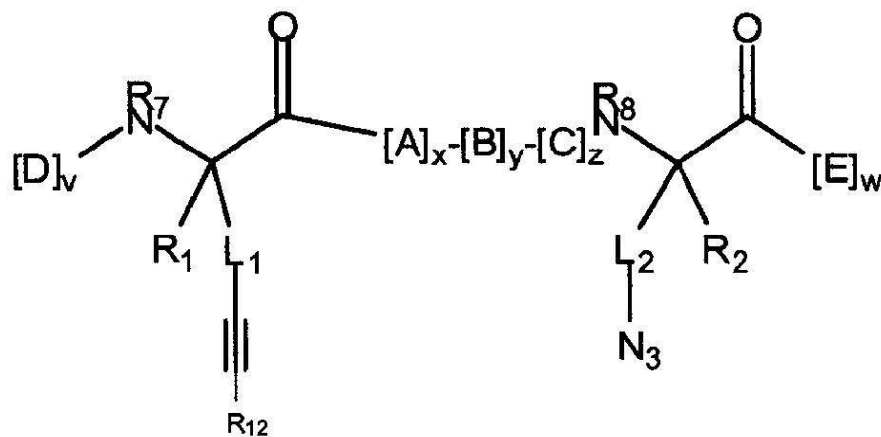
いくつかの実施形態において、アジドはある残基の α -炭素に結合しており、アルキンは別の残基の β -炭素に結合している。いくつかの実施形態において、アジド部分は、アミノ酸 L-リジン、D-リジン、 α -メチル-L-リジン、 α -メチル-D-リジン、L-オルニチン、D-オルニチン、 α -メチル-L-オルニチンまたは α -メチル-D-オルニチンのアジド-アナログである。別の実施形態において、アルキン部分は、L-プロパルギルグリシンである。さらに別の実施形態において、アルキン部分は、L-プロパルギルグリシン、D-プロパルギルグリシン、(S)-2-アミノ-2-メチル-4-ペンチン酸、(R)-2-アミノ-2-メチル-4-ペンチン酸、(S)-2-アミノ-2-メチル-5-ヘキシン酸、(R)-2-アミノ-2-メチル-5-ヘキシン酸、(S)-2-アミノ-2-メチル-6-ヘプチン酸、(R)-2-アミノ-2-メチル-6-ヘプチン酸、(S)-2-アミノ-2-メチル-7-オクチン酸、(R)-2-アミノ-2-メチル-7-オクチン酸、(S)-2-アミノ-2-メチル-8-ノニン酸および (R)-2-アミノ-2-メチル-8-ノニン酸からなる群より選択されるアミノ酸である。

【0149】

いくつかの実施形態において、本発明は、架橋ポリペプチドを合成するための方法であって、式 V または式 VI :

【0150】

【化30】



であって、

式中、 v 、 w 、 x 、 y 、 z 、 A 、 B 、 C 、 D 、 E 、 R_1 、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 L_1 および L_2 は式 (I I) で定義されたとおりであり、大環状分子化試薬が Cu 試薬である場合 R_{12} は $-H$ であり、大環状分子化試薬が Ru 試薬である場合 R_{12} は $-H$ またはアルキルである、ペプチド模倣物前駆体を、大環状分子化試薬と接触させる工程を含み、さらにこの接触させる工程が、式 I I I または式 I V においてアルキンとアジド部分との間に形成される共有結合をもたらし、方法を提供する。例えば、大環状分子化試薬が Ru 試薬である場合、 R_{12} はメチルであってもよい。

【0151】

本発明の架橋ポリペプチドにおいて、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、またはヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 の両方が独立して、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、またはヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態において、 A 、 B 、 C 、 D または E の少なくとも1つは、 α 、 β - 二置換アミノ酸である。1つの例では、 B は α 、 β - 二置換アミノ酸である。例えば、 A 、 B 、 C 、 D または E の少なくとも1つは、2 - アミノイソ酪酸である。

【0152】

例えば、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは、非置換であるかまたはハロ - で置換される、アルキルである。別の例において、 R_1 および R_2 の両方が独立して、非置換であるかまたはハロ - で置換される、アルキルである。いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つはメチルである。他の実施形態において、 R_1 および R_2 はメチルである。大環状分子化試薬は、 Cu 試薬であっても、または Ru 試薬であってもよい。

【0153】

いくつかの実施形態において、ペプチド模倣物前駆体は、接触工程の前に精製される。他の実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、接触工程の後に精製される。さらに他の実施形態において、上記架橋ポリペプチドは、接触工程の後に再折り畳み (リフォールディング) される。この方法は溶液中で行われてもよいし、または、あるいは、この方法は固体支持体上で行われてもよい。

【0154】

上記結合に有利な条件下でペプチド模倣物前駆体または架橋ポリペプチドに結合する、標的高分子の存在下で本発明の方法を行うこともまた、本発明において想定される。いくつかの実施形態において、この方法は、上記結合に有利な条件下でペプチド模倣物前駆体または架橋ポリペプチドに優先的に結合する標的高分子の存在下で行われる。またこの方法を適用して、架橋ポリペプチドのライブラリーを合成してもよい。

【0155】

いくつかの実施形態において、式 V または式 V I のペプチド模倣物前駆体のアルキン部分は、 L - プロパルギルグリシン、 D - プロパルギルグリシン、 (S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 4 - ペンチン酸、 (R) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 4 - ペンチン酸、 (S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 5 - ヘキシニン酸、 (R) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 5 - ヘキシニン酸、 (S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 6 - ヘプチン酸、 (R) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 6 - ヘプチン酸、 (S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 7 - オクチン酸、 (R) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 7 - オクチン酸、 (S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 8 - ノニン酸、および (R) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 8 - ノニン酸からなる群より選択されるアミノ酸の側鎖である。他の実施形態において、式 V または式 V I のペプチド模倣物前駆体のアジド部分は、 e - アジド - L - リジン、 e - アジド - D - リジン、 e - アジド - α - メチル - L - リジン、 e - アジド - α - メチル - D - リジン、 d - アジド - α - メチル - L - オルニチン、および d - アジド - α - メチル - D - オルニチンからなる群より選択されるアミノ酸の側鎖である。

【 0 1 5 6 】

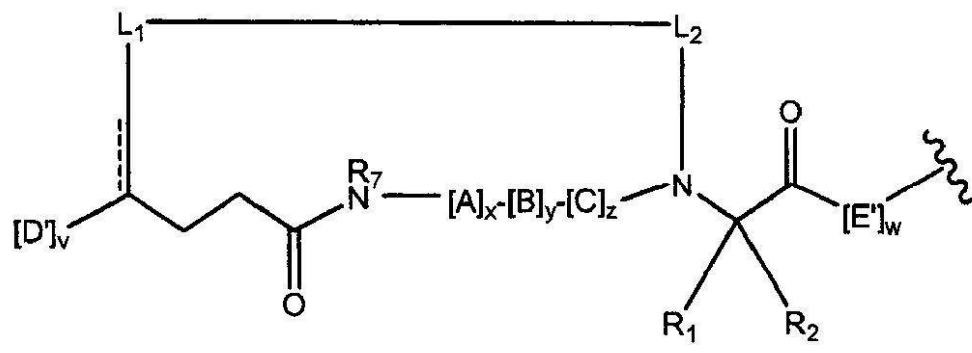
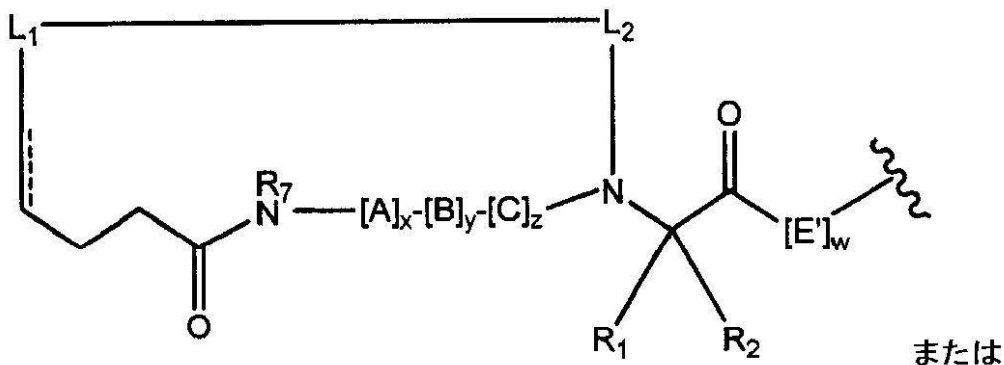
いくつかの実施形態において、 $x + y + z$ は 3 であり、A、B および C は独立して、天然または非天然のアミノ酸である。他の実施形態において、 $x + y + z$ は 6 であり、A、B および C は独立して天然または非天然のアミノ酸である。

【 0 1 5 7 】

本発明のペプチド模倣大環状分子のいくつかの実施形態において、 $[D]_v$ および / または $[E]_w$ は、追加のペプチド模倣大環状分子または大環状分子構造 (macro cyclic structure) を含む。例えば、 $[D]_v$ は、式：

【 0 1 5 8 】

【 化 3 1 】



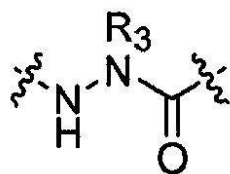
を有してもよく、

式中、A、C、D'、および E' はそれぞれ独立して、天然または非天然のアミノ酸であり；

B は、天然もしくは非天然アミノ酸、アミノ酸アナログ、

【 0 1 5 9 】

【 化 3 2 】



、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 、または $[-NH-L_3-]$ であり；

R_1 および R_2 は独立して、非置換であるかもしくはハロ - で置換される、-H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、もしくはヘテロシクロアルキル、または E 残基を有する環状構造の一部であり；

R_3 は、必要に応じて R_5 で置換される、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、

アリールアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルキルアルキル、シクロアリール、またはヘテロシクロアリールであり；

L_1 および L_2 は独立して、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、シクロアリーレン、ヘテロシクロアリーレン、または $[-R_4-K-R_4-]_n$ であり、それぞれ、必要に応じて R_5 で置換されており；

R_4 はそれぞれ、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、またはヘテロアリーレンであり；

K はそれぞれ、O、S、SO、SO₂、CO、CO₂、または CONR₃ であり；

R_5 はそれぞれ独立して、ハロゲン、アルキル、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R_6 はそれぞれ独立して、-H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、蛍光性部分、放射性同位体、または治療剤であり；

R_7 は、必要に応じて R_5 で置換される、-H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアリール、またはヘテロシクロアリールであり；

v は 1 ~ 1000 の整数であり；

w は 1 ~ 1000 の整数であり；かつ

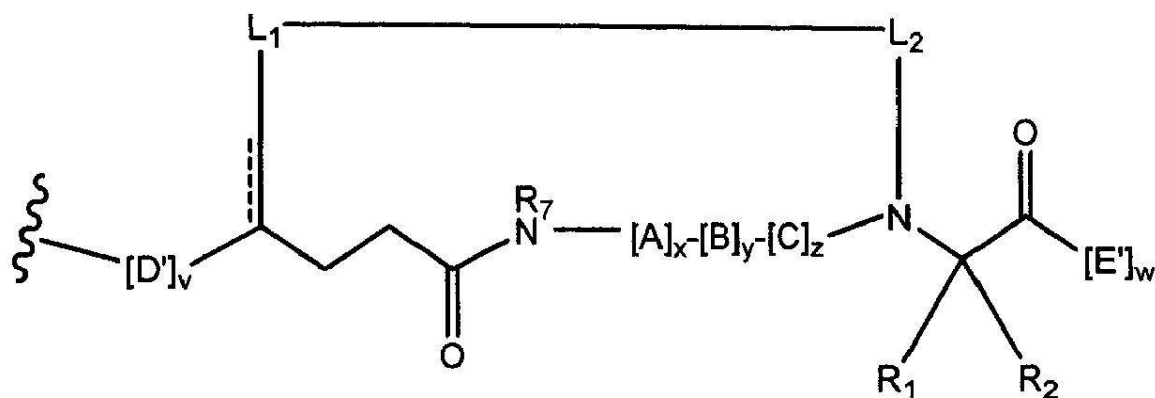
x は 0 ~ 10 の整数である。

【0160】

別の実施形態において、 $[E]_w$ は、式：

【0161】

【化33】



を有し、式中、置換基は、前段落において定義されたとおりである。

【0162】

いくつかの実施形態において、接触工程は、プロトン性溶媒 (protic solvent)、水性溶媒、有機溶媒、およびこれらの混合物からなる群より選択される溶媒において行われる。例えば、溶媒は、H₂O、THF、THF/H₂O、tBuOH/H₂O、DMF、DIPEA、CH₃CN または CH₂Cl₂、ClCH₂CH₂Cl またはこれらの混合物からなる群から選択されてもよい。溶媒は、らせん形成に有利な溶媒であってもよい。

【0163】

代替であるが等価な保護基、脱離基または試薬は置換され、かつ特定の合成工程は、代替の順番または所望の化合物を生成する順序で行われる。本明細書に記載の化合物の合成において有用な、合成化学による変換および保護基の方法論 (保護および脱保護) としては、例えば、Larock、Comprehensive Organic Transformations、VCH Publishers (1989)；Greene およ

びWuts、Protective Groups in Organic Synthesis、第2版、John Wiley and Sons(1991); FieserおよびFieser、Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis、John Wiley and Sons(1994); およびPaquette編、Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis、John Wiley and Sons(1995)、ならびにこれらの後続の版において記載されているものなどを含む。

【0164】

本発明の架橋ポリペプチドは、例えば、Fieldsら、Synthetic Peptides: A User's Guideの第3章、Grant編、W. H. Freeman & Co., New York, N. Y., 1992年、77頁において記載されているものなどの化学合成法によって製造される。従って、例えば、ペプチドは、固相合成の自動化メリフィールド(Merrifield)技術を用いて、側鎖保護アミノ酸を用いてtBocまたはFmoc化学のいずれかによって保護されたアミンを用いて、例えば、自動ペプチド合成機(例えば、Applied Biosystems (Foster City, CA)、430A、431、または433型)において合成される。

【0165】

本明細書に記載のペプチド模倣物前駆体および架橋ポリペプチドを製造する1つの方法は、固相ペプチド合成(SPPS)を用いる。C末端アミノ酸は、リンカー分子との酸不安定結合を介して架橋ポリスチレン樹脂に結合している。この樹脂は、合成に用いられる溶媒において不溶性であり、このため比較的簡単にかつ迅速に過剰な試薬および副産物を洗い流すようになる。N末端は、Fmoc基で保護されており、酸において安定であるが塩基によって除去することができる。側鎖官能基は、必要に応じて塩基に安定だが酸に不安定な基で保護されている。

【0166】

より長いペプチド模倣物前駆体は、例えば、自然な化学的ライゲーション(native chemical ligation)を用いて個々の合成ペプチドを結合することによって作製される。あるいは、より長い合成ペプチドは、周知の組換えDNA技術およびタンパク質発現技術によって生合成される。このような技術は、周知の標準的マニュアルにおいて詳細なプロトコールとともに提供されている。本発明のペプチド模倣物前駆体をコードする遺伝子を構築するために、アミノ酸配列を逆翻訳して、好ましくは遺伝子が発現される生物体に最適なコドンを含む、アミノ酸配列をコードする核酸配列を得る。次に、合成遺伝子を、典型的には、必要であればペプチドおよび任意の調節エレメントをコードするオリゴヌクレオチドを合成することによって作製する。合成遺伝子を適切なクローニングベクター中に挿入し、宿主細胞中にトランスフェクトする。次いでペプチドを、選択した発現系および宿主に適した適切な条件下で発現させる。ペプチドを標準的な方法によって精製し特徴付ける。

【0167】

ペプチド模倣物前駆体は、例えば、ハイスループット多チャンネルコンビナトリアル合成装置(例えば、CreoSalus、Louisville、KY製のThuramed TETRA Sマルチチャンネルペプチド合成装置またはAAPTEC、Inc., Louisville、KY製のModel Apex 396マルチチャンネルペプチド合成装置)を用いるハイスループットなコンビナトリアル法において、例えば作製される。

【0168】

以下の合成スキームは、本発明を例示するためだけに提供され、本明細書に記載の本発明の範囲を限定することを意図するものではない。図面を簡略化するために、例示的なスキームは、アジドアミノ酸アナログであるe-アジド- -メチル-L-リジンおよびe-アジド- -メチル-D-リジン、ならびにアルキンアミノ酸アナログであるL-プロ

10

20

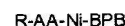
30

40

50

【化 3 4】

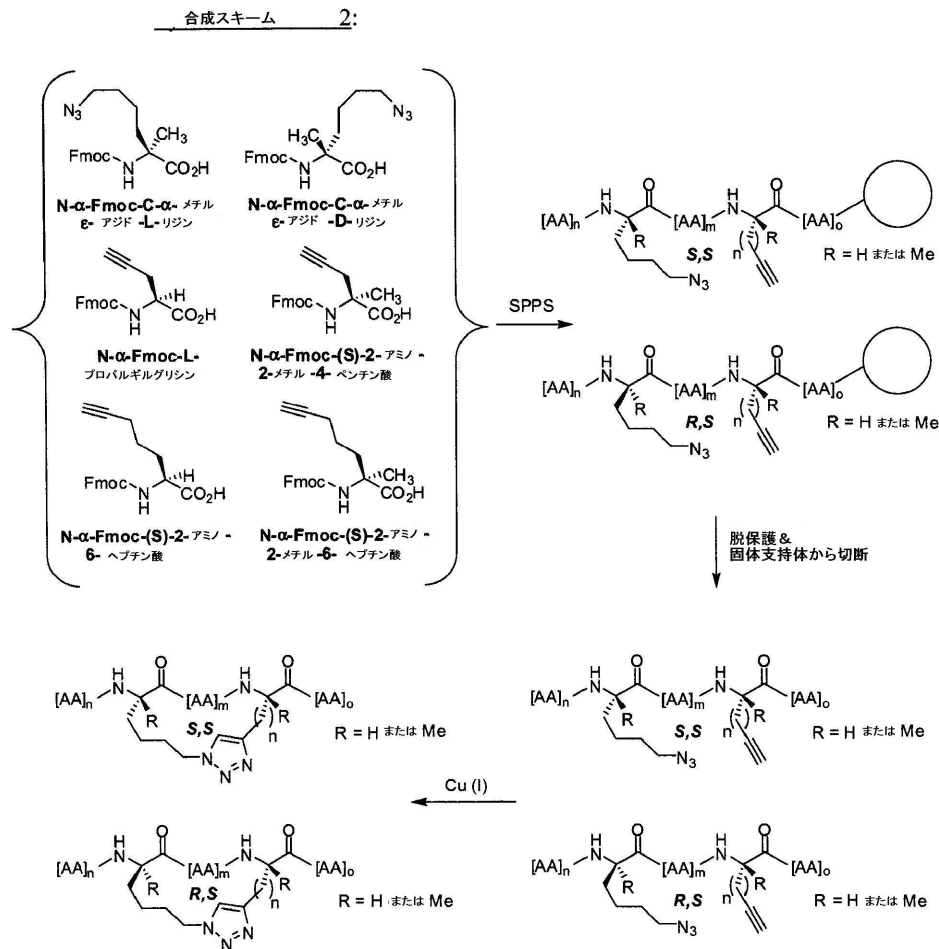
1:



【 0 1 7 0 】

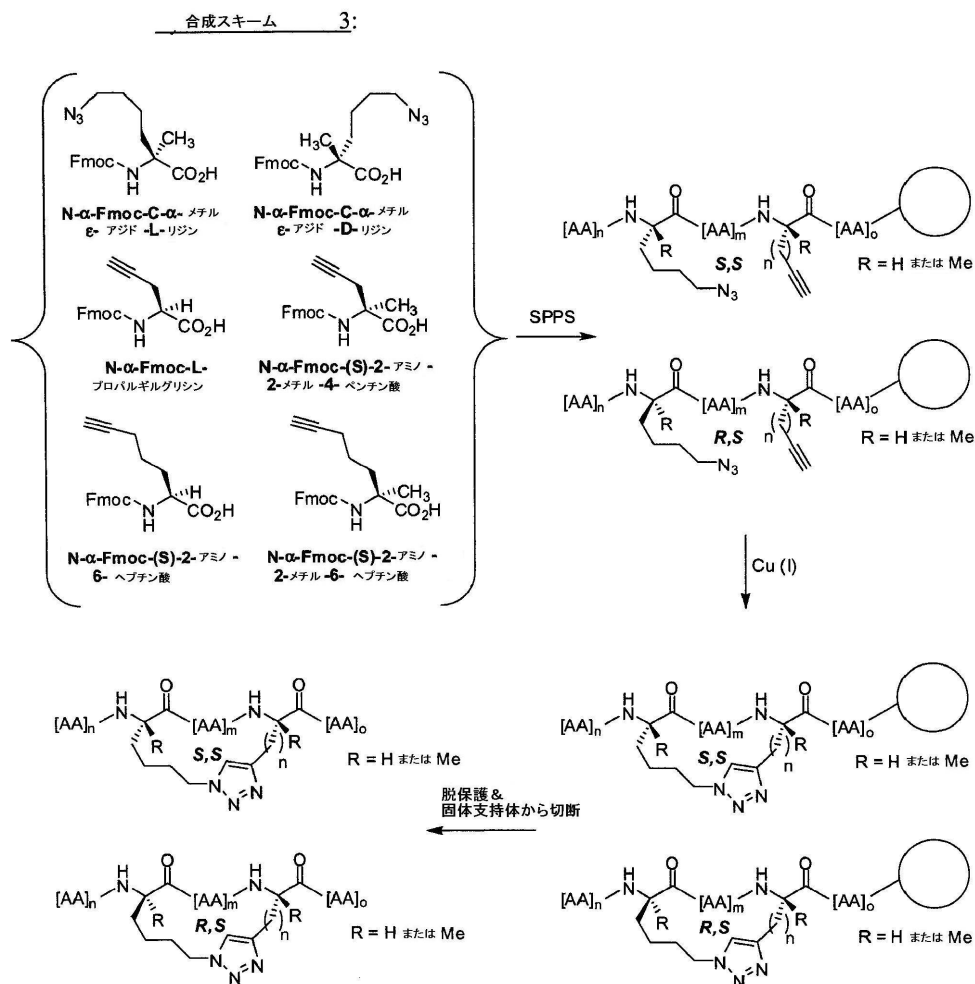
40

【化 3 5】



【0171】

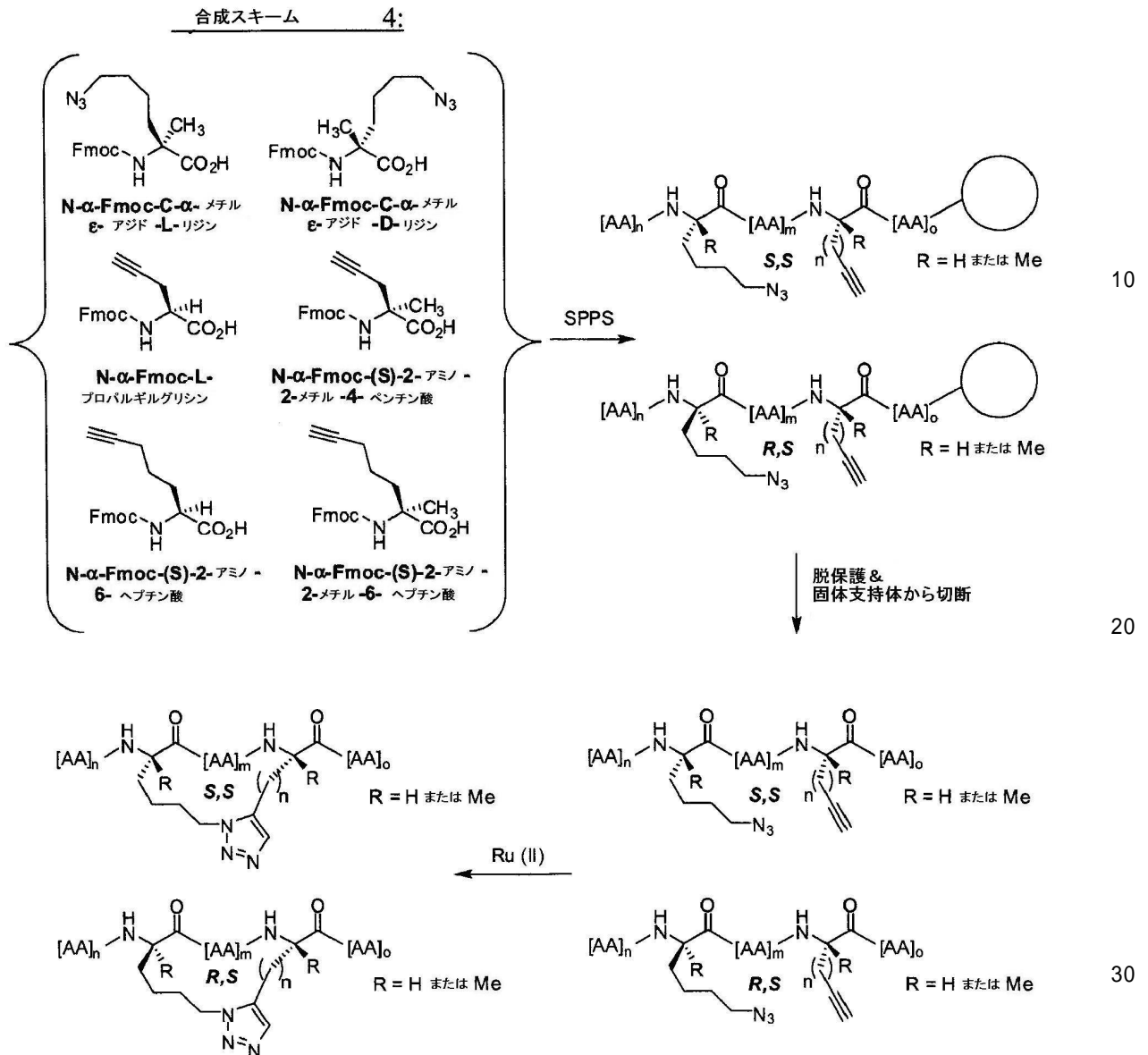
【化 3 6】



合成スキーム 3 に示される架橋ポリペプチドの合成のための一般的な方法において、ペプチド模倣物前駆体は、アジド部分およびアルキン部分を含み、市販のアミノ酸 N - Fmoc - L - プロパルギルグリシンならびにアミノ酸 (S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 4 - ペンチン酸、(S) - 2 - アミノ - 6 - ヘプチン酸、(S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 6 - ヘプチン酸、N - メチル - e - アジド - L - リジン、および N - メチル - e - アジド - D - リジンの N - Fmoc 保護形態を用いた、固相ペプチド合成 (SPPS) によって合成される。ペプチド模倣物前駆体を、樹脂上で粗混合物として Cu (I) 試薬などの大環状分子化試薬と反応させる (Rostovtsev ら (2002)、Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596 ~ 2599; Tornøe ら (2002)、J. Org. Chem. 67: 3057 ~ 3064; Deiters ら (2003)、J. Am. Chem. Soc. 125: 11782 ~ 11783; Punna ら (2005)、Angew. Chem. Int. Ed. 44: 2215 ~ 2220)。次いで、得られたトリアゾール含有架橋ポリペプチドを、標準的な条件 (例えば、95% TFA などの強酸) によって脱保護して、固相樹脂から切断する。いくつかの実施形態において、大環状分子化工程は、CH₂Cl₂、ClCH₂CH₂Cl、DMF、THF、NMP、DIPEA、2,6-ルチジン、ピリジン、DMSO、H₂O またはこれらの混合物からなる群より選択される溶媒において行われる。いくつかの実施形態において、大環状分子化工程は、緩衝化された水性の溶媒または部分的に水性の溶媒において行われる。

【0172】

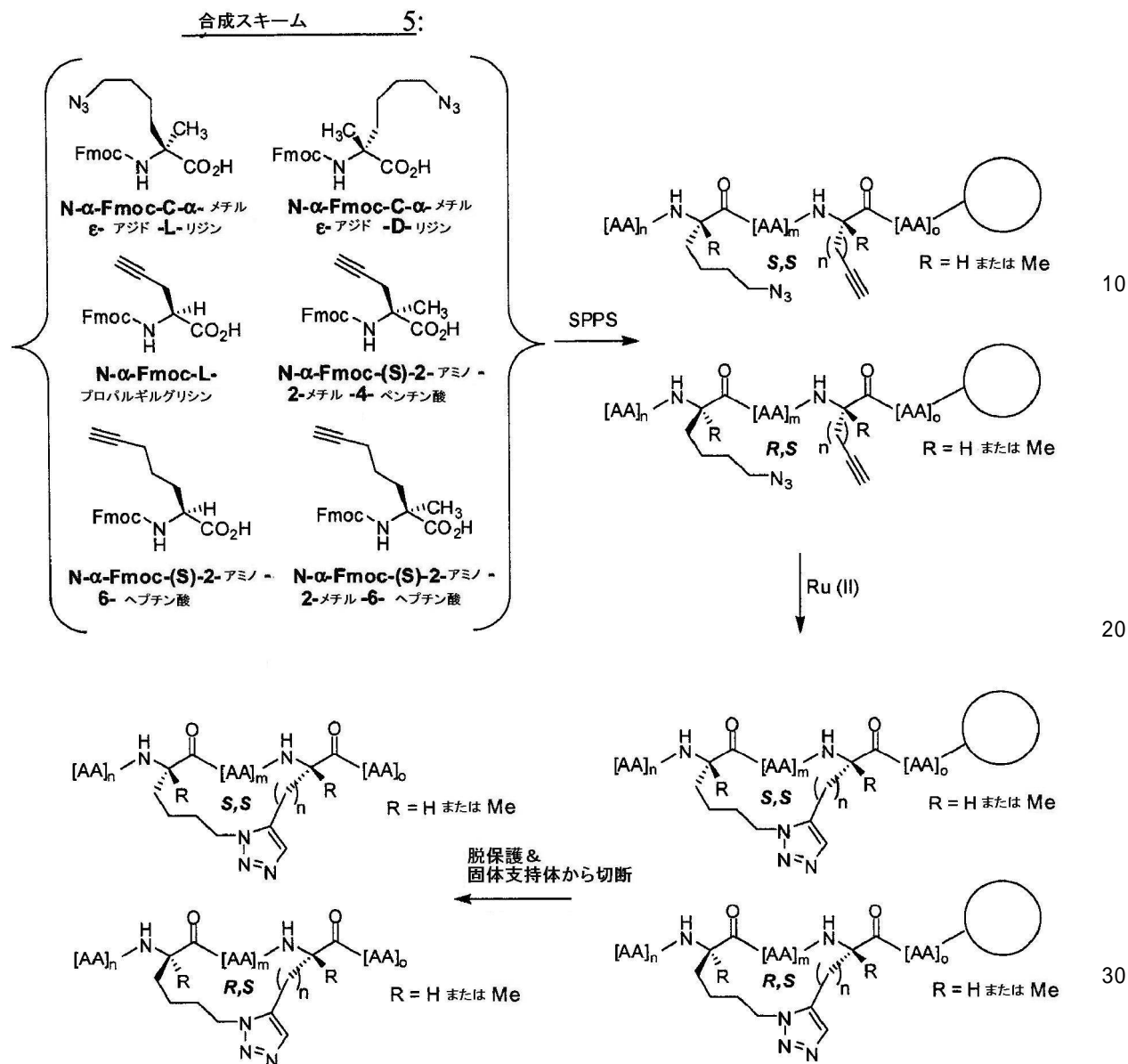
【化 3 7】



合成スキーム 4 に示される架橋ポリペプチドの合成のための一般的な方法において、ペプチド模倣物前駆体は、アジド部分およびアルキン部分を含み、市販のアミノ酸 N - α -Fmoc- L -プロパルギルグリシンならびにアミノ酸 (S) -2-アミノ-2-メチル-4-ペンテン酸、 (S) -2-アミノ-6-ヘプテン酸、 (S) -2-アミノ-2-メチル-6-ヘプテン酸、 N -メチル- e -アジド- L -リジン、および N -メチル- e -アジド- D -リジンの N - α -Fmoc 保護形態を用いる、液相または固相ペプチド合成 (SPPS) によって合成される。次いでペプチド模倣物前駆体は、標準的な条件 (例えば、95% TFA などの強酸) によって脱保護され、固相樹脂から切断される。ペプチド模倣物前駆体は、粗混合物として反応させるか、または $Ru(II)$ 試薬、例えば、 $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ もしくは $[Cp^*RuCl]_4$ などの大環状分子化試薬と反応させる前に精製する (Rasmussen ら (2007)、Org. Lett. 9: 5337~5339; Zhang ら (2005)、J. Am. Chem. Soc. 127: 15998~15999)。いくつかの実施形態において、大環状分子化工程は、DMF、 CH_3CN および THF からなる群より選択される溶媒において行われる。

【0173】

【化 3 8】



合成スキーム 5 に示される架橋ポリペプチドの合成のための一般的な方法において、ペプチド模倣物前駆体は、アジド部分およびアルキン部分を含み、かつ市販のアミノ酸 N - Fmoc - L - プロパルギルグリシンならびにアミノ酸 (S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 4 - ペンチン酸、(S) - 2 - アミノ - 6 - ヘプチン酸、(S) - 2 - アミノ - 2 - メチル - 6 - ヘプチン酸、N - メチル - e - アジド - L - リジン、および N - メチル - e - アジド - D - リジンの N - Fmoc 保護形態を用いる、固相ペプチド合成 (SPPS) によって合成される。ペプチド模倣物前駆体を、粗混合物として樹脂上で Ru (I) 試薬などの大環状分子化試薬と反応させる。例えば、試薬は $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ または $[Cp^*RuCl]_4$ であってもよい (Rasmussen ら (2007)、Org. Lett. 9: 5337 ~ 5339; Zhang ら (2005)、J. Am. Chem. Soc. 127: 15998 ~ 15999)。いくつかの実施形態において、大環状分子化工程は、 CH_2Cl_2 、 $ClCH_2CH_2Cl$ 、 CH_3CN 、DMF、および THF からなる群より選択される溶媒において行われる。

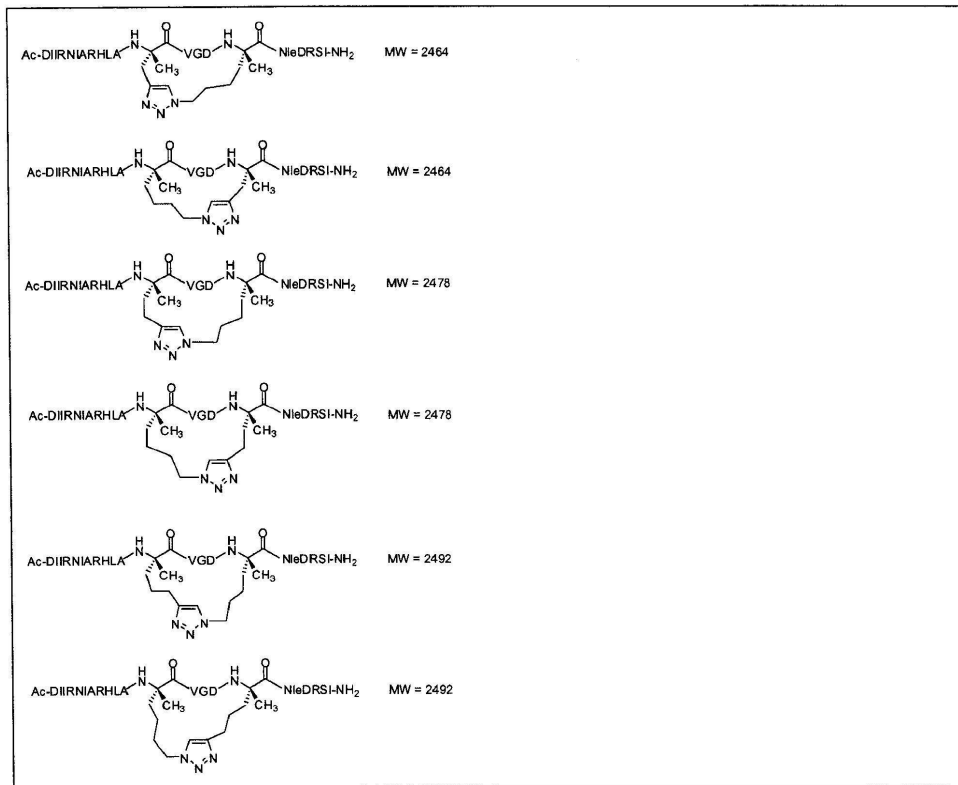
【0174】

いくつかの例示的な架橋ポリペプチドを表 5 に示す。「Nle」はノルロイシンを表し、メチオニン残基を置換する。同様なリンカーを用いて、表 1 ~ 表 4 において開示されているポリペプチド配列に基づいて架橋ポリペプチドを合成することが想定される。

【 0 1 7 5 】

【表 5 - 1】

表 5

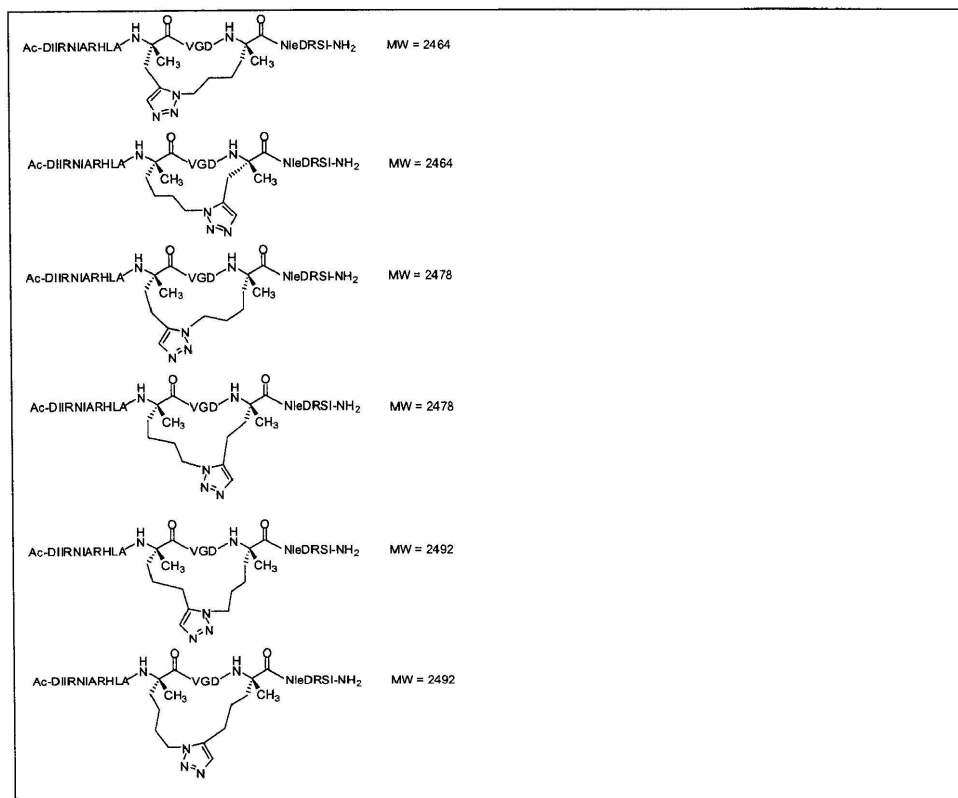


10

20

【 0 1 7 6 】

【表 5 - 2】



30

40

表 5 は、例示的な本発明のペプチド模倣大環状分子を示す。「Nle」はノルロイシンを示す。

50

【 0 1 7 7 】

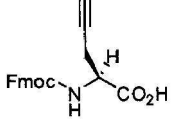
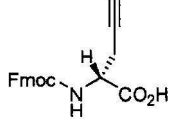
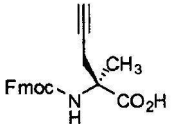
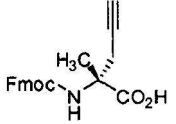
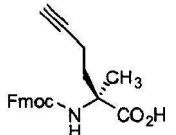
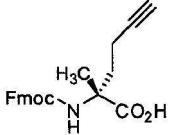
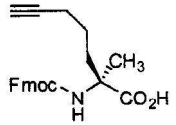
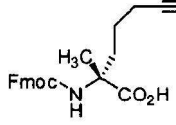
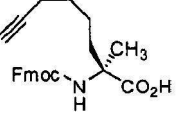
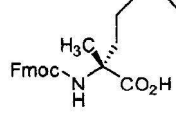
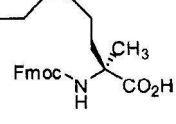
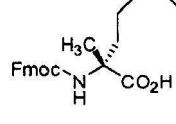
本発明は、本明細書に記載の架橋ポリペプチドの合成における天然に存在しないアミノ酸およびアミノ酸アナログの使用を想定する。安定なトリアゾール含有架橋ポリペプチドの合成のために使用される合成方法を行い易い任意のアミノ酸またはアミノ酸アナログを、本発明において用いることができる。例えば、L-プロパルギルグリシンが本発明において有用なアミノ酸として想定される。しかし、異なるアミノ酸側鎖を含む他のアルキン含有アミノ酸もまた、本発明において有用である。例えば、L-プロパルギルグリシンは、アミノ酸の - 炭素とアミノ酸側鎖のアルキンとの間に1つのメチレン単位を含む。本発明はまた、 - 炭素とアルキンとの間に複数のメチレン単位を有するアミノ酸の使用も想定する。また、アミノ酸であるL-リジン、D-リジン、 - メチル-L-リジン、および - メチル-D-リジンのアジド-アナログが、本発明において有用なアミノ酸であると想定される。しかし、異なるアミノ酸側鎖を含有する他の末端アジドアミノ酸もまた、本発明において有用である。例えば、L-リジンのアジドアナログは、アミノ酸の - 炭素とアミノ酸側鎖の末端アジドとの間に4つのメチレン単位を含む。本発明はまた、 - 炭素と末端アジドとの間に4つ未満のメチレン単位または4つより多いメチレン単位を有するアミノ酸の使用も想定する。表6は、本発明の架橋ポリペプチドの調製において有用ないくつかのアミノ酸を示す。

10

【 0 1 7 8 】

【表 6 - 1】

表 6

 <p>N-α-Fmoc-L-プロパルギルグリシン</p>	 <p>N-α-Fmoc-D-プロパルギルグリシン</p>
 <p>N-α-Fmoc-(S)-2-アミノ-2-メチル-4-ペンチン酸</p>	 <p>N-α-Fmoc-(R)-2-アミノ-2-メチル-4-ペンチン酸</p>
 <p>N-α-Fmoc-(S)-2-アミノ-2-メチル-5-ヘキシニン酸</p>	 <p>N-α-Fmoc-(R)-2-アミノ-2-メチル-5-ヘキシニン酸</p>
 <p>N-α-Fmoc-(S)-2-アミノ-2-メチル-6-ヘプチン酸</p>	 <p>N-α-Fmoc-(R)-2-アミノ-2-メチル-6-ヘプチン酸</p>
 <p>N-α-Fmoc-(S)-2-アミノ-2-メチル-7-オクチン酸</p>	 <p>N-α-Fmoc-(R)-2-アミノ-2-メチル-7-オクチン酸</p>
 <p>N-α-Fmoc-(S)-2-アミノ-2-メチル-8-ノニン酸</p>	 <p>N-α-Fmoc-(R)-2-アミノ-2-メチル-8-ノニン酸</p>

【 0 1 7 9 】

【表 6 - 2】

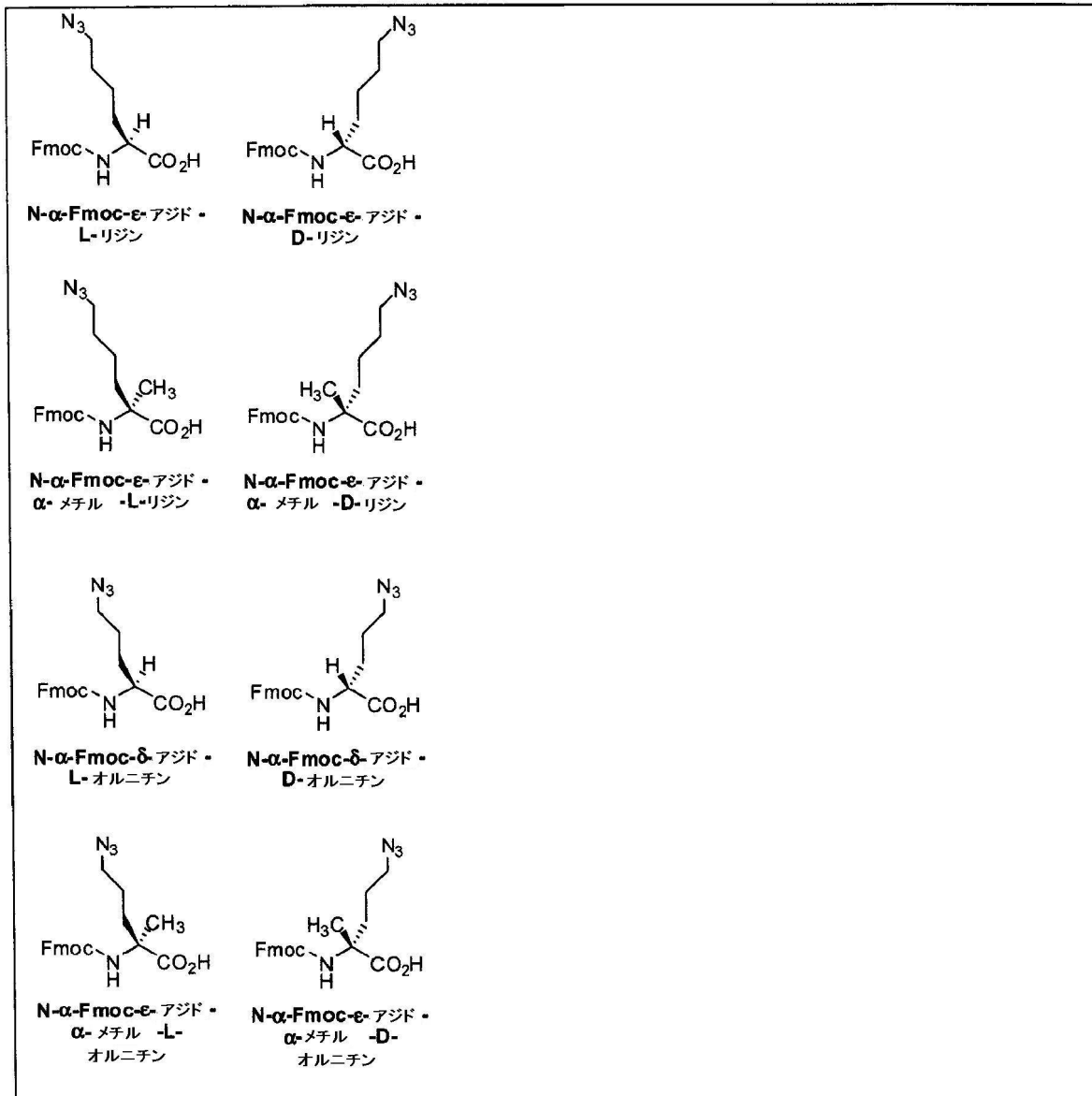


表 6 は、本発明の架橋ポリペプチドの調製において有用な例示的アミノ酸を示す。

【 0 1 8 0 】

いくつかの実施形態において、アミノ酸およびアミノ酸アナログは D - 配置のものである。他の実施形態において、アミノ酸およびアミノ酸アナログは L - 配置のものである。いくつかの実施形態において、ペプチド模倣物中に含有されるアミノ酸およびアミノ酸アナログの一部は D - 配置のものであるが、アミノ酸およびアミノ酸アナログの一部は L - 配置のものである。いくつかの実施形態においてアミノ酸アナログは、 α -メチル-L-プロパルギルグリシン、 α -メチル-D-プロパルギルグリシン、 ϵ -アジド- α -メチル-L-リジン、および ϵ -アジド- α -メチル-D-リジンなどの、 α -置換のものである。いくつかの実施形態においてアミノ酸アナログは、N-アルキル化、例えば、N-メチル-L-プロパルギルグリシン、N-メチル-D-プロパルギルグリシン、N-メチル- ϵ -アジド-L-リジン、および N-メチル- ϵ -アジド-D-リジンである。

【 0 1 8 1 】

いくつかの実施形態において、そのアミノ酸の -NH 部分は、-Fmoc および -Boc を含むがこれらに限定されない保護基を用いて保護される。他の実施形態において、そのアミノ酸は、架橋ポリペプチドの合成の前には保護されていない。

【 0 1 8 2 】

他の実施形態において、式 I I I の架橋ポリペプチドが合成される。以下の合成スキーマ

10

20

30

40

50

10

【化 3 9】

合成スキーム 6:



30



）によって合成される。D - システインまたはL - システインの - メチル化バージョンは、公知の方法（Seebachら（1996）、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 2708 ~ 2748、およびその参考文献）によって作製され、次いで公知の方法（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、「Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins」、Oxford University Press、New York: 1998）によって適切に保護されたN - - Fmoc - S - トリチルモノマーに変換される。次いで前駆体ペプチド模倣物は、標準的な条件（例えば、95% TFAなどの強酸）によって脱保護され、固相樹脂から切断される。前駆体ペプチド模倣物は、粗混合物として反応されるか、または有機溶液もしくは水性溶液においてX - L₂ - Yとの反応の前に精製される。いくつかの実施形態においてアルキル化反応は、大環状分子化を容易にし、重合を回避するために希釈条件下（すなわち0.15 mmol / L）で行われる。いくつかの実施形態において、アルキル化反応は、液体NH₃（Mosbergら（1985）、J. Am. Chem. Soc. 107: 2986 - 2987; Szewczukら（1992）、Int. J. Peptide Protein Res. 40: 233 - 242）、NH₃ / MeOH、またはNH₃ / DMF（Orら（1991）、J. Org. Chem. 56: 3146 - 3149）などの有機溶液中で行われる。他の実施形態において、アルキル化は、6 MのグアニジニウムHCL、pH 8などの水性溶液中で行われる（Brunelら（2005）、Chem. Commun. (20): 2552 ~ 2554）。他の実施形態において、アルキル化反応に使用される溶媒はDMFまたはジクロロエタンである。

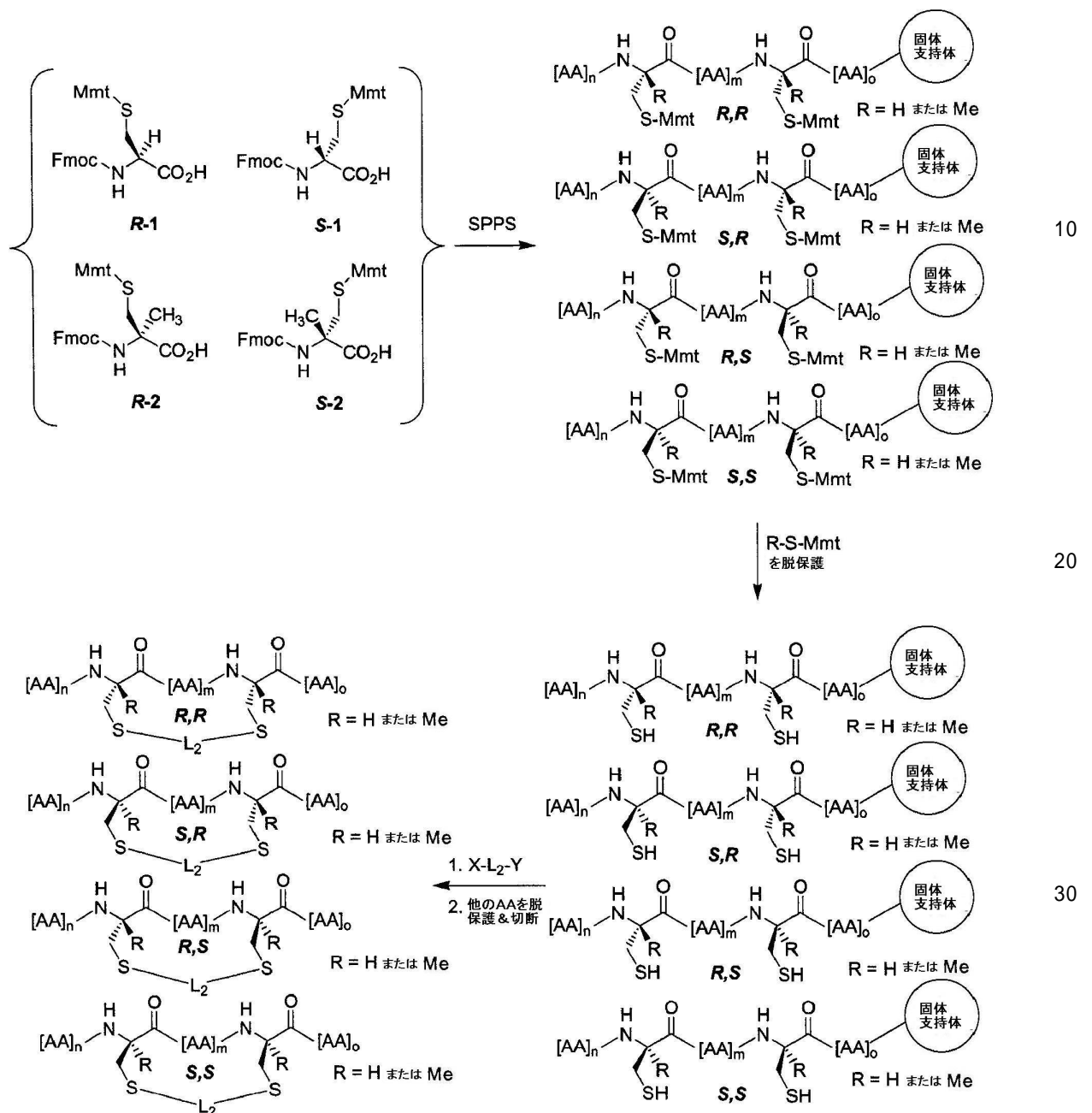
10

20

【0184】

【化 40】

合成スキーム 7:



スキーム7において、前駆体ペプチド模倣物は2つ以上の $-SH$ 部分を含んでおり、その2つは特別に保護されていて、それにより大環状分子形成のためのその選択的な脱保護およびその後のアルキル化が可能になる。前駆体ペプチド模倣物は、N - - Fmoc - S - p - メトキシトリチル - L - シスチンまたはN - - Fmoc - S - p - メトキシトリチル - D - シスチンなどの市販のN - - Fmocアミノ酸を用いる固相ペプチド合成 (SPPS) によって合成される。D - シスチンまたはL - シスチンの α -メチル化バージョンは、公知の方法 (Seebachら (1996)、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 2708 - 2748、およびその参考文献) によって作製され、次いで公知の方法 (その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、「Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins」、Oxford University Press、New York: 1998) によって、適切に保護されたN - - Fmoc - S - p - メトキシトリチルモノマーに変換される。次いでペプチド模倣物前駆体のMmt保護基は、標準的な条件 (例えば、D

10

20

30

40

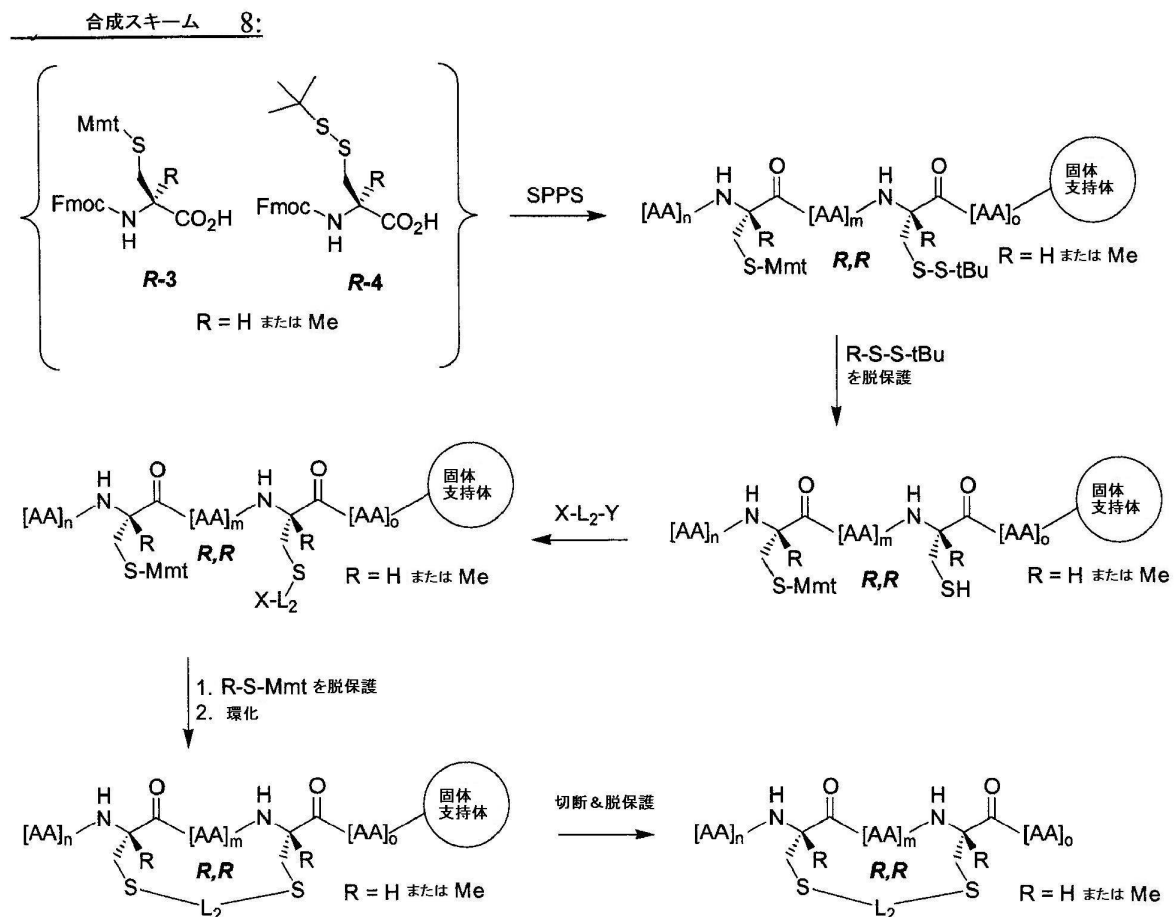
50

CM中1% TFAなどの弱酸)によって選択的に切断される。次いで前駆体ペプチド模倣物を、樹脂上で有機溶液において $X-L_2-Y$ と反応させる。例えば、この反応は、ジイソプロピルエチルアミンなどの立体障害塩基の存在下で起こる。いくつかの実施形態において、アルキル化反応は、液体 NH_3 (Mosbergら(1985)、J. Am. Chem. Soc. 107: 2986-2987; Szewczukら(1992)、Int. J. Peptide Protein Res. 40: 233-242)、 $NH_3/MeOH$ 、または NH_3/DMF (Orら(1991)、J. Org. Chem. 56: 3146-3149)などの有機溶液中で行われる。他の実施形態において、アルキル化反応は、DMFまたはジクロロエタン中で行われる。次いで架橋ポリペプチドは、標準的な条件(例えば、95% TFAなどの強酸)によって脱保護され、固相樹脂から切断される。

10

【0185】

【化41】



スキーム 8 において、ペプチド模倣物前駆体は2つ以上の-SH部分を含んでおり、その2つが特別に保護されており、大環状分子形成のため、その選択的な脱保護およびその後のアルキル化が可能になる。ペプチド模倣物前駆体は、N- - Fmoc-S-p-メトキシトリチル-L-システイン、N- - Fmoc-S-p-メトキシトリチル-D-システイン、N- - Fmoc-S-S-t-ブチル-L-システイン、およびN- - Fmoc-S-S-t-ブチル-D-システインなどの市販のN- - Fmocアミノ酸を用いる固相ペプチド合成(SPPS)によって合成される。D-システインまたはL-システインの -メチル化バージョンは、公知の方法(Seebachら(1996)、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 2708-2748、およびその参考文献)によって作製され、次いで公知の方法(その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、「Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins」、Oxford University Press、New

40

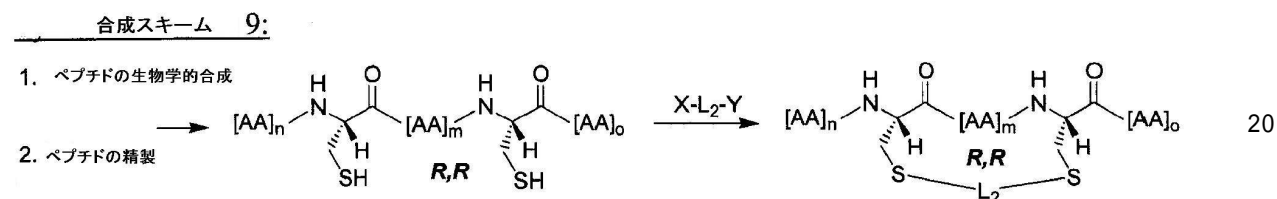
50

York : 1998) によって、適切に保護された N - - Fmoc - S - p - メトキシトリチルまたは N - - Fmoc - S - S - t - ブチルモノマーに変換される。ペプチド模倣物前駆体の S - S - t ブチル保護基は、公知の条件によって選択的に切断される (例えば、DMF 中 20% 2 - メルカプトエタノール、参照 : Galandea (2005)、J. Comb. Chem. 7 : 174 - 177)。次いで前駆体ペプチド模倣物を、樹脂上で、有機溶液においてモル過剰の X - L₂ - Y と反応させる。例えば、反応は、ジイソプロピルエチルアミンなどの立体障害塩基の存在下で起こる。次いでペプチド模倣物前駆体の Mmt 保護基は、標準的な条件 (例えば、DCM 中 1% TFA などの弱酸) によって選択的に切断される。次いでペプチド模倣物前駆体は、樹脂上で有機溶液における立体障害塩基による処理によって環化される。いくつかの実施形態において、アルキル化反応は、NH₃ / MeOH または NH₃ / DMF (Or (1991)、J. Org. Chem. 56 : 3146 - 3149) などの有機溶液中で行われる。次いで架橋ポリペプチドは、標準的な条件 (例えば、95% TFA などの強酸) によって脱保護され、固相樹脂から切断される。

10

【0186】

【化42】



スキーム 9 において、ペプチド模倣物前駆体は、2つの L - システイン部分を含む。ペプチド模倣物前駆体は、生きた細胞中で公知の生物学的発現系によって、または公知のインピトロの無細胞発現方法によって合成される。前駆体ペプチド模倣物は、粗混合物として反応されるか、または有機溶液もしくは水性溶液において X - L₂ - Y との反応の前に精製される。いくつかの実施形態においてアルキル化反応は、大環状分子化を容易にし、重合を回避するために希釈条件下 (すなわち 0.15 mmol / L) で行われる。いくつかの実施形態において、アルキル化反応は、液体 NH₃ (Mosberg (1985)、J. Am. Chem. Soc. 107 : 2986 - 2987; Szezewczuk (1992)、Int. J. Peptide Protein Res. 40 : 233 - 242)、NH₃ / MeOH、または NH₃ / DMF (Or (1991)、J. Org. Chem. 56 : 3146 - 3149) などの有機溶液中で行われる。他の実施形態において、アルキル化は、6 M グアニジニウム HCl、pH 8 (Brunel (2005)、Chem. Commun. (20) : 2552 - 2554) などの水性溶液中で行われる。他の実施形態において、アルキル化は、DMF またはジクロロエタン中で行われる。別の実施形態において、アルキル化は非変性水溶液中で実行され、さらに別の実施形態においてアルキル化は、らせん構造形成に有利な条件下で行われる。さらに別の実施形態において、アルキル化は、前駆体ペプチド模倣物が別のタンパク質に結合するのに有利な条件下で行われ、その結果、アルキル化の間に結合らせん高次構造の形成がもたらされる。

30

40

【0187】

チオール基との反応に適切な、X および Y についての種々の実施形態が想定される。一般に、各々の X または Y は独立して、表 5 に示す一般的なカテゴリーから選択される。例えば、X および Y は、- Cl、- Br または - I などのハロゲン化物である。本明細書に記載の任意の大環状分子形成リンカーを、表 1 ~ 4 に示す任意の配列との任意の組合せ、そしてまた、本明細書に示す任意の R - 置換基との任意の組合せでも用いてもよい。

【0188】

【表 7】

表 7：チオール基と反応可能な反応基および得られる結合の例

X または Y	得られる共有結合
アクリルアミド	チオエーテル
ハロゲン化物（例えば、ハロゲン化アルキルまたはハロゲン化アリール）	チオエーテル
スルホネート	チオエーテル
アジリジン	チオエーテル
エポキシド	チオエーテル
ハロアセトアミド	チオエーテル
マレイミド	チオエーテル
スルホン酸エステル	チオエーテル

10

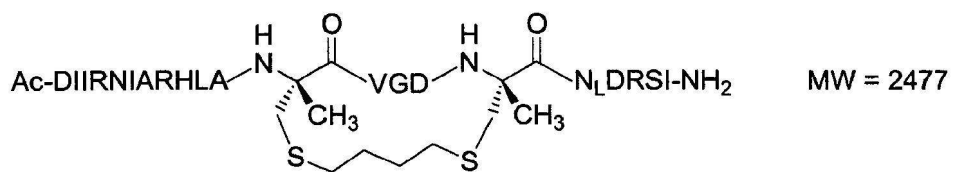
20

表 6 は、本発明の例示的な大環状分子を示す。「N_L」は、ノルロイシンを表し、メチオニン残基を置き換える。同様なリンカーを用いて、表 1～表 4 において開示されているポリペプチド配列に基づいて架橋ポリペプチドを合成することが想定される。

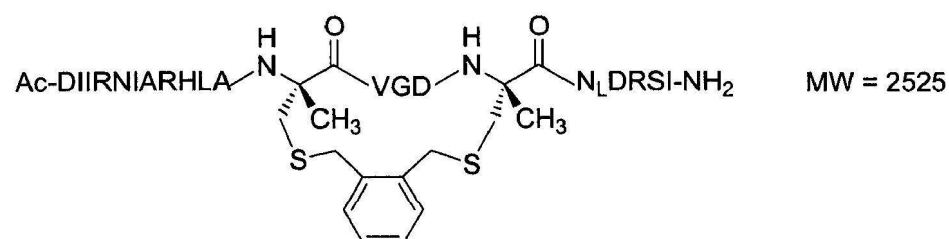
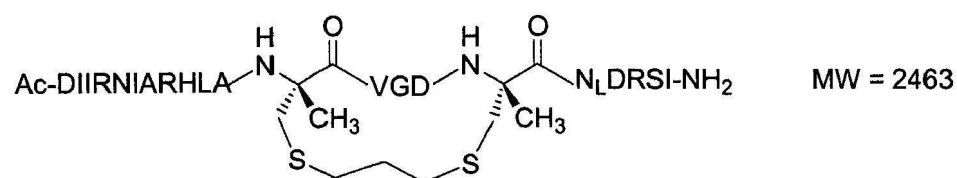
【 0 1 8 9 】

【表 8】

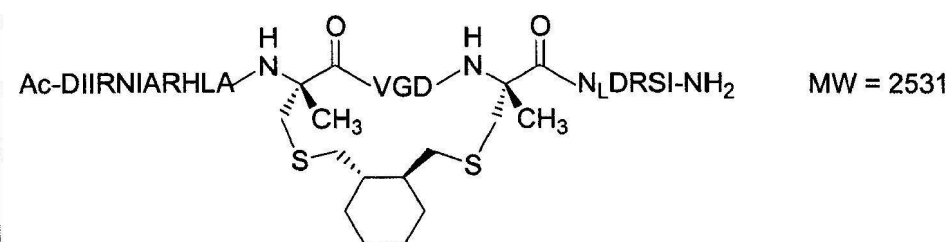
表8: 本発明の架橋ポリペプチドの例



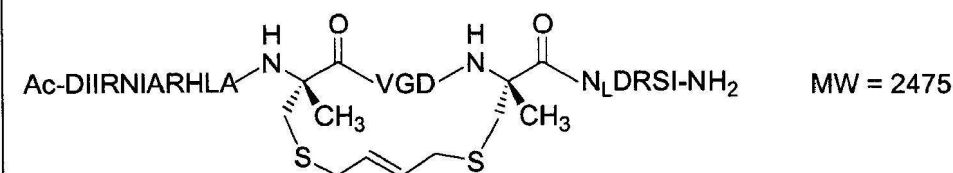
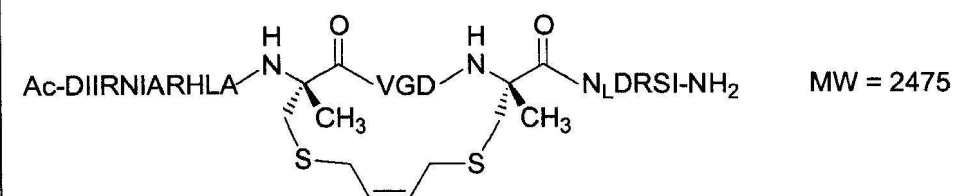
10



20



30



40

この表に示す例では、“N_L”はノルロイシンを示す。

本発明は、式(III)の架橋ポリペプチドの合成における、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸の両方のアミノ酸およびアミノ酸アナログの使用を想定する。安定なビス-スルフィド含有架橋ポリペプチドの合成に使用される合成方法を行い易い任意のアミノ酸またはアミノ酸アナログを、本発明において用いてもよい。例え

50

ば、システインが、本発明における有用なアミノ酸として想定される。しかし、異なるアミノ酸側鎖を含むシステイン以外の含硫アミノ酸もまた、有用である。例えば、システインは、アミノ酸の α -炭素とアミノ酸側鎖の末端-SHとの間に1つのメチレン単位を含む。本発明はまた、 α -炭素と末端-SHの間に複数のメチレン単位を有するアミノ酸の使用も想定する。非限定的な例としては、 γ -メチル-L-ホモシステインおよび γ -メチル-D-ホモシステインが挙げられる。いくつかの実施形態において、アミノ酸およびアミノ酸アナログは、D-配置のものである。他の実施形態において、アミノ酸およびアミノ酸アナログはL-配置のものである。いくつかの実施形態において、ペプチド模倣物に含有されるアミノ酸およびアミノ酸アナログの一部はD-配置のものであるが、アミノ酸およびアミノ酸アナログの一部はL-配置のものである。いくつかの実施形態において、アミノ酸アナログは、 γ -メチル-L-システインおよび γ -メチル-D-システインなどの γ -二置換のものである。

10

【0190】

本発明は、大環状分子形成リンカーを用いてペプチド模倣物前駆体内の2つ以上の-SH部分を連結させて本発明の架橋ポリペプチドが形成される、大環状分子を包含する。上述したように、大環状分子形成リンカーは、立体構造の剛性、代謝安定性の増加および/または細胞透過性の増加を付与する。さらに、いくつかの実施形態において、大環状形成の連結は、ペプチド模倣物の大環状分子の α -らせん二次構造を安定化させる。大環状分子形成リンカーは式 $X-L_2-Y$ のものであり、ここで、上記で定義したとおりXおよびYは両方とも同じ部分または異なる部分である。XおよびYは両方とも、1つの大環状分子形成リンカー-L₂-によるビス-スルフヒドリル含有ペプチド模倣物前駆体のビスアルキル化を可能にするという化学的特性を有する。上記で定義されているとおり、リンカー-L₂-は、上記で定義されているとおり、全てが必要に応じてR₅基で置換することができる、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、シクロアリーレンもしくはヘテロシクロアリーレン、または-R₄-K-R₄-を含む。さらに、スルフヒドリル含有アミノ酸の-SHに結合している炭素以外の、大環状分子形成リンカー-L₂-内の1~3個の炭素原子は、N、SまたはOなどのヘテロ原子で必要に応じて置換される。

20

【0191】

大環状分子形成リンカー $X-L_2-Y$ のL₂成分は、とりわけ、架橋ポリペプチドを形成するために用いられる2つのアミノ酸アナログの位置の間の距離に依存して、長さが増加し得る。さらに、大環状分子形成リンカーのL₁成分および/またはL₃成分の長さが増加するので、安定な架橋ポリペプチドの形成に適切な全長のリンカーを生み出すために、L₂の長さもまた増加し得る。例えば、使用されるアミノ酸アナログがさらなるメチレン単位をL₁およびL₃のそれぞれに付加することによって変化する場合、L₂の長さは、L₁およびL₃の増加した長さを相殺するために約2メチレン単位に相当する(equivalent)長さだけ減少する。

30

【0192】

いくつかの実施形態において、L₂は、式 $-(CH_2)_n-$ のアルキレン基であり、nは約1~約15の整数である。例えば、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である。他の実施形態において、L₂はアルケニレン基である。さらに別の実施形態において、L₂はアリール基である。

40

【0193】

表9は、 $X-L_2-Y$ 基のさらなる実施形態を示す。

【0194】

【表 9】

表9. 本発明の例示的な $X-L_2-Y$ 基

		</

本発明を実行するために適切であると想定される、架橋ポリペプチドを形成するためのさらなる方法としては、Mustapa, M. Firouz Mohdら、J. Org. Chem. (2003)、68、8193~8198頁；Yang, Binら Bioorg. Med. Chem. Lett. (2004)、14、1403~1406頁；米国特許第5,364,851号；米国特許第5,446,128号；米国特許第5,824,483号；米国特許第6,713,280号；および米国特許第7,202,332号によって開示されているものが挙げられる。そのような実施形態において、位置にさらなる置換基R' - を含有しているアミノ酸前駆体が用いられる。そのようなアミノ酸は、架橋剤が置換される位置、または、あるいは、大環状分子前駆体の配列中のどこか他の場所であってもよい所望の位置で、大環状分子前駆体中に組み込まれる。次いで前駆体の環化を、示される方法に従って達成する。

【 0 1 9 5 】

アッセイ

本発明の架橋ポリペプチドの特性を、例えば、以下に記述される方法を用いることによ

ってアッセイする。

【0196】

- ヘリシティを決定するためのアッセイ

溶液中で、 α -らせんドメインを有するポリペプチドの二次構造は、ランダムコイル構造と α -らせん構造との間の動的平衡に到達し、「ヘリシティパーセント (percent helicity)」として表される場合が多い。従って、例えば、非改変プロアポトーシスBH3ドメインは大部分が、溶液中で通常25%未満の α -らせん含量を有するランダムコイルである。一方、最適化されたリンカーを有するペプチド模倣大環状分子は、例えば、対応する架橋されていないポリペプチドのそれよりも少なくとも2倍高い α -ヘリシティを有する。いくつかの実施形態において、本発明の大環状分子は、50%より高い α -ヘリシティを有する。BH3ドメインベースの大環状分子などの本発明のペプチド模倣大環状分子のヘリシティをアッセイするために、上記化合物を、水性溶液（例えば、pH7の50mMのリン酸カリウム溶液、または蒸留水 (distilled H_2O)、25~50 μ Mの濃度まで）に溶解する。標準的な測定パラメーター（例えば、温度、20℃；波長、190~260nm；ステップ分解能、0.5nm；速度、20nm/秒；蓄積、10；応答、1秒；帯域幅、1nm；光路長 (path length)、0.1cm）を用いて、分光偏光計（例えば、Jasco J-710）において円二色性 (CD) スペクトルを得る。平均残基楕円率（例えば、[θ]222obs）を α -らせんデカペプチドモデル (Yangら (1986)、Methods Enzymol. 130: 208) について報告されている値で割ることによって、各ペプチドの α -らせん含量を計算する。

10

20

【0197】

融解温度 (T_m) を決定するためのアッセイ

α -らせんなどの二次構造を含む本発明のペプチド模倣大環状分子は、例えば、対応する架橋されていないポリペプチドよりも高い融解温度を示す。代表的には、本発明のペプチド模倣大環状分子は、水性溶液中で高度に安定な構造を表す60℃超の T_m を示す。融解温度に対する大環状分子形成の影響をアッセイするために、ペプチド模倣大環状分子または非改変ペプチドを、蒸留水中に溶解（例えば、50 μ Mの最終濃度で）し、分光偏光計（例えば、Jasco J-710）において標準的なパラメーター（例えば、波長222nm；ステップ解像度、0.5nm；速度、20nm/秒；蓄積、10；応答、1秒；帯域幅、1nm；温度上昇速度：1℃/分；光路長、0.1cm）を用いて、ある温度範囲（例えば、4~95℃）にわたって楕円率の変化を測定することによって、 T_m を決定する。

30

【0198】

プロテアーゼ耐性アッセイ

ペプチド骨格のアミド結合は、プロテアーゼによる加水分解を受けやすく、そのためペプチド性化合物は、インビボでの急速な分解に対して脆弱になる。しかし、ペプチド α -らせん形成は、代表的にはアミド骨格を埋没させ、従って、タンパク質分解性の切断からアミド骨格を保護することができる。本発明のペプチド模倣大環状分子をインビトロのトリプシンタンパク質分解に供して、対応する架橋されていないポリペプチドと比較した分解速度の変化について評価し得る。例えば、ペプチド模倣大環状分子および対応する架橋されていないポリペプチドを、トリプシンアガロースでインキュベートし、遠心分離によって種々の時点で反応をクエンチして、その後HPLC注入して、280nmでの紫外線吸収により残存基質を定量する。簡潔に述べると、ペプチド模倣大環状分子およびペプチド模倣物前駆体 (5 μ g (mcg)) を、トリプシンアガロース (Pierce) (S/E約125) で0、10、20、90、および180分間インキュベートする。高速での卓上遠心分離によって反応をクエンチし、HPLCによる280nmでのピーク検出によって単離した上清中の残存している基質を定量する。タンパク質分解反応は一次反応速度式 (first-order kinetics) を示し、時間に対する $\ln[S]$ ($k = -1 \times$ 勾配) のプロットから速度定数、 k を決定する。

40

50

【0199】

エキソピボ安定性アッセイ

最適化されたリンカーを有するペプチド模倣大環状分子は、例えば、対応する架橋されていないポリペプチドのそれよりも少なくとも2倍高いエキソピボ半減期を有し、かつ12時間以上のエキソピボ半減期を有する。エキソピボの血清安定性研究には、種々のアッセイを用いてもよい。例えば、ペプチド模倣大環状分子および/または対応する架橋されていないポリペプチド(2 μg)をそれぞれ、新鮮なマウス血清、ラット血清および/またはヒト血清(例えば、1~2 mL)とともに、37 °Cで0、1、2、4、8、および24時間インキュベートする。異なる大環状分子濃度のサンプルは、血清を用いた段階希釈によって調製することができる。インタクトな化合物のレベルを決定するために、以下の手順を用いてもよい: 100 μLの血清を2 mLの遠心管に移すこと、その後10 μLの50%ギ酸および500 μLのアセトニトリルを添加し、4 ± 2 °Cで10分間、14,000 RPMで遠心分離することによって、サンプルを抽出する。次いで上清を新しい2 mLのチューブに移し、TurbovapにおいてN₂ < 10 psi下、37 °Cでエバポレートさせる。サンプルを100 μLのアセトニトリル: 水(50:50)中で再構成し、LC-MS/MS分析にかける。エキソピボ安定性を試験するための同等または同様の手順は公知であり、血清中の大環状分子の安定性を決定するために用いることができる。

10

【0200】

インビトロ結合アッセイ

アクセプタータンパク質に対するペプチド模倣大環状分子およびペプチド模倣物前駆体の結合および親和性を評価するために、例えば、蛍光偏光アッセイ(FPA)を用いる。FPA技術は、偏光および蛍光レーザーを用いて分子の配向および運動性を測定する。偏光によって励起されると、高い見かけの分子量を有する分子に結合している蛍光レーザー(例えば、FITC)(例えば、大きなタンパク質に結合したFITC標識ペプチド)は、より小さい分子に結合している蛍光レーザー(例えば、溶液中で遊離しているFITC標識ペプチド)と比較してそのより遅い回転速度のために、より高いレベルの偏光蛍光を発する。

20

【0201】

例えば、フルオレセイン化(fluoresceinated)ペプチド模倣大環状分子(25 nM)を、結合緩衝液(140 mMのNaCl、50 mMのTris-HCl、pH 7.4)中で、アクセプタータンパク質(25~1000 nM)と一緒に室温で30分間インキュベートする。結合活性を、例えば、ルミネッセンス分光光度計(例えば、Perkin-Elmer LS50B)において蛍光偏光によって測定する。K_d値は、例えば、Graphpad Prismソフトウェア(Graphpad Software, Inc., San Diego, CA)を用いて、非線形回帰分析によって決定し得る。本発明のペプチド模倣大環状分子は、場合によっては、対応する架橋されていないポリペプチドと同様のまたはそれより低いK_dを示す。

30

【0202】

BCL-2、BCL-X_L、BAXまたはMCL1などのBH3ペプチドに対するアクセプタータンパク質を、例えば、このアッセイにおいて用いてもよい。MDM2またはMDMXなどのp53ペプチドに対するアクセプタータンパク質も、このアッセイで用いてもよい。

40

【0203】

ペプチド-タンパク質相互作用のアンタゴニストを特徴付けるためのインビトロ置換アッセイ

ペプチド(例えば、BH3ペプチドまたはp53ペプチド)とアクセプタータンパク質との間の相互作用をアンタゴナイズする化合物の結合および親和性を評価するために、例えば、ペプチド模倣物前駆体配列に由来するフルオレセイン化ペプチド模倣大環状分子を利用する蛍光偏光アッセイ(FPA)を用いる。このFPA技術は、偏光および蛍光レーザーを用いて分子の配向および運動性を測定する。偏光によって励起されるとき、高い

50

見かけの分子量を有する分子に結合している蛍光トレーサー（例えば、F I T C）（例えば、大きなタンパク質に結合したF I T C標識ペプチド）は、より小さい分子に結合している蛍光トレーサー（例えば、溶液中で遊離しているF I T C標識ペプチド）と比較してそのより遅い回転速度のために、より高いレベルの偏光蛍光を発する。フルオレセイン化ペプチド模倣大環状分子とアクセプタータンパク質との間の相互作用をアンタゴナイズする化合物は、競合的結合F P A実験において検出される。

【0204】

例えば、推定アンタゴニスト化合物（1 n M ~ 1 m M）およびフルオレセイン化ペプチド模倣大環状分子（25 n M）を、結合緩衝液（140 m MのNaCl、50 m MのTris-HCl、pH 7.4）中で、アクセプタータンパク質（50 n M）と一緒に室温で30分間インキュベートする。アンタゴニスト結合活性を、例えば、ルミネッセンス分光光度計（例えば、Perkin-Elmer LS50B）において蛍光偏光によって測定する。K_d値は、例えば、Graphpad Prismソフトウェア（Graphpad Software, Inc., San Diego, CA）を用いて非線形回帰分析によって決定することができる。

10

【0205】

有機低分子、ペプチド、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質などの任意のクラスの分子を、このアッセイにおいて推定アンタゴニストとして検査してもよい。BCL2、BCL-XL、BAXまたはMCL1などのBH3ペプチドに対するアクセプタータンパク質を、このアッセイにおいて用いてもよい。MDM2またはMDMXなどのp53ペプチドのアクセプタータンパク質をこのアッセイで用いてもよい。

20

【0206】

インタクトな細胞における結合アッセイ

インタクトな細胞における、それらの天然アクセプターに対するペプチドまたは架橋ポリペプチドの結合は、免疫沈降実験によって測定することが可能である。例えば、インタクトな細胞を、血清の存在または非存在において、フルオレセイン化（F I T C標識）化合物とともに4 ~ 24時間インキュベートする。次いで細胞をペレットにして、溶解緩衝液（50 m MのTris [pH 7.6]、150 m MのNaCl、1% CHAPSおよびプロテアーゼ阻害剤カクテル）中で、10分間4℃でインキュベートする。抽出物を14,000 rpmで15分間遠心分離にかけ、上清を回収して10 µlのヤギ抗F I T C抗体と4℃で回転させながら2時間インキュベートし、その後さらに4℃で2時間、プロテインA/Gセファロース（50 µlの50%ビーズスラリー）とインキュベートする。短時間の遠心分離の後、ペレットを、漸増する塩濃度（例えば、150、300、500 m M）を含有する溶解緩衝液中で洗浄する。次いで、ビーズを、150 m MのNaClで再平衡化させて、その後SDS含有サンプル緩衝液の添加および煮沸を行う。遠心分離後、上清を必要に応じて、4% ~ 12%勾配Bis-Trisゲルを用いて電気泳動し、その後Immobilion-Pメンブレンに移す。ブロッキング後、必要に応じて、プロットを、F I T Cを検出する抗体と、またBCL2、MCL1、BCL-XL、A1、BAX、BAK、MDM2またはMDMXを含む、架橋ポリペプチドに結合するタンパク質を検出する1つ以上の抗体とともに、インキュベートする。

30

40

【0207】

細胞透過性アッセイ

ペプチドまたは架橋ポリペプチドの細胞透過性を測定するために、インタクトな細胞を、フルオレセイン化架橋ポリペプチド（10 µM）と一緒に4時間、37℃で、無血清媒体中で、またはヒト血清を補充された媒体中でインキュベートし、媒体で2回洗浄し、トリプシン（0.25%）で10分間、37℃でインキュベートする。細胞を再度洗浄してPBS中に再懸濁する。細胞の蛍光を、例えば、FACS CaliburフローサイトメーターまたはCellomics' Kinetic Scan（登録商標）HCS Readerのいずれかを用いることによって分析する。

【0208】

50

細胞効力アッセイ

特定の架橋ポリペプチドの効力は、例えば、ヒトまたはマウス細胞集団に由来する種々の腫瘍形成性および非腫瘍形成性の細胞系統ならびに初代細胞を用いる細胞ベースの死滅アッセイにおいて決定される。細胞生存率を、例えば、架橋ポリペプチド ($0.5 \sim 50 \mu\text{M}$) による $24 \sim 96$ 時間のインキュベーションにわたってモニターして、 $EC_{50} < 10 \mu\text{M}$ で死滅させる架橋ポリペプチドを特定する。細胞生存率を測定するいくつかの標準的なアッセイが市販されており、架橋ポリペプチドの効力を評価するために必要に応じて用いられる。さらに、架橋ポリペプチドがアポトーシス機構を活性化することによって細胞を死滅させるか否かを評価するために、アネキシン V およびカスパーゼ活性化を測定するアッセイが必要に応じて用いられる。例えば、細胞内 ATP 濃度の関数として細胞生存率を決定する Cell Titer - glo アッセイが用いられる。

10

【0209】

インビボ安定性アッセイ

架橋ポリペプチドのインビボ安定性を検討するために、化合物を、例えば、マウスおよび/またはラットに、IV、IP、PO または吸入経路によって $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ の範囲の濃度で投与し、注入後 0 分、5 分、15 分、30 分、1 時間、4 時間、8 時間および 24 時間で血液検体を採取する。次いで $25 \mu\text{L}$ の新鮮血清中のインタクトな化合物のレベルを LC-MS/MS によって上記のとおり測定する。

【0210】

動物モデルにおけるインビボ効力

20

インビボでの本発明の架橋ポリペプチドの抗腫瘍形成活性を決定するために、化合物を、例えば、単独で (IP、IV、PO、吸入または鼻腔内経路によって) または最適以下の用量の関連する化学療法 (例えば、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、エトポシド) と組み合わせて投与する。一例において、ルシフェラーゼを安定に発現する 5×10^6 個の RS4; 11 細胞 (急性リンパ芽球性白血病患者の骨髄から樹立した) を、NOD-SCID マウスの尾静脈内に、全身照射を受けてから 3 時間後に注入する。治療しないまま放置した場合、この形態の白血病はこのモデルにおいて 3 週間以内に死に至る。白血病は、例えば、マウスに D-ルシフェリン (60 mg/kg) を注入し、麻酔をかけた動物をイメージングする (例えば、Xenogen In Vivo Imaging System、Caliper Life Sciences、Hopkinton、MA) ことによって、容易にモニターされる。全身の生物発光を、Living Image Software (Caliper Life Sciences、Hopkinton、MA) による光子フラックス (光子/秒) の積分によって定量する。単独のまたは最適以下の用量の関連する化学療法剤と組み合わせたペプチド模倣大環状分子を、例えば、白血病マウス (注入の 10 日後/実験の 1 日目、 $14 \sim 16$ の生物発光範囲内) に尾静脈または IP 経路で $0.1 \text{ mg/kg} \sim 50 \text{ mg/kg}$ の範囲の用量で 7 ~ 21 日間投与する。必要に応じて、実験中 1 日おきにマウスをイメージングし、実験期間中、毎日生存をモニターする。死亡したマウスを必要に応じて、実験終了の時点で解剖する。別の動物モデルは、ルシフェラーゼを安定に発現する、ヒト濾胞性リンパ腫に由来する細胞系統 D0HH2 の、NOD-SCID マウスへの移植である。これらのインビボ試験では必要に応じて、予備的な薬物動態的、薬力学的および毒性データを作成する。

30

40

【0211】

臨床試験

ヒトの治療に対する本発明の架橋ポリペプチドの適合を決定するために、臨床試験を行う。例えば、癌と診断されかつ治療を必要とする患者を選択して、治療群および 1 つ以上のコントロール群に分け、治療群には本発明の架橋ポリペプチドを投与し、一方コントロール群には、プラセボ、または公知の抗癌剤を与える。従って、本発明の架橋ポリペプチドの治療の安全性および効力は、生存およびクオリティー・オブ・ライフなどの因子に関して患者群の比較を行うことによって評価することができる。この例において、架橋ポリペプチドで治療した患者群は、プラセボで治療した患者コントロール群と比較して長期生

50

存の改善を示す。

【0212】

医薬組成物および投与経路

本発明の架橋ポリペプチドはまた、薬学的に受容可能な誘導体またはそのプロドラッグも含む。「薬学的に受容可能な誘導体」とは、レシipientへの投与の際、本発明の化合物を（直接的または間接的に）提供することができる、本発明の化合物の任意の薬学的に受容可能な塩、エステル、エステルの塩、プロドラッグまたは他の誘導体を意味する。特に好ましい薬学的に受容可能な誘導体は、哺乳動物に投与される場合、本発明の化合物のバイオアベイラビリティを増加させる（例えば、経口投与された化合物の血液中への吸収を増加させることによって）か、またはその親種と比較して生物学的区画（例えば、脳またはリンパ系）への活性な化合物の送達を増加させるものである。いくつかの薬学的に受容可能な誘導体は、水溶解度（aqueous solubility）または胃腸粘膜の能動輸送を増大する化学基を含む。

10

【0213】

いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドは、選択的な生物学的特性を増強するために、適切な官能基を共有結合または非共有結合で結合することによって改変される。そのような改変としては、所与の生物学的コンパートメント（例えば、血液、リンパ系、中枢神経系）への生物学的浸透性を増大させる、経口の利用可能性を増加させる、可溶性を増大させて注入による投与を可能にする、代謝を変化させる、および排泄率を変化させる改変が挙げられる。

20

【0214】

本発明の化合物の薬学的に受容可能な塩としては、薬学的に受容可能な無機の酸および塩基に由来する塩ならびに有機の酸および塩基に由来する塩が挙げられる。適切な酸塩（acid salt）の例としては、酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ニグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキササン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パルモエート、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩およびウンデカン酸塩が挙げられる。適切な塩基に由来する塩としては、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩、アンモニウム塩およびN-（アルキル）₄⁺塩が挙げられる。

30

【0215】

本発明の化合物から医薬組成物を調製するために、薬学的に受容可能なキャリアとしては固体または液体のいずれかのキャリアが挙げられる。固体形態の調製物としては、粉末剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、カシェ剤、坐剤、および分散性粒剤が挙げられる。固体キャリアは、希釈剤、着香剤、結合剤、防腐剤、錠剤崩壊剤、またはカプセル化材料としても機能する1つ以上の物質であってもよい。処方および投与のための技術に関する詳細は、科学文献および特許文献において十分に記述されており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、Maack Publishing Co、Easton PAの最新版を参照のこと。

40

【0216】

粉末剤においては、キャリアとは、微粉化した（finely divided）活性成分と混合されている微粉化した固体である。錠剤において、活性成分は、必要な結合特性を有するキャリアと適切な割合で混合され、所望の形状および大きさに圧縮される。

【0217】

適切な固体賦形剤は炭水化物またはタンパク質増量剤（filler）であり、これには、限定するものではないが、糖、例としては、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール；トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ、または別の植物由来のデンプン；セルロース、例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロー

50

ス、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム；ならびにアラビアゴムおよびトラガカントゴムを含むゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質が挙げられる。所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムなどのこれらの塩のような崩壊剤または可溶化剤を加える。

【0218】

液体形態の調製物としては、液剤、懸濁剤、および乳剤、例えば、水または水/プロピレングリコール溶液が挙げられる。非経口注入用に、液体調製物は、水性ポリエチレングリコール溶液中の溶液に処方することができる。「非経口」という用語は、本明細書において使用される場合、代表的には、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、および皮下を含む投与方法のことをいう。

10

【0219】

薬学的調製物は、好ましくは単位剤形である。このような形態では、調製物は、適切な量の活性成分を含有する単位用量に小分割される。単位剤形は、バイアルまたはアンプル中に、小分けされた錠剤、カプセル、および粉末など、個別量の調製物を収容しているパッケージであるパッケージ調製物であってもよい。また、単位剤形は、それ自体カプセル剤、錠剤、カシエ剤、またはロゼンジであってもよく、または、適切な数の任意のこれらのパッケージ化形態であってもよい。

【0220】

本発明の組成物が架橋ポリペプチドと1つ以上のさらなる治療剤または予防剤の組合せを含む場合、化合物およびさらなる薬剤の両方は、単独療法レジメンにおいて通常投与される投薬量の約1~100%、およびより好ましくは約5~95%の投薬量レベルで存在すべきである。いくつかの実施形態において、さらなる薬剤は、反復投与レジメンの一部として、本発明の化合物とは別々に投与される。あるいは、これらの薬剤は1つの剤形の一部であり、1つの組成物中で本発明の化合物と一緒に混合される。

20

【0221】

本発明で用いられ得る投与方法としては限定するものではないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、口腔内、舌下、脳内、膈内、経皮、直腸、吸入による、または耳、鼻、目、もしくは皮膚への塗布による局所が挙げられる。

【0222】

使用方法

30

一局面において、本発明は、架橋ポリペプチドがモデリングされる際にタンパク質またはペプチドの天然リガンド（単数または複数）に結合する因子を特定するための競合的結合アッセイにおいて有用である、新規な架橋ポリペプチドを提供する。例えば、p53MDM2系において、p53に基づく標識され安定化された架橋ポリペプチドを、競合的にMDM2に結合する低分子とともにMDM2結合アッセイにおいて用いる。競合的結合研究によって、p53/MDM2系に特異的な薬物候補の迅速なインビトロ評価および決定が可能になる。同様に、BH3/BCL-X_L抗アポトーシス系では、BH3に基づく標識された架橋ポリペプチドを、競合的にBCL-X_Lに結合する低分子とともにBCL-X_L結合アッセイにおいて用いてもよい。競合的結合研究によって、BH3/BCL-X_L系に特異的な薬物候補の迅速なインビトロ評価および決定が可能になる。本発明はさらに、架橋ポリペプチドに対する抗体の産生を提供する。いくつかの実施形態において、これらの抗体は、架橋ポリペプチド、およびその架橋ポリペプチドが誘導されるp53またはBH3架橋ポリペプチド前駆体の両方に特異的に結合する。そのような抗体は、例えば、p53/MDM2系またはBH3/BCL-X_L系をそれぞれ妨害する。

40

【0223】

別の局面において、本発明は、異常な（例えば、不十分なまたは過剰な）BCL-2ファミリーメンバーの発現または活性（例えば、外因性または内因性アポトーシス経路異常）に関連する障害のリスクがある（または罹患しやすい）か、または障害を有する被験体を処置するための予防方法および治療方法の両方を提供する。いくつかのBCL-2型障害は、少なくとも一部は、1つ以上のBCL-2ファミリーメンバーの異常レベル（例え

50

ば、過剰または過少発現)によって、または異常な活性を示す1つ以上のBCL-2ファミリーメンバーの存在によって引き起こされると考えられている。そのように、BCL-2ファミリーメンバーのレベルおよび/または活性の減少あるいはBCL-2ファミリーメンバーのレベルおよび/または活性の増強は、例えば、障害の有害な症状を改善または減少させるために用いられる。

【0224】

別の局面において、本発明は、腫瘍細胞においてp53とMDM2との間の相互作用または結合を妨害することによって、過剰増殖性疾患を処置または予防するための方法を提供する。これらの方法は、ヒトを含む温血動物に対して、または野生型のp53を含む腫瘍細胞に対して、本発明の化合物の有効量を投与する工程を包含する。いくつかの実施形態では、本発明の化合物の投与は、細胞増殖停止またはアポトーシスを誘導する。他の実施形態またはさらなる実施形態では、本発明を用いて、MDM2レベルの上昇を含む疾患および/または腫瘍細胞を処置する。本明細書において用いる場合、MDM2のレベルの上昇とは、ELISAおよび同様のアッセイによって測定した場合、mdm2の正常なコピー数(2)より多く、または1細胞あたり約10,000個を超えるMDM2分子を含む細胞中に見出されるより大きいMDM2レベルを指す(Pickslleyら、(1994), *Oncogene* 9, 2523-2529)。

【0225】

本明細書において使用される場合、「処置」という用語は、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を、回復させる、治癒する、軽減する、緩和する、変化させる、治す、改善する、好転させる、または影響を与えるという目的で、その疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を有する患者への治療剤の適用もしくは投与、または、その患者から単離した組織もしくは細胞系統への治療剤の適用もしくは投与として定義される。

【0226】

いくつかの実施形態において、本発明の架橋ポリペプチドを用いて、癌および腫瘍性の状態を処置、予防、および/または診断する。本明細書において用いる場合、「癌」、「過剰増殖性」および「腫瘍性」という用語は、自律的増殖能、すなわち、急速に増殖する細胞増殖によって特徴付けられる異常な状況または状態を有する細胞のことをいう。過剰増殖性疾患および腫瘍性疾患の状況は、病的なもの、すなわち、疾患状況の特徴付けているかまたは構成しているものとして分類してもよいし、または非病的なもの、すなわち、正常な状況から逸脱しているが疾患状況を伴わないものとして分類してもよい。この用語は、組織病理学的タイプまたは侵襲性のステージに関係なく、全てのタイプの癌増殖または腫瘍形成過程、転移組織または悪性形質転換した細胞、組織、もしくは器官を含むことを意味する。転移性腫瘍は、乳房、肺、肝臓、結腸および卵巣の起源の腫瘍を含むがこれらに限定されない、複数の原発性腫瘍型から生じる可能性がある。「病的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍増殖によって特徴付けられる疾患状況において発生する。非病的な過剰増殖性細胞の例としては、創傷回復に伴う細胞の増殖が挙げられる。細胞増殖性障害および/または分化性障害の例としては、癌、例えば、癌腫、肉腫、または転移性障害が挙げられる。いくつかの実施形態において、ペプチド模倣大環状分子は、乳癌、卵巣癌、結腸癌、肺癌、そのような癌の転移などを制御するための新規な治療剤である。

【0227】

癌または腫瘍形成病態の例としては、限定するものではないが、線維肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胃癌、食道癌、直腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、頭頸部癌、皮膚癌、脳腫瘍、扁平上皮癌、皮脂腺腺癌(sebaceous gland carcinoma)、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、グリオーマ、星状膠細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、メラノーマ

、神経芽腫、網膜芽腫、白血病、リンパ腫、またはカボジ肉腫が挙げられる。

【0228】

増殖性障害の例としては、造血性新形成障害が挙げられる。本明細書において用いられる場合、「造血性新形成障害」という用語は、造血起源の、例えば、骨髄系、リンパ系または赤血球系、またはこれらの前駆体細胞から生じる、過形成／新形成細胞を伴う疾患を包含する。好ましくは、その疾患は、低分化急性白血病、例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病から生じる。さらなる例示的な骨髄障害としては、急性前骨髄性白血病（APML）、急性骨髄性白血病（AML）および慢性骨髄性白血病（CML）（Vaickus（1991）、Crit Rev. Oncol. / Hemotol. 11: 267～97に概説されている）が挙げられるがこれらに限定されず；リンパ性悪性疾患としては、限定するものではないが、B細胞系ALLおよびT細胞系ALLを含む急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、前リンパ性白血病（PLL）、ヘアリー細胞白血病（HLL）およびワルデンストロームマクログロブリン血症（WM）が挙げられる。悪性リンパ腫のさらなる形態としては、限定するものではないが、非ホジキンリンパ腫およびその変種、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、大顆粒リンパ性白血病（LGF）、ホジキン病およびReed-Sternberg病が挙げられる。

10

【0229】

乳房の細胞増殖障害および／または細胞分化障害の例としては、限定するものではないが、増殖性乳房疾患、例としては、例えば、上皮過形成、硬化性腺症、および小管乳頭腫；腫瘍、例えば、線維腺腫、葉状腫瘍、および肉腫などの間質性腫瘍、ならびに大管乳頭腫などの上皮腫瘍；上皮内腺管癌（ductal carcinoma in situ）（パジェット病を含む）および上皮内小葉癌を含む上皮内（非侵襲性）癌を含む乳房の癌、ならびに、侵襲性腺管癌、侵襲性小葉癌、髄様癌、膠様（粘液性）癌、管状癌、および侵襲性乳頭状癌を含むがこれらに限定されない侵襲性（浸潤性）癌、ならびに混合型悪性新生物が挙げられる。男性乳房における障害としては、女性化乳房および癌腫を含むがこれらに限定されない。

20

【0230】

肺の細胞増殖障害および／または細胞分化障害の例としては、限定するものではないが、気管支原性癌、例としては、腫瘍随伴症候群、細気管支肺炎癌、神経内分泌腫瘍、例えば、気管支カルチノイド、混合型腫瘍、および転移性腫瘍；肋膜の病理、例としては、炎症性胸水、非炎症性胸水、気胸、および胸膜腫瘍、例としては、孤立性線維性腫瘍（胸膜線維腫）および悪性中皮腫が挙げられる。

30

【0231】

結腸の細胞増殖障害および／または細胞分化障害の例としては、限定するものではないが、非新形成ポリープ、腺腫、家族性症候群、結腸直腸発癌、結腸直腸がん、およびカルチノイド腫瘍が挙げられる。

【0232】

肝臓の細胞増殖障害および／または細胞分化障害の例としては、限定するものではないが、結節性過形成、腺腫、ならびに悪性腫瘍、例としては、肝臓の原発性がんおよび転移性腫瘍が挙げられる。

40

【0233】

卵巣の細胞増殖障害および／または細胞分化障害の例としては、限定するものではないが、卵巣腫瘍、例えば、体腔上皮の腫瘍、漿液性腫瘍、粘液性腫瘍、子宮内膜性腫瘍、明細胞腺癌、嚢胞性線維腺腫（cystadenofibroma）、ブレンナー腫瘍、表層上皮腫瘍；胚細胞腫瘍、例えば、成熟型（良性）奇形腫、単胚葉性奇形腫（monodermal teratoma）、未熟型悪性奇形腫、未分化胚細胞種、内胚葉洞腫瘍、絨毛癌；性索間質性腫瘍、例えば、顆粒膜夾膜細胞腫、莢膜細胞腫線維腫（thecoma fibroma）、アンドロblastoma、ヒル（hill）細胞腫瘍、および性腺芽腫；ならびに転移性腫瘍、例えば、クルーケンベルグ腫瘍が挙げられる。

50

【0234】

他の実施形態またはさらなる実施形態では、本明細書に記載のペプチド模倣大環状分子を用いて、過活動性細胞死または生理的傷害などによる細胞死によって特徴付けられる病態を処置、予防または診断する。早発性のまたは望ましくない細胞死によって特徴付けられる病態、またはあるいは望ましくないまたは過剰な細胞増殖のいくつかの例としては、限定するものではないが、細胞低形成性(hypocellular)/低形成性、無細胞性/無形成性、または細胞過形成性(hypercellular)/過形成性の病態が挙げられる。いくつかの例としては、血液系の障害、例としては、限定するものではないが、ファンコニ - 貧血、再生不良性貧血、サラセミア、先天性好中球減少症、骨髓異形成が挙げられる。

10

【0235】

他の実施形態またはさらなる実施形態において、アポトーシスを減少させるように作用する本発明の架橋ポリペプチドを用いて、望ましくないレベルの細胞死に関連する障害を処置する。従って、いくつかの実施形態において、本発明の抗アポトーシス架橋ポリペプチドを用いて、ウイルス感染、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染に関連する感染に伴う細胞死を引き起こすものなどの障害を処置する。広範な神経系の疾患が、特定のセットのニューロンの逐次の消失によって特徴付けられ、本発明の抗アポトーシス架橋ポリペプチドは、いくつかの実施形態においてこれらの障害の処置に用いられる。そのような障害としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症(ALS)色素性網膜炎、脊髄性筋委縮症、および種々の形態の小脳変性症が挙げられる。これらの疾患における細胞消失は、炎症応答を引き起こさず、アポトーシスが細胞死の機構であるようである。加えて、いくつかの血液系疾患が、血球の産生減少と関連している。これらの障害としては、慢性疾患に伴う貧血、再生不良性貧血、慢性好中球減少症、および骨髓異形成症候群が挙げられる。骨髓異形成症候群および一部の形態の再生不良性貧血などの血球産生の障害は、骨髓内のアポトーシス細胞死の増加と関連している。これらの障害は、アポトーシスを促進する遺伝子の活性化、間質細胞もしくは造血性生存因子の後天性欠乏、または毒素および免疫応答のメディエーターの直接的作用に起因する可能性がある。細胞死と関連する2つのよく見られる障害は、心筋梗塞および脳卒中(stroke)である。両方の障害において、急激な血流の喪失という事象において生じる虚血の中心部内の細胞は、壊死の結果として急速に死滅するように見える。しかしながら、中心虚血領域の外部では、細胞はより長い期間にわたって死滅し、形態学的にはアポトーシスによって死滅するように見える。他の実施形態またはさらなる実施形態では、本発明の抗アポトーシス架橋ポリペプチドを用いて、望ましくない細胞死に関連する全てのこのような障害を処置する。

20

30

【0236】

本明細書に記載の架橋ポリペプチドで処置される免疫障害のいくつかの例としては、限定するものではないが、臓器移植拒絶反応、関節炎、狼瘡、IBD、クローン病、喘息、多発性硬化症、糖尿病などが挙げられる。

【0237】

本明細書に記載の架橋ポリペプチドで処置される神経障害のいくつかの例としては限定するものではないが、アルツハイマー病、ダウン症候群、オランダ型遺伝性脳出血アミロイドーシス、反応性アミロイドーシス、蕁麻疹および難聴を伴う家族性アミロイド腎症、マククルウェルズ症候群、特発性骨髄腫；マクログロブリン血症随伴性骨髄腫、家族性アミロイド多発性神経炎、家族性アミロイド心筋症、孤立性心アミロイド、全身性老人性アミロイドーシス、成人発症糖尿病、インスリノーマ、孤立性心房性アミロイド、甲状腺の髄様癌、家族性アミロイドーシス、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、家族性アミロイド性多発性ニューロパシー、スクレイピー、クロイツフェルトヤコブ病、ゲルストマンストロイスラー - シャインカー症候群、ウシ海綿状脳症、プリオン媒介疾患、およびハンチントン病が挙げられる。

40

【0238】

50

本明細書に記載の架橋ポリペプチドで処置される内分泌障害のいくつかの例としては、限定するものではないが、糖尿病、甲状腺機能低下症、下垂体機能低下症、副甲状腺機能低下症、性機能低下症などが挙げられる。

【0239】

本発明の架橋ポリペプチドで処置または予防される心臓血管障害（例えば、炎症性障害）の例としては、限定するものではないが、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、発作（stroke）、血栓症、動脈瘤、心不全、虚血性心疾患、狭心症、心臓突然死、高血圧性心疾患；細動脈硬化症、小血管疾患、腎症、高グリセリド血症、高コレステロール血症、高脂血症、黄色腫症、喘息、高血圧症、気腫および慢性肺疾患などの非冠動脈疾患；あるいは血管形成術後の再狭窄、シャント、ステント、合成もしくは天然切除移植片、留置カテーテル、弁または別の移植可能なデバイスの留置などの介入処置を伴う心臓血管状態（「処置による血管外傷」）が挙げられる。好ましい心臓血管障害としては、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、動脈瘤、および発作が挙げられる。

【実施例】

【0240】

以下の節では、本発明の例示的实施例を提供する。

【0241】

（実施例1）

式（I）の架橋ポリペプチドの合成

- らせん架橋ポリペプチドを、先に記載されたように（Schafmeisterら（2000）、J. Am. Chem. Soc. 122: 5891~5892；Walenskyら（2004）Science 305: 1466-70；Walenskyら（2006）Mol. Cell 24: 199-210）および以下に示すとおり、合成し、精製し、分析する。ヒトBID BH3、ヒトBIM BH3およびヒトMAMLペプチド配列由来の以下の大環状分子を、この研究に用いる：

【0242】

【表10】

表10

化合物番号	親ペプチド	配列	計算値 m/z (M+H)	計算値 m/z (M+3H)	実測値 m/z (M+3H)
1	BID	Ac-DIIRNIARHLA\$VGDS\$NleDRSI-NH2	2438.40	813.47	813.7
2	BID	Ac-DAARNIARHLA\$VAibD\$NleARSI-NH2	2338.35	780.12	780.17
3	BID	Ac-DIARNIARHLA\$VAibD\$NleARSI-NH2	2380.39	794.14	794.15
4	BID	Ac-DAIRNIARHLA\$VAibD\$NleARSI-NH2	2380.39	794.14	794.09
5	BID	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$NleDRSI-NH2	2139.25	713.76	713.79
6	BID	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$NleDRSI-NH2	2153.27	718.43	718.5
7	BID	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$FARSI-NH2	2129.25	710.42	710.3
8	BID	Pr-RNIARHLA\$VGDS\$NleAibRSI-NH2	2081.25	694.42	694.42
9	BID	Pr-RNIAibRHLAib\$VAibD\$AARSI-NH2	2081.25	694.42	694.49
10	BIM	Ac-IWIAQELR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2646.43	882.82	883.15
11	BIM	Ac-IWIAQQLR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2645.45	882.49	882.62
12	BIM	Ac-IWIAQALR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2588.43	863.48	863.85
13	BIM	Ac-RWIAQQLR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2688.46	896.83	896.84
14	BIM	Ac-RWIAQALR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2615.45	872.49	872.64
15	BIM	Ac-RWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH2	2630.45	877.48	877.36
16	BIM	Ac-IWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH2	2587.43	863.14	863.00
17	hMAML	Ac-ERLRRRI\$LCR\$HHST-NH2	2124.21	709.08	708.72
18	hMAML	Ac-ERLRRRI\$LAR\$HHST-NH2	2092.24	698.42	698.09
19	hMAML	Ac-ALRRRI\$LCAS\$HHST-NH2	1825.04	609.35	609.06

上記の配列では、化合物1、10および17は、血清の存在下で実質的に低下する、無血清媒体中で高い効力を有する参照化合物である。次いで、この化合物の改変体（2~9、11~16、18~19）を作製して、本発明の方法を用いて試験する。Nleは、ノルロイシンを表し、Aibは、2-アミノイソ酪酸を表し、Chgは、シクロヘキシルグリシンを表し、Acは、N末端アセチルを表し、PrはN末端プロプリオニル（propionyl）を表し、かつNH₂はC末端アミドを示す。\$として表されるアミノ酸は

、各々のアミノ酸の炭素の間の8つの炭素原子を含む全ての炭素架橋剤を4番目の炭素原子と5番目の炭素原子との間の二重結合と接続し、ここでこの架橋剤が結合される各々の炭素原子は、さらにメチル基で置換されている。予測され、測定される m/z スペクトルを得る。

【0243】

オレフィン側鎖を含む、二置換非天然アミノ酸を、Williamsら(1991) J. Am. Chem. Soc. 113: 9276; および Schafmeisterら(2000) J. Am. Chem. Soc. 122: 5891に従って合成する。架橋ポリペプチドは、2個の天然に存在するアミノ酸(表10および合成スキーム5を参照のこと)を対応する合成アミノ酸で置き換えることにより設計する。置換は、 i および $i+4$ の位置において行うか、または i および $i+7$ 位置で行う。架橋ポリペプチドは、固相ペプチド合成によって、続いて合成アミノ酸のオレフィンメタセシスに基づく架橋によって、それらのオレフィン含有側鎖を介して生成する。

【0244】

非天然アミノ酸(五炭素のオレフィンアミノ酸のRおよびS鏡像異性体ならびに八炭素のオレフィンアミノ酸のS鏡像異性体)を、核磁気共鳴(NMR)分光法(Varian Mercury 400)および質量分析法(Micromass LCT)により特徴付ける。ペプチド合成を、固相条件、リンクアミドAM樹脂(link amide AM resin)(Novabiochem)およびFmoc主鎖保護基化学を用いて、手作業または自動ペプチド合成装置(Applied Biosystems, model 433A)のいずれかで行う。天然Fmoc保護アミノ酸(Novabiochem)のカップリングのために、10当量のアミノ酸および1:1:2モル比のカップリング試薬HBTU/HOBt(Novabiochem)/DIEAを使用する。非天然のアミノ酸(4当量)を、1:1:2モル比のHATU(Applied Biosystems)/HOBt/DIEAを用いてカップリングする。オレフィンメタセシスを、脱気したジクロロメタンに溶解した10mMのGrubbs触媒(Blackwellら, 1994、上記)(Materia)を用いて、固相において行い、室温において2時間反応させる。メタセシスされた化合物の単離は、トリフルオロ酢酸が媒介する脱保護および切断、粗生成物を得るためのエーテル沈殿、ならびに純粋な化合物を得るための逆相C18カラム(Varian)における高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)(Varian ProStar)により達成する。純粋な生成物の化学組成は、LC/MS質量分析(Agilent 1100 HPLCシステムとインターフェース接続したMicromass LCT)およびアミノ酸分析(Applied Biosystem s、モデル420A)により確認する。

【0245】

(実施例2)

本発明の架橋ポリペプチドで処理された腫瘍細胞株の細胞生存度アッセイ

Jurkat細胞株(クローンE6-1, ATCCカタログ番号TIB-152)は、ATCCによって推奨されるとおり、特定の血清補充培地(RPMI-1640, Invitrogenカタログ番号22400)で増殖させる、本研究の開始の前日、細胞を最適の細胞密度($2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/ml)で分けて、細胞の活発な分裂を確実にさせる。翌日、細胞を無血清Opti-MEM培地(Invitrogen, カタログ番号51985)中で2回洗浄し、次いで細胞を、96ウェルホワイト組織培養プレート(Nunc, カタログ番号136102)中の50 μ lのOpti-MEM培地またはOpti-MEM(2%または10%のヒト血清(Bioreclamation, カタログ番号HMSRM)を補充)中で、最適細胞密度(10,000細胞/ウェル)で、プレート培養する。

【0246】

無血清の実験のために、架橋ポリペプチドを無菌水中で2mMのストック(100% DMSO)から希釈して、400 μ Mのワーキング溶液を調製する。架橋ポリペプチドおよ

びコントロールを最初 10 倍希釈し、次いで、用量決定プレート (dosing plate) 中で Opti - MEM 中で 2 倍段階希釈して、1 . 2 ~ 40 μ M の間の濃度を得る。次いで 50 μ L の各々の希釈物を試験プレートの適切なウェルに添加して、0 . 6 ~ 20 μ M の間に等しいポリペプチドの最終濃度を得る。研究ではヒト血清 (Bioreclamation , カタログ番号 HMSRM) を補充した Opti - MEM を用いて、架橋ポリペプチドを、無菌水中で 10 mM のストック (100 % の DMSO) から希釈して、2 mM のワーキング溶液を調製する。架橋ポリペプチドおよびコントロールを最初 10 倍希釈し、次いで、2 % または 10 % のヒト血清の存在下で Opti - MEM 中で 2 倍段階希釈して、6 . 25 ~ 200 μ M の間に等しいポリペプチドの濃度を用量決定プレート中で得る。次いで 50 μ L の各々の希釈物を試験プレートの適切なウェルに添加して、3 . 125 ~ 100 μ M の間に等しいポリペプチドの最終濃度を得る。コントロールには、大環状分子を含むウェルと同じ濃度の DMSO を含有するポリペプチドなしのウェル、0 . 1 % の Triton X - 100 を含むウェル、および細胞を含まないウェルを含めた。プレートを 37 で 24 時間、加湿 5 % CO₂ 雰囲気でインキュベートする。

【 0 2 4 7 】

インキュベーション期間の終わりに、Cell Titer - Glo アッセイを、製造業者の指示 (Promega , カタログ番号 G7573) に従って行い、発光を Synergy HT Plateリーダー (BioTek) を用いて測定する。発光は、生存度と相関する。生存度の減少は、試験化合物が BAX および BAK を介してプログラムされた細胞死を誘発する能力を反映する。漸増濃度のヒト血清での代表的な用量反応曲線を図 1 に示す。

【 0 2 4 8 】

(実施例 3)

ヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性 (K_d^*) の決定

EC50 シフト分析による血清タンパク質についてのみかけの K_d 値の測定によって、HSA および他の血清タンパク質に結合する実験化合物の傾向を定量する簡易かつ迅速な手段が得られる。血清タンパク質の存在下におけるみかけの EC₅₀ (EC' ₅₀) とインビトロアッセイに添加された血清タンパク質の量との間には線形の関係が存在する。この関係は、 K_d^* として表される血清タンパク質についての化合物の結合親和性によって規定される。この項は、複数の実験的に識別不能な結合事象の累積効果から生じ得る、実験的に決定されるみかけの解離定数である。この関係の形態はここでは式 0 . 3 に示しており、その由来は、Copelandら、Bjorg . Med Chem Lett . 2004 , 14 : 2309 ~ 2312 に見出され得る。

【 0 2 4 9 】

【 化 4 3 】

$$(0.3) \quad EC'_{50} = EC_{50} + P \left(\frac{n}{1 + \frac{K_d^*}{EC_{50}}} \right)$$

血清タンパク質結合のかなりの割合が、血清中で HSA が極めて高濃度であることに起因する (35 ~ 50 g / L または 530 ~ 758 μ M)、このタンパク質との薬物相互作用に帰せられ得る。これらの化合物についての K_d 値を算出するために、本発明者らは、タンパク質添加の際の EC₅₀ におけるシフトが、添加された血清に存在する HSA に完全に帰せられ得ると仮定しており、ここで P は 100 % の血清について 700 μ M であり、P は 10 % の血清について 70 μ M であるなどである。本発明者らは、さらに、化合物の全てが 1 : 1 の化学量論で HSA に結合し、そのため式 (0 . 3) の項 n は一致して固

定されるという簡易な仮定を行った。これらのパラメーターを適切な位置において、本発明者らは、Mathematica 4.1 (Wolfram Research, Inc., www.wolfram.com) を用いて式 0.3 の非線形回帰分析によって、血清（および血清タンパク質）濃度を漸増させて、EC₅₀ 値における変化から各々のステープル・ペプチド (stapled peptide) についての K_d* 値を算出した。全血中の EC₅₀ 値は、式 0.3 の P を 700 μM [HSA] に設定することによって推定される。

【0250】

血中の遊離画分は、Trainor, Expert Opin. Drug Disc., 2007, 2(1): 51~64 から誘導されるように、以下の式について算出する（ここで [HSA]_総 は 700 μM に設定される）。

【0251】

【化44】

$$(0.4) \quad \text{遊離画分} = \frac{K_d^*}{K_d^* + [HSA]_{\text{総}}}$$

図2は、化合物1および関連のアナログについて、EC₅₀ 対ヒト血清濃度の代表的なプロットを示す。図3は、化合物10および関連のアナログについて、EC₅₀ 対ヒト血清濃度の代表的なプロットを示す。

【0252】

表11は、本発明による選択および最適化によって、実施例2のアッセイ中で良好な活性を維持したままで、最初のリード化合物（例えば、化合物1または化合物10）よりも実質的に少ない血清シフトの化合物が作製され得ることを示す。

【0253】

【表11】

表11

化合物番号	血清なし EC50, μM	2% 血清 EC50, μM	10% 血清 EC50, μM	血清 Kd* μM	血中での 推定遊離画分 μM	血中での 推定EC50 μM
1	1.2	73.9	>100	<0.1	<0.1%	3636.2
2	1.6	20.5	97.1	<0.1	<0.1%	957.2
3	1.2	14.9	88.9	<0.1	<0.1%	890.1
4	1.0	11.3	73.1	<0.1	<0.1%	734.8
5	1.6	16.7	63.0	0.2	0.04%	606.9
6	1.0	10.1	49.7	0.4	0.07%	490.0
7	2.2	12.4	48.2	1.1	0.19%	459.1
8	2.4	10.5	37.7	2.3	0.39%	352.2
9	1.1	5.6	20.2	2.9	0.48%	190.0
10	1.3	36.9	>100	<0.1	<0.1%	1781.3
11	1.2	7.9	37.6	1.1	0.18%	367.0
12	1.3	8.6	26.5	2.3	0.38%	246.3
13	1.5	5.4	21.5	3.8	0.63%	201.8
14	0.4	2.8	10.8	2.3	0.38%	103.4
15	0.9	2.6	11.5	5.1	0.84%	108.2
16	0.5	2.3	9.3	3.5	0.58%	88.4
17	12.0	55.1	>100	<0.1	<0.1%	2167.0
18	>20	>100	>100	<0.1	<0.1%	>4000
19	2.4	14.7	57.5	0.6	0.10%	549.4

（実施例4）

ヒト血清タンパク質に対するみかけの親和性 (K_d^*) の構造 - 活性相関

図4は、本発明の架橋ペプチド対のらせんホイール図を示しており、ここでは1つ以上のアミノ酸が変更されて、全細胞アッセイにおける細胞内標的（単数または複数）にむかう改善された効力を有する架橋ペプチドアナログが得られる。いくつかの配列にまたがって、疎水性が高い側鎖に隣接する酸性（負に荷電した）側鎖からなるジペプチドモチーフでは、アナログ（酸性の側鎖が中性の側鎖で置換されている）に対するアルブミンなどの、ヒト血清タンパク質に対する高い親和性の結合を生じることが観察されている。ある場合には、それぞれ、中性および疎水性がより低い側鎖での酸性および疎水性が高い側鎖の両方の置き換えによって、ヒト血清タンパク質に対するより低い親和性が得られる。この構造と活性との相関は、ヒト血清タンパク質、および詳細にはヒト血清アルブミンが、生理学的条件下で脂肪酸に結合するという、ならびにこれらの脂肪酸が組み合わされた酸性/疎水性結合モチーフによって認識されるという理解と一致している。ヒトおよび動物の細胞の膜は、リン脂質からなること、ならびに脂質二重層のホスフェートヘッド基が、外部膜において負に荷電した表面を提供し、ペプチドの酸性（負に荷電した）側鎖を静電的に反発すること、そして従って酸性の側鎖を中性の側鎖で置き換えることによって、細胞膜との架橋ポリペプチドの会合が増大するはずであることも公知である。外部膜とのこの会合は、本発明の架橋されたペプチドのエンドサイトーシスにおいて提唱される必要な第一段階である。

10

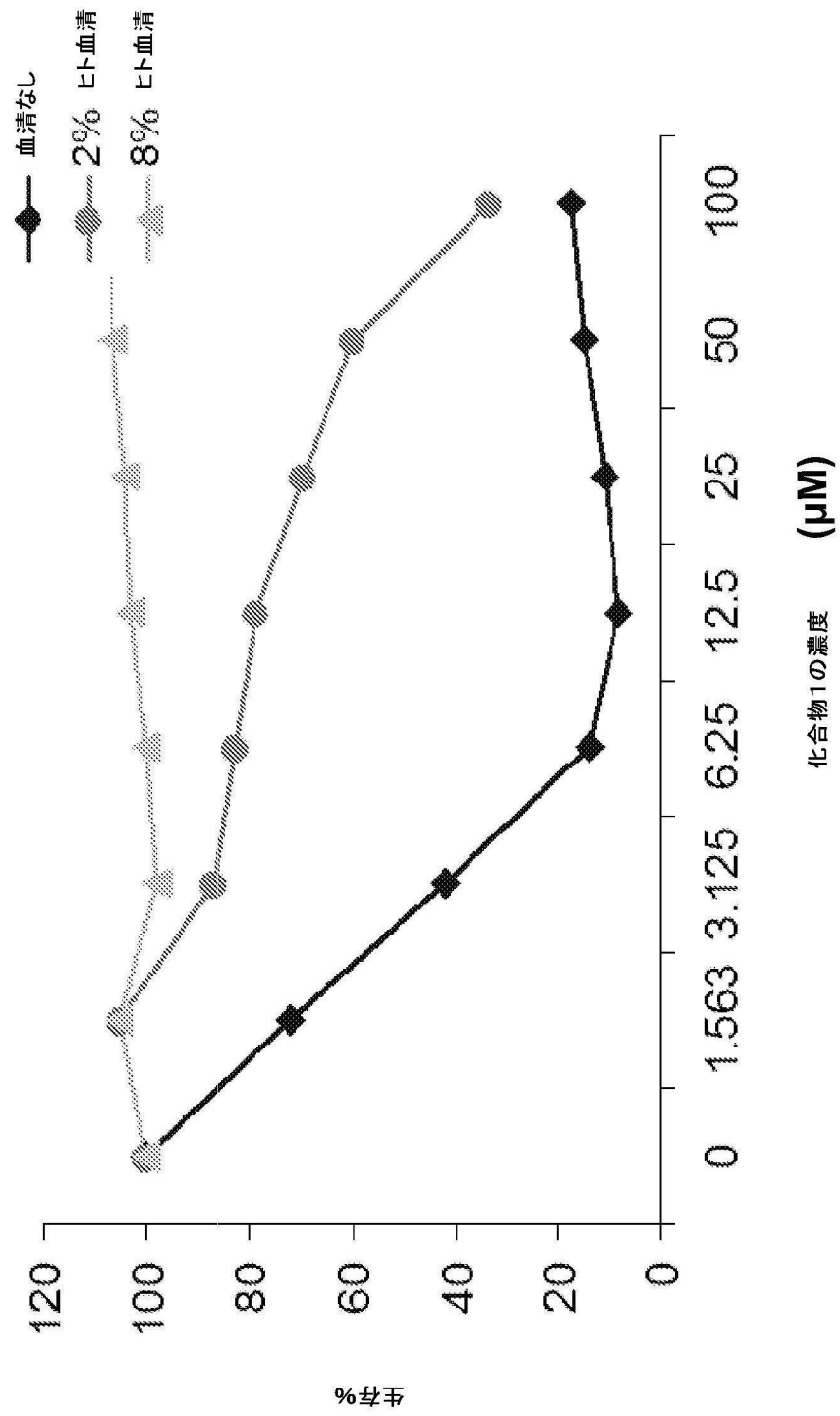
【0254】

本発明の好ましい実施形態を本明細書に示し、記載しているが、このような実施形態が例示目的のみで提供されていることは当業者には明らかであろう。多くの変形、改変および置き換えが、本発明から逸脱することなく当業者には思い浮かぶであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態の種々の代替は、本発明の実践に使用可能であると理解されるべきである。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義しており、そして本特許請求の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの同等物が本発明の範囲に包含されるものとする。

20

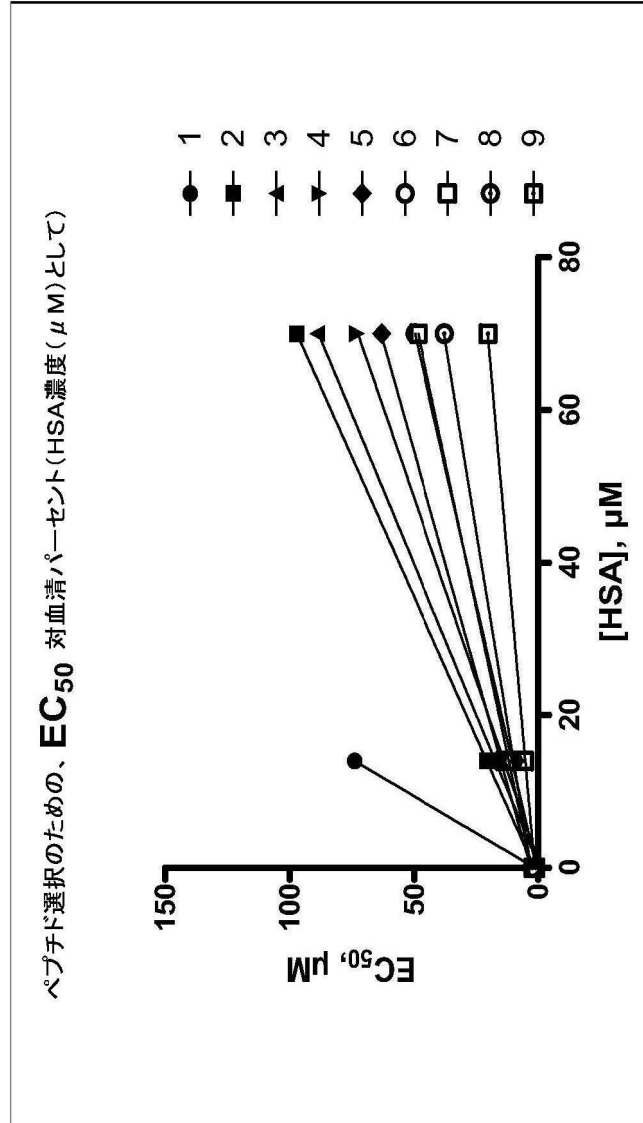
【図 1】

Figure 1



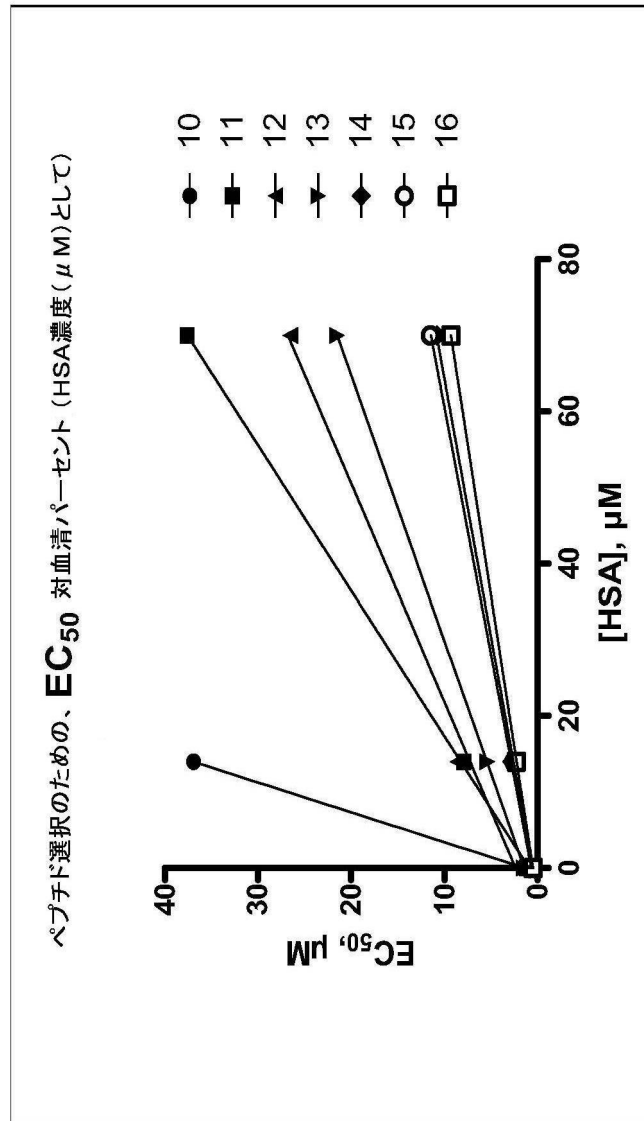
【 図 2 】

Figure 2



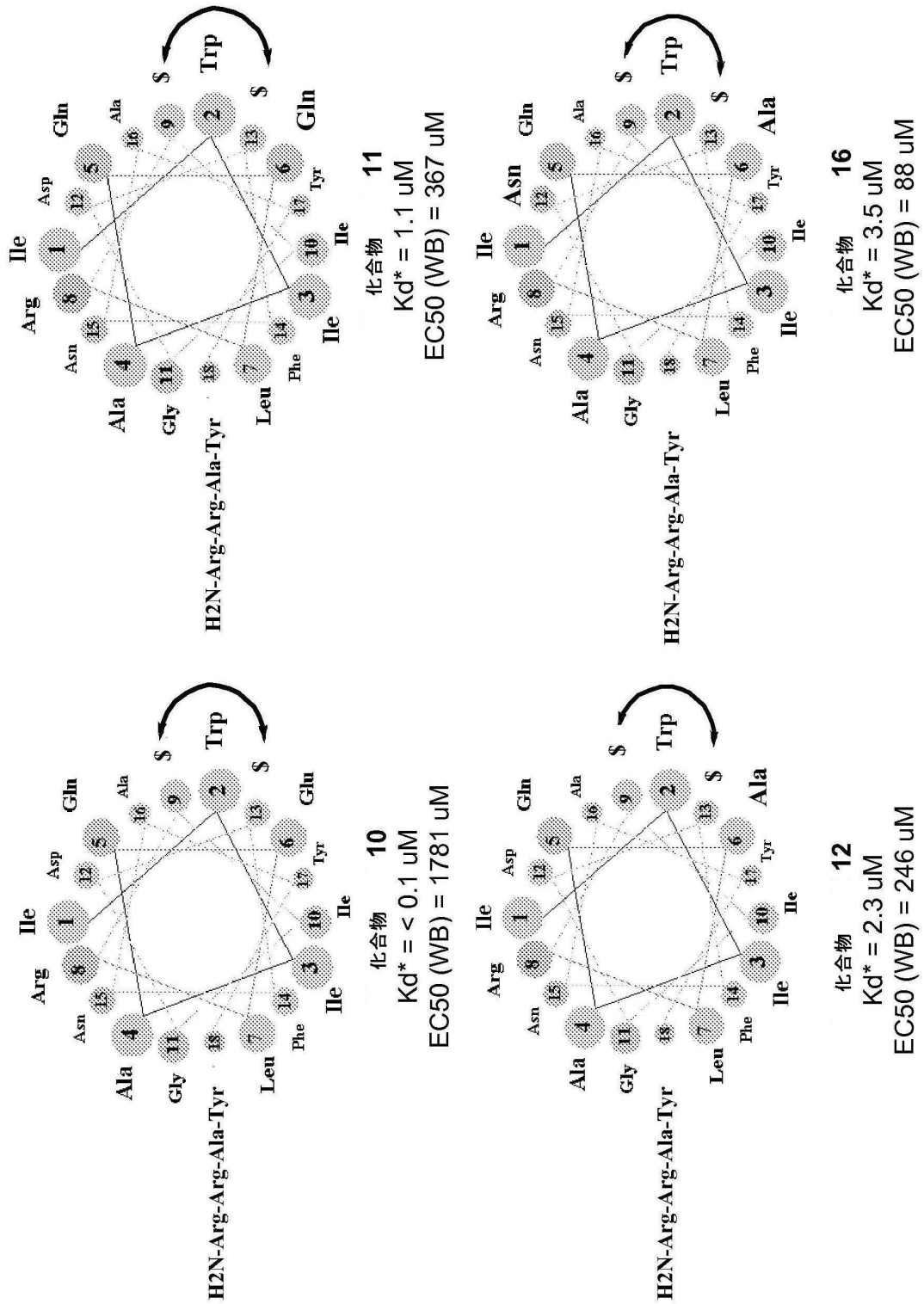
【図 3】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



【 配列表 】

0005711128000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ナッシュ, ヒュー エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01742, コンコード, レッジ ロック ロード 79
- (72)発明者 アニス, デイビッド アレン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, グリーン ストリート 508, ナンバー 3
- (72)発明者 カペラー - リバーマン, ロザナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02467, チェスナット ヒル, ビーコン ストリート 86
- (72)発明者 ソーヤー, トミ ケー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01772, サウスボロー, ネイサン ストーン ロード 8
- (72)発明者 カワハタ, ノリユキ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02132, ウェスト ロックスベリー, ガーネット ロード 79

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 特表2008-501623(JP,A)
国際公開第2008/061192(WO,A1)
国際公開第2008/104000(WO,A1)
国際公開第2008/076904(WO,A1)
特表2007-503461(JP,A)
GEORGE L TRAINOR, THE IMPORTANCE OF PLASMA PROTEIN BINDING IN DRUG DISCOVERY, EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY, 英国, INFORMA HEALTHCARE, 2007年 1月 1日, V2 N1, P51-64

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)