

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6642887号  
(P6642887)

(45) 発行日 令和2年2月12日(2020.2.12)

(24) 登録日 令和2年1月8日(2020.1.8)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 7/00	(2006.01)	C07K 7/00	Z N A
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00	1 1 1
A61K 38/12	(2006.01)	A61K 38/12	
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 45/00	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P 35/00	

請求項の数 36 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-560695 (P2016-560695)  
 (86) (22) 出願日 平成27年4月1日(2015.4.1)  
 (65) 公表番号 特表2017-513826 (P2017-513826A)  
 (43) 公表日 平成29年6月1日(2017.6.1)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2015/023883  
 (87) 國際公開番号 WO2015/153761  
 (87) 國際公開日 平成27年10月8日(2015.10.8)  
 審査請求日 平成30年3月30日(2018.3.30)  
 (31) 優先権主張番号 61/973,994  
 (32) 優先日 平成26年4月2日(2014.4.2)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 507245021  
ユニバーシティ オブ ロチェスター  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1464  
2, ロチェスター, エルムウッド ア  
ベニュー 601, ボックス ユーアー  
ルブイ  
(74) 代理人 100126505  
弁理士 佐貫 伸一  
(74) 代理人 100131392  
弁理士 丹羽 武司  
(72) 発明者 ファサン ルディ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1462  
O ロチェスター サミット ドライブ  
58

最終頁に続く

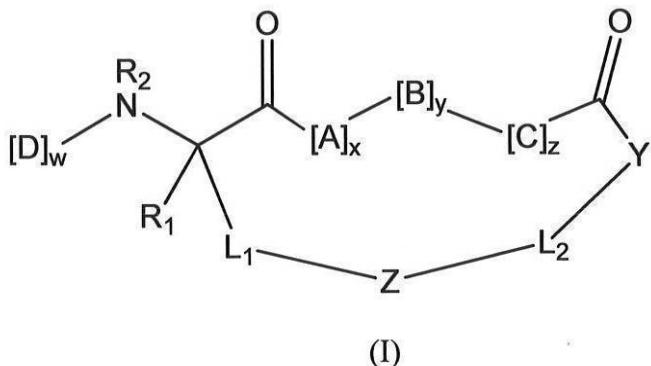
(54) 【発明の名称】アルファヘリックスを模倣した大環状ペプチドミメティック

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I):

【化1】



10

の大環状ペプチドミメティック分子:

式中、

A、C及びD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、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付  
加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むア

20

ミノ酸、エステル、[ - NHN(R<sub>3</sub>)C(O) - ]、[ - NH - L<sub>3</sub> - CO - ]、[ - NH - L<sub>3</sub> - SO<sub>2</sub> - ]または[ - NH - L<sub>3</sub> - ]によって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸であり、

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O-または-S-であり、Zは、-SCH(R<sub>6</sub>)-、-CHR<sub>6</sub>S-、-C=C-、-N(R<sub>5</sub>)CO-、-CON(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N-O-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-O-、-C(R<sub>5</sub>)=N-NH(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-NH(R<sub>6</sub>)-またはトリアゾール基であり、L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及びL<sub>3</sub>は、独立して、それぞれが非置換であるか、またはR<sub>7</sub>で置換された脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基または置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

R<sub>7</sub>は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、xは、0～10の整数であり、

yは、0～10の整数であり、

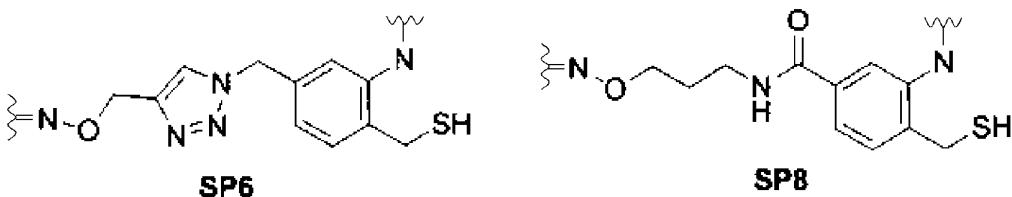
zは、0～10の整数であり、

wは、1～1000の整数であり、

x+y+zは、少なくとも3であり、

[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]はSP6またはSP8：

## 【化2】



であり、[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]以外の部分はアミノ酸配列GXSFAEYWNLLAで表され、

アミノ酸配列中のXはパラアセチルフェニルアラニンであって、前記Xのフェニルアセチル基は[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]に結合してリンカー[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]を形成し、アミノ酸配列中のAのカルボキシ末端に連結されており、前記大環状ペプチドミメティック分子がアルファヘリックスを構成する、大環状ペプチドミメティック分子。

## 【請求項2】

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加した安定性を有する、請求項1に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

## 【請求項3】

前記大環状ペプチドミメティック分子の二次構造が、[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドの二次構造よりも安定である、請求項1に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

## 【請求項4】

前記大環状ペプチドミメティック分子の二次構造が、アルファヘリックスに対応する、請求項3に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

## 【請求項5】

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加したタンパク分解安定性を有する、請求項1に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

## 【請求項6】

10

20

30

40

50

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加した生物活性を有する、請求項 1 に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

**【請求項 7】**

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して生細胞を透過する能力を有する、請求項 1 に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

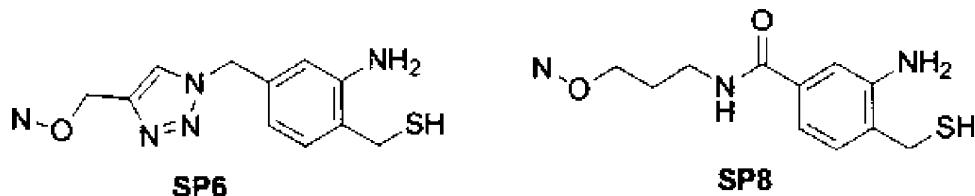
**【請求項 8】**

前記大環状ペプチドミメティック分子が更に、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を共有結合によって含む、請求項 1 に記載の大環状ペプチドミメティック分子。 10

**【請求項 9】**

大環状ペプチドミメティック分子の合成方法であって、  
アミノ酸配列 G X S F A E Y W N L L A - ( L G ) で表される前駆体ペプチドミメティック分子を下記の SP6 または SP8 :

**【化 3】**



の化合物と接触させることを含み、

アミノ酸配列中の X はパラアセチルフェニルアラニンであり、( L G ) は、末端カルボン酸のカルボニル基を求核置換に対して活性化する基であり、  
ここでの接触の結果、リンカー部分を介して、前記 X のフェニルアセチル基とアミノ酸配列中の A の C 末端カルボキシ基との間に共有結合が形成され、更に該大環状ペプチドミメティック分子は ヘリックスを構成する、前記方法。

**【請求項 10】**

求核置換に対して C 末端カルボン酸基を活性化する L G 基が、酸塩化物、酸無水物、アシルアジド、O - アシルイソ尿素、ホスホニウム化合物、活性エステルまたはチオエステルである、請求項 9 に記載の方法。 30

**【請求項 11】**

接触させる前に、細胞内で前駆体ペプチドミメティック分子を発現することを含む、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記前駆体ペプチドミメティック分子の L G 基がインテインである、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記方法が、溶液中で実施される、請求項 9 に記載の方法。 40

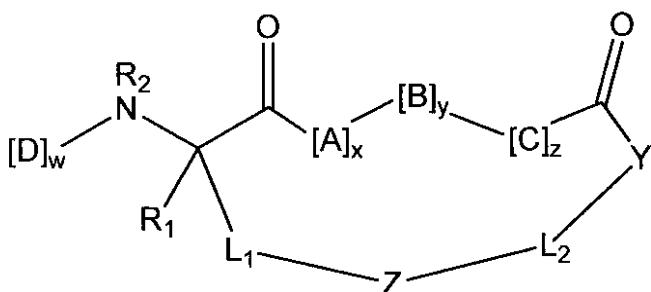
**【請求項 14】**

前記方法が、固体支持体で実施される、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 15】**

大環状ペプチドミメティック分子を含む癌または腫瘍性症状の治療に使用するための、組成物であって、前記大環状ペプチドミメティック分子が、式 ( V I I ) の構造：

## 【化4】



10

(VII)

式中、

A、C及びD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、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステル、[-NHN(R<sub>3</sub>)C(O)-]、[-NH-L<sub>3</sub>-CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-]または[-NH-L<sub>3</sub>-]によって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸であり、

20

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O-または-S-であり、Zは、-SCH(R<sub>6</sub>)-、-CHR<sub>6</sub>S-、-C=C-、-N(R<sub>5</sub>)CO-、-CON(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N-O-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-O-、-C(R<sub>5</sub>)=N-NH(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-NH(R<sub>6</sub>)-またはトリアゾール基であり、L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及びL<sub>3</sub>は、独立して、それが非置換であるか、またはR<sub>7</sub>で置換された脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

30

R<sub>7</sub>は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、xは、0~10の整数であり、

yは、0~10の整数であり、

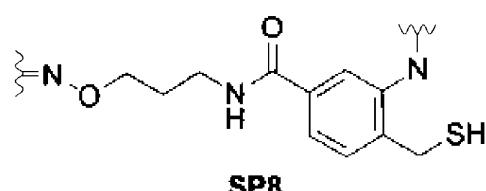
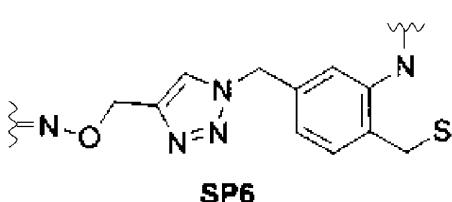
zは、0~10の整数であり、

wは、1~1000の整数であり、

x+y+zは、少なくとも3であり、

[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]はSP6またはSP8：

## 【化5】



40

であり、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]以外の部分はアミノ酸配列GXSFAEYWNLLAで表され、アミノ酸配列中のXはパラアセチルフェニルアラニンであって、前記Xのフェニルアセチル基は[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]に結合してリンカー[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を形成し、アミノ酸配列中のAのカルボキシ末端に連結されており、前記大環状ペプチドミメティック分

50

子がアルファヘリックスを構成する、大環状ペプチドミメティック分子を有する、前記組成物。

【請求項 1 6】

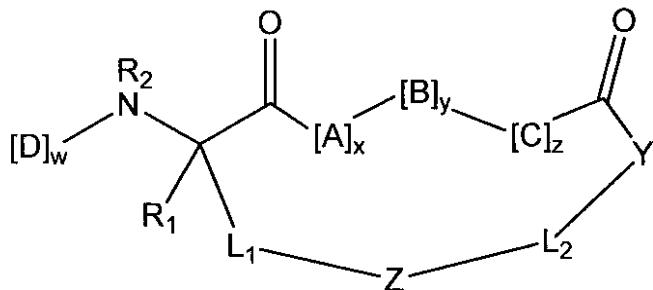
さらに、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

非ヒト対象の癌または腫瘍性疾患の治療方法であって、式 (VII) の構造：

【化 6】

10



(VII)

20

式中、

A、C 及び D 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、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも 1 つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステル、[ - NH N (R<sub>3</sub>) C (O) - ]、[ - NH - L<sub>3</sub> - CO - ]、[ - NH - L<sub>3</sub> - SO<sub>2</sub> - ] または [ - NH - L<sub>3</sub> - ] によって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸であり、

Y は、- NH - 、- N (R<sub>4</sub>) - 、- NH N (R<sub>4</sub>) - 、- NH - O - 、- O - または- S - であり、Z は、- SCH (R<sub>6</sub>) - 、- CHR<sub>6</sub>S - 、- C = C - 、- N (R<sub>5</sub>) CO - 、- CON (R<sub>6</sub>) - 、- C (R<sub>5</sub>) = N (R<sub>6</sub>) - 、- CH (R<sub>5</sub>) - NH (R<sub>6</sub>) - 、- C (R<sub>5</sub>) = N - O - 、- CH (R<sub>5</sub>) - NH - O - 、- C (R<sub>5</sub>) = N - NH (R<sub>6</sub>) - 、- CH (R<sub>5</sub>) - NH - NH (R<sub>6</sub>) - またはトリアゾール基であり、

L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 及び L<sub>3</sub> は、独立して、それが非置換であるか、または R<sub>7</sub> で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub> 及び R<sub>6</sub> は、独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

R<sub>7</sub> は、それぞれ独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、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、

w は、1 ~ 1000 の整数であり、

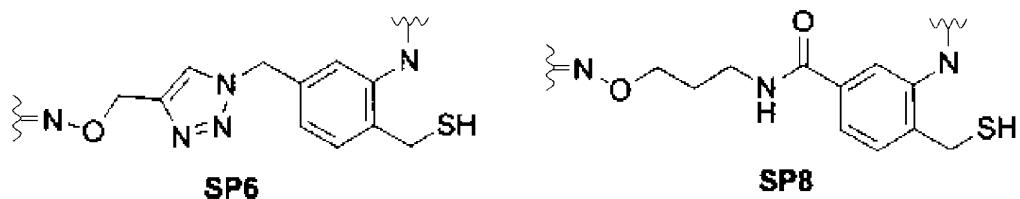
x + y + z は、少なくとも 3 であり、

[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は SP6 または SP8 :

30

40

## 【化7】



であり、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]以外の部分はアミノ酸配列G X S F A E Y W N L L Aで表され、

アミノ酸配列中のXはパラアセチルフェニルアラニンであって、前記Xのフェニルアセチル基は[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]に結合してリンカー[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を形成し、アミノ酸配列中のAのカルボキシ末端に連結されており、前記大環状ペプチドミメティック分子がアルファヘリックスを構成する、大環状ペプチドミメティック分子を治療すべき対象に投与することを含む、前記方法。 10

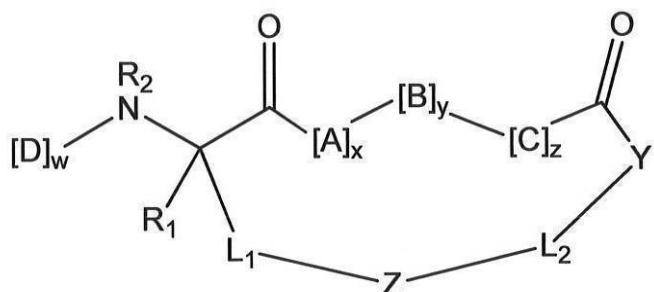
## 【請求項18】

前記大環状ペプチドミメティック分子が更に、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を共有結合によって含む、請求項17に記載の方法。

## 【請求項19】

式(I)：

## 【化8】



(I)

20

30

の大環状ペプチドミメティック分子：

式中、

A、C及びD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、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステル、[-NHN(R<sub>3</sub>)C(O)-]、[-NH-L<sub>3</sub>-CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-]または[-NH-L<sub>3</sub>-]によって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸であり、

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O-または-S-であり、Zは、-SCH(R<sub>6</sub>)-、-CHR<sub>6</sub>S-、-C=C-、-N(R<sub>5</sub>)CO-、-CON(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N-O-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-O-、-C(R<sub>5</sub>)=N-NH(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-NH(R<sub>6</sub>)-またはトリアゾール基であり、 40

L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及びL<sub>3</sub>は、独立して、それぞれが非置換であるか、またはR<sub>7</sub>で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

50

$R_7$  は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、 $x$  は、0 ~ 10 の整数であり、

$y$  は、0 ~ 10 の整数であり、

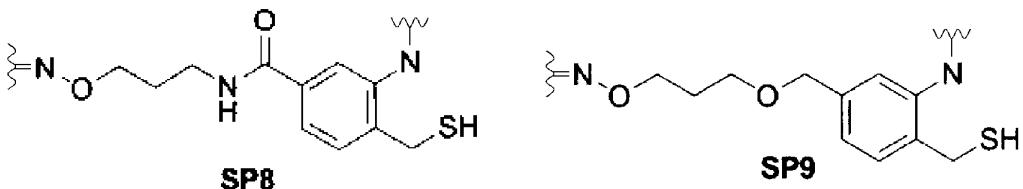
$z$  は、0 ~ 10 の整数であり、

w は、1 ~ 1 0 0 0 の整数であり、

$x + y + z$  は、少なくとも 3 であり、

[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は S P 8 または S P 9 :

【化 9】



であり、[ - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]以外の部分はアミノ酸配列 X S F A E Y W N L L A または G X S F A E Y W N L L A で表され、

アミノ酸配列のアミノ末端にアセチル基がついていてもよく、アミノ酸配列中のXはパラアセチルフェニルアラニンまたはメタアセチルフェニルアラニンであり、Wは6C1Wと置換されていてもよく、前記Xのフェニルアセチル基は[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]に結合してリンカー[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を形成し、アミノ酸配列中のAのカルボキシ末端に連結されており、前記大環状ペプチドミメティック分子がアルファヘリックスを構成する、大環状ペプチドミメティック分子。

【請求項 20】

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加した安定性を有する、請求項19に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

【請求項 21】

前記大環状ペプチドミメティック分子の二次構造が、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドの二次構造よりも安定である、請求項19に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

【請求項 22】

前記大環状ペプチドミメティック分子の二次構造が、アルファヘリックスに対応する、請求項 21 に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

【請求項 2 3】

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加したタンパク分解安定性を有する、請求項19に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

【請求項 2 4】

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加した生物活性を有する、請求項19に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

【請求項 25】

前記大環状ペプチドミメティック分子が、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して生細胞を透過する能力を有する、請求項19に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

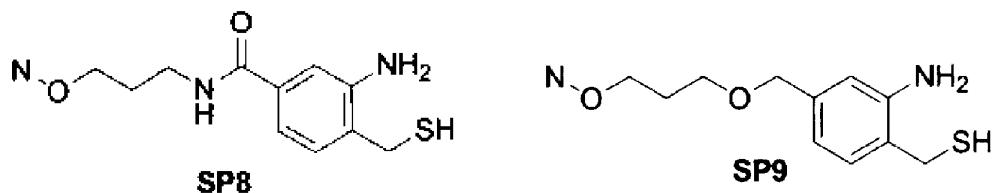
【請求項 26】

前記大環状ペプチドミメティック分子が更に、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を共有結合によって含む、請求項1\_9に記載の大環状ペプチドミメティック分子。

【請求項 27】

大環状ペプチドミメティック分子の合成方法であって、アミノ酸配列 G X S F A E Y W N L L A - ( L G ) または G X S F A E Y W N L L A - ( L G ) で表される前駆体ペプチドミメティック分子を下記の SP8 または SP9 :

【化 1 0】



10

の化合物と接触させることを含み、アミノ酸配列のアミノ末端にアセチル基がついていてもよく、アミノ酸配列中の X はパラアセチルフェニルアラニンまたはメタアセチルフェニルアラニンであり、アミノ酸配列中の W は 6 C 1 W と置換されていてもよく、( L G ) は、C 末端カルボン酸のカルボニル基を求核置換に対して活性化する基であり、

ここでの接触の結果、リンカー部分を介して、前記 X のフェニルアセチル基とアミノ酸配列中の A の C 末端カルボキシ基との間に共有結合が形成され、更に該大環状ペプチドミメティック分子は ヘリックスを構成する、前記方法。

【請求項 2 8】

求核置換に対して C 末端カルボン酸基を活性化する L G 基が、酸塩化物、酸無水物、アシリアルジド、O - アシリルイソ尿素、ホスホニウム化合物、活性エステルまたはチオエステルである、請求項 2 7 に記載の方法。 20

【請求項 2 9】

接触させる前に、細胞内で前駆体ペプチドミメティック分子を発現することを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記前駆体ペプチドミメティック分子の L G 基がインテインである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記方法が、溶液中で実施される、請求項 2 7 に記載の方法。 30

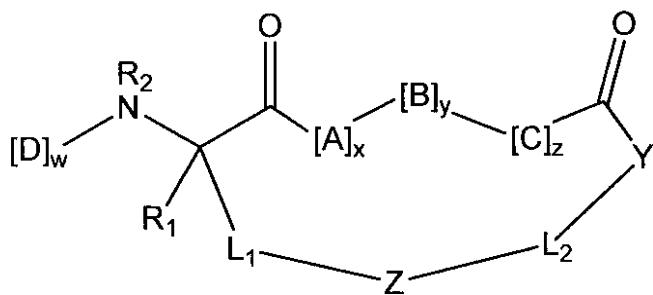
【請求項 3 2】

前記方法が、固体支持体で実施される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 3】

大環状ペプチドミメティック分子を含む、癌または腫瘍性症状の治療に使用するための組成物であって、前記大環状ペプチドミメティック分子が、式 (VII) の構造：

【化 1 1】



40

(VII)

式中、

A、C 及び D 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、

50

Bは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステル、[-NHN(R<sub>3</sub>)C(O)-]、[-NH-L<sub>3</sub>-CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-]または[-NH-L<sub>3</sub>-]によって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸であり、

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O-または-S-であり、Zは、-SCH(R<sub>6</sub>)-、-CHR<sub>6</sub>S-、-C=C-、-N(R<sub>5</sub>)CO-、-CON(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N-O-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-O-、-C(R<sub>5</sub>)=N-NH(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-NH(R<sub>6</sub>)-またはトリアゾール基であり、10

L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及びL<sub>3</sub>は、独立して、それが非置換であるか、またはR<sub>7</sub>で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

R<sub>7</sub>は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、xは、0~10の整数であり、20

yは、0~10の整数であり、

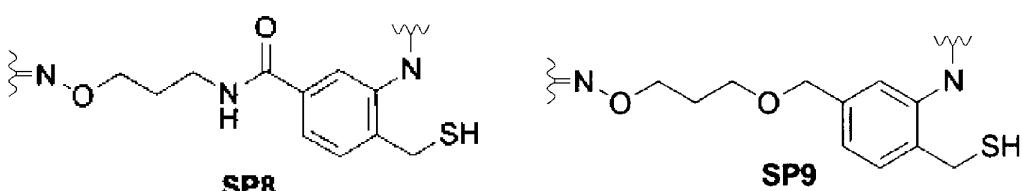
zは、0~10の整数であり、

wは、1~1000の整数であり、

x+y+zは、少なくとも3であり、

[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]はSP8またはSP9：

【化12】



であり、[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]以外の部分はアミノ酸配列GXSFAAEYWNLLAまたはGXSFAAEYWNLLLAで表され、30

アミノ酸配列のアミノ末端にアセチル基がついていてもよく、アミノ酸配列中のXはパラアセチルフェニルアラニンまたはメタアセチルフェニルアラニンであり、アミノ酸配列中のWは6CLWと置換されていてもよく、前記Xのフェニルアセチル基は[-Z-L<sub>2</sub>-Y-]に結合してリンカー[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]を形成し、アミノ酸配列中のAのカルボキシ末端に連結されており、前記大環状ペプチドミメティック分子がアルファヘリックスを構成する、大環状ペプチドミメティック分子を有する、前記組成物。

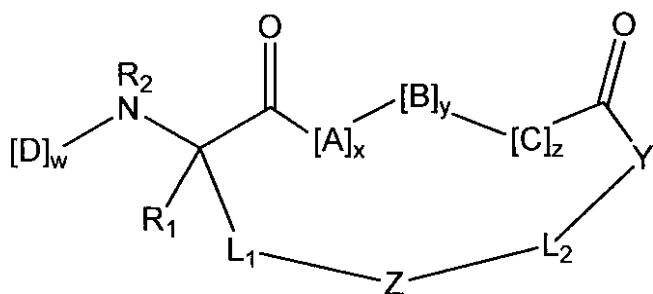
【請求項34】

前記大環状ペプチドミメティック分子が更に、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を共有結合によって含む、請求項33に記載の組成物。40

【請求項35】

非ヒト対象の癌または腫瘍性疾患の治療方法であって、  
式(VII)の構造：

【化13】



10

(VII)

式中、

A、C及びD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、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステル、[-NHN(R3)C(O)-]、[-NH-L3-CO-]、[-NH-L3-SO2-]または[-NH-L3-]によって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸であり、

20

Yは、-NH-、-N(R4)-、-NHN(R4)-、-NH-O-、-O-または-S-であり、Zは、-SCH(R6)-、-CHR6S-、-C=C-、-N(R5)CO-、-CON(R6)-、-C(R5)=N(R6)-、-CH(R5)-NH(R6)-、-C(R5)=N-O-、-CH(R5)-NH-O-、-C(R5)=N-NH(R6)-、-CH(R5)-NH-NH(R6)-またはトリアゾール基であり、L1、L2及びL3は、独立して、それが非置換であるか、またはR7で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R1、R2、R3、R4、R5及びR6は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

30

R7は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、xは、0~10の整数であり、

yは、0~10の整数であり、

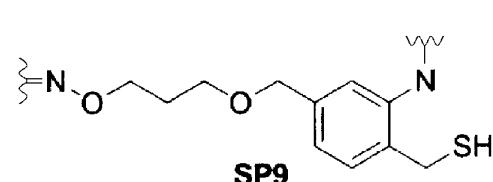
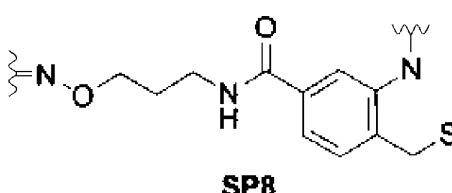
zは、0~10の整数であり、

wは、1~1000の整数であり、

x+y+zは、少なくとも3であり、

[-Z-L2-Y-]はSP8またはSP9：

【化14】



40

であり、[-Z-L2-Y-]以外の部分はアミノ酸配列GXSFAEYWNLLAまたはGXSFALAEYWNLLLAで表され、

アミノ酸配列のアミノ末端にアセチル基がついていてもよく、アミノ酸配列中のXはパラアセチルフェニルアラニンまたはメタアセチルフェニルアラニンであり、アミノ酸配列中のWは6C1Wと置換されていてもよく、前記Xのフェニルアセチル基は[-Z-L2-

50

Y - ]に結合してリンカー[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ]を形成し、アミノ酸配列中のAのカルボキシ末端に連結されており、前記大環状ペプチドミメティック分子がアルファヘリックスを構成する、大環状ペプチドミメティック分子を治療すべき対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 3 6】

前記大環状ペプチドミメティック分子が更に、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を投与することを共有結合によって含む、請求項3 5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年4月2日出願の同時係属中の米国特許仮出願第61/973,994号、表題「MACROCYCLIC PEPTIDOMIMETICS FOR A LPHA-HELIX MIMICRY」に対する優先利益を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

連邦政府支援研究開発に関する声明

本発明は、国立科学財団によって与えられた認可番号CHE-1112342、及び米国国立衛生研究所によって与えられた認可番号CA187502の下の政府支援で行われた。政府は、本発明について一定の権利を有する。

20

【0 0 0 3】

本発明は、側鎖-C末端を結合する非ペプチドテザーによって拘束される、ヘリックス状モチーフの機能的かつ構造的模倣体として使用される大環状ペプチドに関する。本発明は、このような大員環を調製する方法、ならびにその治療的用途での使用方法にも関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

ペプチドは、生体系の研究、生体分子（例えば、酵素、細胞受容体、抗体、キナーゼ）の結合特性及び活性特性の研究、ならびに薬理学的標的の検証に有益な手段の代表例である。ペプチド系分子は、特にタンパク質-タンパク質及びタンパク質-核酸の相互作用などの難度の高い創薬標的と関連する治療剤としても注目を増している。多くのペプチドは興味深い生物活性を呈するが、直鎖ペプチドは通常、タンパク分解性及び代謝安定性の不足、細胞透過性の制限、及び配座柔軟性の結果としての無差別な結合性といった理由により、好適な薬剤には該当しない。分子主鎖の配座自由度を制限する分子拘束性を用いることで、この限界を克服することができる。多くの場合、配座的に拘束されたペプチドは、その直鎖対応物と比較して、酵素安定性（Fairlie, Tyndallら 2000、Wang, Liaoら 2005）、膜透過性（Walensky, Kungら 2004、Rezai, Bockら 2006、Rezai, Yuら 2006）ならびにタンパク質の結合親和性（Tang, Yuanら 1999、Dias, Fasanら 2006）及び選択性（Henchey, Porterら 2010）の強化を呈する。ペプチド分子の活性配座を固定化する拘束の結果、受容体結合時の、配座エントロピーの損失が減少するため、親和性を増加させ得る。そこで、生物活性化合物及び治療薬の開発にとって有望な分子足場として、大環状ペプチドが登場した（Katsara, Tselirosら 2006、Driggers, Haleら 2008、Obrecht, Robinsonら 2009、Marsault及びPeterson 2011）。

30

【0 0 0 5】

ヘリックスはそのタンパク質構造の豊富さを反映して、タンパク質-タンパク質及びタンパク質-核酸の複合体の境界に存在する場合が多い（Jochim及びArora 2009）。タンパク質のコンテクストから一旦切断されると、これらの二次構造モチー

40

50

フを包含する直鎖ペプチドは、溶液中でめったに安定なヘリックス配座を取ることがない。したがって、生体分子の相互作用をターゲット化及び調節できる生物活性分子を生成する手段として、ヘリックスペプチドの安定化及び模倣のための多くの手法が開発されてきた（Henchey, Joachimら 2008）。この分野の一般的なアプローチには、側鎖間の共有結合、例えばジスルフィド結合（Jackson, Kingら 1991）、ラクタム（Osapay 及び Taylor 1992）、チオエーテル（Brunel 及び Dawson 2005）またはトリアゾール（Scrima, Le Chevalier-Isaadら 2010、Kawamoto, Coleskaら 2012）の架橋、炭化水素ステープル（Blackwell 及び Grubbs 1998、Schafmeister, Pola 2000、Bernal, Wadeら 2010）、及びシスティン架橋部分（Zhang, Sadovskiら 2007、Muppidi, Wangら 2011、Jo, Meinhardtら 2012、Spokoyny, Zouら 2013）の使用を必要としてきた。別のアプローチでは、いわゆる「水素結合サロゲート」、すなわちN末端の*i* / *i* + 4水素結合（Wang, Liaoら 2005）を置換する炭化水素結合を導入にし、ヘリックスペプチドを安定化する必要があった。  
10

## 【0006】

「背景技術」内または本出願のいかなる他のセクション内のいずれの文献における引用または特定も、このような参照が本発明に対する先行技術として有効であることを容認するものと見なされるべきではない。  
20

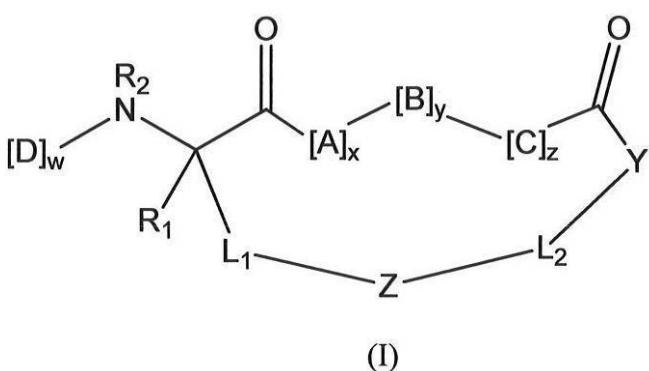
## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

式（I）の大環状ペプチドミメティック分子を提供する：

## 【化1】



（式中、

A、C 及び D 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、  
30

B は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも 1 つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステルによって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸、[-NHN(R<sub>3</sub>)C(O)-]、[-NH-L<sub>3</sub>-CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-] または [-NH-L<sub>3</sub>-] であり、  
40

Y は、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O- または -S- であり、  
45

Z は、-SCH(R<sub>6</sub>)-、-CHR<sub>6</sub>S-、-C=C-、-N(R<sub>5</sub>)CO-、-CO-N(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N-O-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-O-、-C(R<sub>5</sub>)=N-NH(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-NH(R<sub>6</sub>)- またはトリアゾール基であり、  
50

$L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は、独立して、それが非置換であるか、または  $R_7$  で置換された脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基または置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$  及び  $R_6$  は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

$R_7$  は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、

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、

w は、1 ~ 1000 の整数であり、

x + y + z は、少なくとも 3 であり、

更にここで大環状ペプチドミメティック分子は、アルファヘリックスを含む)。

#### 【0008】

一実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、[Z -  $L_2$  - Y] を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加した安定性を有する。

#### 【0009】

別の実施形態では、末端 D はキャッピング基を含む。

#### 【0010】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子の二次構造は、[Z -  $L_2$  - Y] を欠く、対応する非大環状ポリペプチドの二次構造よりも安定である。

#### 【0011】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子の二次構造は、アルファヘリックスに対応する。

#### 【0012】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、[Z -  $L_2$  - Y] を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加したタンパク分解安定性を有する。

#### 【0013】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、[Z -  $L_2$  - Y] を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して増加した生物活性を有する。

#### 【0014】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、[Z -  $L_2$  - Y] を欠く、対応する非大環状ポリペプチドと比較して生細胞の透過能力を有する。

#### 【0015】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、アルファヘリックスは 1 ターン ~ 5 ターンを含む。

#### 【0016】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[-  $L_1$  - Z -  $L_2$  - Y - ] は、1 ターン ~ 5 ターンの ヘリックスに及ぶ。

#### 【0017】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[-  $L_1$  - Z -  $L_2$  - Y - ] の長さは、ヘリックスの 1 ターンにつき約 4 ~ 約 12 である。

#### 【0018】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[-  $L_1$  - Z -  $L_2$  - Y - ] は、約 1 ターンのアルファヘリックスに及ぶ。

10

20

30

40

50

## 【0019】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] の長さは、約 5 個の炭素 - 炭素結合 ~ 約 11 個の炭素 - 炭素結合の長さとほぼ等しい。

## 【0020】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大員環は、約 15 原子 ~ 21 原子の環を含む。

## 【0021】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、約 2 ターンのアルファヘリックスに及ぶ。

## 【0022】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] の長さは、約 7 個の炭素 - 炭素結合 ~ 約 17 個の炭素 - 炭素結合の長さとほぼ等しい。

## 【0023】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大員環は、約 28 原子 ~ 38 原子の環を含む。

## 【0024】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、約 3 ターンのアルファヘリックスに及ぶ。

## 【0025】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] の長さは、約 12 個の炭素 - 炭素結合 ~ 約 22 個の炭素 - 炭素結合の長さとほぼ等しい。

## 【0026】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大員環は、約 43 原子 ~ 53 原子の環を含む。

## 【0027】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、約 4 ターンのアルファヘリックスに及ぶ。

## 【0028】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] の長さは、約 17 個の炭素 - 炭素結合 ~ 約 28 個の炭素 - 炭素結合の長さとほぼ等しい。

## 【0029】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大員環は、約 59 原子 ~ 70 原子の環を含む。

## 【0030】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、約 5 ターンのアルファヘリックスに及ぶ。

## 【0031】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、[ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] の長さは、約 22 個の炭素 - 炭素結合 ~ 約 35 個の炭素 - 炭素結合の長さとほぼ等しい。

## 【0032】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大員環は、約 75 原子 ~ 88 原子の環を含む。

## 【0033】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、R<sub>1</sub> はメチルである。

## 【0034】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は更に、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む。

## 【0035】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大員環形成リンカー [ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、

10

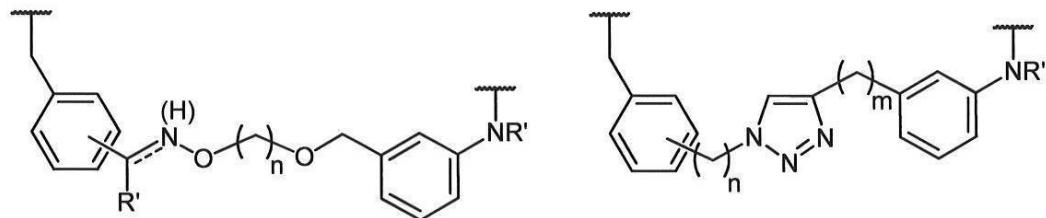
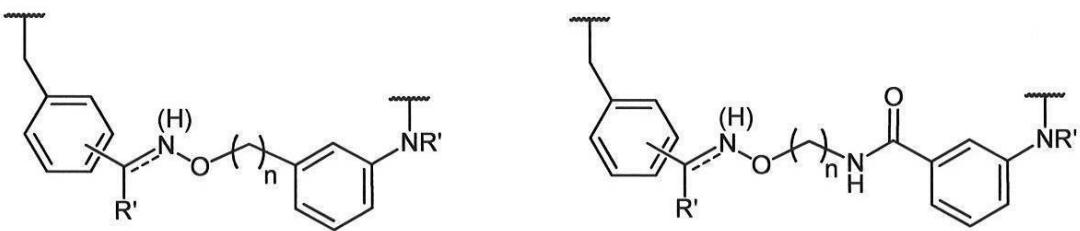
20

30

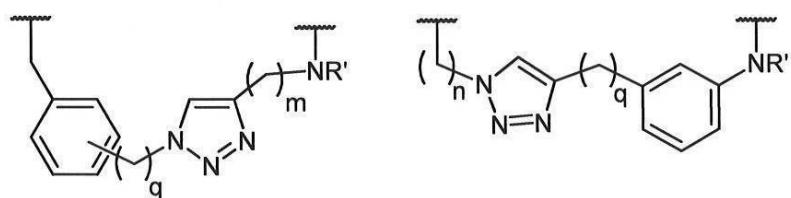
40

50

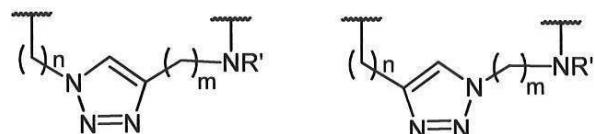
【化 2】



10

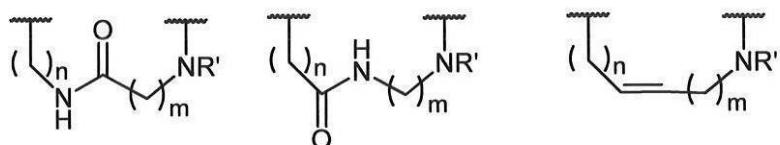
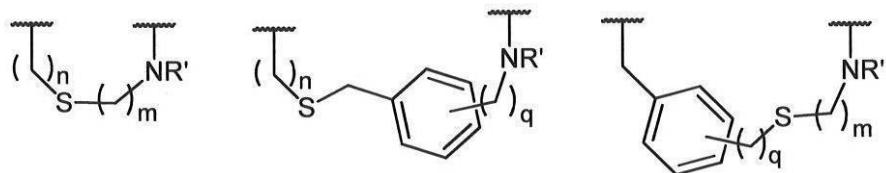


20

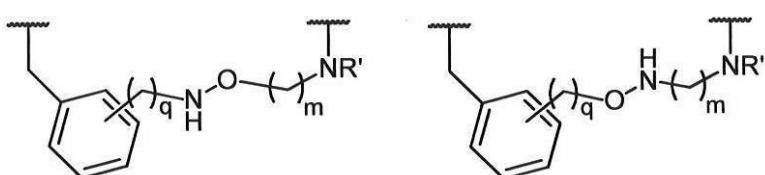
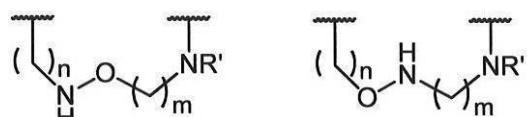


及び

【化3】



10

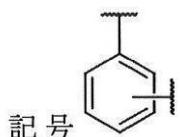


20

からなる大員環形成リンカーの群から選択され、

式中、

【化 4】



30

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、

「 $m$ 」及び「 $n$ 」は、それぞれ独立して、1～10の範囲内の整数であり、

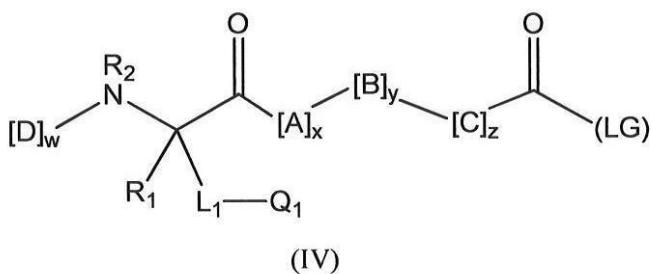
「q」は、0～5の整数であり、

R は、それぞれ独立して、-H または -CH<sub>3</sub> である。

[ 0 0 3 6 ]

大環状ペプチドミメティック分子の合成方法も提供され、この方法には、式(IV)の前駆体ペプチドミメティック分子：

【化 5】



40

を式(Ⅴ)：



の化合物と接触させることを含む：

(式中、

A、C及びD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、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステルによって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸、[-NHN(R<sub>3</sub>)C(O)-]、[-NH-L<sub>3</sub>-CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-]または[-NH-L<sub>3</sub>-]であり、10

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-O-NH-、-O-または-S-であり、

L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及びL<sub>3</sub>は、独立して、それが非置換であるか、またはR<sub>7</sub>で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

Q<sub>1</sub>は、スルフヒドリル(-SH)基、アミノ(-NHR<sub>5</sub>)基、アルケニル(-C=C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)基、アルキニル(-C=CH)基、アジド(-N<sub>3</sub>)基、ケト(-C(O)R<sub>5</sub>)基及びカルボキシ(-C(O)OH)基からなる基から選択され、20

Q<sub>2</sub>は、XがF、Cl、BrまたはIである-CH(R<sub>6</sub>)X、アミノ(-NHR<sub>6</sub>)基、オキシアミノ(-ONH<sub>2</sub>)基、ヒドラジノ(-NR<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)基、アルケニル(-C=C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)基、アルキニル(-C=CH)基、アジド(-N<sub>3</sub>)基、ケト(-C(O)R<sub>6</sub>)基及びカルボキシ(-COOH)基からなる群から選択され、20

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

R<sub>7</sub>は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、

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、30

wは、1~1000の整数であり、

x+y+zは、少なくとも3であり、

(LG)は、末端カルボン酸のカルボニル基を求核置換に対して活性化する基である。ここでの接触の結果、リンカー部分を介して、式(IV)の化合物の側鎖基L<sub>1</sub>とC末端カルボキシ基との間に共有結合が形成され、更に大環状ペプチドミメティック分子はヘリックスを構成する。

#### 【0037】

本方法の一実施形態では、求核置換に対してC末端カルボン酸基を活性化するLG基は、酸塩化物、酸無水物、アシリアルアジド、O-アシリルイソ尿素、ホスホニウム化合物、活性エステルまたはチオエステルである。40

#### 【0038】

本方法の別の実施形態では、末端Dはキャッシング基を含む。

#### 【0039】

別の実施形態では、方法は、接触の前に細胞内で前駆体ペプチドミメティック分子を発現することを含む。

#### 【0040】

本方法の別の実施形態では、前駆体ペプチドミメティック分子のLG基はインテインである。

#### 【0041】

本方法の別の実施形態では、方法は溶液中で実施される。50

## 【0042】

本方法の別の実施形態では、方法は固体支持体上で実施される。

## 【0043】

別の実施形態では、方法は、大環状ペプチドミメティック分子のライブラリを合成することを含む。

## 【0044】

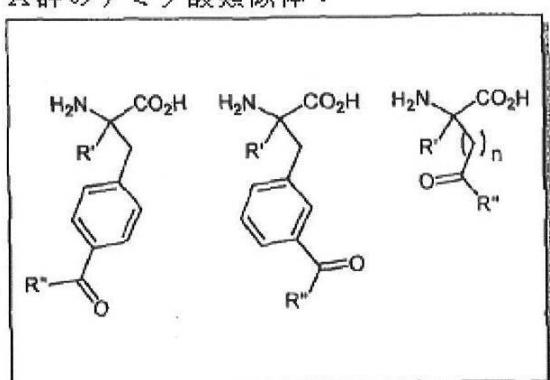
本方法の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、請求項1に記載の式(I)の化合物である。

## 【0045】

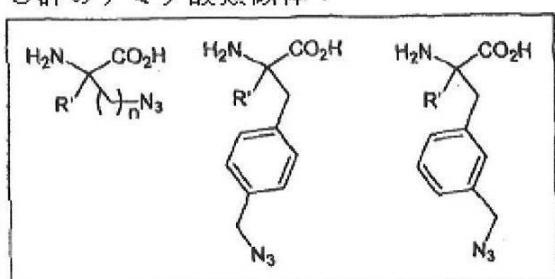
本方法の別の実施形態では、前駆体ペプチドミメティック分子は、

## 【化6】

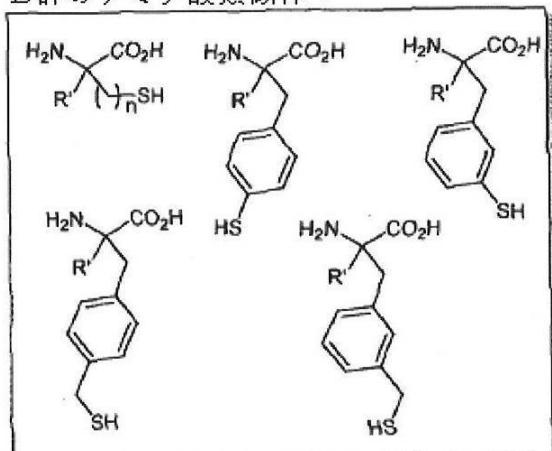
A群のアミノ酸類似体：



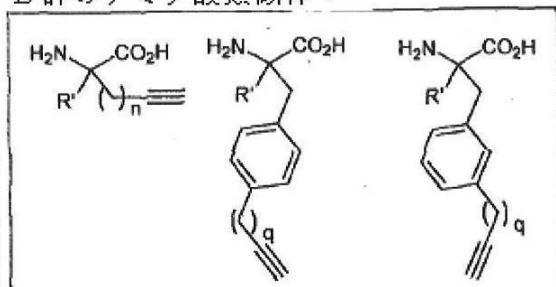
C群のアミノ酸類似体：



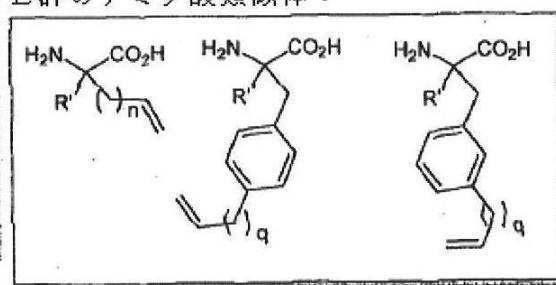
B群のアミノ酸類似体：



D群のアミノ酸類似体：

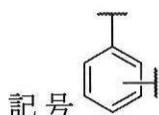


E群のアミノ酸類似体：



からなる群から選択されるアミノ酸類似体を含み、式(V)の大員環形成リンカー試薬は、適合性のある大員環を形成するリンカー試薬からなる群から選択され、ここで、選択されたアミノ酸類似体及び大員環形成リンカー試薬において、

## 【化7】



は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、

「m」及び「n」は、それぞれ独立して、1~10の範囲内の整数であり、

10

20

30

40

50

「q」は、0～5の整数であり、

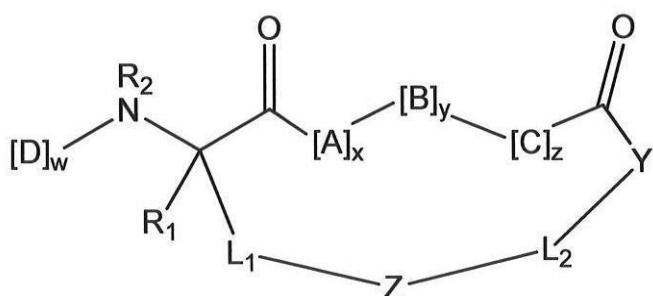
R'は、-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、

Rは、-H、-CH<sub>3</sub>または-OHであり、Xは、-Cl、-Br、-I、-OTS、-OMsまたは-OTfである。

#### 【0046】

提供される大環状ペプチドミメティック分子は、対象のp53/HDM2/HDMX関連疾患の治療に使用するためのものでもあり、この大環状ペプチドミメティックは、式(VII)の構造を有し、

#### 【化8】



(VII)

10

20

式中、

A、C及びDはそれぞれ独立して、天然または非天然アミノ酸であり、末端Dはキャッピング基を含む場合があり、

Bは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステルによって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸、[-NHN(R<sub>3</sub>)C(O)-]、[-NH-L<sub>3</sub>-CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-]または[-NH-L<sub>3</sub>-]であり、

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O-または-S-であり、

Zは、-SCH<sub>2</sub>R<sub>6</sub>-、-CHR<sub>6</sub>S-、-C=C-、-N(R<sub>5</sub>)CO-、-CON(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N-O-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-O-、-C(R<sub>5</sub>)=N-NH(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-NH(R<sub>6</sub>)-またはトリアゾール基であり、

L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>及びL<sub>3</sub>は、独立して、それが非置換であるか、またはR<sub>7</sub>で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

R<sub>7</sub>は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基及び置換アリール基であり、

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、

wは、1～1000の整数であり、

x+y+zは、少なくとも3であり、

更に大環状ペプチドミメティック分子は、配列番号1～37のアミノ酸配列からなる群か

30

40

50

ら選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

**【0047】**

大環状ペプチドミメティック分子の一実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 38 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80 %、90 % または 95 % 同一である。

**【0048】**

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 38 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列である。

**【0049】**

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、少なくとも 1 つの  $\alpha$ ,  $\beta$ -二置換アミノ酸を含む。

**【0050】**

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、少なくとも 1 つの N-メチル化アミノ酸を含む。

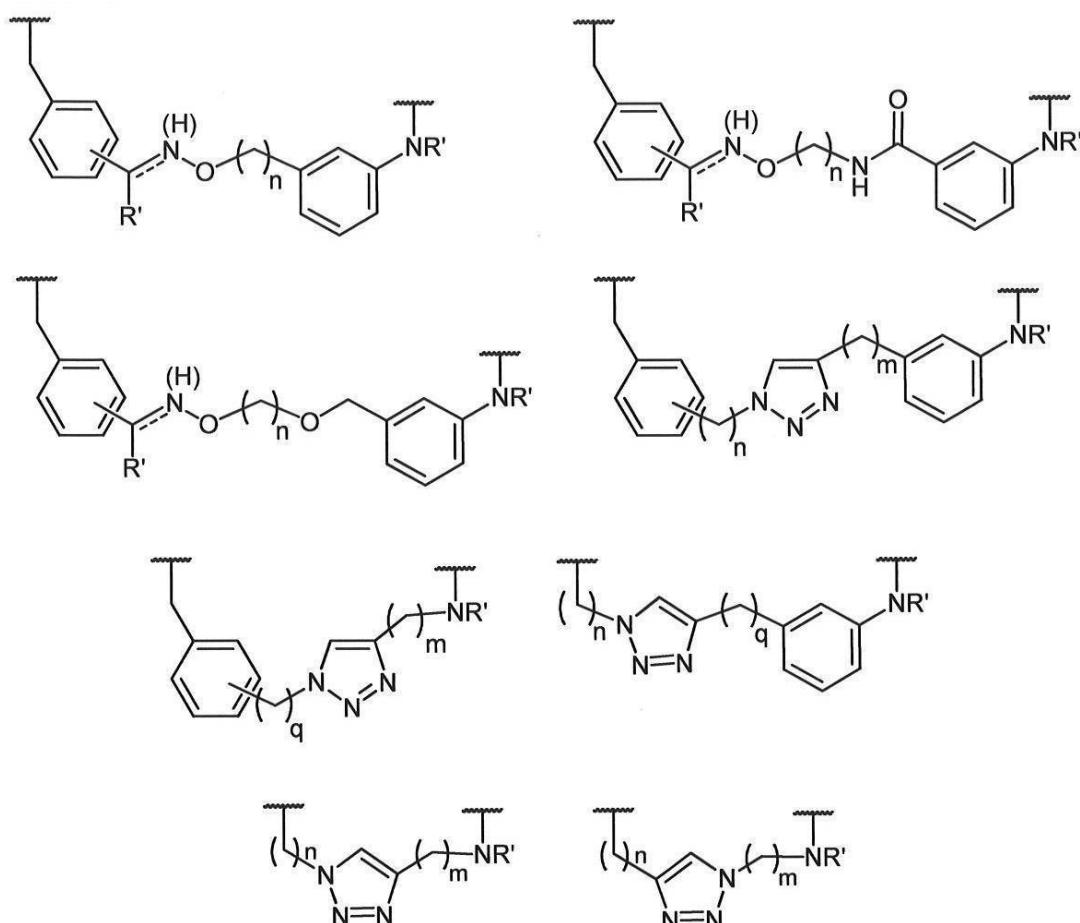
**【0051】**

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む。

**【0052】**

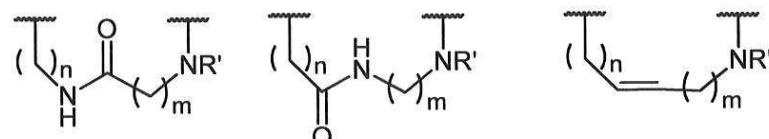
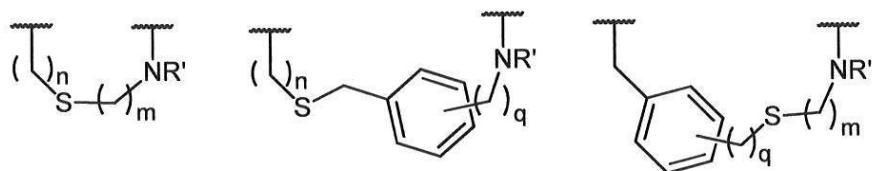
大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、大員環形成リンカー [ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、

**【化9】**

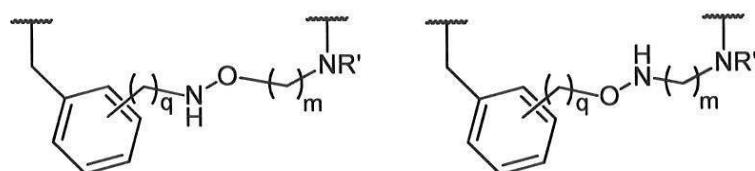
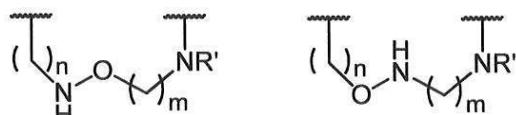


及び

## 【化10】



10

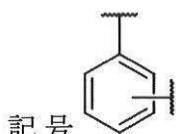


20

からなる大員環形成リンカーの群から選択され、

式中、

## 【化11】



30

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、

「m」及び「n」は、それぞれ独立して、1～10の範囲内の整数であり、

「q」は、0～5の整数であり、

R は、それぞれ独立して、-Hまたは-CH<sub>3</sub>である。

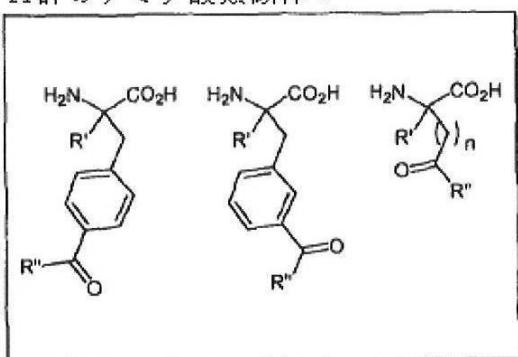
## 【0053】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、p 53 大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列は、配列番号1～37に対応するポリペプチド配列と少なくとも約50%同一であり、側鎖-C末端の大環状化は、

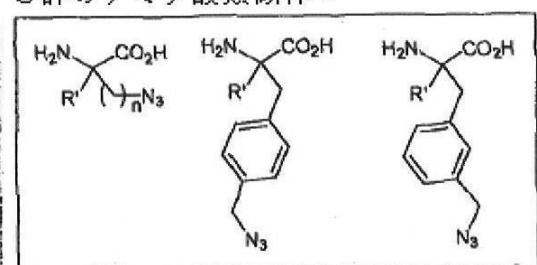
40

## 【化12】

A群のアミノ酸類似体：

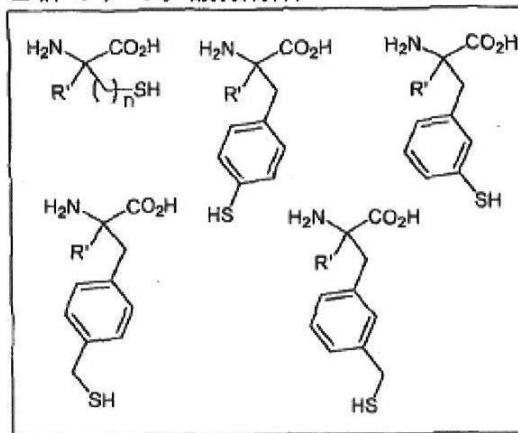


C群のアミノ酸類似体：

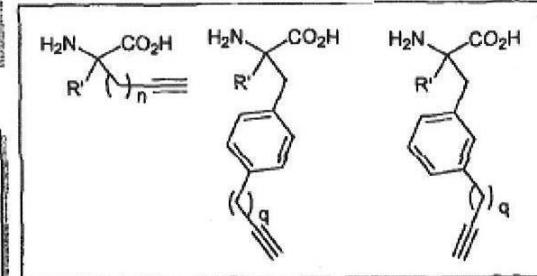


10

B群のアミノ酸類似体：

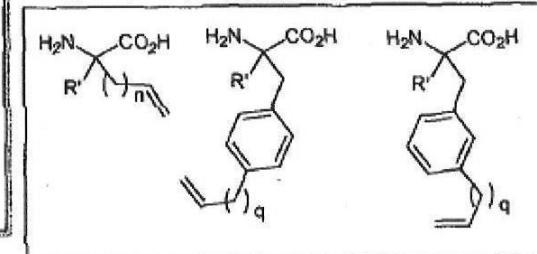


D群のアミノ酸類似体：



20

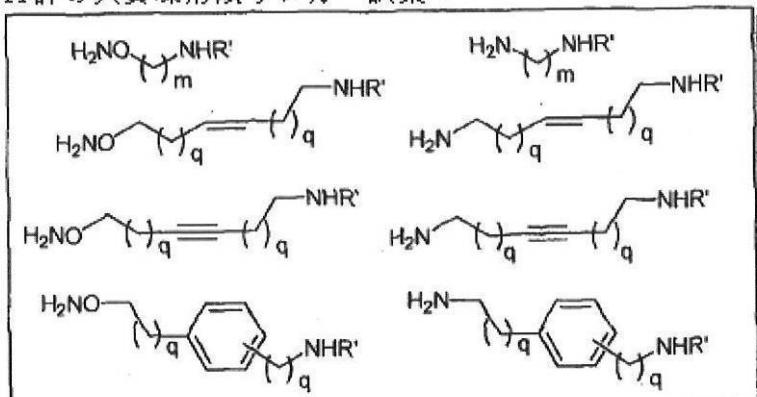
E群のアミノ酸類似体：



からなるアミノ酸類似体の群から選択されるアミノ酸類似体によって、及び

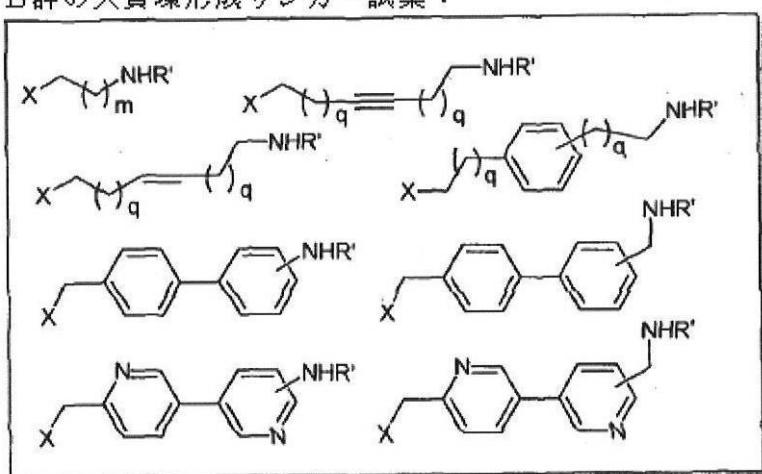
【化 1 3】

### A群の大員環形成リンカー試薬：



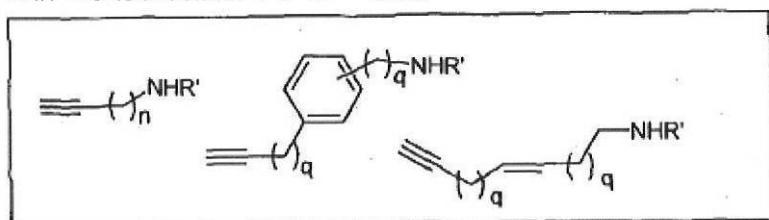
10

### B群の大鼠環形成リンカー試薬：



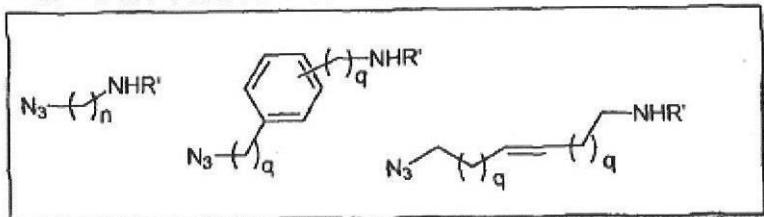
20

### C群の大員環形成リンカー試薬：



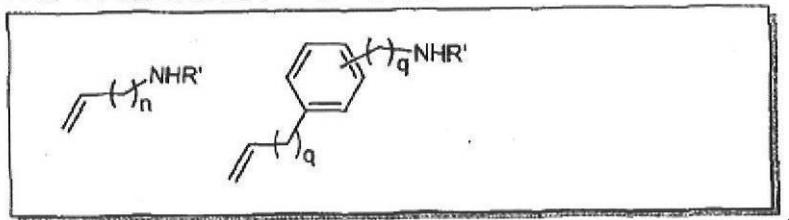
30

### D群の大員環形成リンカー試薬：



40

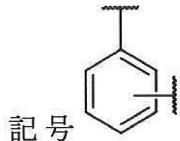
### 正群の大員環形成リンカー試薬：



50

からなる大員環形成リンカー試薬の群から選択される適合性のある大員環形成リンカー試薬によって媒介され、

ここで、選択されたアミノ酸類似体及び大員環形成リンカー試薬において、  
【化14】



10

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、  
「m」及び「n」は、独立して、1～10の範囲内の整数であり、  
「q」は、0～5の整数であり、  
R<sub>1</sub>は、それぞれ独立して、-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、  
R<sub>2</sub>は、-H、-CH<sub>3</sub>または-OHであり、  
Xは、-Cl、-Br、-I、-OTS、-OMsまたは-OTfである。

## 【0054】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、p53/HDM2/HDMX関連疾患は、癌または新生物疾患である。

20

## 【0055】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、p53/HDM2/HDMX関連疾患は、肉腫、胃癌、食道癌、直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、皮膚癌、脳腫瘍、癌腫、子宮頸癌、精巣癌、肺癌、膀胱癌、白血病またはリンパ腫である。

## 【0056】

大環状ペプチドミメティック分子の別の実施形態では、p53/HDM2/HDMX関連疾患は、炎症性、神経変性または自己免疫性疾患である。

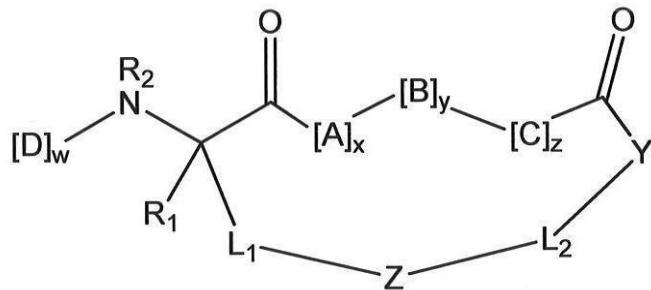
## 【0057】

対象のp53/HDM2/HDMX関連疾患を治療（または改善）するための方法も提供し、該方法は

30

式（VII）：

## 【化15】



40

(VII)

の構造を有する大環状ペプチドミメティック分子を治療すべき対象（p53/HDM2/HDMX関連疾患に罹患している）に投与することを含み、

式中、

A、C及びDはそれぞれ独立して、天然または非天然アミノ酸であり、末端Dはキャッピング基を含む場合があり、

Bは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの付

50

加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステルによって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸、[ - NHN ( R<sub>3</sub> ) C ( O ) - ]、[ - NH - L<sub>3</sub> - CO - ]、[ - NH - L<sub>3</sub> - SO<sub>2</sub> - ] または [ - NH - L<sub>3</sub> - ] であり、

Y は、- NH - 、- N ( R<sub>4</sub> ) - 、- NHN ( R<sub>4</sub> ) - 、- NH - O - 、- O - または - S - であり、

Z は、- SCHR<sub>6</sub> - 、- CHR<sub>6</sub>S - 、- C = C - 、- N ( R<sub>5</sub> ) CO - 、- CON ( R<sub>6</sub> ) - 、- C ( R<sub>5</sub> ) = N ( R<sub>6</sub> ) - 、- CH ( R<sub>5</sub> ) - NH ( R<sub>6</sub> ) - 、- C ( R<sub>5</sub> ) = N - O - 、- CH ( R<sub>5</sub> ) - NH - O - 、- C ( R<sub>5</sub> ) = N - NH ( R<sub>6</sub> ) - 、- CH ( R<sub>5</sub> ) - NH - NH ( R<sub>6</sub> ) - またはトリアゾール基であり、

L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 及び L<sub>3</sub> は、独立して、それそれが非置換であるか、または R<sub>7</sub> で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub> 及び R<sub>6</sub> は、独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

R<sub>7</sub> は、それぞれ独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基及び置換アリール基であり、

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、

w は、1 ~ 1000 の整数であり、

x + y + z は、少なくとも 3 であり、

更に大環状ペプチドミメティック分子は、配列番号 1 ~ 37 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 50 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

#### 【0058】

本方法の一実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 38 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 80 %、90 % または 95 % 同一である。

#### 【0059】

本方法の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 38 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列である。

#### 【0060】

本方法の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、少なくとも 1 つの，- 二置換アミノ酸を含む。

#### 【0061】

本方法の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、少なくとも 1 つの N - メチル化アミノ酸を含む。

#### 【0062】

本方法の別の実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む。

#### 【0063】

本方法の別の実施形態では、大員環形成リンカー [ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、

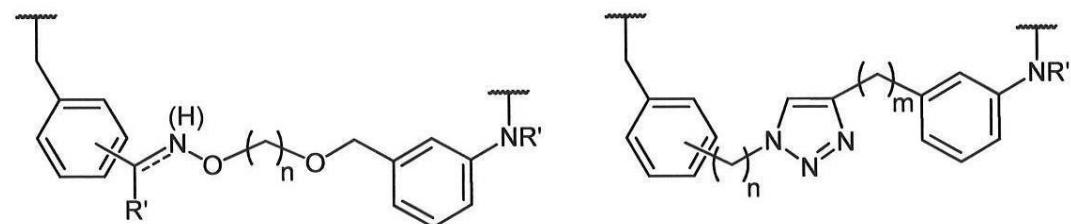
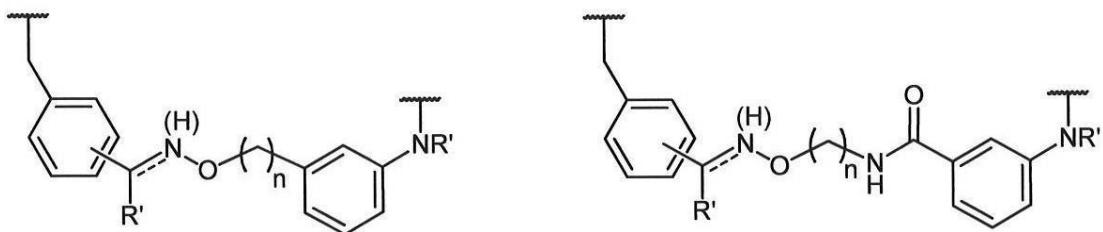
10

20

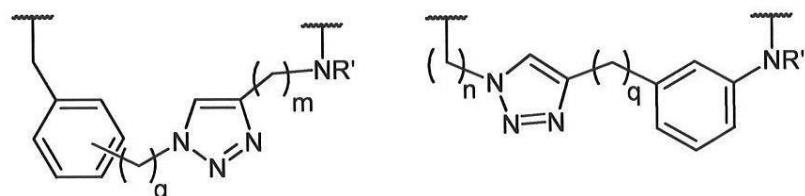
30

40

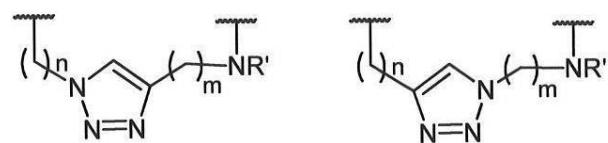
【化 16】



10



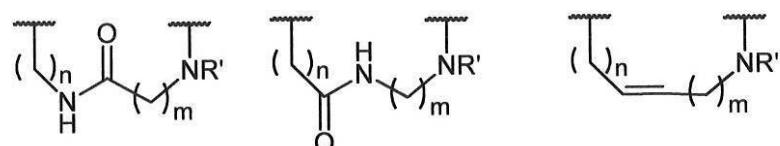
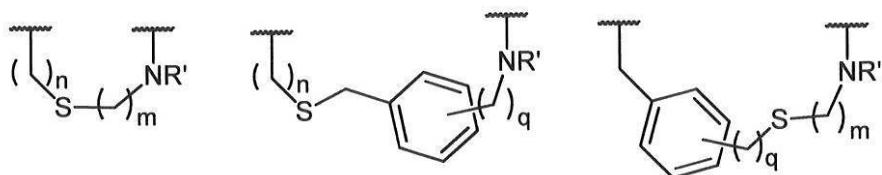
20



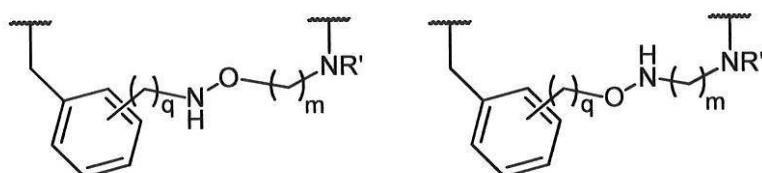
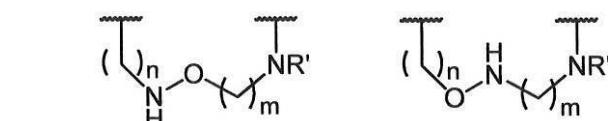
及び

30

## 【化17】

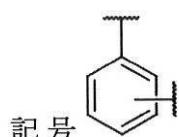


10



20

からなる大員環形成リンカーの群から選択され、式中、  
【化18】



30

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、  
「m」及び「n」は、それぞれ独立して、1～10の範囲内の整数であり、  
「q」は、0～5の整数であり、  
R は、それぞれ独立して、-Hまたは-CH<sub>3</sub>である。

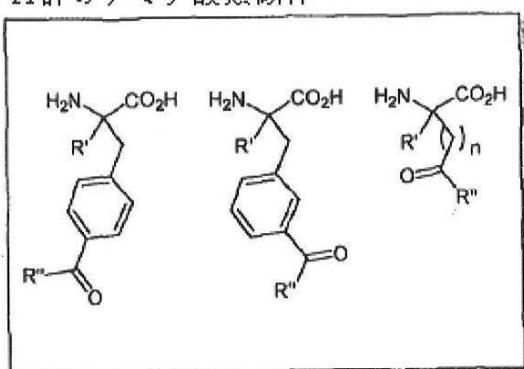
## 【0064】

本方法の別の実施形態では、p 53 大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列は、配列番号1～37に対応するポリペプチド配列と少なくとも約50%同一であり、側鎖-C末端の大環状化は、

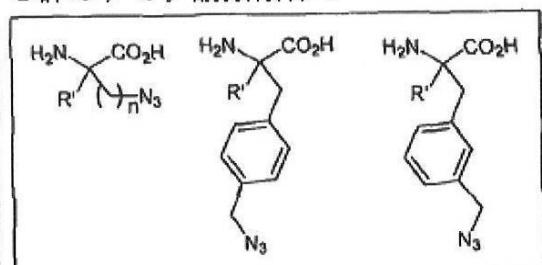
40

## 【化19】

A群のアミノ酸類似体：

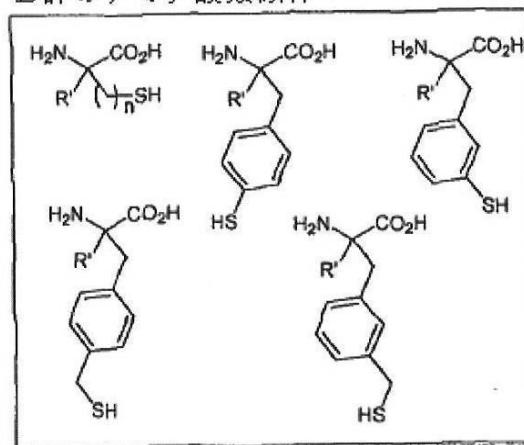


C群のアミノ酸類似体：

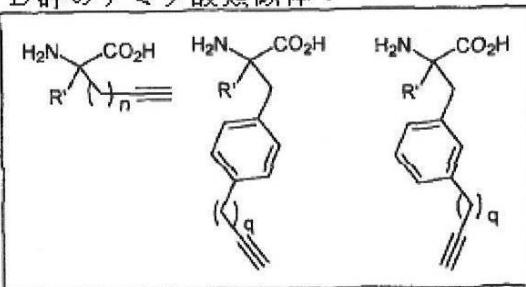


10

B群のアミノ酸類似体：

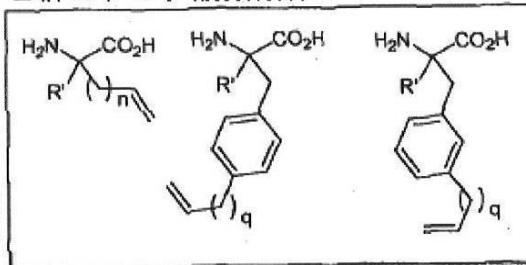


D群のアミノ酸類似体：



20

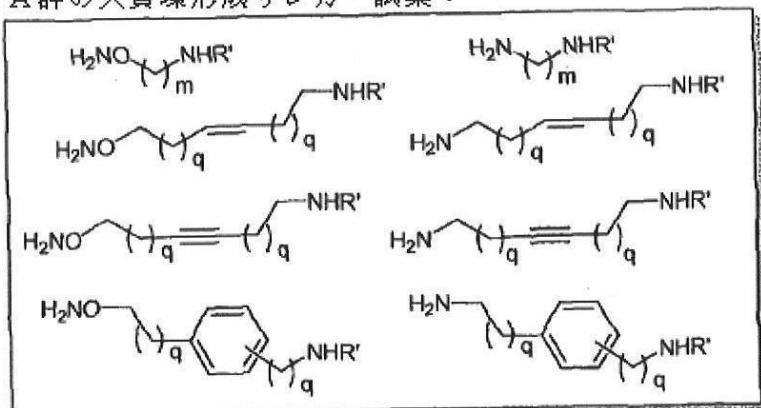
E群のアミノ酸類似体：



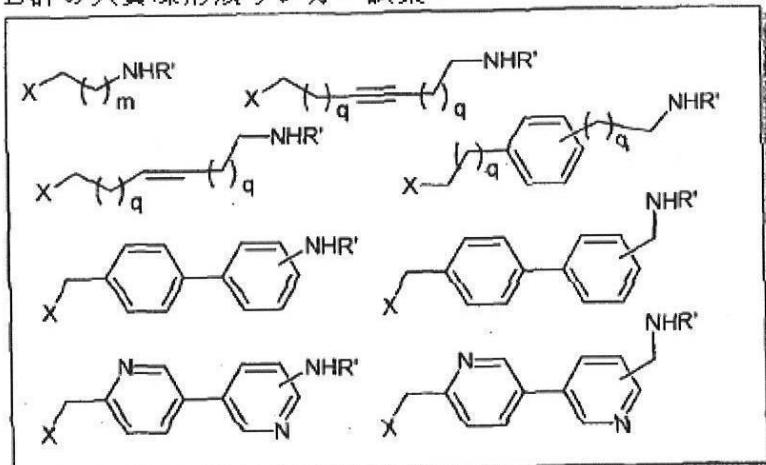
からなるアミノ酸類似体の群から選択されるアミノ酸類似体によって、及び

## 【化 20】

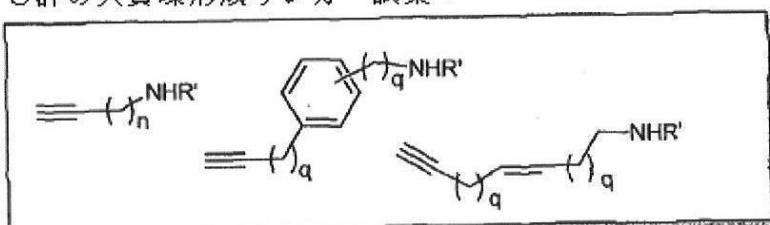
## A群の大員環形成リンカー試薬：



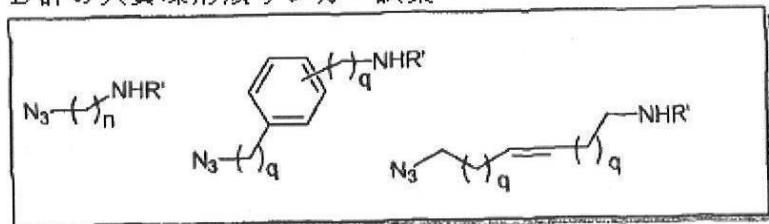
## B群の大員環形成リンカー試薬：



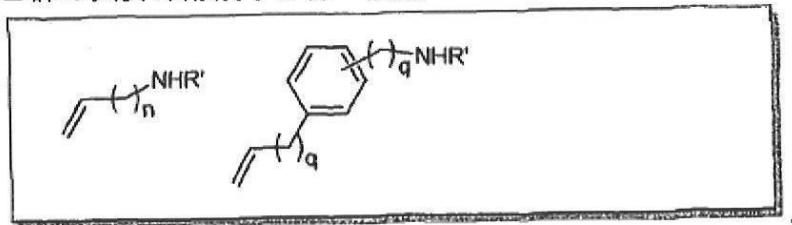
## C群の大員環形成リンカー試薬：



## D群の大員環形成リンカー試薬：

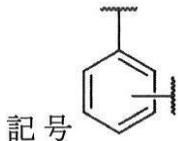


## E群の大員環形成リンカー試薬：



からなる大員環形成リンカー試薬の群から選択される適合性のある大員環形成リンカー試薬によって媒介され、

ここで、選択されたアミノ酸類似体及び大員環形成リンカー試薬において、  
【化 2 1】



10

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、  
「m」及び「n」は、独立して、1～10の範囲内の整数であり、  
「q」は、0～5の整数であり、  
R は、それぞれ独立して、-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、  
R は、-H、-CH<sub>3</sub>または-OHであり、  
Xは、-Cl、-Br、-I、-OTS、-OMsまたは-OTfである。

## 【0065】

本方法の別の実施形態では、p53/HDM2/HDMX関連疾患は、癌または腫瘍性疾患である。

20

## 【0066】

本方法の別の実施形態では、p53/HDM2/HDMX関連疾患は、肉腫、胃癌、食道癌、直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、皮膚癌、脳腫瘍、癌腫、子宮頸癌、精巣癌、肺癌、膀胱癌、白血病またはリンパ腫である。

## 【0067】

本方法の別の実施形態では、p53/HDM2/HDMX関連疾患は、炎症性、神経変性または自己免疫性疾患である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0068】

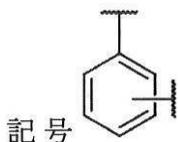
図面の簡単な説明において下記の記号をそれぞれ結合記号及び環記号と呼ぶ。

30

## 【化 2 2】

記号「C … N」

## 【化 2 3】



40

【図1】本明細書に記載する方法による ヘリックス状モチーフの大環状ペプチドミメティックの設計及び調製を示す一般的なスキーム。例えば、目的とするタンパク質 - タンパク質またはタンパク質 - ペプチド複合体に関する結晶構造に基づいて、標的とする ヘリックス状の識別モチーフを最初に特定する。次に、このような ヘリックス状の結合モチーフから誘導されるポリペプチド配列の側鎖 - C末端の環化によって、大環状ペプチドミメティック分子を生成する。アミノ酸配列、リンカー構造及び側鎖 - C末端結合性を変化させることで、タンパク質パートナーとの結合親和性、阻害力価、ヘリックス性、タン

50

パク分解安定性及び／または細胞透過性に関して、ペプチドミメティック分子の最適化を達成することができる。F G<sub>1</sub> 及び F G<sub>2</sub> は、互いに反応可能な官能基であり、N u H : 求核基、A c t : 求核置換活性化基の共有結合を形成する。

【図2】本明細書で開示される大環状ペプチドミメティック分子の代表的な構造。具体的に図は、L - - - アミノ酸を含むポリペプチド配列を含み、側鎖 - C 末端の結合性を有する代表的な大環状ペプチドミメティックを、i / i + 3 (CO) (すなわち、残基「i」が大員環形成リンカーを介して、残基「i + 3」のカルボニル基と結合している)からi / i + 8 (CO)まで示している。本明細書に記載する方法に従って、これらの分子の複数の変異体を構想し、調製することができる。

【図3】このスキームは、本明細書で開示される大環状ペプチドミメティック分子を調製するための代表的な合成方法を示している。この例では、3 - アミノ - N - (3 - (アミノオキシ)プロピル) - 4 - (メルカプトメチル)ベンズアミド (SP8) は大員環形成リンカー試薬の役割を果たし、L - パラ - アセチル - フェニルアラニン (pAcF) は一般式 (VI) のアミノ酸類似体の役割を果たす。簡潔には、非環式の前駆体ペプチドミメティック分子は、固相ペプチド合成 (SPPS) により調製される。安全キャッチ (safety catch) リンカーのアルキル化の後、大員環形成リンカー試薬と、樹脂に固定された前駆体分子とが反応して大環化が得られる(「樹脂上環化」)。あるいは、非環式の前駆体分子を、最初にチオエステルとして樹脂から切り出し、その後、溶液中で大員環形成リンカー試薬と反応させて環化する(「溶液中環化 (in-solution cyclization)」)。この具体例において、大員環形成リンカー内に含まれるチオール基は、C末端のライゲーション反応を促進する、及び大員環の固定化または蛍光色素、アフィニティータグまたは他の分子との更なる官能化のための利便なハンドルを付与するという二重の役割を果たしている。

【図4】本明細書で開示される大環状ペプチドミメティック分子の調製のための代替的な化学生合成方法。この場合、非環式の前駆体ポリペプチド分子は宿主(例えば、大腸菌)のリボソーム発現によって生じる。ここでは、L - パラ - アセチル - フェニルアラニンなどの一般式 (VI) のアミノ酸類似体は、アンバー終止コドンの抑制により導入され、ポリペプチドのC末端はインテインタンパク質の融合により活性化される。前駆体ポリペプチドと、適切な大員環形成リンカー試薬(例えば、3 - アミノ - N - (3 - (アミノオキシ)プロピル) - 4 - (メルカプトメチル)ベンズアミド) (SP8))との反応によって環化が形成され、所望の大環状ペプチドミメティック分子が得られる。

【図5 A - 5 B】アミノ酸類似体の合成。(A) エナンチオピュアのN - Fmoc保護されたL - 及びD - パラ - アセチル - フェニルアラニンを調製するための合成ルート。(B) アルキン官能化アミノ酸であるO - プロパルギル - チロシンを調製するための合成ルート。

【図5 C】アミノ酸類似体の合成。(C) チオール官能化アミノ酸であるAmmFを調製するための合成ルート。

【図5 D】アミノ酸類似体の合成。(D) チオール官能化アミノ酸であるMeFを調製するための合成ルート。

【図6】エナンチオピュアのN - Fmoc保護された6 - クロロ - トリプトファン (6Cl - Trp) を調製するための合成ルート。

【図7】大員環形成試薬SP4、SP5、SP6及びSP7を調製するための合成ルート。試薬及び条件：a) LiAlH<sub>4</sub>、THF; 95%、b) Ms - Cl、DIPEA、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 88%、c) NaN<sub>3</sub>、DMF; 100%、d) LiAlH<sub>4</sub>、THF; 95%、e) LiOH、THF: H<sub>2</sub>O; 100%、f) 11、DCC、DMAP、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 26%、g) TIPS、TFA、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 100%、h) HONHBOC、DBU、DMF; 89%、i) TIPS、TFA、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 100%、j) 12、CuSO<sub>4</sub>、NaAsc、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O; 72%、k) TIPS、TFA、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 100%、l) 13、HBTU、DIPEA、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 55%、m) TIPS、TFA、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 100%。

10

20

30

30

40

50

【図8】本明細書に記載する方法に使用される大員環形成リンカー試薬の代表的な構造。

【図9A-9B】(A) p53関連のペプチドPMI(pdb 3EQS)と結合したHDM2の結晶構造。(B) p53大環状ペプチドミメティックP8(図10)のモデル。

【図10】選択されたp53大環状ペプチドミメティック及び基準となる直鎖ペプチドのアミノ酸配列、構造及び阻害活性。阻害活性とは、表面プラズモン共鳴による阻害アッセイを使用して測定された、p53<sub>(15-29)</sub>-HDM2の相互作用またはp53<sub>(15-29)</sub>-HDMXの相互作用の妨害に関するIC<sub>50</sub>値を指す。

【図11A-11C】パラ-アセチル-フェニルアラニン(=4-エチル-アセトフェノン部分による模倣)と大員環形成リンカー試薬SP4(A)、SP8(B)及びSP6(C)との反応から生成される大員環形成リンカーを示す最小限のエネルギーモデル。側鎖とC末端のライゲーション位置間の近似最大点間距離を示す。

【図12A-12B】選択されたp53大環状ペプチドミメティック及び基準となる直鎖ペプチドによる、(A)p53-HDM2相互作用及び(B)p53-HDMX相互作用の阻害に関する濃度依存曲線。データは、表面プラズモン共鳴による阻害アッセイを使用して得た。この場合、可溶性のHDM2/Xと、固定化ビオチンをコンジュゲートしたp53ペプチド(biot-p53<sub>15-29</sub>)との結合が、化合物の量が増加するにつれて阻害される。

【図13A-13B】ヘリックス性及びタンパク質分解安定性(A)リン酸緩衝液(pH 7.0)及び40%のTFE中で測定された、代表的なp53大環状ペプチドミメティック(P7及びP8)及び基準となる直鎖ペプチド(P6)の円二色性スペクトル。(B)キモトリプシン(1.0 μg/mL)の存在下、37°での同一化合物のタンパク質分解安定性試験。グラフは、キモトリプシンと共に培養した後の、種々の時点での化合物の残留量を示す。

【図14A】(A)フルオレセインで標識した直鎖p53誘導ペプチドP1及び(B)フルオレセインで標識したp53大環状ペプチドミメティック化合物P8で処理したHEK293細胞の共焦点蛍光顕微鏡の画像。青=DAPI核染色、緑=フルオレセインでコンジュゲートした化合物。

【図14B】(A)フルオレセインで標識した直鎖p53誘導ペプチドP1及び(B)フルオレセインで標識したp53大環状ペプチドミメティック化合物P8で処理したHEK293細胞の共焦点蛍光顕微鏡の画像。青=DAPI核染色、緑=フルオレセインでコンジュゲートした化合物。

【図15】p53大環状ペプチドミメティックP13及び対応するアシルペプチドP10で治療後のSJS-1細胞(HDM2を過剰発現している骨肉腫細胞)の細胞生存性。既知の小分子HDM2阻害剤nutlin-3の用量反応曲線も示す。

【図16】本明細書で記載する方法に使用できる、式[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]の大員環形成リンカーの構造。結合記号は、単結合または二重結合を示す。環記号は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示す。Rは、-Hまたは-CH<sub>3</sub>である。記号'm'及び'n'は1~10の整数であり、「q」は0~5の整数である。

【図17】本明細書で記載する方法に使用できる、式[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]の追加の大員環形成リンカーの構造。環記号は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示す。記号'm'及び'n'は1~10の整数であり、「q」は0~5の整数である。

【図18】本明細書に記載する方法に使用できる、アミノ酸類似体(左パネル)及び適合性のある大員環形成リンカー試薬(矢でつながれた右パネル)の構造。環記号は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示す。記号'm'及び'n'は1~10の整数であり、「q」は0~5の整数である。Rは、-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、Rは、-H、-CH<sub>3</sub>または-OHであり、Xは、-Cl、-Br、-I、-OTs、-OMsまたは-OTfである。

【図19】本明細書に記載する方法に使用できる、追加のアミノ酸類似体(左パネル)及び適合性のある大員環形成リンカー試薬(矢でつながれた右パネル)の構造。環記号は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示す。記号'm'及び'n'は1~10の

10

20

30

40

50

整数であり、「q」は0～5の整数である。R<sub>1</sub>は、-Hまたは-C<sub>1</sub>H<sub>3</sub>であり、Xは、-Cl、-Br、-I、-OTs、-OMsまたは-OTfである。

**【発明を実施するための形態】**

**【0069】**

本開示は、配座安定性、生物活性、代謝安定性及び/または細胞透過性の増加を呈するヘリックスペプチドミメティックの產生に関する。

**【0070】**

発明を実施するための形態は、限定目的としてではなく、開示を明確化するために、以下に定めるサブセクションに分類される。

**【0071】**

定義

**【0072】**

本明細書で別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術的用語及び科学的用語は、本開示が属する分野の当業者に共通に理解されるものと同じ意味を有している。

**【0073】**

本明細書で使用される単数形「a」、「and」及び「the」は、その内容について別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象物を包含する。

**【0074】**

用語「複数」は、その内容について別段の明確な指示がない限り、2以上の指示対象を含む。

**【0075】**

本明細書で使用される場合、用語「官能基」は、特定の反応条件下で共に化学反応を受け得る隣接する原子団を指す。官能基の例は、多数ある中でも特に、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SH、-(C=O)-、-N<sub>3</sub>、-C(=O)CH<sub>3</sub>である。

**【0076】**

本明細書で使用される場合、用語「脂肪族」または「脂肪族基」は、完全に飽和された、若しくは1つ以上の（すなわち、少なくとも1単位）の不飽和単位を含有する、直鎖若しくは分枝鎖のC<sub>1</sub>～C<sub>5</sub>炭化水素鎖、または单環式C<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>炭化水素、または完全に飽和された、若しくは1つ以上の不飽和単位を含有するが、それが芳香族（「シクロアルキル」とも称する）でない二環式C<sub>8</sub>～C<sub>12</sub>炭化水素を意味する。例えば、好適な脂肪族基として、直鎖または分枝鎖のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはそのハイブリッド、例えば（シクロアルキル）アルキル、（シクロアルケニル）アルキルまたは（シクロアルキニル）アルキルが挙げられるが、これらに限定されない。アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基は、直鎖状でも分枝状でも環状でも良く、最大15、最大8、または最大5の炭素原子を含むことができる。アルキル基は、メチル基、エチル基、プロピル基、シクロプロピル基、ブチル基、シクロブチル基、ペンチル基及びシクロペンチル基を含むが、これらに限定されない。アルケニル基は、プロペニル基、ブテニル基及びペニテニル基を含むが、これらに限定されない。アルキニル基は、プロピニル基、ブニル基及びペンチニル基を含むが、これらに限定されない。

**【0077】**

本明細書で使用される場合、用語「アリール」及び「アリール基」は、共に融合される、直接的に結合される、または間接的に結合される（例えば、メチレン部分またはエチレン部分によって結合される）、单一の芳香族環または複数の芳香環を含有する芳香族置換基を指す。アリール基は、5～24の炭素原子、5～18の炭素原子または5～14の炭素原子を含み得る。

**【0078】**

用語「ヘテロ原子」は、窒素、酸素または硫黄を意味し、窒素及び硫黄の何らかの酸化形態及び任意の塩基性窒素の四級化形態を含む。ヘテロ原子は更に、Se、Si及びPを含む。

**【0079】**

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロアリール」は、少なくとも1つの炭素原子がヘテロ原子と置換されたアリール基を指す。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は、酸素、硫黄及び窒素原子を含むが、これらに限定されない群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含有する、5～18員、5～14員、または5～10員の芳香環系である。ヘテロアリール基は、ピリジル基、ピロリル基、フリル基、チエニル基、インドリル基、イソインドリル基、インドリジニル基、イミダゾリル基、ピリドニル基、ピリミジル基、ピラジニル基、オキサゾリル基、チアゾリル基、ブリニル基、キノリニル基、イソキノリニル基、ベンゾフラニル基及びベンゾオキサゾリル基を含むが、これらに限定されない。

## 【0080】

10

複素環基は、少なくとも1つのヘテロ原子を含有する単環式系または多環式系であって良く、不飽和であっても、または部分的若しくは完全に飽和されていても良い。したがって、用語「複素環式」には、上記のようなヘテロアリール基に加え、非芳香族複素環基も含む。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は、酸素、硫黄及び窒素原子を含むが、これらに限定されない群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含有する、3～18員、3～14員、または3～10員の環系である。複素環基は、上記に挙げた具体的なヘテロアリール基に加えて、ピラニル基、ピペリジニル基、ピロリジニル基、ジオキサン基、ピペラジニル基、マクロサイクロリニル(macrocycleoliny1)基、チオマクロサイクロリニル(thiomacrocyleoliny1)基、マクロサイクロリノスルフォニル(macrocycleolinosulfonyl)基、テトラヒドロイソキノリニ基及びテトラヒドロフラニル基を含むが、これらに限定されない。

## 【0081】

20

ハロゲン原子は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素原子であり得る。

## 【0082】

「場合により置換された」は、上記に挙げたいずれかの化学基(例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、ヘテロアルキル基、ヘテロアルケニル基、ヘテロアルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、複素環基、トリアゾリル基)において、1つ以上の(すなわち、少なくとも1つの)水素原子が水素以外の原子または化学基で場合により置換されていることを意味する。このような置換基の具体例としては、ハロゲン原子、ヒドロキシ(-OH)基、スルフヒドリル(-SH)基、置換スルフヒドリル基、カルボニル(-CO-)基、カルボキシ(-COOH)基、アミノ(-NH<sub>2</sub>)基、ニトロ(-NO<sub>2</sub>)基、スルホ(-SO<sub>2</sub>-OH)基、シアノ(-C≡N)基、チオシアネート(-S-C≡N)基、ホスホノ(-P(O)OH<sub>2</sub>)基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、ヘテロアルキル基、ヘテロアルケニル基、ヘテロアルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、複素環基、アルキルチオール基、アルキルオキシ基、アルキルアミノ基、アリールチオール基、アリールオキシ基またはアリールアミノ基が挙げられるが、これらに限定されない。「場合により置換された」が、読点で区切られた一連の群を修飾する場合(例えば、「場合により置換されたAA、BBまたはCC」、または「～で、場合により置換されたAA、BBまたはCC」)、群のそれぞれ(例えば、AA、BBまたはCC)が場合により置換されることを意味する。

30

## 【0083】

40

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロ原子を含む脂肪族」は、少なくとも1つの炭素原子がヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、硫黄、セレニウム、リンまたはケイ素、通常は酸素、窒素または硫黄で置換される脂肪族部分を指す。

## 【0084】

本明細書で使用される場合、用語「アルキル」と「アルキル基」は、通常1～24の炭素原子または1～12の炭素原子を含む直鎖状、分枝状または環状の飽和炭化水素、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、オクチル、デシルなどを指す。

## 【0085】

50

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロ原子を含むアルキル」は、少なくとも1つの炭素原子がヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、硫黄、リンまたはケイ素、通常は酸素、窒素または硫黄で置換されるアルキル部分を指す。

#### 【0086】

本明細書で使用される場合、用語「アルケニル」及び「アルケニル基」は、2～24の炭素原子または2～12の炭素原子からなり、少なくとも1つの二重結合を含む直鎖状、分枝状または環状の炭化水素基、例えばエテニル、n-プロペニル、イソプロペニル、n-ブチニル、イソブチニル、オクチニル、デセニルなどを指す。

#### 【0087】

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロ原子を含むアルケニル」は、少なくとも一つの炭素原子がヘテロ原子で置換されているアルケニル部分を指す。 10

#### 【0088】

本明細書で使用される場合、用語「アルキニル」及び「アルキニル基」は、2～24の炭素原子または2～12の炭素原子からなり、少なくとも1つの三重結合を含む直鎖状、分枝状または環状の炭化水素基、例えばエチニル、n-プロピニルなどを指す。

#### 【0089】

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロ原子を含むアルキニル」は、少なくとも一つの炭素原子がヘテロ原子で置換されているアルキニル部分を指す。

#### 【0090】

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロ原子を含むアリール」は、少なくとも一つの炭素原子がヘテロ原子で置換されているアリール部分を指す。 20

#### 【0091】

本明細書で使用される場合、用語「アルコキシ」及び「アルコキシ基」は、単一の末端エーテル結合によって結合された、脂肪族基またはヘテロ原子を含む脂肪族基を指す。いくつかの実施形態では、アリールアルコキシ基は1～24の炭素原子を含み、他の実施例では、アルコキシ基は1～14の炭素原子を含む。

#### 【0092】

本明細書で使用される場合、用語「アリールオキシ」及び「アリールオキシ基」は、単一の末端エーテル結合によって結合された、アリール基またはヘテロ原子を含むアリール基を指す。いくつかの実施形態では、アリールオキシ基は5～24の炭素原子を含み、他の実施例では、アリールオキシ基は5～14の炭素原子を含む。 30

#### 【0093】

用語「置換基」は、隣接する原子団を指す。「置換基」の例としては、アルコキシ、アリールオキシ、アルキル、ヘテロ原子を含むアルキル、アルケニル、ヘテロ原子を含むアルケニル、アルキニル、ヘテロ原子を含むアルキニル、アリール、ヘテロ原子を含むアリール、アルコキシ、ヘテロ原子を含むアルコキシ、アリールオキシ、ヘテロ原子を含むアリールオキシ、ハロ、ヒドロキシ(-OH)、スルフヒドリル(-SH)、置換スルフヒドリル、カルボニル(-CO-)、チオカルボニル(-CS-)、カルボキシ(-COOH)、アミノ(-NH<sub>2</sub>)、置換アミノ、ニトロ(-NO<sub>2</sub>)、ニトロソ(-NO)、スルホ(-SO<sub>2</sub>-OH)、シアノ(-C≡N)、シアナト(-O-C≡N)、チオシアナト(-S-C≡N)、ホルミル(-CO-H)、チオホルミル(-CS-H)、ホスホノ(-P(O)OH<sub>2</sub>)、置換ホスホノ及びホスホ(-PO<sub>2</sub>)が挙げられるが、これらに限定されない。 40

#### 【0094】

本明細書中で使用される場合、用語「大員環」は、少なくとも9つの共有結合原子によって形成される環またはサイクルを含む化学構造を有する分子を指す。

#### 【0095】

本明細書で使用される場合、用語「環状」及び「大環状」は、環を形成する構成原子を有することを指す。したがって、「大環状ペプチドを含む分子」は、分子に含まれる原子によって形成される1つ以上の環（すなわち、少なくとも1つの環）を含む、ペプチドを 50

含む分子である。本明細書中で使用される場合、「環化」または「大環状化」は、それによって環状分子が形成される、または形成されるべく作製されるプロセスまたは反応を指す。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド主鎖」は、天然タンパク質の主鎖に相当する一連の原子を指す。本明細書で使用される場合、「非ペプチド主鎖」は、ペプチド主鎖に相当しない一連の原子を指す。

#### 【0096】

本明細書で使用される場合、用語「大環状ペプチドミメティック」及び「大環状ペプチドミメティック分子」は、複数のペプチド結合及び少なくとも1つの大員環形成リンカーによって連結された複数のアミノ酸残基を含む化合物を指し、大員環形成リンカーは、1つ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若しくはアミノ酸類似体残基の炭素と、別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若しくはアミノ酸類似体残基のC末端カルボニル基(-C(=O)-)との間で大員環を形成する。大環状ペプチドミメティックは、1つ以上のアミノ酸残基間及び/またはアミノ酸類似体残基間に1つ以上の(すなわち、少なくとも1つの)非ペプチド結合を含む場合もあれば、大員環を形成するものに加えて、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類似体残基を含む場合もある。

#### 【0097】

用語「-アミノ酸」または単に「アミノ酸」は、炭素と称される炭素と結合したアミノ基及びカルボキシ基の両方を含む分子を指す。好適なアミノ酸としては、天然に存在するアミノ酸のD型及びL型異性体の両方、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が、これらに限定されない。文脈上、別途具体的な指示のない限り、本発明で使用される場合、用語「アミノ酸」は、アミノ酸類似体を含むことを意図する。

#### 【0098】

用語「天然に存在するアミノ酸」は、自然合成されたペプチドに一般に見られ、1文字の略称、A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y及びVによって知られている、20のアミノ酸のうちいずれか1つを指す。

#### 【0099】

用語「アミノ酸類似体」は、アミノ酸と構造的に類似し、ペプチドまたは大環状ペプチドミメティック分子の形成時にアミノ酸と置換され得る分子を指す。アミノ酸類似体には、アミノ基とカルボキシ基との間に1つ以上の(すなわち、少なくとも1つの)追加のメチレン基を包含すること(例えば-アミノ-カルボキシ酸)を除いて、または類似した反応性基によってアミノ基若しくはカルボキシ基が置換されること(例えば第二級若しくは第三級アミンによる第一級アミンの置換またはエステルによる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を含む。

#### 【0100】

用語「キャッピング基」は、大環状ペプチドミメティック分子に含まれるポリペプチド鎖のアミノ末端に存在する化学的部分を指す。アミノ末端のキャッピング基には、非修飾アミン(すなわち、-NH<sub>2</sub>)または置換基を有するアミンが含まれる。例えば、アミノ末端をアシリル基で置換して、N末端においてカルボキサミドを生成することができる。多様な置換基には、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>カルボニル、C<sub>7</sub>~C<sub>30</sub>カルボニル、及びPEG化したカルバメートを含む、置換アシリル基が含まれるが、これらに限定されない。N末端に対する代表的なキャッピング基には、アセチル基、プロピオニル基、tert-ブチルカルボニル基、アダマンチルカルボニル基、1-ナフチルメチルカルボニル基、イソニコチニルカルボニル基、デカノイルカルボニル基、パルミチルカルボニル基またはポリエチレングリコール-カルボニル基を含むが、これらに限定されない。

#### 【0101】

本明細書で大員環または大員環形成リンカーと関連して使用される場合、用語「員」は、大員環を形成している、または形成することができる原子を指し、置換基または側鎖原子を除外する。類推から、シクロデカン、1,2-ジフルオロ-デカン及び1,3-ジメ

10

20

30

40

50

チルシクロデカンは、水素若しくはフルオロ置換基またはメチル側鎖が大員環の形成に関与していないため、全て10員の大員環と見なされる。

#### 【0102】

用語「アミノ酸側鎖」は、アミノ酸中の炭素に結合した部分を指す。例えば、アラニンの場合のアミノ酸側鎖はメチルであり、フェニルアラニンの場合のアミノ酸側鎖はフェニルメチルであり、システインの場合のアミノ酸側鎖はチオメチルであり、アスパラギン酸の場合のアミノ酸側鎖はカルボキシメチルであり、チロシンの場合のアミノ酸側鎖は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には、例えは自然に発生するもの（例えは、アミノ酸代謝産物）または合成により作製されるもの（例えは、二置換アミノ酸）も含まれる。

10

#### 【0103】

本明細書で使用される場合、用語「ペプチド」及び「ポリペプチド」は、共有結合（例えは、アミド結合）により連結された2個以上の天然に存在するまたは存在しないアミノ酸からなる何らかの鎖を指す。本明細書で記載されるポリペプチドには、完全長タンパク質（例えは、完全にプロセシングされたタンパク質）ならびにより短いアミノ酸配列（例えは、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）が含まれる。

#### 【0104】

本明細書で使用される場合、用語「安定性」は、円二色性、NMRまたは別の生物物理学的な測定法により測定した際の、本明細書で開示するペプチドまたは大環状ペプチドミメティック分子による溶液中での規定の二次構造の維持、またはインビトロ若しくはインビトロでのタンパク質分解性に対する耐性を指す。本開示で検討される二次構造の非限定的例は、ヘリックス、ターン、 $\beta$ ヘリックス及びヘリックスである。

20

#### 【0105】

本明細書で使用される場合、用語「ヘリックス安定性」は、円二色性、NMRまたは別の生物物理学的方法により測定した際の、本明細書で開示するペプチドまたは大環状ペプチドミメティック分子によるヘリックス状構造の維持を指す。例えは、いくつかの実施形態では、本明細書で開示する大環状ペプチドミメティック分子は、円二色性により決定した際に、対応する非大環状ポリペプチドと比較して、ヘリックス性が少なくとも1.25倍、1.5倍、1.75倍または2倍の増大を示す。

30

#### 【0106】

本明細書で使用される場合、用語「タンパク分解安定性」は、1つ以上（すなわち、少なくとも1つの）プロテアーゼの存在下で、HPLCまたは別の分析法により測定した際の、本明細書で開示するペプチドまたは大環状ペプチドミメティック分子による完全体構造の維持を指す。例えは、いくつかの実施形態では、本明細書で開示する大環状ペプチドミメティック分子は、HPLCによって測定した際の、1つ以上のプロテアーゼ存在下での半減期が、対応する非大環状ポリペプチドと比較して、少なくとも1.25倍、1.5倍、1.75倍または2倍の増大を示す。

#### 【0107】

本明細書で使用される場合、化学的単位の相互作用に関する用語「接触」は、化学的単位の相互作用を支配する短距離の非共有相互作用（例えはファンデルワールス力、水素結合、疎水性相互作用、静電相互作用、双極子相互作用）が可能である距離に化学的単位があることを示す。例えは、タンパク質が化学種と「接触される」とき、タンパク質は化学種と相互作用することが可能になり、それによってタンパク質と化学種との間に反応が発生し得る。

40

#### 【0108】

本発明で使用される場合、用語「親和性標識」または「親和性タグ」は、物理的な方法によって、それに共有結合した別の分子（例えは、標的ポリペプチド）の分離を可能にする分子を指す。親和性標識の非限定的例は、ビオチン及びグルタチオンである。親和性標識分子を分離するための有用な物理的方法の例として、アフィニティーコロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、ゲルパーティションクロマト

50

グラフィ及び関連した技術を含むが、これらに限定されない。

【0109】

本発明で使用される場合、用語「蛍光分子」は、励起時に光子を放出し、それにより蛍光性となる分子を指す。蛍光分子の非限定的例として、クマリン、ナフタレン、ピレン、フルオレセイン、ローダミン、ナフトキサンテン、フェナントリジン、二フッ化ホウ素ジプロメテン(BODIPY)、シアニン、フタロシアニン、オキサジン及び種々に官能化されたそれらの誘導体が挙げられる。

【0110】

本発明で使用される場合、用語「放射性同位体標識」は、その原子核が、例えばアルファ若しくはベータ粒子またはガンマ放射線などの核放射線を自発的に放射する群を含む分子を指す。

10

【0111】

本発明で使用される場合、用語「標的薬剤」は、別の分子と、特定の生命体、組織、細胞または細胞内区画との共有性または非共有性の会合を誘導できる分子構造である。標的薬剤の非限定的例として、抗体、短ペプチド(例えば、Arg-Gly-Asp)及び葉酸などの小分子が挙げられる。

【0112】

本明細書中で使用される場合、用語「治療薬」は、ヒト疾患の治療への使用を法的に認可された何らかの分子を指す。

20

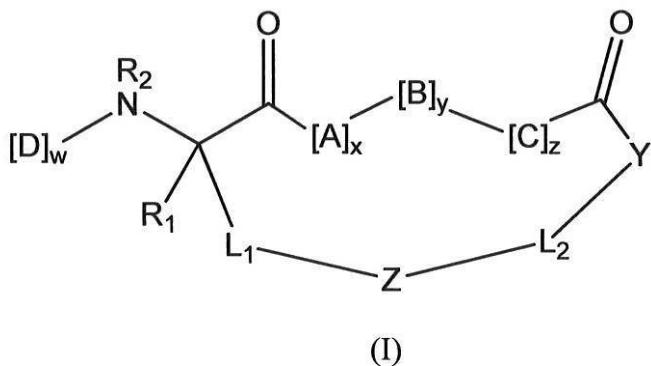
【0113】

大環状ペプチドミメティック

【0114】

式(I)の大環状ペプチドミメティックを提供する：

【化24】



30

(式中、

A、C及びDはそれぞれ独立して、天然または非天然アミノ酸であり、末端Dはキャッピング基を含む場合があり、

Bは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも1つの附加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステルによって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸、[-NH<sub>2</sub>(R<sub>3</sub>)CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-CO-]、[-NH-L<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-]または[-NH-L<sub>3</sub>-]であり、

40

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O-または-S-であり、

Zは、-SCH<sub>2</sub>R<sub>6</sub>-、-CHR<sub>6</sub>S-、-C=C-、-N(R<sub>5</sub>)CO-、-CON(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH(R<sub>6</sub>)-、-C(R<sub>5</sub>)=N-O-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-O-、-C(R<sub>5</sub>)=N-NH(R<sub>6</sub>)-、-CH(R<sub>5</sub>)-NH-NH(R<sub>6</sub>)-またはトリアゾール基であり、

50

$L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は、独立して、それが非置換であるか、または  $R_7$  で置換された脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$  及び  $R_6$  は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

$R_7$  は、それぞれ独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基であり、

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、

w は、1 ~ 1000 の整数である)。

#### 【0115】

いくつかの実施形態では、 $x + y + z$  は、少なくとも 3 である。他の実施形態では、 $x + y + z$  は、3、4、5、6、7、8、9 または 10 である。大員環または大員環前駆体の A、B、C または D の存在はそれぞれ独立して選択される。例えば、式  $[A]_x$  で表される配列は、x が 3 であるとき、アミノ酸が同一でない実施形態、例えば A1a - G1y - A1s p、ならびにアミノ酸が同一である実施形態、例えば A1a - A1a - A1a を包含する。これは、指定された範囲内であれば、x、y、z または w がどの値であっても当てはまる。

#### 【0116】

いくつかの実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、二次構造状モチーフとして ヘリックスを含む。一般に、ヘリックスは、ターン当たり 3 ~ 4 のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子に含まれる ヘリックスは、1 ~ 5 ターンを含み、その結果、3 ~ 20 のアミノ酸残基を含む。具体的な実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子に含まれる ヘリックスは、1 ターン、2 ターン、3 ターン、4 ターンまたは 5 ターンを含む。

#### 【0117】

いくつかの実施形態では、 $L_1$  と結合したアミノ酸 炭素から Y 基までを測定した際の、大員環形成リンカー [-  $L_1$  - Z -  $L_2$  - Y - ] の長さは、ポリペプチドまたはペプチドミメティック配列  $[A]_x - [B]_y - [C]_z$  に包含されるアミノ酸残基によって形成される ヘリックスの安定性を増加するように選択される。いくつかの実施形態では、[-  $L_1$  - Z -  $L_2$  - Y - ] として定義される大員環形成リンカーは、ヘリックスの 1 ターン ~ 5 ターンに及ぶ。いくつかの実施形態では、大員環形成リンカーは、ヘリックスの約 1 ターン、2 ターン、3 ターン、4 ターンまたは 5 ターンに及ぶ。

#### 【0118】

いくつかの実施形態では、大員環形成リンカー [-  $L_1$  - Z -  $L_2$  - Y - ] の長さは、ヘリックスの 1 ターンにつき 4 ~ 12 である。他の実施形態では、大員環形成リンカーの長さは、ヘリックスの 1 ターンにつき 5 ~ 9 である。

#### 【0119】

いくつかの実施形態では、大員環形成リンカーは約 1 ターンの ヘリックスに及び、その長さは約 5 個の炭素 - 炭素結合 ~ 約 11 個の炭素 - 炭素結合にほぼ等しく、リンカーは少なくとも 4 原子 ~ 10 原子を含む。この場合、得られる大員環は、15 員 ~ 21 員を有する環を形成する。

#### 【0120】

他の実施形態では、大員環形成リンカーは約 2 ターンの ヘリックスに及び、その長さは約 7 個の炭素 - 炭素結合 ~ 約 17 個の炭素 - 炭素結合にほぼ等しく、リンカーは少なくとも 6 原子 ~ 16 原子を含む。この場合、得られる大員環は、28 員 ~ 38 員を有する環を形成する。

#### 【0121】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、大員環形成リンカーは約3ターンのヘリックスに及び、その長さは約12個の炭素-炭素結合～約22個の炭素-炭素結合にほぼ等しく、リンカーは少なくとも11原子～21原子を含む。この場合、得られる大員環は、43員～53員を有する環を形成する。

## 【0122】

他の実施形態では、大員環形成リンカーは約4ターンのヘリックスに及び、その長さは約17個の炭素-炭素結合～約28個の炭素-炭素結合にほぼ等しく、リンカーは少なくとも16原子～27原子を含む。この場合、得られる大員環は、59員～70員を有する環を形成する。

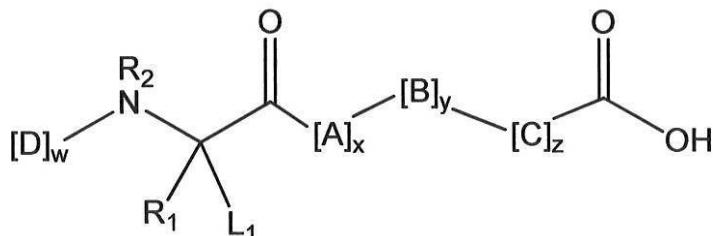
## 【0123】

他の実施形態では、大員環形成リンカーは約5ターンのヘリックスに及び、その長さは約22個の炭素-炭素結合～約35個の炭素-炭素結合にほぼ等しく、リンカーは少なくとも21原子～34原子を含む。この場合、得られる大員環は、75員～88員を有する環を形成する。

## 【0124】

いくつかの実施形態では、式(I)の大環状ペプチドミメティック分子は、非大環状ポリペプチドまたはペプチドミメティック分子相対物と比較して、構造安定性の増加、標的に対する親和性の増加、タンパク質分解への耐性の増加及び／または細胞透過性の増加などの、改善された生物学的性質を呈する。一般式(I)の化合物に対する、基準となる非大環状相対物は一般式(II)の化合物である：

## 【化25】



(II)

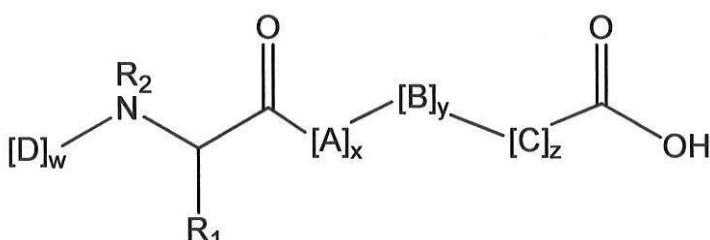
10

20

30

(式中、A、B、C、D、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、L<sub>1</sub>、x、y、z及びwは全て、上記の式(I)に定める通りである)。あるいは、一般式(I)の化合物に対する、基準となる非大環状相対物は一般式(III)の化合物である：

## 【化26】



(III)

40

(式中、A、B、C、D、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、x、y、z及びwは全て、上記の式(I)に定める通りである)。

## 【0125】

50

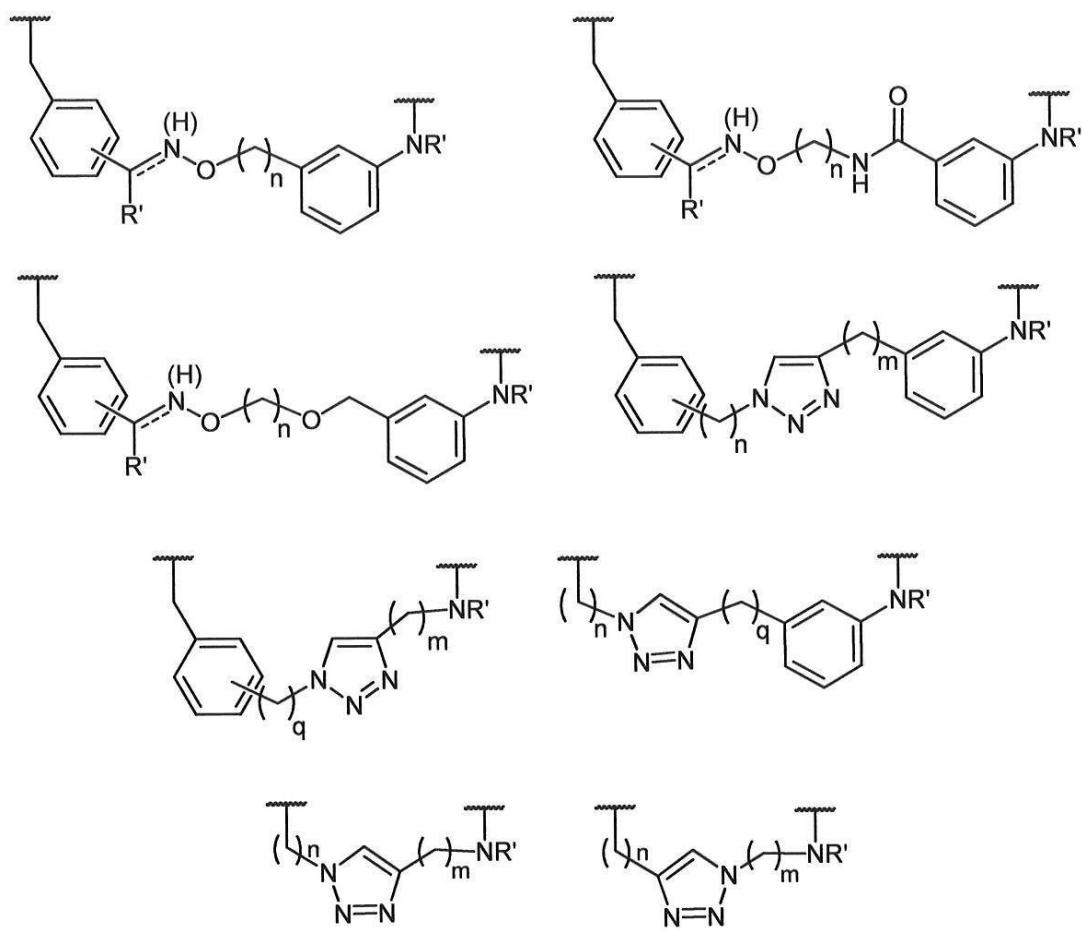
いくつかの実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は水溶液中でヘリックスを含み、上記に定義される非大環状相対物と比較した場合に、ヘリックス性の程度の増加を呈する。いくつかの実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、円二色性により測定した際に、式(I I)または(I I I)の基準となる非大環状相対物と比較して、ヘリックス性が少なくとも1.1倍、少なくとも1.5倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍または少なくとも4倍の増加を有する。

## 【0126】

いくつかの実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は一般式(I)の大環状ペプチドミメティック分子に対応し、この場合、ペプチドミメティック分子の主鎖及びカルボキシ末端に結合する大員環形成リンカー[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]は、

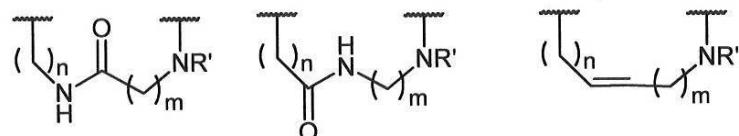
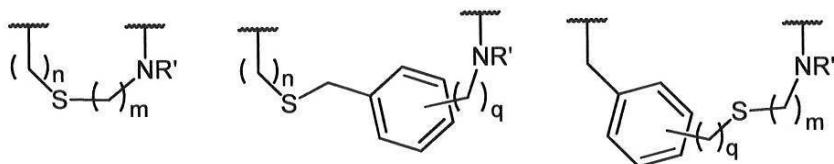
10

## 【化27】

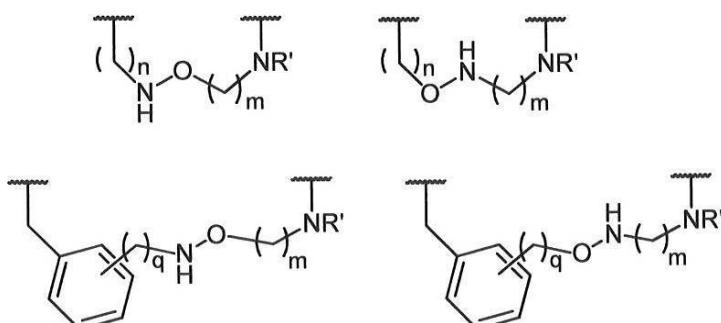


及び

## 【化28】



10

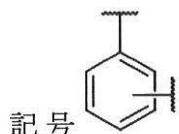


20

を含むが、これらに限定されない：

(式中、

## 【化29】



30

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、「m」及び「n」は、それぞれ独立して、1～10の範囲内の整数であり、

「q」は、0～5の整数であり、

R は、それぞれ独立して、-Hまたは-CH<sub>3</sub>である)。

## 【0127】

いくつかの実施形態では、式(I)の大環状ペプチドミメティック分子は、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む。

40

## 【0128】

別の生体分子（すなわち、タンパク質、DNA、RNA、オリゴ糖、脂質）との相互作用を媒介し、それによりある種の生物学的活性を媒介すると考えられるヘリックスを含む既知の一次アミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドはいずれも、本開示の対象である。例えば、図1に概略的に示すように、標的のヘリックス状モチーフを包含するペプチド配列の分析によって、このようなモチーフを模倣するための適切な大環状ペプチドミメティック分子を、(a)標的のポリペプチド配列内の適切なアミノ酸残基を、側鎖基L<sub>1</sub>を持つアミノ酸類似体で置換し、次に(b)Z-L<sub>2</sub>-Yリンカー部分を介して、ポリペプチド配列のカルボキシ末端に、側鎖基L<sub>1</sub>をテザリングすることにより生成することができる。最も好都合には、L<sub>1</sub>基とZ-L<sub>2</sub>-Yリンカー部分との間の連結は

50

、適切な反応条件下で互いに選択的、かつ効率的に反応する2つの官能基（例えば - Q<sub>1</sub> 及び - Q<sub>2</sub>）によって達成される。最も好都合には、Z - L<sub>2</sub> - Y リンカー部分とポリペプチドのカルボキシ末端との間の連結は、求核基 - YH 及び活性形態のC末端カルボキシ基によって達成される。

#### 【0129】

この方法を使用して、図2に構造を例示したような、種類の異なる側鎖 - C末端の大環状ヘリックスペプチドミメティックを得ることができる。側鎖 - C末端のテザリングに最適な位置は、生物活性に必要とされるヘリックスの分子表面を確認し、それによって、生物活性に必要とされる表面を立体的にブロックすることなく、大環状分子を生成するために、大員環形成リンカーを導入できるそれ以外の表面を確認することにより決定される。図9A～9Bに例示したように、このような決定は、標的となるヘリックス状モチーフまたは独立したヘリックスを含むタンパク質と、天然の結合相手との間の複合体に関して、X線結晶学などの方法を使用して、活性化に関与するヘリックスの残基及び表面を視覚化することにより行うことができる。あるいは、部位特異的突然変異を用いて、生物活性に関連するヘリックス状モチーフの残基を特定することができる。この情報に基づいて、アミノ酸類似体及び大員環形成リンカーによって、標的のヘリックス状モチーフを拘束するための適切な側鎖及びC末端結合部位を選択することができる。例えば、

ヘリックス状二次構造では、生物活性のために、ヘリックスの一表面（例えば、ヘリックス軸に沿って長手方向に伸び、かつヘリックス軸周り45～135°の半径方向に伸びる分子表面）が、別の生体分子とインビオまたはインビトロで接触することが必要となり得る。このような場合、大員環形成リンカーは、活性に直接必要でないその表面の一部のヘリックス表面に沿って長手方向に伸びつつ、ヘリックスの炭素とカルボキシ末端を連結するように設計される。

#### 【0130】

##### 大環状ペプチドミメティックの合成

#### 【0131】

一般に、本明細書で開示する大環状ペプチドミメティック分子の合成は、(a)適切に官能化された側鎖基L<sub>1</sub>及び活性化C末端カルボキシ基を含む前駆体ポリペプチドを合成すること、(b)次に前駆体ポリペプチドを、適切に官能化されたリンカー試薬と接触させ、側鎖基L<sub>1</sub>がポリペプチドのC末端カルボキシ基に共有結合された大環状ペプチドミメティックを生成することを伴う。この一般的な方法により、前駆体ペプチドの側鎖 - C末端の環状化が可能となり、構造安定性、標的に対する親和性、タンパク質分解に対する耐性、及び／または細胞透過性などの生物学的性質の改善を示す新規な化合物を生成する。更に、この一般的な方法により、大環状ペプチドミメティック分子への多種多用なリンカー部分の迅速かつ選択的な導入が可能となり、関連する大員環のライブラリを作製することが可能となる。この一般的な方法はまた、これらの大環状化合物への標識（例えば、放射性同位体標識、化学発光標識または蛍光標識）または治療薬の容易な導入も可能にする。

#### 【0132】

したがって、大環状ペプチドミメティック分子の合成のための方法が提供され、本方法は、式(IV)：

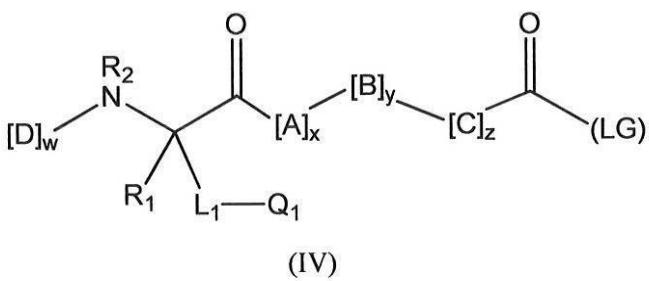
10

20

30

40

## 【化30】



10

の前駆体ペプチドミメティック分子を式(V)：

$Q_2 - L_2 - Y - H$  (V)

の化合物と接触させることを含む：

(式中、

A、B、C、D、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $L_1$ 、 $L_2$ 、Y、x、y、z及びwは全て、式(I)の化合物について上記に定めた通りであり、

$x + y + z$ は、少なくとも3であり、

$Q_1$ 及び $Q_2$ は、式(I)の化合物について上記に定めたようにZ基を形成する、互いに反応し得る2つの反応性官能基であり、

(LG)は、式(V)のリンカー試薬中の求核基-YHによって、末端カルボン酸のカルボニル基を求核置換に対して活性化し、それによって共有結合-C(O)-Y-を形成する基であり、

ここでの接触の結果、リンカー部分-Z-L<sub>2</sub>-Y-を介して、側鎖基L<sub>1</sub>とC末端カルボキシ基との間に共有結合が形成され、式(I)の化合物が得られる)。

20

## 【0133】

いくつかの実施形態では、官能基 $Q_1$ は、スルフヒドリル(-SH)基、アミノ(-NR<sub>5</sub>)基、アルケニル(-C=C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)基、アルキニル(-C=C<sub>2</sub>H)基、アジド(-N<sub>3</sub>)基、ケト(-C(O)R<sub>5</sub>-)基及びカルボキシ(-C(O)OH)基(式中、R<sub>5</sub>は-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基)を含むが、これらに限定されない。

30

## 【0134】

それぞれの事例において、官能基 $Q_2$ は、共有結合を形成する反応が $Q_1$ と $Q_2$ との間に発生し得るように選択される。当業者であれば、特定の $Q_1$ 基の場合に、この目的に好適である $Q_2$ を容易に特定できるだろう。いくつかの実施形態では、官能基 $Q_2$ は、-CH(R<sub>6</sub>)X(式中、Xは、F、Cl、BrまたはI)、アミノ(-NR<sub>6</sub>)基、オキシアミノ(-ONH<sub>2</sub>)基、ヒドラジノ(-NR<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)基、アルケニル(-C=C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)基、アルキニル(-C=C<sub>2</sub>H)基、アジド(-N<sub>3</sub>)基、ケト(-C(O)R<sub>6</sub>-)基またはカルボキシ(-COOH)基(式中、R<sub>6</sub>は-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基)を含むが、これらに限定されない。

40

## 【0135】

求核置換に対するC末端カルボン酸基の活性化は、当該技術分野で周知の方法によって実施できる。例えば、C末端カルボン酸基は、PCl<sub>5</sub>またはSOC<sub>12</sub>を使用したアシルクロリドへの変換によって、保護されたアミノ酸またはペプチドエステルのヒドラジン分解に続く、水性酸中のNaNO<sub>2</sub>での処理によるアシルアジドへの変換によって、ジシクロヘキシリカルボジイミドとの反応によるO-アシルイソ尿素への変換によって、カルボキシレートアニオンとホスホニウムまたはウロニウムカチオン(例えば、BOP、PyBOPまたはHB TU)との反応によるアシルオキシホスホニウムまたはウロニウム種への変換によって、または前述の活性化酸誘導体のいずれかとチオールまたはアルコールそ

50

それぞれとの反応による、チオエステル（例えばフェニルチオエステル）若しくは活性化エステル（例えば、ペンタフルオロフェノールエステル）への変換によって、それぞれに活性化することができる。いくつかの実施形態では、求核置換に対してC末端カルボン酸基を活性化する（L G）基は、酸塩化物、酸無水物、アシルアジド、O - アシルイソ尿素、ホスホニウム化合物、活性エステルまたはチオエステルである。具体的な実施形態では、活性化C末端カルボン酸はチオエステルの形態であり、このとき（L G）基はアリールメルカプタン（例えば、チオフェノール、ベンジルメルカプタンなど）、アルキルメルカプタン（例えば、-メルカブトエタノール、MESNAなど）またはインテインタンパク質である。

## 【0136】

10

前駆体ペプチドミメティック分子及び大環状ペプチドミメティック分子は、液相法または固相法によって合成することができる。更に、前駆体ペプチドミメティック分子及び大環状ペプチドミメティック分子は、天然に存在する、天然に存在しないアミノ酸及び/またはアミノ酸類似体を含み得る。代替的であるが等価の保護基、脱離基または試薬は置き換え可能であり、合成工程によっては、所望の化合物を生成するために代替的なシーケンスまたは順序で実行できる。本明細書に記載された化合物の合成に有用な合成化学変換及び保護基方法論（保護及び脱保護）には、例えば、Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989)、Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2版, John Wiley and Sons (1991)、Fieser and Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994)、ならびにPaquette編, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)及びその続版に記載されたようなものを含む。

## 【0137】

20

大環状ペプチドミメティック分子は、例えば、Fieldsら, Synthetic Peptides: A User's Guide版の第3章. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N. Y., 1992, p. 77に記載の化学法によって作製することができる。したがって、例えば、ペプチドは、側鎖保護されたアミノ酸を用いるtBocまたはFmoc化学合成法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装置（例えば、Applied Biosystems (Foster City, Calif.)、Model 430A, 431または433）上で、メリフィールド自動固相合成技術を使用して合成される。

## 【0138】

30

本明細書に記載された前駆体ペプチド及びペプチドミメティックを生成する1つの様式は、固相ペプチド合成（SPPS）を使用する。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される。この樹脂は合成に用いる溶媒に不溶性であるため、比較的簡単かつ迅速に過剰剤及び副生成物を洗い流せる。N末端は、酸中では安定だが塩基によって除去可能なFmoc基で保護される。側鎖官能基は、必要に応じて塩基安定な酸不安定基で保護する。長い前駆体ペプチドは、例えば、ネイティブな化学ライゲーションを用いて個々の合成ペプチドを結合することによって生成される。

40

## 【0139】

前駆体ペプチド及びペプチドミメティックは、例えば、ハイスループットコンビナトリアル形式で、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、AAPTEC, Inc., Louisville, KY製のModel Apex 396多チャンネルペプチド合成装置）を使用して作製される。

## 【0140】

以下のセクションは、本明細書で開示する化合物の調製に使用される、利用可能な種々

50

の方法を例示するために示される。しかしながら、本開示は、本明細書で開示する化合物の調製に有用な反応または反応シーケンスの範囲を限定することを意図しない。

#### 【0141】

図3及び4の合成スキームは、一部の実施形態を例示するために提供され、本明細書で開示する化合物及び方法の範囲を限定することを意図しない。簡潔には、図示したスキームにおいて、(a)アミノ酸パラ-アセチル-フェニルアラニン(pAcF)は、官能化された側鎖基-L<sub>1</sub>-Q<sub>1</sub>を持つアミノ酸類似体の例として記述され、この場合のリンカー基L<sub>1</sub>は-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-であり、反応性官能基Q<sub>1</sub>は-C(O)-CH<sub>3</sub>であり；また(b)化合物3-アミノ-N-(3-(アミノオキシ)プロピル)-4-(メルカプトメチル)ベンズアミド)(SP8)は一般式(V)Q<sub>2</sub>-Z-L<sub>2</sub>-YHの官能化されたリンカー試薬の例として記述され、この場合のQ<sub>2</sub>基は-ONH<sub>2</sub>であり、-YH基は-NH<sub>2</sub>であり、L<sub>2</sub>基は-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCO-(4-(CH<sub>2</sub>SH))C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-である。記号「[-NHCH(R)CO]<sub>n</sub>」は、一連のアミド結合で連結された部分、例えば天然または非天然のアミノ酸からなるポリペプチド配列を表す。前述したように、「[-NHCH(R)CO-]<sub>n</sub>」のような式は、例えば、同一でないアミノ酸の配列ならびに同一のアミノ酸の配列を包含する。

#### 【0142】

図3で例示された第1の一般的な方法では、前駆体ペプチドミメティック分子は、市販のN--Fmocアミノ酸及び安全キャッチリンカー樹脂を使用して、固相ペプチド合成(SPPS)(“Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins”, Oxford University Press, New York: 1998)により合成される。この例では、大環化を媒介するための適切に官能化された側鎖基-L<sub>1</sub>-Q<sub>1</sub>を持つアミノ酸類似体(例えばpAcF)は、パラ-アセチル-フェニルアラニン(pAcF)である。図5A～5Dに示したように、既知の方法(Frost, Vitaliら 2013)を使用したラセミ体の形成、続いて酵素分解及び適切に保護されたN--Fmoc-pAcFへの変換により、pAcFを合成することができる。SPPSによって非環式の前駆体ペプチドミメティック分子をアセンブリした後、ヨードアセトニトリルを有するスルホンアミドアンカー基のアルキル化により、側鎖保護された前駆体ペプチドミメティック分子を樹脂から切り出し、続いてチオールにより処理する。この工程により、前駆体ペプチドミメティック分子のC末端カルボキシ基も活性化され、チオエステル形態となる。次に、前駆体ペプチドミメティック分子を粗製混合物として、または精製後に、適切な大員環形成リンカー試薬(すなわち、この例のオキシアミノ/アミノチオール試薬SP8)と反応させ、部分的にまたは完全に保護された形態の大環状ペプチドミメティック分子を得る(溶液中環化、図3)。次に、この生成物を標準条件(例えば、95%のTFAなどの強酸)によって脱保護し、所望の大環状ペプチドミメティック分子を得る。いくつかの実施形態では、環化反応は、pH8の水溶液中で実施される。他の実施形態では、アルキル化反応に使用する溶媒は、DMFまたはメタノールである。他の実施形態では、ヨードアセトニトリルにてスルホンアミドのアンカー基がアルキル化された後、樹脂と結合した前駆体ペプチドミメティック分子は、大員環形成リンカー試薬と直に反応を起こし、それにより部分的にまたは完全に保護された形態の大環状生成物が形成され、それに伴って樹脂から切り出される(樹脂上環化、図3)。次に、切り出した生成物の脱保護により、所望の最終的な大環状生成物を得る。

#### 【0143】

他の実施形態では、最初に非環式の前駆体ペプチドミメティックをSPPSによりアセンブリし、次に遊離C末端カルボキシ基(-COOH)を有する側鎖保護された形態で樹脂から切り出した後、C末端チオエステルへ(例えば、C末端カルボキシ基の活性化、続いてチオールとの反応により)変換する。次に、C末端チオエステル前駆体ペプチドミメティックを、適切な大員環形成リンカー試薬によって環化する。

#### 【0144】

図4で例示された第2の一般的な方法では、前駆体ポリペプチドを生細胞の組換え発現

10

20

30

40

50

によって、または既知のインビトロ無細胞発現方法によって生成する。この場合、大環化を媒介するための適切に官能化された側鎖基 - L<sub>1</sub> - Q<sub>1</sub> を持つアミノ酸類似体（例えば p A c F）を、当該技術分野で既知の方法、例えば、所望の非天然アミノ酸のリボソームを取り込むための操作されたアミノアシル - t R N A シンテターゼ / t R N A の存在下でのアンバー終止コドンの抑制（Frost, Vitalic 2013）などによって組換えポリペプチドに導入する。更に、組換えポリペプチドをインティンタンパク質に遺伝子的に融合することで、ペプチドの C 末端に反応性チオエステル基を生成でき、それによりポリペプチドの C 末端と大員環形成リンカーとのライゲーションが可能になる。次に、大環状ペプチドミメティックを、組換え生成されたインティン融合前駆体ポリペプチドと、大員環形成リンカー試薬（例えば、この例では S P 8）水溶液との反応により生成する。いくつかの実施形態では、チオール触媒（例えば、チオフェノールまたは M E S N A）の添加によって大環化反応を促進する。  
10

## 【0145】

アミノ酸類似体

## 【0146】

本開示は、上記の大環状ペプチドミメティック分子の合成における天然に存在する及び天然に存在しないアミノ酸の両方ならびにアミノ酸類似体の使用を企図する。安定な側鎖 - C 末端架橋された大環状ペプチド及びペプチドミメティック分子の合成に用いられる合成方法に従った任意のアミノ酸またはアミノ酸類似体を使用することができる。使用時に特に有用なアミノ酸は、反応性側鎖官能基、例えば、スルフヒドリル (- S H) 基、アミノ (- N H<sub>2</sub>) 基、アルケニル (- C = C H<sub>2</sub>) 基、アルキニル (- C C H) 基、アジド (- N<sub>3</sub>) 基、ケト (- C (O) - ) 基またはカルボキシ (- C O O H) 基を含むアミノ酸であり、それにより側鎖とポリペプチドまたはペプチドミメティックの C 末端との間の共有結合を、好適な反応条件下で適切なリンカー試薬との反応によって形成することができる。例えば、スルフヒドリル基を含むアミノ酸、例えば、システィン、ホモシスティン、o - 、m - 及び p - メルカブト - フェニルアラニン、o - 、m - 及び p - メルカブトメチル - フェニルアラニンは、本開示の有用なアミノ酸であると考えられる。同様に、アミノ基を含むアミノ酸、例えば、2 , 3 - ジアミノプロパン酸、2 , 4 - ジアミノブタン酸、オルニチン、リシン、o - 、m - 及び p - アミノ - フェニルアラニン、o - 、m - 及び p - アミノメチル - フェニルアラニン；ケト基を含むアミノ酸、例えば、o - 、m - 及び p - アセチル - フェニルアラニン、2 - アミノ - 5 - オキソヘキサン酸、2 - アミノ - 6 - オキソヘプタン酸、2 - アミノ - 7 - オキソオクタン酸、2 - アミノ - 2 - オキソブロパン酸、2 - アミノ - 8 - オキソノナン酸；アルケニル基を含むアミノ酸、例えば、2 - (2 - プロペニル) グリシン、2 - (3 - ブテニル) グリシン、2 - (4 - ペンテニル) グリシン、2 - (5 - ヘキセニル) グリシン、2 - (6 - ヘプテニル) グリシン、2 - (7 - オクテニル) グリシン；アジド基を含むアミノ酸、例えば、o - 、m - 及び p - アジド - フェニルアラニン、2 - アミノ - 3 - アジドプロパン酸、2 - アミノ - 4 - アジドブタン酸、2 - アミノ - 5 - アジドペンタン酸、2 - アミノ - 6 - アジドヘキサン酸ならびにアルキニル基を含むアミノ酸、例えば、2 - アミノペント - 4 - イン酸、2 - アミノヘキス - 5 - イン酸、2 - アミノヘプト - 6 - イン酸、2 - アミノオクト - 7 - イン酸、2 - アミノノン - 8 - イン酸、o - 、m - 及び p - プロパルギル - フェニルアラニン、o - 、m - 及び p - エチニル - フェニルアラニンは、本開示に有用なアミノ酸であると考えられる。  
30  
40

## 【0147】

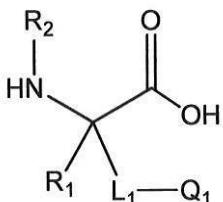
いくつかの実施形態では、アミノ酸及びアミノ酸類似体のアルファ炭素の構成単位は S である。他の実施態様では、アミノ酸及びアミノ酸類似体のアルファ炭素の構成単位は R である。いくつかの実施形態では、ペプチドミメティックに含まれるアミノ酸及びアミノ酸類似体は、S 構成単位にアルファ炭素原子を有するものもあれば、アミノ酸及びアミノ酸類似体によっては、R 構成単位にアルファ炭素原子を有するものもある。いくつかの実施形態では、アミノ酸類似体は、二基置換、例えば - メチル - (S) - システィン  
50

及び - メチル - ( R ) - システインである。いくつかの実施形態では、アミノ酸類似体は N アルキル化された、例えば、N - メチル - ( S ) - システイン及び N - メチル - ( R ) - システインである。

【 0 1 4 8 】

本明細書で開示する大環状ペプチドミメティック分子の形成に有用な他のアミノ酸類似体は、式 ( V I ) の化合物である：

【 化 3 1 】



(VI)

10

(式中、

L<sub>1</sub> は、それぞれが非置換であるか、または R<sub>7</sub> で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基、アルコキシ基及びアリールオキシル基を含むが、これらに限定されないリンカー基であり、

R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は、独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

R<sub>7</sub> は、それぞれ独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基及び置換アリール基であり、

Q<sub>1</sub> は、スルフヒドリル (- SH) 基、アミノ (- NH R<sub>5</sub>) 基、アルケニル (- C = C H<sub>2</sub>) 基、アルキニル (- C C H) 基、アジド (- N<sub>3</sub>) 基、ケト (- C (O) R<sub>5</sub> - ) 基及びカルボキシ (- COOH) 基(式中、R<sub>5</sub> は - H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基)を含むが、これらに限定されない反応性官能基である)。

【 0 1 4 9 】

いくつかの実施形態では、式 ( V I ) のアミノ酸類似体の L<sub>1</sub> は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>2~4</sub> アルキル基、C<sub>1</sub> ~ C<sub>2~4</sub> 置換アルキル基、C<sub>1</sub> ~ C<sub>2~4</sub> 置換ヘテロ原子を含むアルキル基、C<sub>1</sub> ~ C<sub>2~4</sub> 置換ヘテロ原子を含むアルキル基、C<sub>2</sub> ~ C<sub>2~4</sub> アルケニル基、C<sub>2</sub> ~ C<sub>2~4</sub> 置換アルケニル基、C<sub>2</sub> ~ C<sub>2~4</sub> 置換ヘテロ原子を含むアルケニル基、C<sub>5</sub> ~ C<sub>2~4</sub> アリール基、C<sub>5</sub> ~ C<sub>2~4</sub> 置換アルキル基、C<sub>5</sub> ~ C<sub>2~4</sub> 置換ヘテロ原子を含むアリール基、C<sub>1</sub> ~ C<sub>2~4</sub> アルコキシ基及び C<sub>5</sub> ~ C<sub>2~4</sub> アリールオキシ基を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態では、式 ( V I ) のアミノ酸類似体は、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む。

【 0 1 5 1 】

大員環形成リンカー試薬

【 0 1 5 2 】

前駆体ペプチドミメティック分子の側鎖と C 末端とを連結して、本明細書で開示する大環状ペプチドミメティック分子を形成するために使用する大員環形成リンカー試薬を提供する。上記のように、大員環形成リンカーは、配座剛性、代謝安定性の増加及び / または

20

30

40

50

細胞浸透性の増加をもたらす。更に、いくつかの実施形態では、大員環を形成する連結は、大環状ペプチドミメティック分子のヘリックス状二次構造を安定化させる。

#### 【0153】

いくつかの実施形態では、大員環形成リンカー試薬は、式(V)の化合物である：



(式中、

Yは、-NH-、-N(R<sub>4</sub>)-、-NHN(R<sub>4</sub>)-、-NH-O-、-O-または-S-（式中、R<sub>4</sub>は-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基）であり、

L<sub>2</sub>は、それが非置換であるか、またはR<sub>7</sub>（R<sub>7</sub>は、独立して、-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基、置換アリール基）で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

Q<sub>2</sub>は、-CH(R<sub>6</sub>)X（式中、Xは、F、Cl、BrまたはI）、アミノ(-NHR<sub>6</sub>)基、オキシアミノ(-ONH<sub>2</sub>)基、ヒドラジノ(-NR<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)基、アルケニル(-C=CH<sub>2</sub>)基、アルキニル(-C≡CH)基、アジド(-N<sub>3</sub>)基、ケト(-C(O)R<sub>6</sub>-)基及びカルボキシ(-COOH)基（式中、R<sub>6</sub>は-H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基）を含むが、これらに限定されない）。

#### 【0154】

いくつかの実施形態では、L<sub>2</sub>は、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む。

#### 【0155】

上記のように、大員環形成リンカー試薬のQ<sub>2</sub>の選択は、前駆体ペプチドミメティック分子に存在するQ<sub>1</sub>基の選択に依存し、その選択によって当該技術分野で周知の手順に従った好適な反応条件下にて、これら2つの官能基間に結合を形成する反応が起こり得る。例えば、Q<sub>1</sub>がアルキニル基(-C≡CH)である場合、Q<sub>2</sub>はアジド基(-N<sub>3</sub>)であり得、これら基間の結合を形成する反応は、触媒であるCu(I)の存在下でアジド-アルキンの1,3-双極子付加環化を経て、L<sub>1</sub>とL<sub>2</sub>との側鎖結合をトリアゾール基(Z=トリアゾール)の形態で得ることで実施できる。別の例として、Q<sub>1</sub>がアルケニル基(-C=CH<sub>2</sub>)である場合、Q<sub>2</sub>はアルケニル基(-C=CH<sub>2</sub>)であり得、これら基間の結合を形成する反応は、Ru触媒（例えば、Grubbs触媒）の存在下でオレフィンメタセシス反応を経て、L<sub>1</sub>とL<sub>2</sub>との側鎖結合をオレフィン基(Z=-CH=CH-)の形態で得ることで実施できる。別の例として、Q<sub>1</sub>がケトン(-C(O)CH<sub>3</sub>)である場合、Q<sub>2</sub>はオキシアミノ基(-ONH<sub>2</sub>)であり得、酸性条件（例えばpH 5.0の水性溶媒中）でオキシムライゲーションを経て、L<sub>1</sub>とL<sub>2</sub>との側鎖結合をオキシム基(Z=-C(CH<sub>3</sub>)=N-O-)の形態で得ることで実施できる。別の例として、Q<sub>1</sub>がスルフヒドリル基(-SH)である場合、Q<sub>2</sub>はアルキル臭化物(-CH<sub>2</sub>Br)であり得、これらの基間の結合を形成する反応は、アルカリ条件（例えばpH 8.0の水性溶媒中）下で求核置換を経て、L<sub>1</sub>とL<sub>2</sub>との側鎖結合をチオエーテル基(Z=-CH<sub>2</sub>S)の形態で形成することで実施できる。別の例として、Q<sub>1</sub>がカルボキシ基(-COOH)である場合、Q<sub>2</sub>はアミノ基(-NH<sub>2</sub>)であり得、これら基間の結合を形成する反応は、標準的なアミドカップリング条件下で（例えば、DMF中のカルボジイミドカップリング試薬を用いて）、L<sub>1</sub>とL<sub>2</sub>との側鎖結合をアミド基(Z=-C(O)NH-)の形態で形成することで実施できる。当業者は、Q<sub>1</sub>及びQ<sub>2</sub>の好適な組み合わせ、ならびにQ<sub>1</sub>及びQ<sub>2</sub>を共に反応させて側鎖共有結合を形成し、大環状ペプチドミメティックを形成するための好適な反応条件を容易に特定できるであろう。

#### 【0156】

-YHは、前駆体ペプチドミメティック分子の活性化C末端カルボキシ基と反応し得る求核基であり、それによってY基とこのようなC末端カルボキシ基との間に共有結合が形成される。-YH基の性質に応じて、ペプチドミメティック分子のC末端と大員環形成リ

10

20

30

40

50

ンカ-との間の共有結合は、一級アミド(-C(=O)NH-)基、二級アミド(-C(=O)N(R)-)基、ヒドラジド(-C(=O)NHN(R)-)基、オキシアミド(-C(=O)NH-O-)基、エステル(-C(=O)O-)基またはチオエステル(-C(=O)S)基を含む。

#### 【0157】

上記のように、活性化C末端カルボン酸基は、酸塩化物、酸無水物、アシリアルジド、O-アシリルイソ尿素、ホスホニウム化合物、活性エステルまたはチオエステルの形態であり得る。

#### 【0158】

いくつかの実施形態では、「C末端カップリング反応」、すなわち前駆体ポリペプチドまたはペプチドミメティック分子での-YH基と活性化C末端カルボキシ基との結合を形成する反応は、「側鎖カップリング反応」、すなわち前駆体分子のQ<sub>1</sub>と大員環形成リンカー試薬のQ<sub>2</sub>基との結合を形成する反応の前に実施される。他の実施形態では、側鎖カップリング反応は、C末端カップリング反応の前に実施される。他の実施形態では、側鎖カップリング反応及びC末端カップリング反応は同時に、すなわち単独の反応で実施される。活性化C末端カルボキシ基、-YH基、Q<sub>1</sub>基及びQ<sub>2</sub>基の性質に応じて、当業者は、本明細書で開示する大環状分子の生成に最適な反応シーケンスを特定できるであろう。10

#### 【0159】

いくつかの実施形態では、大員環形成リンカー試薬の-YH基は、一級または二級アミノ基(-NH<sub>2</sub>または-NHR)であり、L<sub>2</sub>成分は、3個または4個の結合によって-YH基から切り離されるスルフヒドリル基(-SH)を含む。1,2-または1,3-アミノチオール部分は、活性化C末端カルボキシ基が、アルキル-、アリール-、またはインテイン-チオエステル形態である、C末端カップリング反応に特に有用である。特に、大員環形成リンカー試薬のチオール基は、ネイティブの化学ライゲーション様のチオエ斯特交換反応での、C末端アルキル-、アリール-、またはインテイン-チオエ斯特との反応、それに続くS-Nアシリル転位により、ペプチドミメティック分子のC末端と大員環形成リンカー試薬から誘導される部分との間で安定なアミド結合を得ることにより、C末端カップリング反応を促進することができる。20

#### 【0160】

いくつかの実施形態では、式(V)の大員環形成リンカーのL<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>~C<sub>2~4</sub>アルキル基、C<sub>1</sub>~C<sub>2~4</sub>置換アルキル基、C<sub>1</sub>~C<sub>2~4</sub>置換ヘテロ原子を含むアルキル基、C<sub>1</sub>~C<sub>2~4</sub>置換ヘテロ原子を含むアルキル基、C<sub>2</sub>~C<sub>2~4</sub>アルケニル基、C<sub>2</sub>~C<sub>2~4</sub>置換アルケニル基、C<sub>2</sub>~C<sub>2~4</sub>置換ヘテロ原子を含むアルケニル基、C<sub>5</sub>~C<sub>2~4</sub>アリール基、C<sub>5</sub>~C<sub>2~4</sub>置換アリール基、C<sub>5</sub>~C<sub>2~4</sub>置換ヘテロ原子を含むアリール基、C<sub>5</sub>~C<sub>2~4</sub>置換ヘテロ原子を含むアリール基、C<sub>1</sub>~C<sub>2~4</sub>アルコキシ基及びC<sub>5</sub>~C<sub>2~4</sub>アリールオキシ基を含むが、これらに限定されない。30

#### 【0161】

大員環形成リンカー試薬、Q<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-YHのL<sub>2</sub>成分は、特に、側鎖結合に使用されるアミノ酸類似体のアルファ炭素と、所望の大環状ペプチドミメティック分子に連結されるべきC末端カルボキシ基との間の距離に応じて、長さが変化し得る。更に、大員環形成リンカー試薬のL<sub>2</sub>成分の長さの変化に応じて、L<sub>1</sub>の長さも変化することにより、上記のような適切な全長のリンカーを作成することができる。例えば、追加のメチレン単位をL<sub>1</sub>成分に付加することにより、使用するアミノ酸類似体が変化した場合、L<sub>2</sub>の長さは、L<sub>1</sub>の増加した長さを相殺するために、1つのメチレン単位分の長さが減少する。40

#### 【0162】

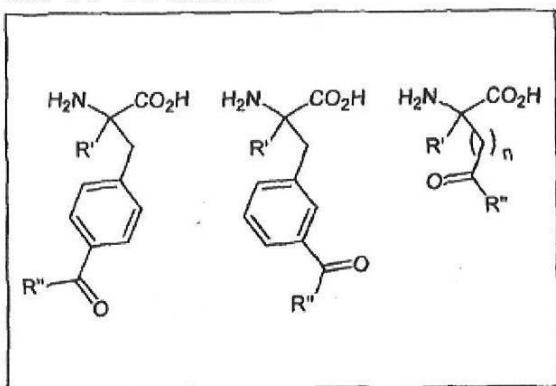
いくつかの実施形態では、大員環形成リンカー試薬のL<sub>2</sub>は、式(C<sub>n</sub>H<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-のアルキル基であり、この場合のnは1~20の整数である。例えば、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15または20である。他の実施形態では、L<sub>2</sub>は、アルケニル基、アリール基または1,2,3-トリアゾリル基である。50

## 【0163】

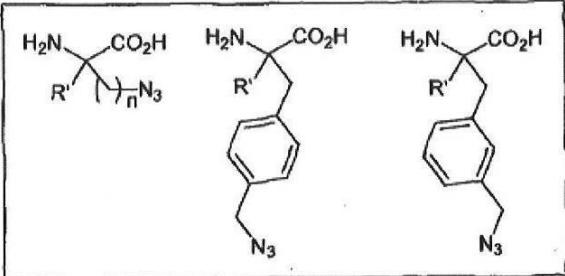
いくつかの実施形態では、式(VI)のアミノ酸類似体は、以下を含むが、これらに限定されないアミノ酸類似体からなる群から選択される化合物である：

## 【化32】

A群のアミノ酸類似体：

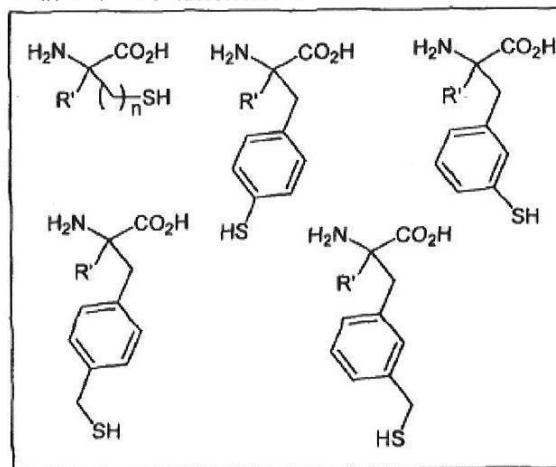


C群のアミノ酸類似体：

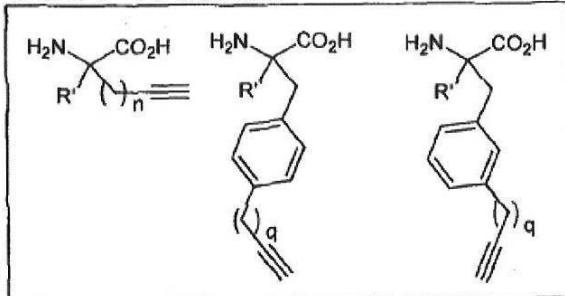


10

B群のアミノ酸類似体：

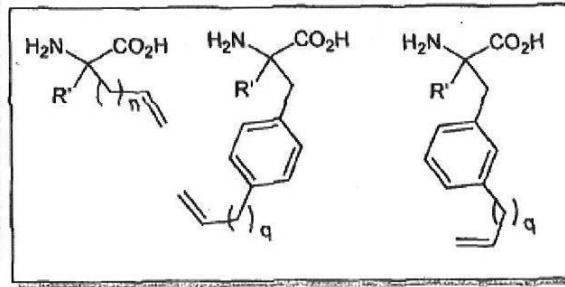


D群のアミノ酸類似体：



20

E群のアミノ酸類似体：

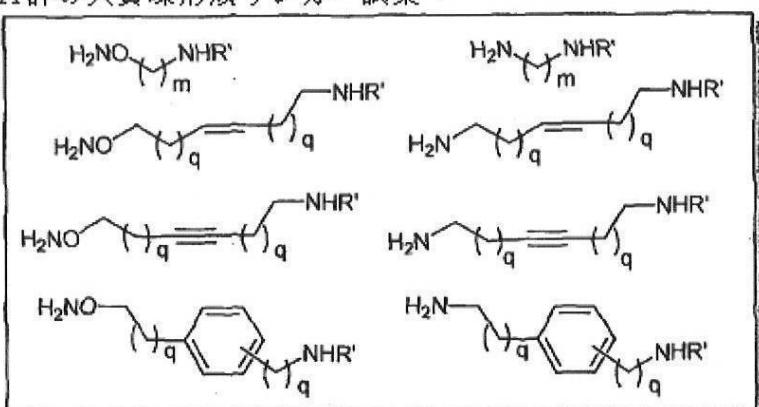


30

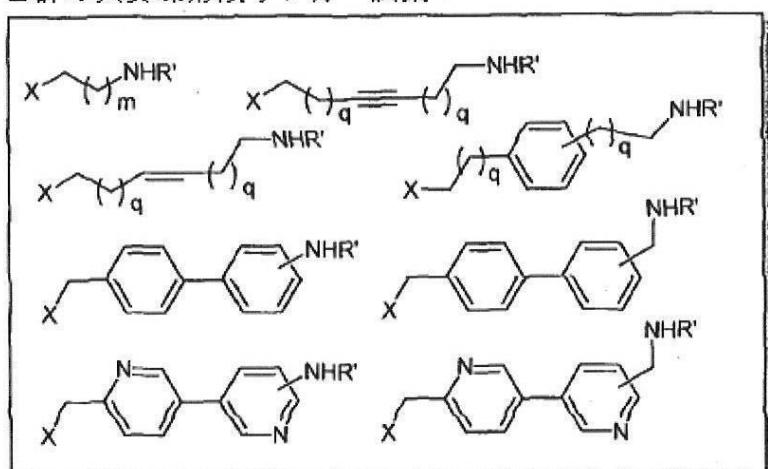
(式中、「 $n$ 」は1～10の範囲の整数であり、「 $q$ 」は0～5の整数であり、「 $R'$ 」は- $\text{H}$ または- $\text{CH}_3$ であり、「 $R''$ 」は- $\text{H}$ 、- $\text{CH}_3$ または- $\text{OH}$ である)。また、式(V)の大員環形成リンカー試薬は、以下を含むが、これらに限定されない適合性のある大員環形成リンカー試薬の群である：

【化 3 3】

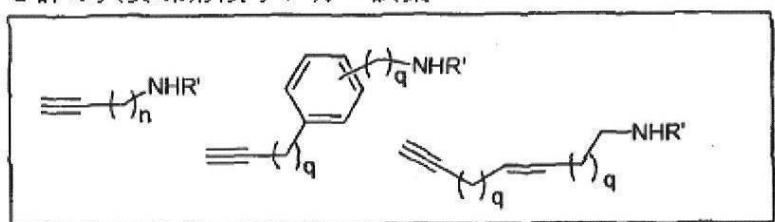
A群の大員環形成リンカー試薬：



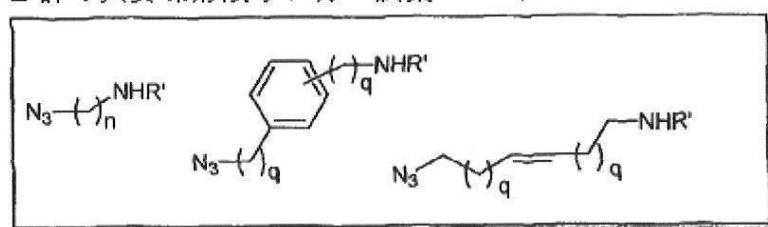
B群の大員環形成リンカー試薬：



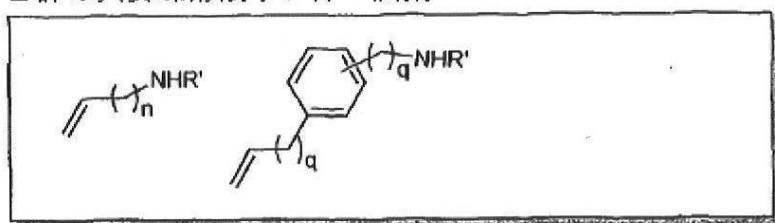
C群の大員環形成リンカー試薬：



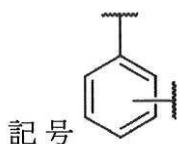
D群の大員環形成リンカー試薬：



E群の大員環形成リンカー試薬：



(式中、  
【化34】)



は、オルト、メタ、またはパラニ置換フェニル環を示し、  
「m」及び「n」は、それぞれ独立して、1～10の範囲内の整数であり、  
「q」は、0～5の整数であり、  
R は、-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、  
R は、-H、-CH<sub>3</sub>または-OHであり、  
Xは、-Cl、-Br、-I、-OTS、-OMsまたは-OTfである)。

【0164】

図16は、本明細書で記載する方法に使用できる、式[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]の大員環形成リンカーの構造を示す。

【化35】

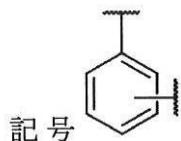
記号「C—N」

10

20

は、単結合または二重結合を示す。

【化36】



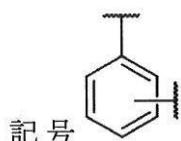
30

は、オルト、メタ、またはパラニ置換フェニル環を示す。R は、-Hまたは-CH<sub>3</sub>である。記号「m」及び「n」は1～10の整数であり、「q」は0～5の整数である。

【0165】

図17は、本明細書で記載する方法に使用できる、式[-L<sub>1</sub>-Z-L<sub>2</sub>-Y-]の追加の大員環形成リンカーの構造を示す。

【化37】



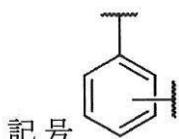
40

は、オルト、メタ、またはパラニ置換フェニル環を示す。記号「m」及び「n」は1～10の整数であり、「q」は0～5の整数である。

【0166】

図18は、本明細書で記載する方法に使用できる、アミノ酸類似体(左パネル)の構造及び適合性のある大員環形成リンカー試薬の構造(矢でつながれた右パネル)を示す。

## 【化38】

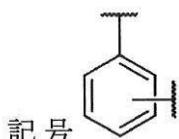


は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示す。記号「m」及び「n」は1～10の整数であり、「q」は0～5の整数である。R<sub>1</sub>は-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、R<sub>2</sub>は、-H、-CH<sub>3</sub>または-OHであり、Xは、-Cl、-Br、-I、-OTS、-OMsまたは-OTfである。

## 【0167】

図19は、本明細書で記載する方法に使用できる、追加のアミノ酸類似体（左パネル）の構造及び適合性のある大員環形成リンカー試薬の構造（矢でつながれた右パネル）を示す。

## 【化39】



は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示す。記号「m」及び「n」は1～10の整数であり、「q」は0～5の整数である。R<sub>1</sub>は-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、Xは、-Cl、-Br、-I、-OTS、-OMsまたは-OTfである。

## 【0168】

アッセイ

## 【0169】

本明細書で開示する大環状ペプチドミメティックの特性は、例えば、以下に記載する方法を用いることによって分析される。いくつかの実施形態では、大員環は、対応する非大環状ポリペプチドと比較して特性が増強されている。対応する非大環状ポリペプチドは、例えば、大環状ペプチドミメティック分子の非環式の前駆体であり、式(I I)または(I I I)の化合物などである。あるいは、対応する非大環状ポリペプチドは、大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列と実質的に配列が重複する天然ポリペプチド配列などのポリペプチド配列である。本明細書で開示する大環状ペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列と実質的に重複する非大環状ポリペプチドの例は、図10のP1、P2、及びP10である。

## 【0170】

一般に、対応する非大環状ポリペプチドは、標識した天然ポリペプチドまたはペプチドミメティック前駆体であっても良い。例えば蛍光標識または放射性標識によるこのような標識化は、必要に応じて以下に記載するアッセイのいくつかにおいて使用される。このようなアッセイでは、大員環及び対応する非大環状ポリペプチドはいずれも、通常は、類似したまたは機能的に等価な方法によって標識される。

## 【0171】

ヘリックス性のアッセイ。本明細書で開示する大環状ペプチドミメティック分子及び基準となる非大環状化合物のアルファヘリックス含有量を円二色性(CD)分光法により測定することができる。CDスペクトルは、分光偏光計(例えば、JASCO J-710)上で、以下の標準的な測定パラメータを用いて20℃で記録される：波長195～200nm

10

20

30

40

50

50 nm ; 工程分解能 0.5 nm ; 速度 10 nm / 秒 ; 積算回数 3 ; 反応 1 秒 ; バンド幅 2 nm ; 経路長 0.1 cm。これらの分析では、大環状分子及び基準となる非大環状化合物は通常、5 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解させ、20 ~ 50 μM の最終濃度を得る。平均残基構円率は波長に対してプロットでき、各ペプチドのヘリックス含有量は以下の式に基づいて導出できる：n をペプチド結合数とした場合、 $[ ]_{222} / [40000 \times (n - 4) / n]$  (Johnson, W. C. 及び Tinoco, I. J. Am Chem Soc, 1972, 94, 4389)。

#### 【0172】

タンパク分解安定性の分析。直鎖ペプチドはプロテアーゼによる加水分解に対して感受性があり、その結果、インビオで急速な分解を受けやすくなる。本明細書で開示される方法によるペプチド系分子の大環状化により、タンパク質分解性に対する耐性強化などの改善された特性の付与が期待される。この特性は、精製されたプロテアーゼ、または代わりにヒト血清の存在下で、大環状ペプチドミメティック分子及び対応する基準となる非大環状ポリペプチドを培養することによって評価することができる。次に、化合物のインビトロタンパク質分解性は、紫外線検出器を備える HPLC によって経時的にモニターすることができる。結果として生じる時間依存的曲線から、化合物の半減期を測定できる。一例として、50 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 中の化合物 (10 μM) を室温にてキモトリプシン (1.0 μg/mL) の存在下で培養することにより、大員環のインビトロタンパク分解安定性を測定した。種々の時点 (例えば、0、30、60、120、180、240 分) で、反応混合物のアリコート (50 μL) を除去し、TFA (5 μL) を添加してクエンチした後、HPLC 分析を行った。完全体のペプチドと比較したピーク面積の減少に基づいて、ペプチドの切断をモニターした。

#### 【0173】

インビトロタンパク質結合アッセイ。本明細書で開示される大環状ペプチドミメティック分子の、目的タンパク質への結合能は、例えば、インビトロ蛍光偏光 (FP) アッセイによって評価することができる。例えば、これらの化合物と、腫瘍性タンパク質 HD M 2 及び / または HD M X との結合能は、大環状ペプチドミメティック分子の蛍光標識された (例えば、フルオレセインをコンジュゲートした) 誘導体をタンパク質を増量しながら培養し、更に増加したタンパク質濃度での蛍光偏光の増加を測定することにより確定することができる。蛍光偏光法の原理は確立されており、このアッセイは蛍光標識したペプチドとタンパク質との間の複合体形成の結果として生じる蛍光偏光の増強を利用している。更に、タンパク質濃度に応じた分子の FP 变化を分析して、平衡解離定数 ( $K_D$ ) を基準にして、タンパク質に対する化合物の結合親和性を測定することができる。

#### 【0174】

インビトロ阻害アッセイ。大環状ペプチドミメティック分子の、目的タンパク質への結合能、及び標的タンパク質 - タンパク質の相互作用の阻害能は、例えば、インビトロで表面プラズモン共鳴 (SPR) による阻害アッセイによって評価することができる。例えば、p53 と腫瘍性タンパク質 HD M 2 及び HD M X との相互作用に対する、これらの化合物の阻害能は、溶液中での阻害アッセイにより測定できる。このアッセイでは、ビオチン化 p53 から誘導したペプチド (例えば、ビオチン - SGSG - p53<sub>15-29</sub>) が、ストレプトアビジンをコーティングしたバイオセンサーに最初に固定される。次に、可溶性 HD M 2 (または HD M X) を種々の濃度の大員環と共に培養し、次いでその混合物を官能化された表面に注入する。阻害剤の濃度の增加に応じて、HD M 2 (または HD M X) と表面との結合が阻害され、それに伴いバイオセンサーでの反応は減少する。更に、濃度反応曲線を分析して、最大半数阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を基準にして、化合物の阻害能を測定することができる。

#### 【0175】

細胞透過性の分析。いくつかの実施形態では、本明細書で記載する大環状ペプチドミメティックは、対応する非大環状相対物よりも細胞透過性が高い。最適化された側鎖 - C 末端テザーを有する大環状ペプチドミメティック分子は、対応する非大環状相対物よりも、

10

20

30

40

50

例えば、少なくとも 1 . 1 倍、 1 . 5 倍、 2 倍または 3 倍大きいまたはそれ以上の細胞透過性を有する。これらの化合物の細胞透過性を測定するためには、無傷の細胞を、蛍光標識した（例えばフルオレセインをコンジュゲートした）大環状ペプチドミメティック分子または対応する非大環状相対物（ $10 \mu M$ ）と共に、血清を含まない培地中で 37 にて 4 時間培養する。次に、細胞を培地で 2 回洗浄し、トリプシンで培養した後（例えば 0 . 25 % トリプシン、 10 分、 37 ）、再度洗浄し、 PBS 中で再懸濁する。細胞蛍光は、例えば、 F A C S C a l i b u r フローサイトメーターを使用することにより分析する。あるいは、蛍光標識した化合物の細胞透過能を、共焦点蛍光顕微鏡によって評価することができる。

## 【 0176 】

10

細胞有効性の分析。大環状ペプチドミメティック分子の細胞毒性活性は、例えば、腫瘍形成性及び非腫瘍形成性細胞株、ならびにヒトまたはマウスの細胞集団に由来する一次細胞を使用して、細胞ベースのアッセイにて測定する。細胞生存性は、例えば、大環状ペプチドミメティック分子（例えば  $0 . 1 \sim 100 \mu M$  ）と共に培養する 24 ~ 96 時間にわたってモニターし、  $100 \mu M$  未満の EC<sub>50</sub> で細胞生存性が減少するものを特定する。細胞生存性を測定するいくつかの標準的なアッセイ、例えば、 MTT ( 3 - ( 4 , 5 -ジメチルチアゾール - 2 - イル ) - 2 , 5 - デフェニルテトラゾリウムプロミド ) アッセイなどが市販されている。このようなアッセイを使用して、腫瘍形成性及び非腫瘍形成性の細胞の生存性を低減させる大環状ペプチドミメティック分子の有効性を評価することができる。加えて、場合により、アネシン V 及びカスパーゼ活性化を測定するアッセイを使用して、大環状ペプチドミメティック分子の細胞毒性が、 p53 活性の再活性化に起因すると予測される、アポトーシス機構の活性化に依存するかどうかを評価することができる。

## 【 0177 】

20

使用方法

## 【 0178 】

30

いくつかの実施形態では、式（ I ）の大環状ペプチドミメティック分子に含まれるペプチド配列は、腫瘍抑制因子 p53 タンパク質の HDM2 結合ドメインから誘導される。ヒト転写因子 p53 は、 DNA 損傷及び細胞ストレスに応答して細胞周期停止及びアポトーシスを誘発し、それにより細胞を悪性形質転換から保護する役割を果たす。 E3 ユビキチンリガーゼ HDM2 は、直接的な結合相互作用によって、 p53 依存的なトランス活性化活性の中和、核からの p53 輸送の媒介、及びユビキチン - プロテアソーム経路による分解対象となる p53 の標的化を行い、 p53 の機能を負に調節する。 HDMX ( HDM4 とも称する ) は、 HMD2 の構造同族体であり、これは主に p53 トランス活性化因子ドメインとの結合によって、 p53 の負の調節因子としても作用する。 HMD2 または HMDX いずれかの過剰発現は、いくつかの悪性腫瘍と関連付けられてきた（ Marine , Dyer ら . 2007 、 Wahl 及び Wade 2009 ）。

## 【 0179 】

HDM2 及び HDMX との結合を担う p53 の領域は、ヒト p53 タンパク質（ p53<sub>15 - 29</sub> ）の N 末端トランス活性化ドメインに認められた。このドメインは、 15 残基配列（ HDM2 （または HDMX ）との結合時に、約 2 . 5 ターンの両親媒性 ヘリックスを形成する、 SQ E T F S D L W K L L P E N ( 配列番号 1 ) ）を包含する（ Kussie , Gorina ら 1996 、 Popowicz , Czarnala 2008 ）。悪性腫瘍研究に基づいて立証されたように、この HDM2 / X と結合する p53 のドメイン内の 3 つの残基、詳細には、 F19 、 W23 、及び L26 は、 HDM2 及び HDMX との相互作用に関わる（ Kussie , Gorina ら 1996 、 Popowicz , Czarnala 2008 ）。 p53 と HDM2 / X との相互作用に関与することが知られている、対面型（ cofacial ） i / i + 4 / i + 7 アミノ酸残基のトライアドを持つ他の多数の直鎖 p53 関連ペプチドが、ファージディスプレイによって特定され、これには、 Pazgier らが報告した、直鎖ペプチド PMI ( T<sup>1</sup> S F A E Y W N L L S P<sup>1</sup> <sup>2</sup> 、配列番号 2 ) 及び直鎖ペプチド PDI ( L<sup>1</sup> T F E H Y W A Q L T S<sup>1</sup> <sup>2</sup> 、配列番号 50

3) が含まれる (Pazgier, Liuaら 2009)。

**【0180】**

p53遺伝子の欠失若しくは変異、またはHDM2若しくはHMDXの過剰発現の結果として生じるp53活性の減少または喪失は、いくつかのヒト悪性腫瘍の発生及び進行の根源となる因子として特定された (Marine, Dyerら 2007, Wahl及びWade 2009)。野生型p53を発現する腫瘍は、活性なp53の濃度を安定化または増加させる薬理剤に対する感受性を存続する。したがって、p53-HDM2の相互作用の化学的阻害によるp53活性の再活性化は、インピトロ及びインピボの両方で、癌細胞のアポトーシスを促進する有効なアプローチと認められた (Marine, Dyerら 2007, Wahl及びWade 2009)。更に、HDM2及びHMDXはいずれもp53活性の負の調節に関与しているため、HDM2/Xの二重阻害は特に抗癌治療の魅力的な方法として注目されている (Hu, Gilkesら 2006, Wade, Wongら 2006)。更に、これらのタンパク質同族体のp53結合間隙には微細な差があるため、HDM2の小分子阻害剤の大半は、p53対HMDXの相互作用を強力に阻害できないことから (Popowicz, Czarnala 2007)、HDM2/Xの二重阻害ができる化合物は有望な抗癌剤として非常に興味深い (Bernal, Wadeら 2010, Brown, Quahら 2013)。

**【0181】**

いくつかの実施形態では、新規の大環状ヘリックス状ペプチドミメティックは、p53-HDM2及びp53-HMDXのタンパク質-タンパク相互作用を効果的に阻害できる化合物を生成するために、本明細書で開示される方法に従って調製される。本明細書では、これらの化合物を「p53大環状ペプチドミメティック」と称する。これら新規のHDM2/X阻害剤は、多くの用途に有用であり、例えば、HDM2若しくはHMDXの過剰発現によって、またはp53活性の減少によって生じる悪性腫瘍の治療的処置を含むが、これに限定されない。

**【0182】**

一実施形態では、p53とHDM2間、p53とHMDX間、またはp53とHDM2及びHMDX両方のタンパク質とのタンパク質-タンパク相互作用を阻害できるp53大環状ペプチドミメティックを提供する。これらのp53大環状ペプチドミメティックを治療用途に使用すると、例えば、ヒト及びヒト以外の哺乳動物での癌及び他の疾患を治療することができ、ここでの癌及び他の疾患は、p53が不所望に低濃度または低活性であることを特徴とし、及び/またはHDM2またはHMDXの活性レベルが不所望に高いことを特徴とする癌及び他の疾患を治療することができる。これらのp53大環状ペプチドミメティックは、癌及び自己免疫などの過剰な細胞生存及び増殖の症状に加えて、神経変性及び免疫不全などの不適切な細胞周期停止及びアポトーシスの症状を引き起こす、p53転写経路の調節阻害と関連したヒトまたはヒト以外の哺乳動物でのいかなる疾患に対しても有用であり得る。いくつかの実施形態では、これらのp53大環状ペプチドミメティックは、HDM2(例えば、GenBank Accession番号: 228952; GL228952)及び/またはHMDX(別称:HDM4; GenBank Accession番号: 88702791; GL88702791)と結合する。

**【0183】**

本明細書で使用される場合、用語「p53/HDM2/HMDX関連の疾患」は、少なくとも部分的に、ヒトタンパク質p53、HDM2またはHMDXの異常な(すなわち、異常に高い、または異常に低い)活性または発現レベルによって引き起こされる、何らかのヒト疾患または障害を指す。

**【0184】**

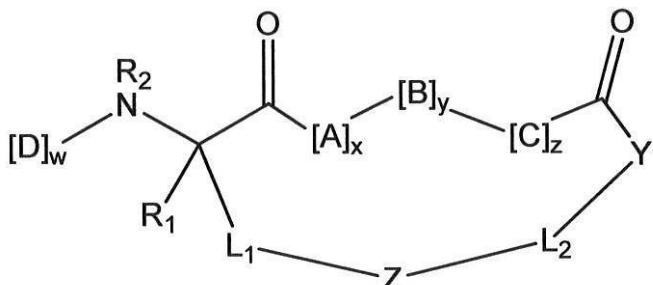
本明細書で使用される場合、用語「治療」は、患者(ヒトまたはヒト以外の哺乳動物を含むが、これらに限定されない)に対する治療薬の適用または投与、あるいは、疾患、疾患の症状または疾患素因の治療、治癒、緩和、軽減、変化、回復、寛解、改善または作用を目的として、疾患、疾患の症状または疾患の素因を有する患者からの単離組織または細

胞株に対する治療薬の適用または投与と定義される。

【0185】

したがって、式（VII）：

【化40】



10

(VII)

の p 5 3 大環状ペプチドミメティックは、ヒト（またはヒト以外の哺乳動物）対象での p 5 3 / H D M 2 / H D M X 関連の疾患の治療に使用するために提供される  
（式中、

20

A、C 及び D はそれぞれ独立して、天然または非天然アミノ酸であり、末端 D はキャッピング基を含む場合があり、

B は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ基とカルボキシ基間に少なくとも 1 つの付加的なメチレン基を含むアミノ酸、二級アミンまたは三級アミンであるアミノ基を含むアミノ酸、エステルによって置換されたカルボキシ基を含むアミノ酸、[ - N H N ( R<sub>3</sub> ) C ( O ) - ]、[ - N H - L<sub>3</sub> - C O - ]、[ - N H - L<sub>3</sub> - S O<sub>2</sub> - ] または [ - N H - L<sub>3</sub> - ] であり、

Y は、- N H - 、- N ( R<sub>4</sub> ) - 、- N H N ( R<sub>4</sub> ) - 、- N H - O - 、- O - または- S - であり、

30

Z は、- S C H R<sub>6</sub> - 、- C H R<sub>6</sub> S - 、- C = C - 、- N ( R<sub>5</sub> ) C O - 、- C O N ( R<sub>6</sub> ) - 、- C ( R<sub>5</sub> ) = N ( R<sub>6</sub> ) - 、- C H ( R<sub>5</sub> ) - N H ( R<sub>6</sub> ) - 、- C ( R<sub>5</sub> ) = N - O - 、- C H ( R<sub>5</sub> ) - N H - O - 、- C ( R<sub>5</sub> ) = N - N H ( R<sub>6</sub> ) - 、- C H ( R<sub>5</sub> ) - N H - N H ( R<sub>6</sub> ) - またはトリアゾール基であり、

L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 及び L<sub>3</sub> は、独立して、それぞれが非置換であるか、または R<sub>7</sub> で置換された、脂肪族基、アリール基、置換脂肪族基、置換アリール基、ヘテロ原子を含む脂肪族基、ヘテロ原子を含むアリール基、置換ヘテロ原子を含む脂肪族基、置換ヘテロ原子を含むアリール基であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub> 及び R<sub>6</sub> は、独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基または置換アリール基であり、

40

R<sub>7</sub> は、それぞれ独立して、- H、脂肪族基、置換脂肪族基、アリール基及び置換アリール基であり、

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、

w は、1 ~ 1000 の整数である）。

【0186】

いくつかの実施形態では、p 5 3 大環状ペプチドミメティック分子に含まれるペプチド配列は、p 5 3 タンパク質のトランス活性化ドメイン（配列番号 1）から誘導される。他の実施形態では、p 5 3 大環状ペプチドミメティック分子に含まれるペプチド配列は、配

50

列番号 2 及び配列番号 3 の p 5 3 関連ポリペプチドから誘導される。

【0187】

いくつかの実施形態では、p 5 3 大環状ペプチドミメティック分子は、配列番号 1、2 及び 3 に対応するポリペプチド配列と、少なくとも約 50%、60%、80%、90% または 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、p 5 3 大環状ペプチドミメティック分子は、表 1、2、3 及び / または 4 に記載されたアミノ酸配列を含む。

【0189】

【表 1】

10

表 1 : A i b = 2 - アミノイソ酪酸、A c 3 c = 1 - アミノシクロプロパンカルボン酸、C b a = 2 - アミノ - 3 - シクロブチルプロパン酸。

アミノ酸配列 (X = 大員環形成リンカーによってカルボキシ末端に連結されるアミノ酸)															配列番号
Ser	Gln	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Pro	
		Thr	Ser	Phe	Ala	Glu	Tyr	Trp	Asn	Leu	Leu	Ser	Pro		2
		Leu	Thr	Phe	Glu	His	Tyr	Trp	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser		3
Ac-	X	Ser	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu/Tyr	Trp/6Cl-Trp	Arg	Leu	Leu	Pro/Ala		4
Ac-	Gln	X	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu/Tyr	Trp/6Cl-Trp	Arg	Leu	Leu	Pro/Ala		5
Ac-	Gln	Ser	X	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu/Tyr	Trp/6Cl-Trp	Arg	Leu	Leu	Pro/Ala		6
Ac-	Gln	Ser	Gln	X	Phe	Ser	Asn	Leu/Tyr	Trp/6Cl-Trp	Arg	Leu	Leu	Pro/Ala		7
Ac-	Gln	Ser	Gln	Thr	Phe	X	Asn	Leu/Tyr	Trp/6Cl-Trp	Arg	Leu	Leu	Pro/Ala		8
Ac-	Gln	Ser	Gln	Thr	Phe	Ser	X	Leu/Tyr	Trp/6Cl-Trp	Arg	Leu	Leu	Pro/Ala		9
Ac-	Gln	Ser	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	X	Trp/6Cl-Trp	Arg	Leu	Leu	Pro/Ala		10
Ac-	Gln	Ser	Gln	Thr	Phe	Ser	Asn	Leu/Tyr	Trp/6Cl-Trp	X	Leu	Leu	Pro/Ala		11

【0190】

【表 2】

20

表 2 : A i b = 2 - アミノイソ酪酸、A c 3 c = 1 - アミノシクロプロパンカルボン酸、C b a = 2 - アミノ - 3 - シクロブチルプロパン酸。

30

アミノ酸配列 (X = 大員環形成リンカーによってカルボキシ末端に連結されるアミノ酸)														配列番号		
Ac-	X	Ser	Phe	Ala/Glu/Met	Glu/Gln/Ala/His	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Leu/Ac3c/Gln	Leu/Cba	Ala/Gly					
Ac-	Thr/Leu	X	Phe	Ala/Glu/Met	Glu/Gln/Ala/His	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Leu/Ac3c/Gln	Leu/Cba	Ala/Gly					12
Ac-	Thr/Leu	Ser	Phe	X	Glu/Gln/Ala/His	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Leu/Ac3c/Gln	Leu/Cba	Ala/Gly					13
Ac-	Thr/Leu	Ser	Phe	Ala/Glu/Met	X	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Leu/Ac3c/Gln	Leu/Cba	Ala/Gly					14
Ac-	Thr/Leu	Ser	Phe	Ala/Glu/Met		X	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Leu/Ac3c/Gln	Leu/Cba	Ala/Gly				15
Ac-	Thr/Leu	Ser	Phe	Ala/Glu/Met	Glu/Gln/Ala/His	X	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Leu/Ac3c/Gln	Leu/Cba	Ala/Gly					16
Ac-	Thr/Leu	Ser	Phe	Ala/Glu/Met	Glu/Gln/Ala/His	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Leu/Ac3c/Gln	Leu/Cba	Ala/Gly					17

【0191】

40

## 【表3】

表3 : A i b = 2 - アミノイソ酪酸、A c 3 c = 1 - アミノシクロプロパンカルボン酸、C b a = 2 - アミノ - 3 - シクロブチルプロパン酸。

アミノ酸配列 (X = 大員環形成リンカーによってカルボキシ末端に連結されるアミノ酸)												配列番号
Ac-	X	Thr	Phe	Glu/Met	Ala/His/Asn/Glu	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	18
Ac-	Leu/Gln	X	Phe	Glu/Met	Ala/His/Asn/Glu	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	19
Ac-	Leu/Gln	Thr	Phe	X	Ala/His/Asn/Glu	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	20
Ac-	Leu/Gln	Thr	Phe	Glu/Met	X	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	21
Ac-	Leu/Gln	Thr	Phe	Glu/Met	Ala/His/Asn/Glu	X	Trp/6Cl-Trp	Asn/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	22
Ac-	Leu/Gln	Thr	Phe	Glu/Met	Ala/His/Asn/Glu	Tyr	Trp/6Cl-Trp	X	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	23
Ac-	X	Thr	Phe	Glu/Met	Ala/His/Asn/Glu	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		24
Ac-	Leu/Gln	X	Phe	Glu/Met	Ala/His/Asn/Glu	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		25
Ac-	Leu/Gln	Thr	Phe	X	Ala/His/Asn/Glu	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		26
Ac-	Leu/Gln	Thr	Phe	Glu/Met	X	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		27
Ac-	Leu/Gln	Thr	Phe	Glu/Met	Ala/His/Asn/Glu	X	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		28

10

## 【0192】

## 【表4】

表4 : A i b = 2 - アミノイソ酪酸、A c 3 c = 1 - アミノシクロプロパンカルボン酸、C b a = 2 - アミノ - 3 - シクロブチルプロパン酸。

20

アミノ酸配列 (X = 大員環形成リンカーによってカルボキシ末端に連結されるアミノ酸)											配列番号
Ac-	X	Phe	Met	Aib/His/Asn	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	29
		Phe	X	Aib/His/Asn	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	30
		Phe	Met	X	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	31
		Phe	Met	Aib/His/Asn	X	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	32
		Phe	Met	Aib/His/Asn	Tyr	Trp/6Cl-Trp	X	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba	Thr/Ala	33
Ac-	X	Phe	Met	Aib/His/Asn	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		34
		Phe	X	Aib/His/Asn	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		35
		Phe	Met	X	Tyr	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		36
		Phe	Met	Aib/His/Asn	X	Trp/6Cl-Trp	Glu/Ala	Ac3c/Gln/Leu	Leu/Cba		37

30

## 【0193】

いくつかの実施形態では、p 53 大環状ペプチドミメティック分子は、配列番号 4 ~ 37 のポリペプチド配列のいずれかと、少なくとも約 50%、60%、80%、90% または 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。

## 【0194】

いくつかの実施形態では、p 53 大環状ペプチドミメティック分子は、一般式 (VII) の大環状ペプチドミメティック分子に対応する。この場合のアミノ酸配列は表 1、2、3 及び / または 4 に記載されるアミノ酸配列であり、これらのアミノ酸配列の残基

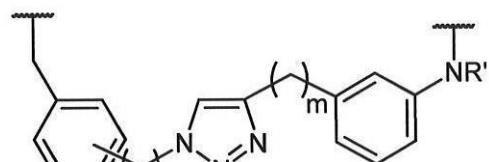
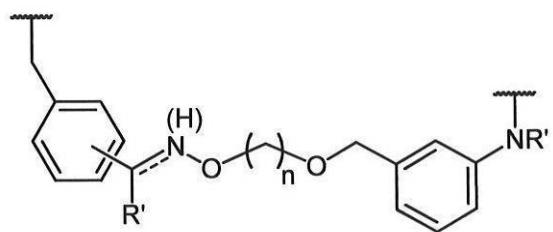
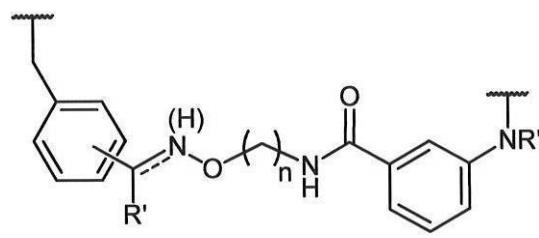
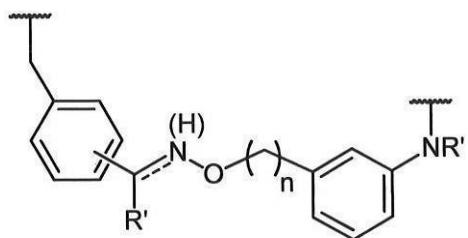
## 【化41】

X

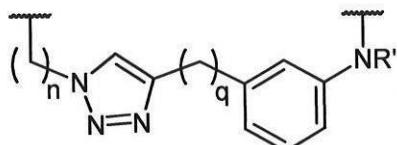
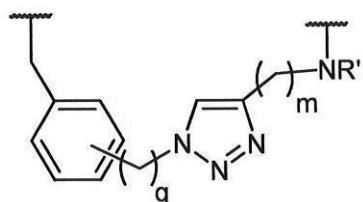
とカルボキシ末端とを結合する大環状形成性リンカー [ - L<sub>1</sub> - Z - L<sub>2</sub> - Y - ] は、

40

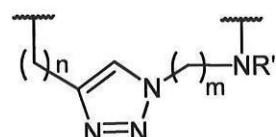
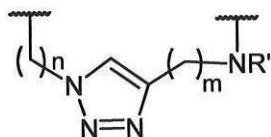
【化 4 2】



10

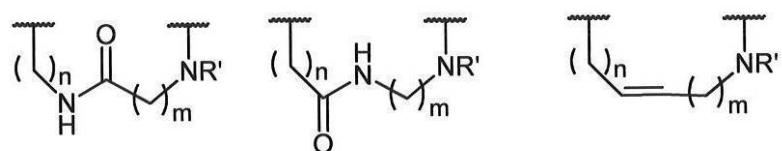
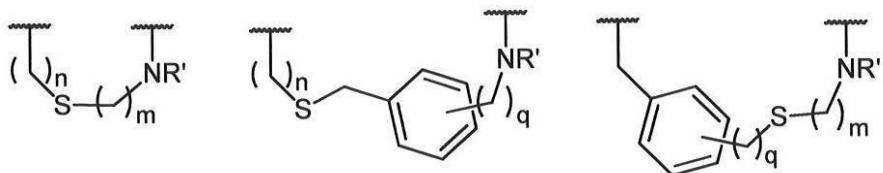


20

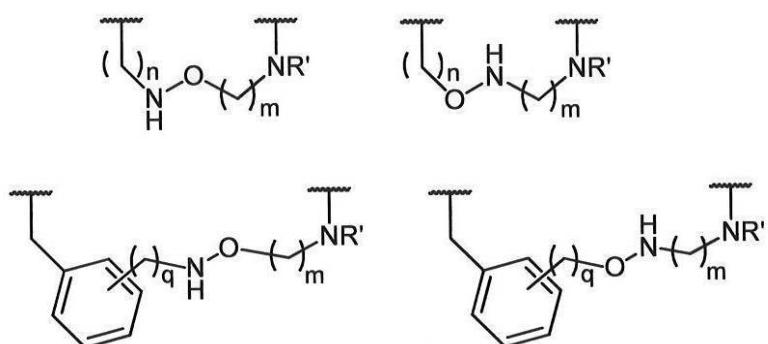


及び

## 【化43】

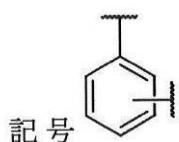


10



20

を含む大環状形成性リンカーの群から選択されるが、これらに限定されない（式中、  
【化44】



30

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、

「m」及び「n」は、それぞれ独立して、1～10の範囲内の整数であり、

「q」は、0～5の整数であり、

R は、それぞれ独立して、-Hまたは-CH<sub>3</sub>である）。

## 【0195】

いくつかの実施形態では、p53大環状ペプチドミメティック分子は、一般式（VII）の化合物に対応し、この場合、

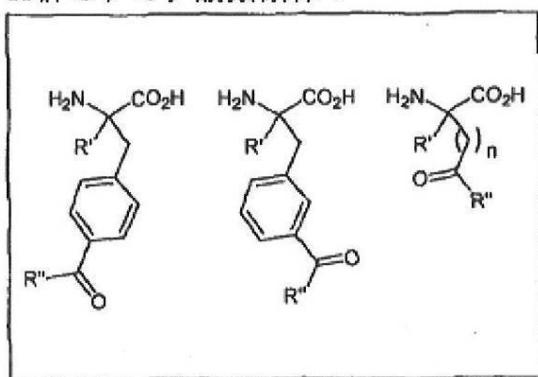
i) p53大環状のペプチドミメティック分子に含まれるアミノ酸配列は、配列番号1～37に対応するポリペプチド配列と、少なくとも少なくとも約50%、60%、80%、90%または95%同一であり、

ii) 側鎖-C末端の大環状化は、

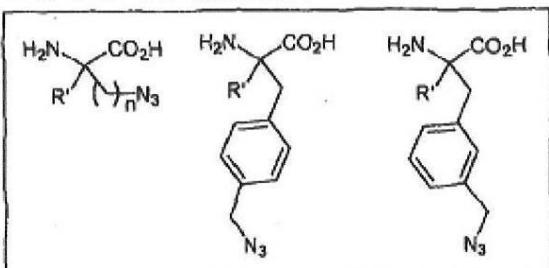
40

## 【化45】

A群のアミノ酸類似体：

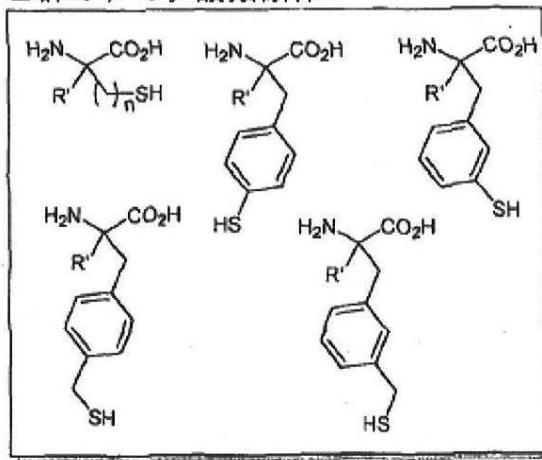


C群のアミノ酸類似体：

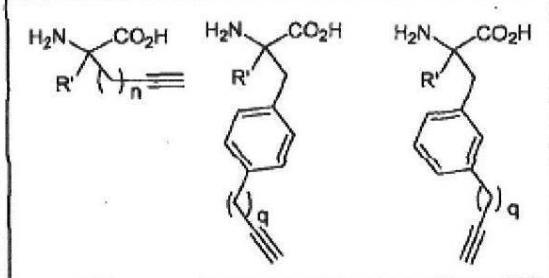


10

B群のアミノ酸類似体：

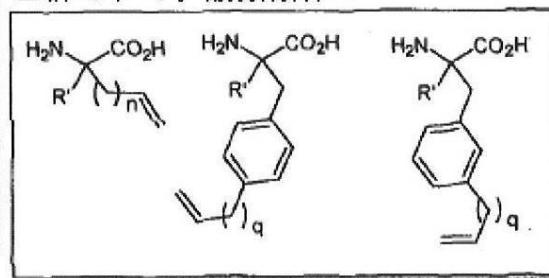


D群のアミノ酸類似体：



20

E群のアミノ酸類似体：

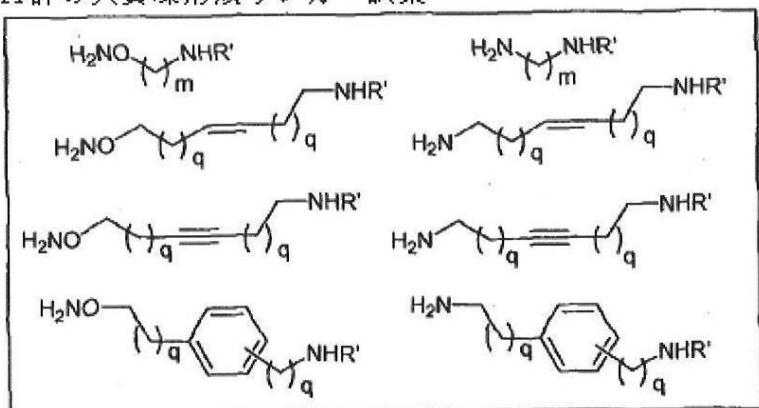


を含むがこれらに限定されない、アミノ酸類似体の群から選択されるアミノ酸類似体によって、及び

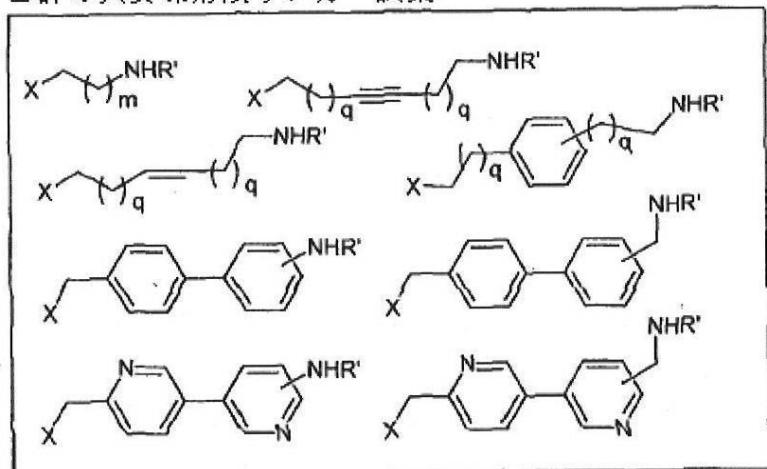
30

## 【化46】

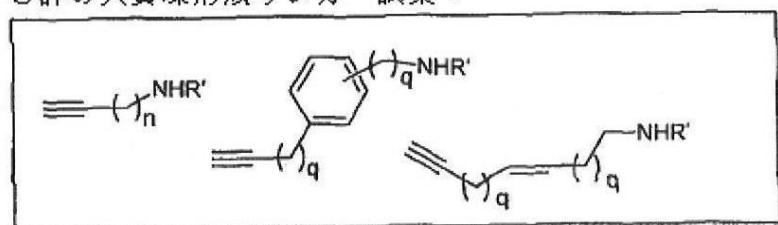
A群の大員環形成リンカー試薬：



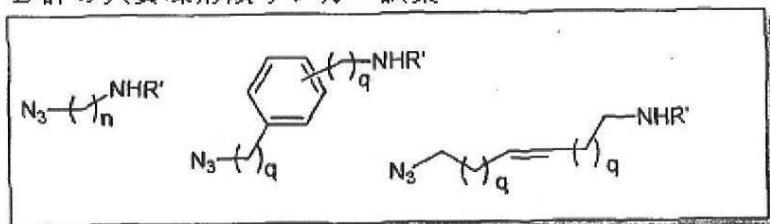
B群の大員環形成リンカー試薬：



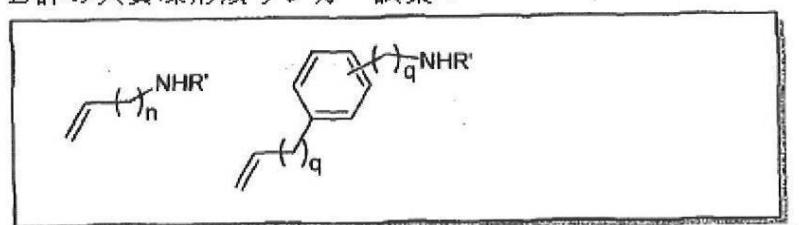
C群の大員環形成リンカー試薬：



D群の大員環形成リンカー試薬：



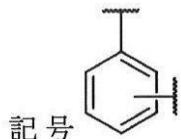
E群の大員環形成リンカー試薬：



を含むがこれらに限定されない、大員環形成リンカーの群から選択される、適合性のある大員環形成リンカーによって媒介され、

ここで、選択されたアミノ酸類似体及び大員環形成リンカー試薬において、

**【化47】**



記号

10

は、オルト、メタ、またはパラ二置換フェニル環を示し、

「m」及び「n」は、独立して、1～10の範囲内の整数であり、

「q」は、0～5の整数であり、

Rは、それぞれ独立して、-Hまたは-CH<sub>3</sub>であり、

Rは、-H、-CH<sub>3</sub>または-OHであり、

Xは、-Cl、-Br、-I、-OTS、-OMsまたは-OTfである。

**【0196】**

いくつかの実施形態では、式(VII)のp53大環状ペプチドミメティック分子は、蛍光標識、親和性標識、放射性同位体標識、標的薬剤または治療薬を含む。

**【0197】**

いくつかの実施形態では、タンパク質p53、HMD2またはHD MXの異常な発現または活性と関連した障害に感受性である、または障害を有している対象の予防的または治療的両方の処置に使用できる、p53大環状ペプチドミメティック分子を提供する。いくつかの実施形態では、この障害は、少なくとも部分的に、p53またはHMD2またはHD MXの異常なレベル(例えば、過剰発現または過小発現)によって、あるいは異常な活性を有するp53またはHMD2またはHD MXの存在によって引き起こされる。したがって、p53大環状ペプチドミメティック分子によって引き起こされる、p53またはHMD2またはHD MXのレベル及び/若しくは活性の低減、またはp53またはHMD2またはHD MXのレベル及び/若しくは活性の増強は、障害の有害症状の改善または低減に有用であり得る。

**【0198】**

いくつかの実施形態では、p53大環状ペプチドミメティック分子は、癌及び腫瘍症状の治療、予防及び/または診断に使用される。本明細書で使用される場合、用語「癌」、「過剰増殖性」及び「腫瘍性」は、自律的増殖能、すなわち、細胞成長の急速な増殖を特徴とする異常な状態または症状を有する細胞を指す。過剰増殖性及び腫瘍性の疾患状態は、病理的異常、すなわち疾患状態の特徴または性質を有するものとして分類することも、非病理的異常、すなわち疾患状態を伴わないが正常からの逸脱として分類することもできる。この用語は、侵襲性の組織病理的なタイプまたはステージを問わず、全ての種類の癌性増殖または腫瘍形成のプロセス、転移性組織、または悪性形質転換性の細胞、組織若しくは器官を含むこと意味する。転移性腫瘍は、多数の原発腫瘍タイプから生じ得、胸部、肺、肝臓、結腸及び卵巣由来のものを含むが、これらに限定されない。「病理的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍増殖を特徴とする疾患状態で発生する。非病理学過剰増殖性細胞の例は、損傷修復と関連した細胞増殖を含むが、これらに限定されない。細胞増殖及び/または分化障害の例は、癌、例えば、癌腫、肉腫または転移性の障害を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、大環状ペプチドミメティック分子は、乳癌、卵巣癌、大腸癌、肺癌、このような癌の転移などを抑制するための新規治療薬である。

**【0199】**

癌または腫瘍性病状の例として、纖維肉腫、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、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーリング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胃癌、食道癌、直腸癌、脾臓癌、卵巣癌、前立

20

30

40

50

腺癌、子宮癌、頭頸部癌、皮膚癌、脳腫瘍、扁平上皮細胞癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、囊胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、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、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、またはカポジ肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0200】

増殖障害の例として、造血腫瘍性障害が挙げられるが、これに限定されない。本明細書で使用される場合、用語「造血腫瘍性障害」は、例えば骨髓、リンパ系統若しくは赤血球系統、またはその前駆細胞に起因する、造血系由来の過形成性／腫瘍性細胞を含む疾患を含むが、これらに限定されない。未分化型急性白血病から生じる疾患として、赤芽球性白血病及び急性巨核芽球性白血病が挙げられるが、これらに限定されない。追加の例示的な骨髓性障害には、急性前骨髓球性白血病（APML）、急性骨髓性白血病（AML）、及び慢性骨髓性白血病（CML）を含むが、これらに限定されず、リンパ性悪性腫瘍には、B系ALL及びT系ALLを含むが、これに限定されない急性リンパ球白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、毛様細胞白血病（HLL）、及びワルデンストロームマクログロブリン血症（WM）を含むが、これらに限定されない。悪性リンパ腫の追加の形態は、非ホジキンリンパ腫及びその変異体、末梢性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）、大顆粒リンパ球性白血病（LGF）、ホジキン病及びリード　スタンバーグ病を含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0201】

乳房の細胞増殖性及び／または分化障害の例は、上皮過形成、硬化性腺症、及び小管乳頭腫を含む増殖性乳房疾患；腫瘍、例えば、線維腺腫、葉状腫瘍及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（パジェット病を含む）及び上皮内小葉癌を含む上皮内（非侵襲性）癌などの乳癌、ならびに侵襲性腺管癌、侵襲性小葉癌、髄様癌、膠様（粘液）癌、管状癌、及び侵襲性乳頭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腫瘍を含むが、これらに限定されない。男性乳房における障害は、女性化乳房及び癌を含むが、これらに限定されない。

20

#### 【0202】

肺の細胞増殖及び／または分化障害の例は、腫瘍随伴症候群を含む気管支原性癌、細気管支肺胞上皮がん、気管支カルチノイドなどの神経内分泌腫瘍、混合型腫瘍、及び転移性腫瘍；炎症性胸水、非炎症性胸水、気胸を含む胸膜の病理的異常、ならびに単発性線維性腫瘍（胸膜線維腫）及び悪性中皮腫を含む胸膜腫瘍を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0203】

結腸の細胞増殖及び／または分化障害の例は、非腫瘍性ポリープ、腺腫、家族性症候群、結腸直腸発癌、結腸直腸癌、及びカルチノイド腫瘍を含むが、これらに限定されない。

#### 【0204】

肝臓の細胞増殖及び／または分化障害の例は、結節性過形成、腺腫、ならびに肝臓の原発性癌及び転移性腫瘍を含む悪性腫瘍を含むが、これらに限定されない。

40

#### 【0205】

卵巣の細胞増殖及び／または分化障害の例は、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、囊胞性線維腺腫、ブレンナー腫瘍、表層上皮腫瘍などの卵巣腫瘍；成熟型（良性）奇形腫、单胚葉性奇形腫、未熟悪性奇形腫、未分化胚細胞種、内胚葉洞腫瘍、絨毛癌などの胚細胞腫瘍；顆粒膜細胞腫瘍、莢膜細胞線維腫、男性ホルモン産生細胞腫、ヒル（hil）細胞腫瘍及び性腺芽腫などの性索間質腫瘍；ならびにクルケンベルグ腫瘍などの転移性腫瘍を含むが、これらに限定されない。

#### 【0206】

他の実施形態では、本明細書に記載する大環状ペプチドミメティックは、過活性細胞死または生理的傷害などによる細胞死を特徴とする病状の治療、予防または診断に使用され

50

る。早発性若しくは望ましくない細胞死、またはその代わりに望ましくない若しくは過度の細胞増殖を特徴とする病状のいくつかの例は、細胞過少／低形成性、無細胞／無形成性、または細胞過多／過形成の病状を含むが、これらに限定されない。例の一部は、ファンコーニ貧血、再生不良性貧血、サラセミア、先天性好中球減少症及び骨髄形成異常を含むが、これらに限定されない血液疾患を含む。

#### 【0207】

他の実施形態では、アポトーシスの減少に作用する本明細書で開示する大環状ペプチドミメティックを使用して、望ましくないレベルの細胞死を伴う障害を治療することができる。したがって、いくつかの実施形態では、抗アポトーシス大環状ペプチドミメティックを使用して、ウイルス感染症に伴う細胞死に至るもののような障害、例えばヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染に伴う感染症、及び細胞アポトーシスに伴う神経疾患を治療することができる。このような障害として、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、色素性網膜炎、脊髄性筋萎縮症及び脳変性の種々の形態が挙げられる。これらの疾患における神経単位の漸進的喪失は、炎症反応を引き起こさず、アポトーシスレベルの異常な増加と関連して出現する。

#### 【0208】

別の実施形態では、本明細書に記載するp53大環状ペプチドミメティックは、自動免疫疾患を含むがこれに限定されない炎症性障害の治療、予防または診断に使用される。本明細書に記載するp53ペプチドミメティック大員環を用いて治療される自己免疫疾患の例は、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、アジソン病、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群（APS）、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、自己免疫内耳疾患、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、セリアック病、シャーガス病、チャーチー・ストラウス症候群、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、クローン病、皮膚筋炎、I型真正糖尿病、子宮内膜症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギラン・バレー症候群（GBS）、橋本病、化膿性汗腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸炎（IBD）、間質性膀胱炎、紅班性狼瘡、限局性強皮症、多発性硬化症、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経ミオトニー、尋常天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、リウマチ様関節炎、統合失調症、強皮症、シェーグレン症候群、側頭動脈炎（別名「巨細胞性動脈炎」）、高安動脈炎、血管炎、白斑及びウェゲナー肉芽腫症を含むが、これらに限定されない。

#### 【0209】

本明細書に記載するp53大環状ペプチドミメティックを用いて治療できる他の種類の炎症性疾患の例は、アレルギー性鼻炎／副鼻腔炎、皮膚アレルギー（蕁麻疹／発疹、血管性浮腫、アトピー性皮膚炎）、食物アレルギー、薬剤アレルギー、昆虫アレルギー、及び肥満細胞症、喘息を含む希少アレルギー傷害を含むアレルギー、骨関節炎、リウマチ様関節炎及び脊椎関節症を含む関節炎、中枢神経限局性血管炎、サルコイドーシス、臓器移植拒絶反応、線維筋痛、纖維症、腱炎及び骨盤炎症性疾患を含むが、これらに限定されない。

#### 【0210】

本明細書に記載するp53大環状ペプチドミメティックを用いて治療または予防できる心臓血管系障害（例えば、炎症性障害）の例は、アテローム動脈硬化症、心筋梗塞、心臓発作、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、腎臓病、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高脂血症、黄色腫症、喘息、高血圧、気腫及び慢性肺疾患などの非冠状動脈疾患；または、介入的手技を伴う心臓血管系の病状（「手技による血管外傷」）、例えば血管形成術後の、シャント、ステント、合成若しくは天然の切除移植片、留置カテーテル、バルブ若しくは他の埋込み可能な用具の留置後の再狭窄を含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0211】

加えて、本明細書に記載するp53大環状ペプチドミメティック分子を対象に投与することを含む、対象におけるp53/HDM2/HDMX関連疾患の治療方法を提供する。

10

20

30

40

50

加えて、本明細書に記載する p 53 大環状ペプチドミメティック分子を対象に投与することを含む、対象における癌の治療方法を提供する。

#### 【 0 2 1 2 】

本明細書で提供される化合物は、1つ以上の（すなわち、少なくとも1つの）キラル中心を含み得る。したがって、化合物は、ラセミ混合物、ジアステレオマー、エナンチオマー、または1つ以上の立体異性体が豊富な混合物であり得る。本明細書で置換基群が開示される場合、その群の個々の構成要素の全て、及びいかなる異性体、エナンチオマー及びジアステレオマーを含む全てのサブグループも本開示に含まれることを意図する。加えて、本明細書で開示する化合物の全ての同位体的形態は、本開示に含まれることを意図する。例えば、本明細書で開示される分子内の1つ以上の水素を、いずれもジウテリウムまたはトリチウムと置換できることが理解されよう。10

#### 【 0 2 1 3 】

医薬組成物及び投与経路

#### 【 0 2 1 4 】

本明細書で開示する p 53 大環状ペプチドミメティックはまた、薬学的に許容される誘導体またはそのプロドラッグも含む。「薬学的に許容される誘導体」は、レシピエントへの投与時に、本明細書で開示する化合物を（直接的または間接的に）提供できるような、本明細書で開示する化合物の薬学的に許容される任意の塩、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許容される誘導体は、哺乳動物に投与された場合に、本明細書で開示する化合物のバイオアベイラビリティを増大するもの（例えば、経口投与された化合物の血中への吸収を増大することによる）、または親種と比較して、活性化合物の生物学的区画（例えば、脳またはリンパ系）への送達を増強するものである。一部の薬学的に許容される誘導体は、水への溶解度または消化管膜を通る能動輸送を増強する化学基を含む。20

#### 【 0 2 1 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示する p 53 大環状ペプチドミメティックは、選択的な生物学的特性を増強する適切な官能基を共有結合または非共有結合することにより修飾されても良い。このような修飾は、所与の生物学的区画（例えば、血液、リンパ系、中枢神経系）への生物学的透過性を増加させるもの、経口有効性を増加させるもの、可溶性を増加させて注射による投与を可能にするもの、代謝を変化させるもの及び排泄率を変化させるものを含む。30

#### 【 0 2 1 6 】

本化合物の薬学的に許容される塩は、薬学的に許容される無機及び有機の酸及び塩基に由来するものを含むが、これらに限定されない。好適な酸性塩の例は、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、ジグルコン酸塩、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、パモ酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、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、トシリ酸塩及びウンデカン酸塩を含む。適切な塩基に由来する塩は、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、アンモニウム塩及びN - (アルキル)<sub>4</sub><sup>+</sup> 塩を含む。40

#### 【 0 2 1 7 】

本開示の化合物から医薬組成物を調製するための、薬学的に許容される担体は固体または液体いずれかの担体を含む。固体形態の製剤は、粉末剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、カシェ剤、坐剤及び分散性粒剤を含む。固体担体は、希釈剤、着色剤、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つ以上の物質であり得る。処方及び投与のための技術に関する詳細は、科学文献及び特許文献に十分に記述されており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co, Easton PA の最新版を参照されたい。50

**【0218】**

粉末剤において、担体は、微粉化した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担体と好適な割合で混合され、所望の形状及び大きさに圧縮される。

**【0219】**

好適な固体賦形剤は、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を含む糖；トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモまたは別の植物のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース；ならびにアラビアゴム及びトラガカントゴムを含むゴム；ならびにゼラチン及びコラーゲンなどのタンパク質を含むがこれらに限定されない炭水化物またはタンパク質充填剤である。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などの崩壊剤または可溶化剤を添加する。10

**【0220】**

液体形態の製剤は、液剤、懸濁剤及び乳剤、例えば、水または水／プロピレングリコール溶液を含む。非経口注射用に、液体製剤を水性ポリエチレングリコール溶液にて溶液に処方することができる。本明細書で使用される場合、用語「非経口」は、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内及び皮下を含む投与様式を指す。

**【0221】**

本明細書で開示される組成物が、大環状ペプチドミメティック分子と1つ以上の追加の治療薬または予防薬との組み合わせを含む場合、大環状ペプチドミメティック分子及び追加の薬剤はいずれも、約1～100%の用量レベルで存在すべきであり、いくつかの実施形態では、単剤療法レジメンにおいて通常投与される約5～95%または約10～90%の用量で存在すべきである。いくつかの実施形態では、追加の薬剤は、複数回投与レジメンの一部として、本開示の化合物とは別に投与される。あるいは、これらの薬剤は1つの剤形の一部であり、本明細書で開示される化合物と共に1つの組成物中に混合される。20

**【0222】**

本明細書で開示するp53大環状ペプチドミメティックの投与方法は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、経口、舌下、脳内、腔内、経皮、直腸、吸入による、または耳、鼻、目若しくは皮膚への局所塗布による投与を含むが、これらに限定されない。30

**【0223】**

本明細書で用いられる用語及び表現は、限定のためではなく説明のための用語として使用され、このような用語及び表現の使用にあたり、記載及び説明される特徴及びその一部のいかなる等価物も排除することを意図しないが、本明細書で開示される及び／または特許請求の範囲に記載される主題の範囲内で、種々の改変が可能であることが理解される。したがって、実施形態及び任意の特徴を開示しているが、開示される概念の改変及び変形を当業者は用いることができ、このような改変及び変形は、本明細書で開示される及び／または特許請求の範囲に記載される主題の範囲内であると見なされることを理解すべきである。

**【0224】**

特段の記載のない限り、本開示は、具体的な分子構造、置換基、合成法、反応条件など、それ自体変化し得るものに限定されない。各実施形態は、当然変化し得る特定の組成物または生物系に限定されないことを理解すべきである。40

**【0225】**

本明細書で開示される化合物及び方法の実施にあたり、具体的に例示されたもの以外の出発材料、生体物質、試薬、合成法、精製法、分析法、アッセイ法及び生物学的方法を使用できることを当業者であれば理解されよう。このような何らかの材料及び方法の当該分野で既知の機能的等価物は全て包含されることを意図する。

**【実施例】****【0226】**

10

20

30

40

50

実施例 1 . p 5 3 大環状ペプチドミメティックの設計。

【0227】

PMI (T<sup>1</sup>SFAEYWNLSP<sup>1-2</sup>、配列番号2)と呼ばれる直鎖12-merペプチドが、近年、Pazgierら(Pazgier, Liuら 2009)によるバクテリオファージディスプレイによって単離された。PMIは、p53とHDM2/Xとの相互作用に関与することが知られている、対面型i/i+4/i+7アミノ酸残基のトライアド(Kussie, Gorinaら 1996, Popowicz, Czarnaら 2008)(すなわち、Phe<sup>3</sup>、Trp<sup>7</sup>及びLeu<sup>10</sup>がそれぞれp53のPhe<sup>1-9</sup>、Trp<sup>2-3</sup>及びLeu<sup>2-6</sup>に対応)を持つが、p53誘導ペプチドp53(15-29)よりも大きな親和性で、HDM2及びHDMXのいずれとも結合する(それぞれ、IC<sub>50</sub>は約30~40nM対200~300nM)(Pazgier, Liuら 2009)。PMI/HDM2複合体の入手可能な結晶構造を検証すると(Pazgier, Liuら 2009)(図9A)、溶媒に露出する2つの残基、すなわち、Thr<sup>1</sup>及びGlu<sup>5</sup>は、本明細書で開示される一般的な方法(図1)に従ってp53大環状ペプチドミメティック(図9B)を生成するための2つの生存可能な側鎖結合点であると確認された。大環化方法に関しては、アミノ酸類似体パラ-アセチル-フェニルアラニン(pAcF)によって、及び図8に提示されたもののようなオキシアミノ/アミノチオール大員環形成リンカーによって媒介される、側鎖-C末端の大環化手順を選択した。PMIペプチド内のPro<sup>1-2</sup>はHDM2表面と有意な接触を確立しないと思われたため(Pazgier, Liuら 2009)、p53大環状ペプチドミメティックを構築するためのC末端結合部位をSer<sup>1-1</sup>の次に置くことを選択し、ペプチドミメティック分子によるヘリックス形成を更に促進するために、これをAlaに変更した。  
10

【0228】

対応するThr<sup>1</sup>pAcF及びGlu<sup>5</sup>pAcFを含む前駆体ペプチドミメティック分子のモデル分析により、pAcFの炭素原子とi+6またはi/i+10のAla<sup>1-1</sup>残基のカルボニル原子との間の距離はそれぞれ約13及び17であることが明らかになった。この距離は、pAcFと大員環形成リンカー試薬SP6及びSP8(図8)との反応で生成される大員環形成リンカーにより得られる点間距離(約14~17、図11B~11C)と一致する。このような理由から、i/i+6(CO)及びi/i+10(CO)で連結された、一連のp53大環状ペプチドミメティックを設計した。これには、SP6(化合物P3及びP7、図10)またはSP8(化合物P4及びP8、図10)のいずれかが、pAcFの側鎖とペプチド配列のC末端とを結合するリンカー部分の一部として組み込まれている。陰性対照として、同じアミノ配列を含むが、「距離不一致」のSP4ベースのリンカー(図9Aの目標距離13~17に対して、10(図11A))を組み込んだ大員環も調製した。結果として生じるペプチドミメティックは、図10の化合物P5及びP9に対応する。  
20

【0229】

i/i+10(CO)で連結されたp53大環状ペプチドミメティックP8を、p53-HMD2及びp53/HDMXの相互作用の最も有望な阻害剤であると特定するにあたって(実施例6を参照)、N末端のアセチル化(P8-P12、図10)、ペプチド配列の短縮(P12-P13、図10)、pAcFとメタ-アセチル-フェニルアラニンとの置換(P13-P14、図10)、ならびにアミノ酸配列(P13-P15、図10)及び大員環形成リンカーの変異(P13-P17、図10)によって、この化合物の更なる最適化を追求した。これらの最適化努力の結果、HMD2及びHDMXに対してナノモル阻害活性を有するp53大環状ペプチドミメティック分子(P15、図10)を得た。これは細胞による試験で抗癌活性も示した。  
40

【0230】

本実施例では、本開示の方法をどのように適用すると、目的とする標的ヘリックス状タンパク質結合モチーフ(例えば、p53トランス活性化ドメイン)である大環状ペプチドミメティック分子の設計、開発及び最適化が可能であるかについても示す。  
50

## 【0231】

実施例2. アミノ酸類似体の合成。

## 【0232】

本実施例は、大環状ペプチドミメティック分子の調製に使用する一般式(VI)のアミノ酸類似体の合成を示す。具体的には、本実施例は、図3及び4に例示されているもののような大環状ペプチドミメティック分子の調製に有用である、パラ-アセチル-フェニルアラニン(pAcF)及びメタ-アセチル-フェニルアラニン(mAcF)などのラセミ体及び/またはエナンチオピュアのアミノ酸類似体を示す。加えて、本実施例は、側鎖アルキニル基(-C<sub>2</sub>H、例えばOppY)または側鎖スルフヒドリル基(-SH、例えばAmmF及びMeaF)を含むアミノ酸類似体などの、他の種類のアミノ酸類似体の合成を示す。これは、本開示の各種実施形態に包含される代わりの種類のリンカーによって拘束される大環状ペプチドミメティック分子の調製に有用であり得る。更に本実施例は、これらの化合物(例えば、図10の化合物P15～P19)の特性を調節するために、大環状ペプチドミメティック分子のペプチド主鎖内に組み込むことができるアミノ酸類似体(例えば、6-クロロ-トリiptファン)の合成を示す。  
10

## 【0233】

pAcF及びmAcFラセミ体の合成。pAcF形態の合成を、公開された手順(Frost, Vitaliら 2013)に従って実施した。mAcFラセミ体を、3-アセチル-トルエンを出発物質とする以外は同一のプロトコルを使用して調製した。

## 【0234】

エナンチオピュアなN-Fmoc-pAcF(及びmAcF)の合成。この化合物は、図5Aに記載されている手順に従って合成した。無水酢酸(4.52mL, mmol, 1当量)を添加した酢酸(20mL)に、ラセミ体のp-アセチルフェニルアラニン(1g, 4.83mmol, 1当量)を溶解した。反応物質を室温で2時間、攪拌した後、蒸発により溶媒を除去した。1mMのCoCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oを含有するpH8.0のリン酸緩衝液(50mL)に粗生成物を再溶解させた後、アシラーゼI(500mg)を添加した。隨時LiOHを用いてpHを8.0に調整しながら、反応物質を37℃で24時間、攪拌した。反応混合物を60℃で5分間加熱して、室温まで冷却し、セライトに通して濾過した。HClを使用して濾過液をpH約3まで酸性化した後、EtOAcにて抽出した。水性層を凍結乾燥し、次の反応のための粗生成物(410mgのL-エナンチオマー、収率約82%)として使用した。L-p-アセチル-フェニルアラニン(410mg, 1.98mmol, 1当量)を、NaHCO<sub>3</sub>(332.6mg, 3.96mmol, 2当量)を添加した水/アセトン混合液(1:1, v/v)中に溶解させた。Fmoc-OSu(735.4mg, 2.18mmol, 1.1当量)をアセトン中で溶解し、3時間かけて反応混合物に部分添加した。反応が完了した時点で、アセトンを蒸発により除去し、酢酸を用いて水性層をpH約3まで酸性化させた後、EtOAcにより抽出した。有機層を混合して、硫酸ナトリウムを通して乾燥させ、蒸発させた。粗生成物を、フラッシュカラムクロマトグラフィ及びヘキサン:EtOAc:AcOH(10:9:1)の溶媒系を用いて精製し、純粋なFmoc-p-アセチル-L-フェニルアラニン(832.7mg、98%)を得た。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CD<sub>3</sub>OD), δ 2.57(s, 3H), 3.22-3.41(m, 2H), 4.45(t, 1H), 7.37-7.55(m, 8H), 7.88(d, 2H), 7.98(d, 2H). MS (ESI) C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>[M+H]<sup>+</sup>の計算値: m/z 429.16, 実測値 429.4。同一の手順を適用して、Fmoc-m-アセチル-L-フェニルアラニンを得た。  
30  
40

## 【0235】

O-プロパルギル-チロシン(OpgY)の合成。この化合物は、図5Bに記載されている手順に従って合成した。無水DMF(30mL)を入れた反応フラスコに、L-N-Boc-チロシン(6.0g, 21.0mmol)及び炭酸カリウム(9.0g, 63.0mmol)を添加した。臭化プロパルギル(6.3mL, 63.0mmol)を添加し  
50

て、反応混合物を室温で20時間、攪拌した。得られた二重アルキル化された生成物を、ジエチルエーテル（黄色油、6.8g、91%）を用いて抽出し、直ちに次の工程に使用した。この中間体（6.8g、19.04mmol）をメタノール（180mL）中の塩化アセチル混合物（21mL）に0℃で4時間かけて添加した。次に、得られた中間体（4.9g、19.04mmol）を2NのNaOH（42mL）とメタノール（30mL）との混合物に添加し、この混合物を室温で攪拌した。TLCによって加水分解の完了を確認し（2時間）、濃HClを用いてpHを7.0に調整して、この混合物を4℃で一晩攪拌した。析出沈殿を濾過して、冷水にて洗浄し、減圧下にて一晩乾燥させ、白色粉末として純度98%のOpgY（3.3g、80%）を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 2.78 (s, 2H), 2.94 (dd, J = 6.8, 22.4 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 9.6, 20 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 2.0, 12.8 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 35.4, 56.0, 76.6, 78.7, 115.6, 128.5, 130.6, 156.1, 173.9. MS (ESI) C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> の計算値：m/z 220.1；実測値：220.3。

## 【0236】

2-アミノ-3-(3-アミノ-4-(メルカプトメチル)フェニル)プロパン酸（AmmF）の合成。この化合物は、図5Cに記載されている合成スキームに従って合成した。化合物1（Frost, Vitaliら 2013）を出発物質とするこの化合物（20.32g、1.48mmol）を無水THF（400mL）中に溶解させ、次いで溶液を0℃まで冷却した。THF中（1M、52.8mL、52.8mmol、1.1当量）に、LiAlH<sub>4</sub>溶液を徐々に添加した。反応混合物をアルゴン下にて0℃で3時間攪拌し、低温のH<sub>2</sub>O（3mL）及び4NのNaOH水溶液（1mL）を0℃でゆっくりと添加することにより反応物質をクエンチした後、混合物を室温で10分間、攪拌した。混合物を減圧下で濃縮し、EtOAc/飽和NaHCO<sub>3</sub>（10:1、330mL）にて懸濁し、セライトに通して濾過した。濾過液を飽和NaHCO<sub>3</sub>で1回、次にブラインで1回洗浄した。無水MgSO<sub>4</sub>を用いて有機層を乾燥させ、揮発物を除去し、黄色固体を得た。これをフラッシュカラムクロマトグラフィ（シリカゲル、7:3のヘキサン/EtOAc）によって精製し、黄色油（18g、95%収率）としてN-Boc-S-トリチル-3-アミノ-4-(メルカプトメチル)ベンジルアルコール（2）を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : δ 7.78 (s, 1H), 7.49 (d, J = 7.3 Hz, 5H), 7.34 (t, J = 7.7 Hz, 5H), 7.26 (t, J = 3.0 Hz, 5H), 7.13 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.17 (s, 2H), 1.54 ppm (s, 9H); MS (ESI) : C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>3</sub>S の計算値：534.68 [M+Na]<sup>+</sup>；実測値：535.64。2(9.3g、18.19mmol)を無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>（100mL）に溶解し、溶液を0℃まで冷却した。メタンスルホニルクロリド（1.8mL、23.66mmol、1.3当量）及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIPSEA；4.2mL、23.66mmol、1.3当量）を添加し、反応混合物をアルゴン下にて0℃で2時間、攪拌した。次に混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中に溶解させ、NaHCO<sub>3</sub>飽和水溶液で2回、ブラインで1回洗浄した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、揮発物を除去し、黄色固体である化合物3（9.42g、88%収率）を得た。材料を更に精製することなく、次の工程を進めた。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : δ 7.88 (s, 1H), 7.49 (d, J = 7.3 Hz, 5H), 7.34 (t, J = 7.7 Hz, 5H), 7.26 (d, J = 14.6 Hz, 5H), 7.16 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.90 (s, 3H), 1.54 ppm (s, 9H); MS (ESI) : C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>5</sub> の計算値：559.66 [M+Na]<sup>+</sup>；実測値：559.62。

10

20

30

40

50

$^5S_2$  の計算値： 612.76 [M + Na]<sup>+</sup>；実測値： 612.04。乾燥させるため、アルゴンを充填した丸底フラスコに化合物3 (9.42 g) 及びジエチルアセトアミドマロネート (4.52 g, 20.8 mmol, 1.3当量) を添加した。この混合物を100 mLの無水DMF中に溶解させた後、0℃まで冷却した。次に、NaH (60% 鉛油分散物) (0.84 g, 20.8 mmol, 1.3当量) を添加し、反応混合物をアルゴン下にて0℃で15時間、攪拌した。完了した時点では、反応物質を10 mLまで濃縮し、350 mLのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>によって抽出して、フラッシュクロマトグラフィ後に白色固体として化合物5を得た (5.4 g, 60% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 7.52 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8 Hz, 6H), 7.32 (t, J = 7.5 Hz, 6H), 7.23 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 7.01 (d, J = 8 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.63 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.26 (q, J = 7.5 Hz, 4H), 3.58 (s, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.52 (s, 9H), 1.27 ppm (t, J = 7 Hz, 6H)；MS (ESI) : C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S の計算値： 733.89 [M + Na]<sup>+</sup>；実測値： 733.22。アルゴン充填した250 mLの乾燥した丸底フラスコに化合物4 (5.4 g, 7.6 mmol, 1当量) を添加し、70 mLの無水ジクロロメタン中に溶解させた。この溶液に、トリイソプロピルシラン (3.88 mL, 19 mmol, 2.5当量) を添加し、反応混合物を氷浴にて冷却した。TFA (18 mL) をシリングによって徐々に添加し、アルゴン下にて0℃で30分間、反応物質の攪拌を続けた。完了した時点では、AmmFをフラッシュクロマトグラフィによって反応混合物から分離した (2.27 g, 100%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) 7.54 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.41 - 7.30 (m, 2H), 4.31 (t, J = 5 Hz, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.36 - 3.27 ppm (m, 2H)；<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O) = 171.57, 135.46, 134.41, 131.42, 130.60, 128.73, 124.78, 54.29, 35.01, 23.12 ppm；MS (ESI) : C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S の計算値： 227.08 [M + H]<sup>+</sup>；実測値： 226.98。

## 【0237】

2-アミノ-3-((2-メルカブトエチル)アミノ)フェニルプロパン酸 (Meaf) の合成。この化合物は、図5Dに記載されている合成スキームに従って合成した。中間体7を得るために、NaH (60% 鉛油分散物) (1.11 g, 27.7 mmol, 1.2当量) を、アルゴン充填した乾燥した丸底フラスコに添加し、150 mLの無水DMF中に溶解させた。フラスコを0℃まで冷却し、溶液にジエチルアセトアミドマロネート (5.53 g, 25.5 mmol, 1.1当量) を添加した。5分後に、化合物6 (5 g, 23.14 mmol, 1当量) を添加した。反応をアルゴン下にて0℃で16時間、続行した。抽出後、7を白色固体として得た (8 g, 98% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 8.12 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.46, (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.27 (q, J = 8 Hz, 4H), 3.78 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.48 ppm (t, J = 6.8 Hz, 6H)；MS (ESI) : C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> の計算値： 375.34 [M + Na]<sup>+</sup>；実測値： 375.85。化合物7 (5 g, 14.2 mmol, 1当量) に、1 g のPd/Cをアルゴン充填したフラスコ及びフラスコ中で添加した。115 mLの脱気したメタノールを添加して、反応混合物を室温にて3時間、H<sub>2</sub>を用いてスパージングした。抽出後、化合物8をオフホワイト色の固体として得た (4.45 g, 97% 収率)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 8.12 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.55 ppm (t, J = 7.5 Hz, 6H)；MS (ESI) : C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> の計算値： 375.34 [M + Na]<sup>+</sup>；実測値： 375.85。

( s , 1 H ) , 4 . 2 9 ( q , J = 7 Hz , 4 H ) , 3 . 7 8 ( s , 2 H ) , 2 . 0 6 ( s , 1 H ) , 1 . 3 2 ppm ( t , J = 7 Hz , 6 H ) ; MS ( E S I ) : C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の計算値 : 345.36 [M+Na]<sup>+</sup> ; 実測値 : 345.19。化合物 8 ( 4 . 5 g、1.4 mmol、1 当量) を丸底フラスコに添加して、90 mL のエタノール中に溶解させた。NaCNBH<sub>3</sub> ( 0 . 97 g、1.5 . 4 mmol、1 . 1 当量) を添加し、溶解性を補助するため混合物を超音波処理した。クロロアセトアルデヒド ( 2 . 7 mL、1.5 . 4 mmol、1 . 1 当量) 、続いて冰酢酸 ( 0 . 81 mL、1.4 mmol、1 当量) を添加した。反応は、アルゴン下にて室温で4時間、続行した。フランクシュクロマトグラフィによる精製後、黄色油として化合物 9 を得た ( 3 . 46 g、9 mmol、64.2% 収率)。<sup>1</sup>H NMR ( 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 6 . 9 1 ( t , J = 8 Hz , 1 H ) , 6 . 4 2 ( d , J = 8 Hz , 1 H ) , 6 . 2 1 ( d , J = 7 . 6 Hz , 1 H ) , 6 . 1 9 ( s , 1 H ) , 4 . 1 8 - 4 . 0 6 ( m , 4 H ) , 3 . 5 2 ( t , J = 6 . 4 Hz , 2 H ) , 3 . 4 1 - 3 . 2 9 ( m , 4 H ) , 1 . 9 1 ( s , 3 H ) , 1 . 1 6 ppm ( t , J = 7 . 2 Hz , 6 H ) ; MS ( E S I ) : C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>C<sub>1</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の計算値 : 407.86 [M+Na]<sup>+</sup> ; 実測値 : 407.33。化合物 9 ( 3 . 46 g、9 mmol、1 当量) を 85 mL の無水 DMF 中に溶解させた。これに、トリフェニルメチルメルカプタン ( 2 . 73 g、9 . 9 mmol、1 . 1 当量) 、続いて炭酸カリウム ( 1 . 5 g、10 . 8 mmol、1 . 2 当量) を添加し、50 °C で 12 時間、攪拌した。フランクシュクロマトグラフィによりシリカゲル上で粗生成物を精製し、化合物 10 を黄色油として得た ( 3 . 38 g、5 . 4 mmol、60% 収率)。<sup>1</sup>H NMR ( 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 7 . 3 9 ( d , J = 7 . 5 Hz , 6 H ) , 7 . 2 6 ( t , J = 7 . 2 Hz , 3 H ) , 7 . 2 2 ( d , J = 7 . 1 Hz , 6 H ) , 7 . 1 9 ( s , 1 H ) , 7 . 0 0 ( t , J = 7 . 8 Hz , 1 H ) , 6 . 5 1 ( s , 1 H ) , 6 . 3 2 ( d , J = 7 . 1 Hz , 2 H ) , 6 . 1 3 ( s , 1 H ) , 4 . 2 5 ( p , J = 7 . 2 Hz , 4 H ) , 3 . 5 3 ( s , 2 H ) , 2 . 9 8 ( t , J = 6 . 6 Hz , 2 H ) , 2 . 4 7 ( t , J = 6 . 5 Hz , 2 H ) , 1 . 9 6 ( s , 3 H ) , 1 . 2 7 ppm ( t , J = 7 . 1 Hz , 6 H ) ; MS ( E S I ) : C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S の計算値 : 647.80 [M+Na]<sup>+</sup> ; 実測値 : 647.91。化合物 10 ( 3 . 38 g、5 . 4 mmol、1 当量) を 8 mL の TFA にて 0 °C で 20 分間、脱保護した。乾燥した残基を 35 mL の 4 N HCl 水溶液中に溶解させ、還流状態にて一晩加熱した。精製後、MeaF をモノマー及びダイマーの混合物 (薄茶色固体 ; 1 . 5 g、5 . 4 mmol、99 . 9%) として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 500 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO) = 8 . 6 9 ( s , 1 H ) , 7 . 4 1 - 7 . 2 ( m , 3 H ) , 4 . 1 6 ( t , J = 10 Hz , 1 H ) , 3 . 3 7 ( t , J = 5 Hz , 2 H ) , 3 . 1 8 - 3 . 1 0 ( m , 2 H ) , 2 . 7 9 ( t , J = 10 Hz , 2 H ) , 2 . 5 0 ( s , 1 H ) ; <sup>13</sup>C NMR ( 126 MHz, MeOD) = 170 . 86 , 138 . 87 , 136 . 78 , 132 . 19 , 132 . 13 , 125 . 21 , 123 . 43 , 55 . 71 , 54 . 77 , 36 . 86 , 20 . 72 ppm ; MS ( E S I ) : C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S の計算値 : 241.32 [M+H]<sup>+</sup> ; 実測値 : 241.61。

## 【0238】

L-6-クロロ-トリプトファンの合成。この化合物は、図 6 に記載されている合成スキームに従って合成した。酢酸 ( 10 mL ) 中の 6-クロロインドール ( 500 mg、3 . 31 mmol、1 当量) 溶液に、L-セリン ( 695 mg、6 . 62 mmol、2 当量) 及び無水酢酸 ( 3 . 1 mL、33 . 1 mmol、10 当量) を添加し、混合物をアルゴン下にて 73 °C で 4 時間、攪拌した。反応混合物を半量まで濃縮し、水で希釈して、EtOAc を用いて抽出した。有機層を混合して硫酸ナトリウム上で乾燥させ、蒸発させて粗生成物 N-アセチル-L-トリプトファン ( 686 mg、74% 収率) を得た。<sup>1</sup>H NMR ( 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 1 . 9 1 ( s , 3 H ) ,

3.15 - 3.31 (m, 2H), 4.67 (t, 1H), 6.97 (dd, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.53 (d, 1H)。N - アセチル - 6 - クロロ - D, L - リトリプトファン (686 mg, 2.45 mmol) を、1 mM の C o C l<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O を含有する pH 8.0 のリン酸緩衝液 (50 mL) 中に溶解させた。反応混合物に、アシラーゼ I (500 mg) を添加し、随時 LiOH を用いて pH を 8.0 に調整しながら、反応物質を 37 °C で 24 時間、攪拌した。反応混合物を 60 °C で 5 分間加熱して、室温まで冷却し、セライトに通して濾過した。HCl を使用して濾過液を pH 約 3 まで酸性化して、EtOAc にて抽出した。水性層を凍結乾燥し、次の反応のための粗生成物として使用した。(L - エナンチオマーに対する理論収率に基づいて) 収率を 43%、125.4 mg と推定した。6 - クロロ - L - リトリプトファン (125.4 mg, 0.527 mmol, 1 当量) を、NaHCO<sub>3</sub> (88.5 mg, 1.05 mmol, 2 当量) を添加した水 / アセトン混合液 (1 : 1, v/v) 中に溶解させた。Fmoc - OSu (195.6 mg, 0.58 mmol, 1.1 当量) をアセトン中で溶解し、3 時間かけて反応混合物に部分添加した。反応の完了に続いて、アセトンを蒸発させ、酢酸を用いて水性層を pH 約 3 まで酸性化させた後、EtOAc により抽出した。有機層を混合して、硫酸ナトリウムに通して乾燥させ、蒸発させた。粗生成物を、フラッシュカラムクロマトグラフィ及びヘキサン : EtOAc : AcOH (10 : 9 : 1) の溶媒系を用いて精製し、純粋な Fmoc - 6 - クロロ - L - リトリプトファン (237 mg, 98%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 3.16 - 3.32 (m, 2H), 4.65 (t, 1H), 6.98 (dd, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.3 - 7.55 (m, 8H), 7.79 (d, 2H). MS (ESI) C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> の計算値 : m/z 460.12, 実測値 460.4。

## 【0239】

実施例 3. 大員環形成リンカー試薬の合成。

## 【0240】

本実施例は、本明細書で提示される方法による大環状ペプチドミメティックの調製に有用であり得る種々の大員環形成リンカー試薬の合成を示す。特に、本実施例は、図 8 に提示されたもののような、オキシアミノ / アミノチオール官能化された大員環形成リンカー試薬の合成について示す。これは図 3 及び 4 に記載されている代表的な方法による大環状ペプチドミメティックの調製に有用であり得る。

## 【0241】

SP4、SP5、SP6 及び SP7 の合成。これらの化合物を、図 7 に提示され、( Frost, Vitali et al., 2013) に記載されたスキームに従って調製した。

## 【0242】

SP8 及び SP9 の合成。1 (図 5C) を出発物質として、この化合物を、対応する遊離カルボン酸誘導体 (= 3 - ((tert - プトキシカルボニル) アミノ) - 4 - ((トリチルチオ) メチル) 安息香酸) に加水分解した。0.677 g のこの中間体 (1.31 mmol) をジクロロメタン (15 mL) 中に溶解させ、アルゴン下で溶液に tert - ブチル - 3 - アミノプロポキシカルバメート (0.25 g, 1.31 mmol)、HBTU (0.745 g, 1.96 mmol) 及び DIPEA (0.55 mL, 3.15 mmol) を添加した。フラッシュクロマトグラフィによる抽出及び精製後、tert - ブチル - 3 - ((tert - プトキシカルボニル) アミノ) オキシプロピルカルバモイル) - 2 - ((トリチルチオ) メチル) - フェニル) カルバメートを分離した (0.658 g, 72%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.45 (s, 9H), 1.52 (s, 9H), 1.85 - 1.90 (m, 2H), 3.18 (s, 2H), 3.56 - 3.61 (m, 2H), 3.98 (t, 2H, J = 5.6), 7.14 (d, 1H, J = 8.0), 7.22 - 7.26 (m, 3H), 7.30 - 7.34 (m, 6H), 7.48 - 7.52 (m, 7H), 8.18 (s, 1H)。この中間体 (0.48 g, 0.69 mmol)

をアルゴン下にて0℃でジクロロメタン(7.5mL)中に溶解させた。トリイソプロピルシラン(0.36mL、1.75mmol)、続いてTFA(1.6mL、滴下)を添加した。反応物質を0℃で30分間、攪拌した。次に、揮発物を減圧下で除去し、黄色の残留物を高真空下に一晩配置した。氷冷ヘキサンを加えて生成物を粉碎し、減圧下で乾燥させ、SP8を固体で得た(0.18g、定量)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, d<sub>4</sub>-MeOD): 1.95-2.01(m, 2H), 3.48(t, J=6.8, 2H), 3.72(s, 2H), 4.11(t, 2H, J=6.0), 7.09(d, J=8.0, 1H), 7.13(d, J=8.0, 1H), 7.23(s, 1H). <sup>13</sup>C NMR(125MHz, d<sub>4</sub>-MeOD): 29.14, 37.34, 40.14, 74.16, 116.3, 116.6, 117.8, 126.5, 132.7, 135.9, 170.5. MS(EI) C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup> m/z の計算値: 256.34; 実測値: 255.92。 10

## 【0243】

実施例4.p53大環状ペプチドミメティックの化学生合成による合成。

## 【0244】

本実施例は、図4に例示している代表的な方法(実施形態)による、本開示の大環状ペプチドミメティックの調製を示す。

## 【0245】

大腸菌での生合成前駆体の合成。簡潔には、標的ペプチド配列(GTSFA(pAcF)YWNLLA)及び(G(pAcF)SFAEYWNLNA)の後ろにMxeGyrA(N198A)インテイン及びC末端Hisタグを含むタンパク質前駆体を以下の手順で調製した。最初に、GyrA遺伝子と融合された、これらのペプチド配列をコードする遺伝子(pAcFの組み込みには、アンバー終止コドンTAGが使用される)を、pET22bベースのプラスミドpMG-G8T(Frost, Vitaliら 2013)をテンプレートとして、フォワードプライマーのPMI\_for1 5'-gcgattggaaacctgtggcgatcacaagg-gagatgcactagt-3'及びPMI\_for2 5'-ctagacatat-gggctagagcttcgcggaatatttggaaacctgtggcgatcat-3'、ならびにリバースプライマーのT7ターミネーター5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC-3'を使用してPCRにより生成した。得られたPCR産物(約0.75Kbp)を、Nde I及びXho I制限酵素を使用して、pET22プラスミド(Novagen)にクローニングし、プラスミドpPMI-2-GyrA及びpPMI-3-GyrAを作製した。これらの構造物において、生合成前駆体タンパク質のための遺伝子コード化は、IPTG誘導可能なT7プロモーターの制御下にある。pPMI-2-GyrA(またはpPMI-3-GyrA)と、パラアセチルフェニルアラニン(pAcF)でアンバー終止コドンを抑制する報告済みのMj-tRNA<sub>CUA</sub>/アミノアシル-tRNAシンターゼ対(Wang, Zhangら 2003)をコードするpEVOLベースのベクターとをBL21(DE3)大腸菌細胞に共形質転換し、前駆体タンパク質を発現させた。タンパク質の発現は記載(Frost, Vitaliら 2013)のように実施された。発現後、上記に記載したようにNiアフィニティークロマトグラフィでタンパク質を精製した。単離されたタンパク質の同一性をMALDI-TOF及びSDS-PAGEによって確認した。MS分析は、精製されたタンパク質において、最初のメチオニンが完全に切断していることを示した。 30 40

## 【0246】

大環状ペプチドミメティックの合成及び単離。図10の化合物P3~P9を、前駆体タンパク質PMI-2-GyrA(またはPMI-3-GyrA)と適切な合成前駆体(SP6、SP8またはSP4)との間の大規模大環状化反応によって調製した。通常の反応では、タンパク質(200μM、リン酸カリウム50mM、NaCl 150mMの緩衝液(pH7.5)中)を10mMの合成前駆体及び10mMのTCEP(総量:6mL) 50

と混合した。30時間後、反応混合物のpHを8.5に調整し、ヨードアセトアミド(15 mM)と共に1時間培養して遊離チオール基をキャップした。反応物質を4000×gで2分間、遠心分離し、その後上清(a)をペレットから分離した。ペレットを20%のアセトニトリル/H<sub>2</sub>O中に再懸濁させ、数分間ボルテックスして大員環生成物を溶解させた後、4000×gで2分間、遠心分離して上清(b)を得た。上清(a及びb)を混合して、10カラムボリューム(CV)のMeOH、10CVのアセトニトリル及び10CVの水にて前洗浄した固相抽出C<sub>18</sub>カラムに加えた。大員環生成物を10%~80%のアセトニトリル水溶液の勾配を利用して溶出した。溶出した大員環を更に、25℃に維持したGrace Smart RP C18カラム(250×4.6 mm, 5 μm)、流量0.9 mL/分、A:水+0.1%TEA及びB:アセトニトリル+0.1%TFAからなる二成分移動相系、ならびに10%~90%の溶媒Bによる直線的濃度勾配(12分)を用いてHPLCにより精製した。単離した大員環の同一性をLC-MS及びMS/MSによって確認した。全ての大員環生成物の質量を以下の表に列挙する。

【表4-1】

大員環	質量計算値 [M + H] <sup>+</sup>	質量実測値 [M + H] <sup>+</sup>
P 3	1718.5	1719.1
P 4	1708.9	1708.4
P 5	1637.9	1637.5
P 7	1746.4	1746.2
P 8	1736.9	1737.3
P 9	1608.8*	1608.5*

\*遊離チオール(アセトアミドでアルキル化されない)を意味する

## 【0247】

実施例5. p53大環状ペプチドミメティックの固相合成。

## 【0248】

本実施例は、図3に例示している代表的な方法(実施形態)による、本開示の大環状ペプチドミメティックの調製を示す。

## 【0249】

大環状ペプチドミメティックの合成及び単離。図10のP12~P19の大員環は、最初に安全キャッチ樹脂上での標準的なFmoc固相ペプチド合成によって、対応する非環式前駆体分子をアセンブリし、続いて対応する大員環形成リンカー試薬(すなわちSP8またはSP9、図8)の存在下で、樹脂上または溶液中で環化することにより調製した。簡潔には、SPPS工程の全てのアミノ酸カップリングは、2当量のFmoc保護アミノ酸、カップリング試薬としてHBTU及びHOBT(それぞれ2当量)、ならびに0.4 MのNMM/DMFを使用して1時間で実施した。アミノ酸類似体(すなわち、N-Fmoc保護されたPACF、MACFまたは6CL-Trp)も全て同様に、同一条件を使用してカップリングした。Fmoc基の除去は、20%のピベリジン/DMFを使用して、20分間で実施した。ペプチドは全て、無水酢酸及びDIPPEAを使用してN末端にアセチル化した。工程は全て、遊離アミン検出のためのKaiser標準プロトコルを使用してモニターした。直鎖前駆体分子の形成後、過剰(50当量)のヨードアセトニトリルを用いて、穏やかに振盪しながら一晩処理することによりスルホニアミドリンカーを活性化した。洗浄時に、適切な大員環形成リンカー試薬(すなわち、SP8、SP9またはSP4)単独で、または固体担体からのペプチド切り出し、それに続くS-Nアシル転位(THF、一晩)を促進するため、ベンジルメルカプタンを添加して樹脂に処理を施した。

反応は、ジスルフィド形成を阻止するため T C E P の存在下で行い、M A L D I - T O F M S によってモニターした。環化反応の完了後、T F A ( T F A : トリイソプロピルシリラン : 水 = 9 5 : 2 . 5 : 2 . 5 、 v / v / v ) を用いた処理をペプチドに施して、保護基の全てを除去し、冷ジエチルエーテル中で沈殿させた。粗生成物を引き続きヨードアセトアミド ( 1 時間、 2 0 % の D M S O / 水 ) で処理して、残留チオール基をアルキル化し、R P - H P L C 及び 5 ~ 9 5 % のアセトニトリル水溶液 ( 0 . 1 % の T F A 添加 ) の勾配を使用して 3 0 分にわたり精製した。精製されたペプチドの同一性を M A L D I - T O F M S を使用して確認した ( 表 5 ) 。

## 【 0 2 5 0 】

フルオレセイン ( F I T C ) で標識したペプチドの合成を、N 末端 - A l a がアセチル化の代わりに N 末端に付加されることを除いて同様に実施した。 - A l a から F m o c 保護基を除去して、D M F 中で 2 当量の過剰の D I P E A を使用して F I T C をカップリングした。ペプチドを更に上記と同様に処理した。精製されたペプチドの同一性を M A L D I - T O F M S を使用して確認した ( 表 5 ) 。

## 【 0 2 5 1 】

## 【表 5 】

表 5 : 大環状ペプチドミメティック及び基準となる直鎖ペプチドの E S I - M S データ。

化合物名	計算値 [ M + H ] +	実測値 [ M + N a ] +	
P 1 2	1776.80	1799.02	20
P 1 3	1719.78	1741.87	
P 1 4	1719.78	1741.93	
P 1 5	1710.73	1732.81	
P 1 6	1710.73	1732.87	
P 1 7	1697.74	1719.88	
P 1 8	1697.74	1719.83	30
P 1 9	1620.71	1642.89	
P 1 0	1443.67	1465.76	
P 1 1	1434.63	1456.81	
P 1	1847.89	1869.91	
F I T C - β - A l a - P 1 3	2139.85	2161.96	
F I T C - β - A l a - P 1 5	2130.81	2152.96	
F I T C - β - A l a - P 1 9	2040.79	2062.87	40
F I T C - β - A l a - P 1 0	1863.74	1885.91	
F I T C - β - A l a - P 1	2267.97	2290.03	

## 【 0 2 5 2 】

実施例 6 . インビトロ阻害活性。

## 【0253】

本実施例は、p53とHDM2またはHDMXとの間のタンパク相互作用を阻害する、実施例1に記載したp53大環状ペプチドミメティック分子設計の機能を示す。

## 【0254】

p53とHDM2/Xとの相互作用を阻害するP1～P19の化合物(図10)の能力を、表面プラズモン共鳴(SPR)阻害アッセイを使用して評価した。簡潔には、最初にビオチンをコンジュゲートしたp53<sub>(15-29)</sub>ペプチドをストレプトアビシンでコーティングしたバイオセンサーチップに固定し、一定濃度のHDM2またはHDMXに、阻害剤の濃度を増加させながら添加した。対応する用量反応曲線(図12A～12B)から、化合物の最大半数阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を決定し、図10にまとめた。興味深いことに、これらの研究で、P3及びP4はいずれも非環式相対物P2と比較して、HDMX(P4)に対して、またはHMD2及びHDMX(P3)の両方に対して約2分の1のIC<sub>50</sub>を示し、改善された阻害活性を有することが明らかになった。加えて、SP4をベースとする大員環P5が非常に弱い阻害(IC<sub>50</sub> 10 μM)を示したことから、予測されたように合成リンカーの長さと標的の側鎖-C末端の架橋距離との間の不一致が有害な影響を及ぼすことが示された。10

## 【0255】

i/i+10(CO)で連結された大員環P7及びP8は、P3及びP4と比較して、HMD2/Xとのp53相互作用を阻害する大幅に改善された能力を示した(図10)。対応する大員環の結合特性に対する非ペプチド性リンカー型の顕著な効果も明らかだった。特に、SP4を含むP9は、HDM2またはHDMXに対してごくわずかな阻害活性しか所有しないことがわかった(IC<sub>50</sub>>50 μM)。これにより、「距離不一致」のSP4を介する環化は、組み込みPMI誘導ペプチド配列による生物活性のヘリックス状配座との適合を強く妨げることが確認された。顕著な対照として、「距離一致」のSP6の存在下では、非常に高い阻害活性が観察され、両方のタンパク質同族体に対してマイクロモル以下のIC<sub>50</sub>値を有する化合物をもたらした。興味深いことに、P7のトリアゾール単位をP8のアルキル鎖に置き換えるだけで、HDM2(IC<sub>50</sub>: 110対475 nM)及びHDMX(IC<sub>50</sub>: 340対910 nM、図10)の両方に対する阻害活性が更に有意に(3倍～4倍)改善された。興味深いことに、リンカーの性質は、2つのタンパク質同族体に対する化合物の選択性にも影響を及ぼすことがわかった。実際、拘束性のないペプチドP6は、HDMXよりもHDM2に対して強い選択性を有するが、大環状相対物及び特にP7は、むしろ等能性の二重阻害剤として挙動する(IC<sub>50</sub>(HDMX)/IC<sub>50</sub>(HDM2)=5.5対1.9)。20

## 【0256】

最も有望な大員環P8を出発物質として、大員環に包含されるペプチド配列を更に短縮及び修飾することにより、この化合物のHDM2/X阻害活性の更なる最適化を達成した(例えば、P15のIC<sub>50</sub>が2分の1に低下、図10)。代わりのリンカー(例えば、SP9対SP8)ならびに側鎖テザリングのための代わりのアミノ酸類似体(例えば、mAcF対pAcF)を有する大員環でも、HDM2及びHDMXに対する強力な阻害剤が得られ(IC<sub>50</sub><200 nM)、基準となる直鎖p53誘導ペプチドP1と比較して、これらのタンパク質に5倍～10倍高い親和性を示した。概してこれらの結果は、標的ヘリックス媒介性のタンパク質-タンパク質相互作用の強力な阻害剤の開発に対する、本明細書に記載する方法の有用性及び多用性を示している。40

## 【0257】

HMD2及びHMDXタンパク質のクローニング、発現及び精製。ヒトHDM2(残基1～109)及びヒトHDMX(残基1～109)のp53結合ドメインをコードする遺伝子を、pET22ベクター(Novagen)にクローニングした。HDM2遺伝子のPCR增幅用テンプレートは、プラスミドpGEX-4T MDM2 WT(Addgene #16237)であった(Zhou, Liaoら 2001)。最終的なプラスミド構造物(pET22-HDM2-YFP-His及びpET22-HDMX-YFP-H)50

i s ) では、C末端H i sタグを含む黄色蛍光タンパク質( Y F P )にH D M 2 / Xタンパク質をC末端融合した。Y F Pタンパク質との融合は、タンパク質構造物の溶解性及び安定性を改善することがわかった。H D M 2 - Y F P 及びH D M X - Y F P 融合タンパクを単離するために、p E T 2 2 - H D M 2 - Y F P - H i s 及びp E T 2 2 - H D M 2 - Y F P - H i s プラスミドをそれぞれB L 2 1 ( D E 3 )細胞に形質転換させ、続いてアンピシリン( 5 0 m g L <sup>-1</sup> )を含有するL B 培地にプレーティングし、一晩増殖させた。一晩培養物を用いて5 0 0 m L のL B 培土( 5 0 m g L <sup>-1</sup> のアンピシリン)に播種し、これをO D <sub>6 0 0</sub> 値約0 . 6 で0 . 5 m M のI P T G を加えて誘導し、2 7 で1 6 時間培養した。細胞を遠心分離により採取し、音波処理により溶解させた。上清の溶解液をN i - N T A アフィニティーカラム上に充填し、タンパク質を5 0 m M のトリス、1 5 0 m M のN a C l 、3 0 0 m M のイミダゾール( p H 7 . 4 )を用いて溶出した。緩衝液をリン酸カリウム5 0 m M 、N a C l 1 5 0 m M の緩衝液( p H 7 . 5 )に交換した後、タンパク質溶液のアリコートを- 8 0 で保存した。タンパク質濃度を、タンパク質の一次配列に基づいて算出された吸光係数2 8 0 n m ( <sub>2 8 0</sub> )を使用して測定した。単離されたタンパク質の同一性をM A L D I - T O F 及びS D S - P A G E によって確認した。  
。

#### 【 0 2 5 8 】

阻害アッセイ。表面プラズモン共鳴( S P R )による阻害アッセイを、B I A c o r e T 1 0 0 測定器を使用して実施した。最初に、ストレプトアビシンをコーティングしたバイオセンサーチップ( S A チップ、G E H e a l t h c a r e )上に、約5 0 0 R U のビオチン化したp 5 3ペプチド( ビオチン - S G S G - p 5 3 <sub>1 5 - 2 9</sub> )を固定化することにより、H D M 2 / X 結合表面を生成した。ランニングバッファー及びサンプルバッファーは、1 5 0 m M のN a C l 、3 m M のE D T A 及び0 . 0 5 % v / v のT w e e n 2 0 を含む、1 0 m M のH E P E S 緩衝液( p H 7 . 4 )を含有していた。阻害試験のために、一定濃度( 1 5 0 n M )の精製されたH D M 2 - Y F P またはH D M X - Y F P に阻害剤の濃度を増加させながら添加し、その混合物を官能化表面上に注入した。阻害剤の濃度の増加に応じて、H D M 2 ( またはH D M X )と表面との結合が阻害され、それに伴いバイオセンサーの反応は減少する。阻害剤サンプルを加えたH D M 2 / H D M X を、2 分の解離期間及び1 0 m M のH C l を使用した1 0 秒の再生工程ごとに、2 分間隔で速度3 0 u L / m i n で注入した。p 5 3 コーティング面での反応から基準面の反応を減算することにより、阻害剤の濃度ごとの特異的な結合曲線を得た。S i g m a P l o t 1 2 . 5 ソフトウェアを用いてデータを分析し、ある部位の競合的結合についてシグモイドプロットとヒルの式との相関からI C <sub>5 0</sub> 値を導出した。

#### 【 0 2 5 9 】

実施例7 . H D M 2 結合試験。

#### 【 0 2 6 0 】

H D M 2 結合試験。選択された大員環( 例えば、P 8 )及び基準となる直鎖p 5 3 <sub>( 1 5 - 2 9 )</sub> ペプチド( P 1 )のH D M 2 に対する直接結合について、蛍光偏光アッセイを使用して平衡解離定数( K <sub>D</sub> )を測定した。結合試験のために、-アラニンリンカーを介して大員環またはペプチドのN末端にフルオレセインを取り付けることによって( すなわちF I T C - - A l a - P 8 、F I T C - - A l a - P 1 )、各化合物の蛍光標識誘導体を調製した。このアッセイでは、2 5 ~ 2 0 0 n M のフルオレセイン標識化合物、及び1 0 n M ~ 2 μ M の範囲で濃度変化するH D M 2 を試験した。実験は、1 % のD M S O を添加した、最終容量7 5 μ L のP B S 緩衝液を入れた9 6 ウェル黒色プレートにて室温で実施した。4 7 0 / 5 2 0 n m での蛍光の励起 / 放出を検出し、変化するタンパク質濃度に対する蛍光偏光の変化をプロットした。これらの試験は、大環状ペプチドミメティックの多数が強力にH D M 2 と結合することを示した。例えば、P 8 は6 3 n M の推定K <sub>D</sub> でH D M 2 と結合すると判定され、これは直鎖p 5 3 <sub>( 1 5 - 2 9 )</sub> ペプチドと比較して( K <sub>D</sub> 約5 5 0 n M )、1 衡高い親和性に相当する。

#### 【 0 2 6 1 】

10

20

30

40

50

### 実施例 8 . 大環状ペプチドミメティックの ヘリックス。

#### 【 0 2 6 2 】

ペプチドの配座特性に対する大環化の影響を検討するために、円二色性 ( C D ) 分析を、代表的な大環状化合物 ( P 7 及び P 8 ) に対して、ならびに対照としての直鎖ペプチド P 6 に対して実施した ( 図 1 3 A ) 。ペプチド P 6 は、ヘリックス状配座の存在と一致する、 2 2 2 nm 及び 2 0 8 nm で最低値を示すことを見出した。ペプチドの ヘリックス含有量は約 3 1 % であると推定された。 S P 6 ( P 7 ) を有するこの配列の環化は、ヘリックス性の増加 ( 4 0 % ) をもたらし、対して P 8 は、組み込みペプチド配列において ヘリックス含有量のわずかな減少 ( 2 1 % ) を示した。総合すると、これらの試験は、ヘリックス状モチーフに適応する大環状ペプチドミメティックの能力、及び特定の場合において ヘリックス状モチーフを安定化させる大環状ペプチドミメティックの能力を示している。ヘリックス性とインビトロ阻害活性との間に厳密な相関関係がないことは驚くべきことではない。その理由は、 H D M 2 / X 結合分子の結合特性には、リンカー部分とタンパク質表面との潜在的相互作用 ( Brown , Quahら 2 0 1 3 ) を含む、追加の要因が影響し得るためである ( Bernal , Wadeら 2 0 1 0 、 Muppidi , Wangら 2 0 1 1 ) 。

#### 【 0 2 6 3 】

円二色性試験。 0 . 1 cm 経路長のキュベットを使用した J A S C O J - 7 1 0 C D 分光偏光計を用いて、室温にて C D スペクトルを記録した。精製したペプチドを、 4 0 % トリフルオロエタノールを含有する 5 mM のリン酸カリウム緩衝液 ( pH 7 . 0 ) 中に溶解させ、最終濃度を 2 0 ~ 5 0 μ M にした。 1 9 5 ~ 2 5 0 nm の波長範囲で、速度 1 0 nm / 分、応答時間 1 . 0 秒、及び解像度 0 . 5 nm にて記録された 2 スキャンのスペクトルを平均した。帯域幅は 2 . 0 nm に設定し、分光計の感度は 1 0 0 m d e g に設定した。平均残基構造率を波長に対してプロットし、各ペプチドのヘリックス含有量を以下の式に基づいて導出した : n をペプチド結合数とした場合、 [ ]<sub>2 2 2</sub> / [ 4 0 0 0 0 × ( n - 4 ) / n ] ( Johnson 及び Tinoco 1 9 7 2 ) 。

#### 【 0 2 6 4 】

### 実施例 9 . 大環状ペプチドミメティックのタンパク分解安定性。

#### 【 0 2 6 5 】

本明細書に記載する方法によるペプチドベースの分子の大環化から想定される潜在的利点は、タンパク分解安定性の増強である。直鎖ペプチド P M I は、インビトロでは効率が高いにも関わらず、急速なタンパク質分解に部分的に起因し、細胞によるアッセイで効果がないことが実際に見出された ( Pazgier , Liuら 2 0 0 9 ) 。 p 5 3 大環状ペプチドミメティックのタンパク分解安定性を評価するために、代表的な大員環 P 7 及び P 8 を、基準となる直鎖ペプチド P 6 と共に、キモトリプシンの存在下で培養した ( 図 1 3 B ) 。 P 6 は急速なタンパク質分解を受け、元のペプチドはわずか 3 0 分後に検出不能になることがわかった。対照的に、大環状ペプチド P 7 及び P 8 は、プロテアーゼによる最大 3 及び 4 時間の培養にも生存し、それぞれ非環式相対物と比較して 1 0 倍 ~ 1 5 倍長い半減期を示した。これらのデータから、タンパク質分解に対する増加した耐性をこれらの化合物に与える、有益な分子内結合の効果が明示された。 S P 6 ベースのリンカーが S P 8 ベースのリンカーと比較して、ヘリックスの安定化とタンパク質分解耐性の両方に關して良好なパフォーマンスをいかに提供するかも言及すべき興味深い点であった。これは、 S P 8 よりも S P 6 の配座柔軟性が減少することと関連し得る。

#### 【 0 2 6 6 】

タンパク分解耐性の分析。 1 5 0 mM の N a C l 及び 1 0 % の D M S O を含有する 5 0 mM のリン酸カリウム緩衝液 ( pH 7 . 5 ) 中に、各ペプチド ( 1 0 μ M ) を溶解させた。キモトリプシン ( Sigma - Aldrich ) を最終濃度 1 . 0 μ g / mL となるよう添加して、室温で培養した。各時点で、混合物の 5 0 μ L アリコートを除去し、 T F A ( 5 μ L ) を添加してクエンチした後、 H P L C 分析を行った。完全体のペプチドと比較したピーク面積の減少に基づいて、ペプチドの切断をモニターした。実験は、少なくと

も2回実施した。25に維持したGrace Smart RP C18カラム(250×4.6mm、5μm)、流量0.9mL/分、A：水+0.1%TFA及びB：アセトニトリル+0.1%TFAからなる二成分移動相系、ならびに10%~90%の溶媒Bによる直線的濃度勾配(12分)を用いてHPLC分析を実施した。

#### 【0267】

実施例10.大環状ペプチドミメティックの細胞透過特性。

#### 【0268】

本明細書に記載する方法によるペプチドベースの分子の大環化から想定される別の潜在的利点は、細胞透過性の増強である。この態様を検討するために、代表的なp53大環状ペプチドミメティック(フルオレセインをコンジュゲートしたP8)及び対照のフルオレセインをコンジュゲートした直鎖ペプチドP10を、ヒト細胞(HEK-293)と共に培養し、続いて共焦点蛍光顕微鏡にて分析した。図14A~14Bに提示する画像が示すように、直鎖ペプチドは、検出可能なレベルの細胞取り込みを示さなかった。顕著な対照として、大環状化合物P8で処理した細胞は、細胞内レベルで拡散蛍光を示しており、それによって効率的に細胞をする大環状ペプチドミメティック分子の能力を示した。図10に記載されている他のp53大環状ペプチドミメティック分子でも同様の結果を得た。

10

#### 【0269】

細胞透過性アッセイ。大環状ペプチドミメティック及び参照の直鎖ペプチドの細胞透過性特性をHEK-293細胞株を使用して評価した。10%のウシ胎児血清及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM培地で、これらの細胞を培養した。細胞透過性評価のために、24ウェルの組織培養用処理済みガラス底プレートに細胞を一晩留置した(1×104細胞/ウェル)。PBS洗浄の後、20μM濃度のフルオレセインをコンジュゲートしたP8または対照のフルオレセインをコンジュゲートした直鎖ペプチドP10を含有する還元血清培地(DMEM-RS)を細胞に添加して、2時間培養した。共焦点撮影の前に、細胞をPBSにて洗浄し、PBS中の2%パラホルムアルデヒドで固定して、核染色DAPIで染色した。

20

#### 【0270】

実施例11.大環状ペプチドミメティックの抗癌活性。

#### 【0271】

ヒト癌細胞の生存性を低減するp53大環状ペプチドミメティック分子の能力を調査するために、HMD2の異常な過剰発現によりp53/HDM2/HDMX経路の調節不全を呈する、SJS A-1骨肉腫細胞を使用して更なる活性試験を実施した。図15に提示された生存率曲線が示すように、SJS A-1細胞の生存性は、基準となる直鎖ペプチドP10による治療時には検出可能な減少を示さなかった。対照的に、p53大環状ペプチドミメティックP8によるこれらの細胞の治療時には、細胞生存性の減少をもたらした。このことは、この化合物のp53依存的なアポトーシス経路の再活性化による癌細胞殺傷能力を示している。図10に記載されている他のp53大環状ペプチドミメティック分子でも同様の結果が得られ、LD<sub>50</sub>は低マイクロモルの範囲内であった。p53-HDM2阻害に対する細胞応答性を、HDM2の既知の強力な、かつ細胞透過性の小分子阻害剤であるnutlin-3と平行した実験において確認した。

30

#### 【0272】

細胞生存性アッセイ。10%のウシ胎児血清を補充したRPMI-1640培地の中で、培養されたSJS A-1細胞を維持した。生存性評価のために、96ウェルの組織培養用処理済みプレート(2×104細胞/ウェル)に細胞を入れ、一晩培養した。PBS洗浄後に、様々な濃度のnutlin-3、大環状ペプチドミメティック化合物、または基準となる直鎖ペプチドのうちのいずれかを引き続き添加した。細胞を一晩処理し、標準的なMTT(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド)アッセイによって生存性を評価した。生存性は未処置の細胞の生存性との比率で表す。

40

#### 【0273】

50

上記で開示された、ならびにそれ以外の特徴及び機能の変形またはそれらの代替を多くの他の異なるシステムまたは用途と組み合わせて良いことが理解されよう。現時点での予測または予期されない、本開示に関する種々の代替、改変、変形または改善を後に当業者によって行うことができるが、これらもまた以降の特許請求の範囲に包含されるものとする。

#### 【0274】

本開示の実施形態を具体的に示し、特定の例及び特徴について説明したが、細部に対する種々の変更が、記載された説明及び図面によって立証できる特許請求の範囲によって規定される本開示の趣旨及び範囲から逸脱することなくなされ得ることを当業者は理解されよう。更に、一定数の要素に関して例示的実施形態が記載されている場合、一定数未満または一定数超の要素いずれを利用しても例示的実施形態を実施できることが理解されよう。

#### 【0275】

本明細書で引用される全ての参考文献は、個別の刊行物、特許または特許出願がそれぞれ具体的かつ個別にその全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれた場合と同様に、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0276】

いかなる刊行物の引用も、提出日に先立つその開示のためであり、本発明が先行発明を理由としてこのような刊行物に先行する権利を与えられないことを容認するものとは見なされない。

#### 参考文献

Bernal, F., M. Wadeら(2010). Cancer Cell 18(5): 411-422.

Blackwell, H. E. 及び R. H. Grubbs(1998). Angew. Chem. Int. 版 37(23): 3281-3284.

Brown, C. J., S. T. Quahら(2013). ACS Chem. Biol. 8(3): 506-512.

Brunel, F. M. 及び P. E. Dawson(2005). Chem. Commun. (20): 2552-2554.

Dias, R. L. A., R. Fasanら(2006). J. Am. Chem. Soc. 128(8): 2726-2732.

Driggers, E. M., S. P. Haleら, (2008). Nat Rev Drug Discov 7(7): 608-624.

Fairlie, D. P., J. D. A. Tyndallら(2000). J. Med. Chem. 43(7): 1271-1281.

Frost, J. R., F. Vitaliら(2013). Chembiochem 14(1): 147-160.

Henchey, L. K., A. L. Jochimら(2008). Curr. Opin. Chem. Biol. 12(6): 692-697.

Henchey, L. K., J. R. Porterら(2010). Chembiochem 11(15): 2104-2107.

Hu, B., D. M. Gilkesら(2006). J. Biol. Chem. 281(44): 33030-33035.

Jackson, D. Y., D. S. Kingら(1991). J. Am. Chem. Soc. 113(24): 9391-9392.

Jo, H., N. Meinhhardtら(2012). J. Am. Chem. Soc. 134(42): 17704-17713.

Jochim, A. L. and P. S. Arora(2009). Mol. Biosyst. 5(9): 924-926.

Johnson, W. C., Jr. 及び I. Tinoco, Jr. (1972). J. A 50

10

20

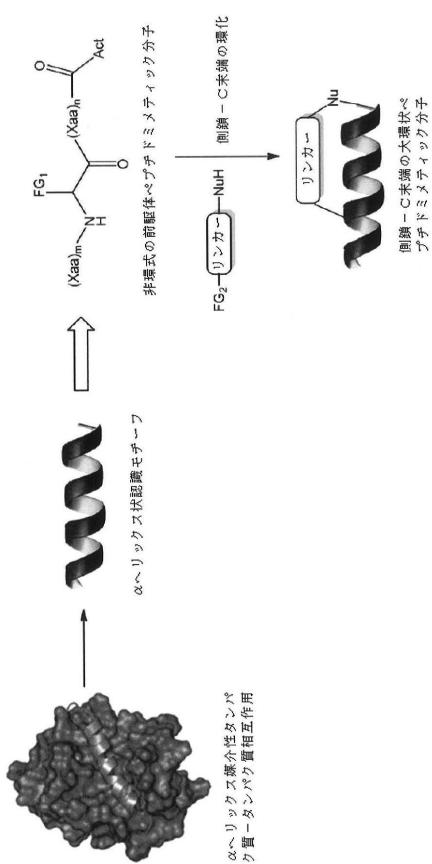
30

40

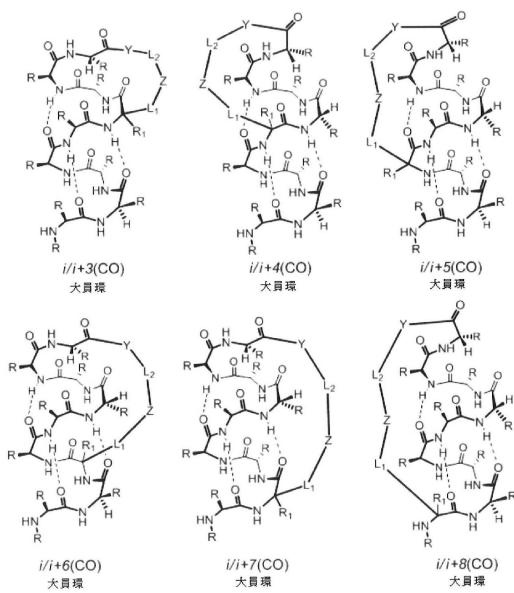
- m. Chem. Soc. 94 (12) : 4389 - 4392.
- Katsara, M., T. Tselliosら(2006). Curr Med. Chem. 13 (19) : 2221 - 2232.
- Kawamoto, S. A., A. Coleskaら(2012). J. Med. Chem. 55 (3) : 1137 - 1146.
- Kussie, P. H., S. Gorinaら(1996). Science 274 (5289) : 948 - 953.
- Marine, J. C., M. A. Dyerら(2007). J. Cell. Sci. 120 (Pt 3) : 371 - 378.
- Marsault, E. and M. L. Peterson(2011). Journal of Medicinal Chemistry 54 (7) : 1961 - 2004. 10
- Muppidi, A., Z. Wangら(2011). Chem. Commun. 47 (33) : 9396 - 9398.
- Obrecht, D., J. A. Robinsonら(2009). Current Medicinal Chemistry 16 (1) : 42 - 65.
- Osapay, G. 及び J. W. Taylor(1992). J. Am. Chem. Soc. 114 (18) : 6966 - 6973.
- Pazgier, M., M. Liuら(2009). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (12) : 4665 - 4670.
- Popowicz, G. M., A. Czarnaら(2008). Cell Cycle 7 (15) : 2441 - 2443. 20
- Popowicz, G. M., A. Czarnaら(2007). Cell Cycle 6 (19) : 2386 - 2392.
- Rezai, T., J. E. Bockら(2006). Journal of the American Chemical Society 128 (43) : 14073 - 14080.
- Rezai, T., B. Yuら(2006). Journal of the American Chemical Society 128 (8) : 2510 - 2511.
- Schafmeister, C. E., J. Poら(2000). J. Am. Chem. Soc. 122 (24) : 5891 - 5892. 30
- Scrima, M., A. Le Chevalier - Isaadら(2010). Eur. J. Org. Chem. (3) : 446 - 457.
- Spokoyny, A. M., Y. Zouら(2013). J. Am. Chem. Soc. 135 (16) : 5946 - 5949.
- Tang, Y. Q., J. Yuanら(1999). Science 286 (5439) : 498 - 502.
- Wade, M., E. T. Wongら(2006). J. Biol. Chem. 281 (44) : 33036 - 33044.
- Wahl, G. M. 及び M. Wade(2009). Mol. Cancer Res. 7 (1) : 1 - 11. 40
- Walensky, L. D., A. L. Kungら(2004). Science 305 (5689) : 1466 - 1470.
- Wang, D., W. Liaoら(2005). Angew. Chem. Int. Ed Engl. 44 (40) : 6525 - 6529.
- Wang, D., W. Liaoら(2005). Angew. Chem. Int. Ed. 44 (40) : 6525 - 6529.
- Wang, L., Z. Zhangら(2003). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (1) : 56 - 61.
- Zhang, F. Z., O. Sadovskিら(2007). J. Am. Chem. Soc. 129 (46) : 14154 - 14155. 50

Z h o u , B . P . , Y . L i a o l a ( 2 0 0 1 ) . N a t C e l l B i o l 3 ( 1 1 ) : 9 7 3 - 9 8 2 .

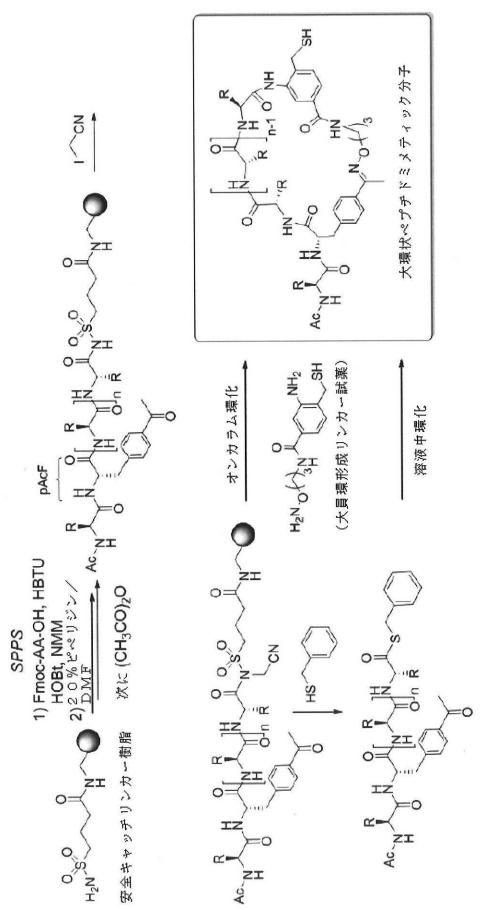
【図1】



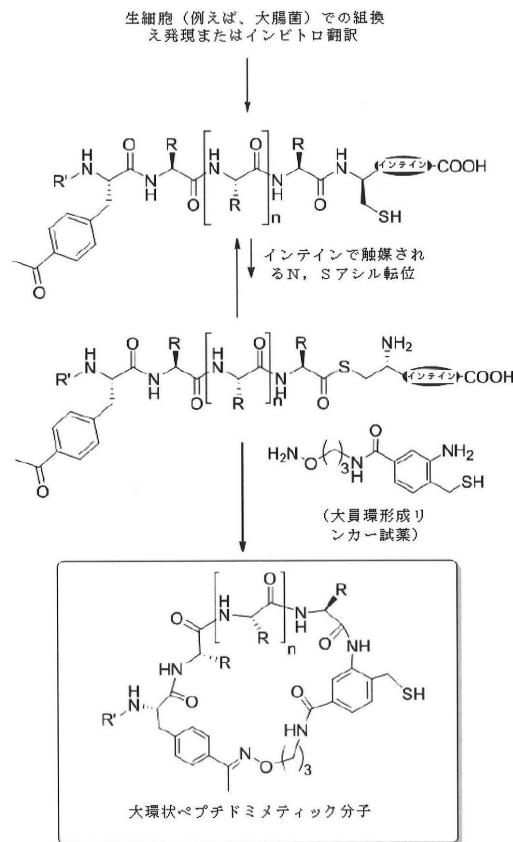
【図2】



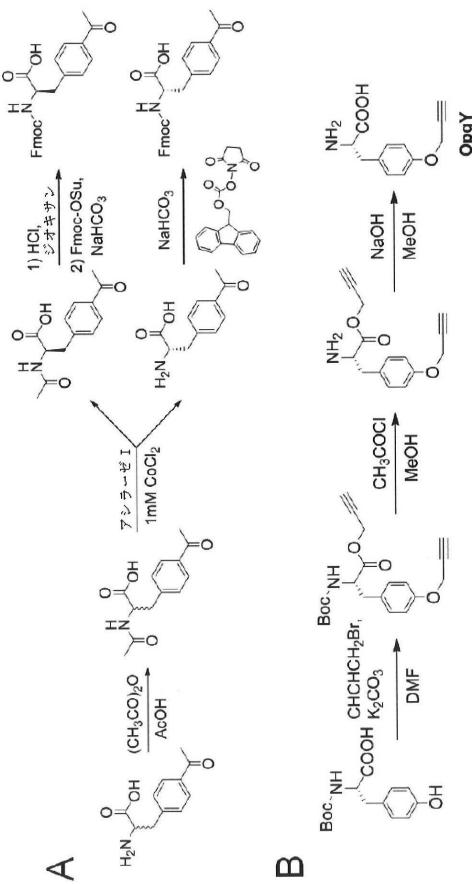
【図3】



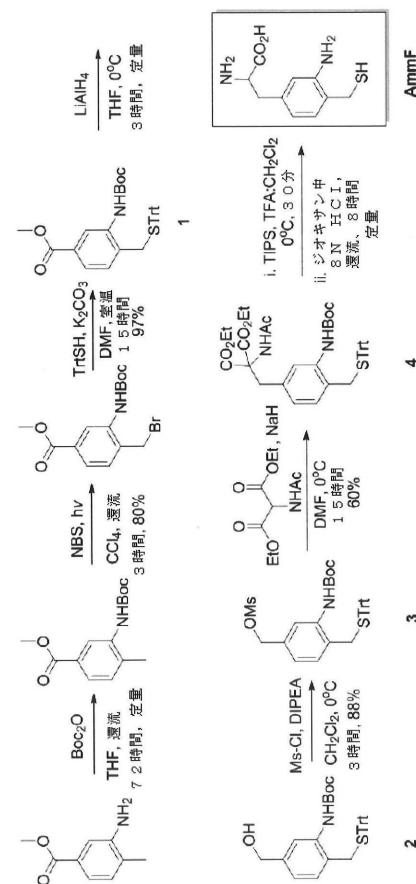
【図4】



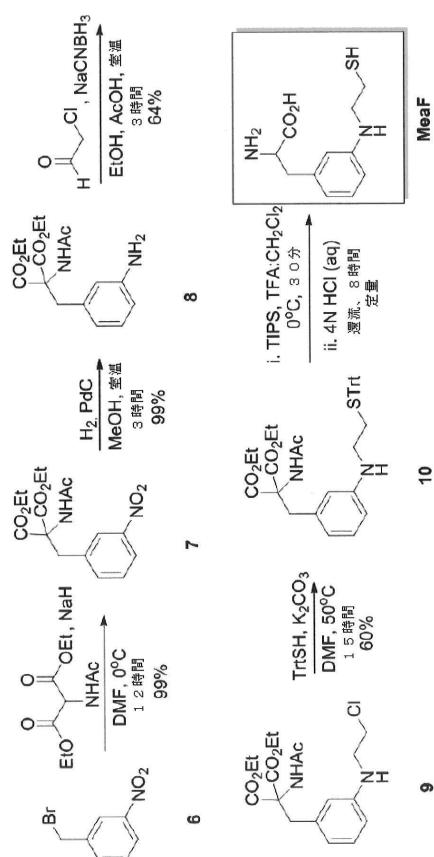
【図5 A - 5 B】



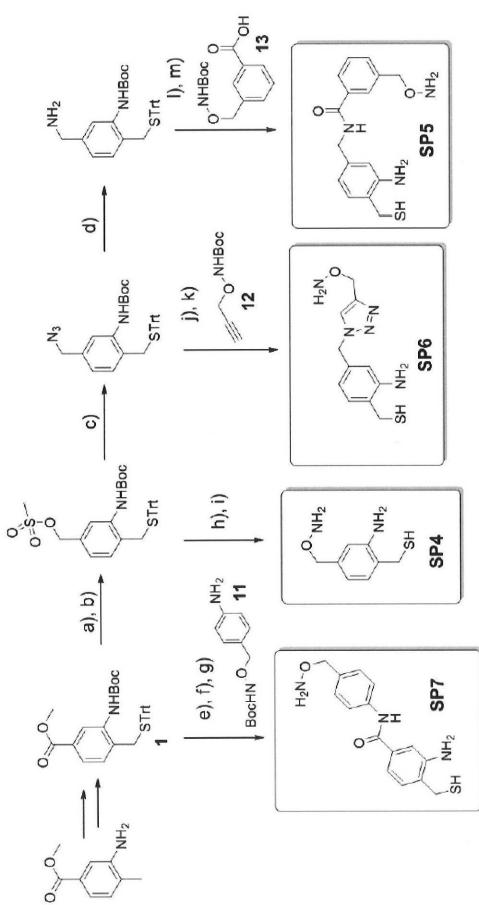
【図5 C】



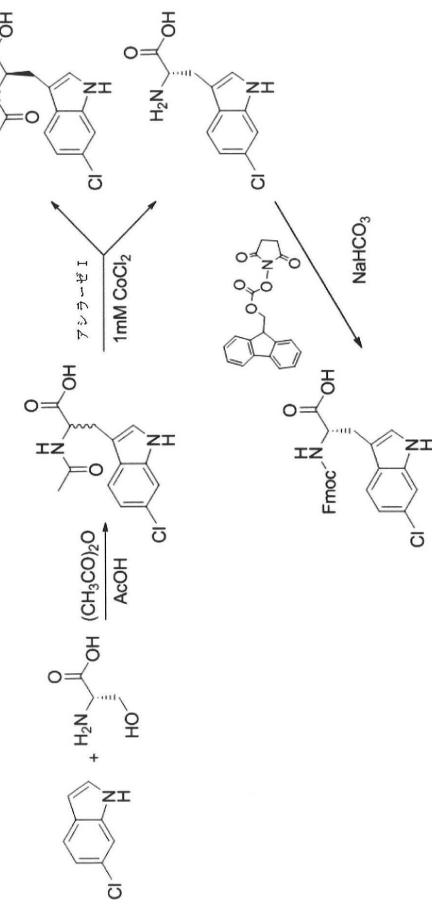
【図 5 D】



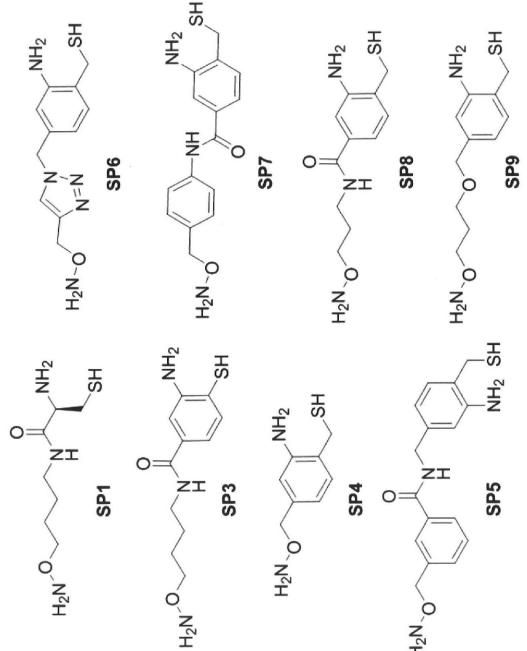
【図 7 D】



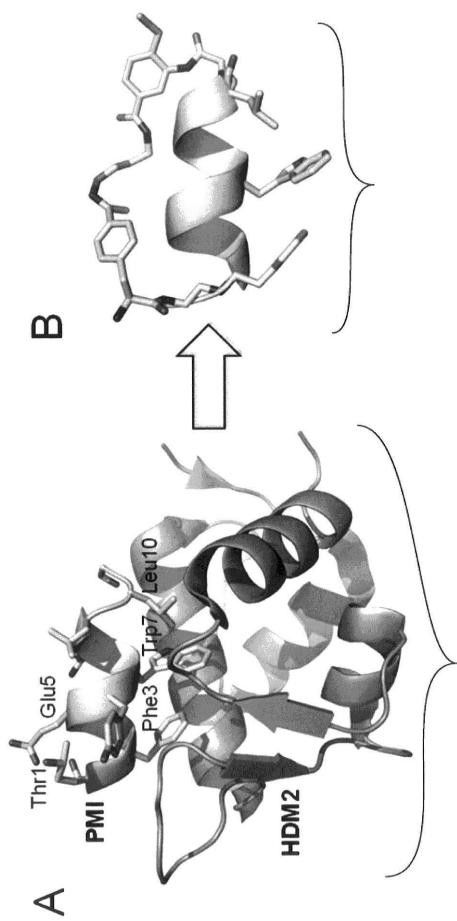
【図 6】



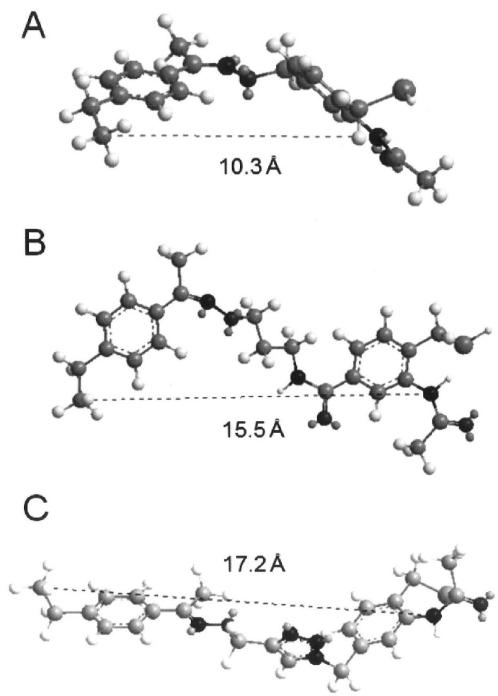
【図 8】



【図 9 A - 9 B】



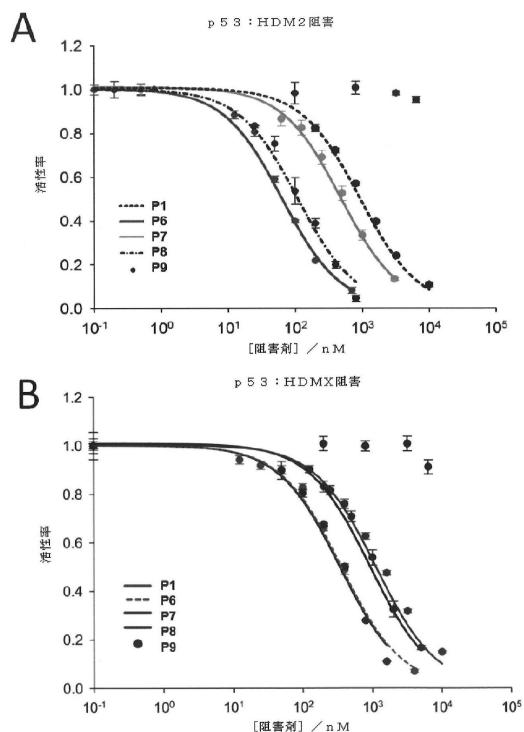
【図 11 A - 11 C】



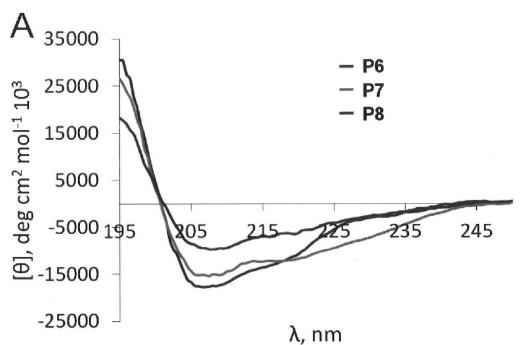
【図 10】

名称	配列	架橋	HDM2 IC <sub>50</sub> [nM]	HDMX IC <sub>50</sub> [nM]
P1	H-SQETFSDLWKLPPEN-NH <sub>2</sub>	直鎖	920	1,200
P2	Ac-GTSAFYYWNLLA NH <sub>2</sub>	直鎖	1,510	7,500
P3	H-GTSFA(pAcF) <sub>2</sub> YWNLLA	i/i+6(CO)	870	4,100
P4	H-GTSFA-pAcF(YWNLLA)	i/i+6(CO)	1,500	3,500
P5	H-GTSFA-pAcF(YWNLLA)	i/i+6(CO)	10,000	ND
P6	Ac-GYSFAEYWNLPA-NH <sub>2</sub>	直鎖	65	355
P7	H-G(pAcF)SFAEYWNLPA	i/i+10(CO)	475	910
P8	H-G(pAcF)SFAEYWNLPA	i/p+10(CO)	110	340
P9	H-G(pAcF)SFAEYWNLPA	i/i+10(CO)	>50,000	>50,000
P10	Ac-(pAcF)SFAEYWNLPA-NH <sub>2</sub>	直鎖	110	
P11	Ac-(pAcF)SFAEY(6CIW)ALLA-NH <sub>2</sub>	直鎖	30	
P12	Ac-G(pAcF)SFAEYWNLPA	i/i+10(CO)	145	
P13	Ac-(pAcF)SFAEYWNLPA	i/i+10(CO)	135	
P14	Ac-(mAcF)SFAEYWNLPA	i/i+10(CO)	255	
P15	Ac-(pAcF)SFAEY(6CIW)ALLA	i/i+10(CO)	50	
P16	Ac-(mAcF)SFAEY(6CIW)ALLA	i/i+10(CO)	105	
P17	Ac-(pAcF)SFAEY(6CIW)ALLA	i/i+10(CO)	305	
P18	Ac-(mAcF)SFAEY(6CIW)ALLA	i/i+10(CO)	400	
P19	Ac-(pAcF)SFAEY(6CIW)ALLA	>i/i+10(CO)	>50,000	

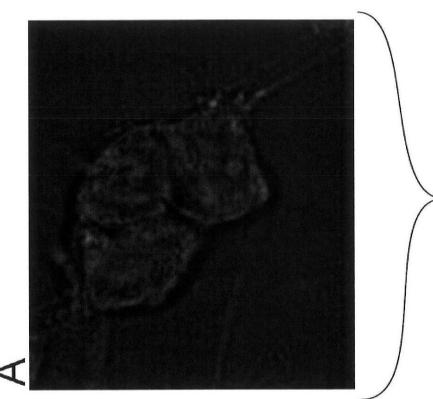
【図 12 A - 12 B】



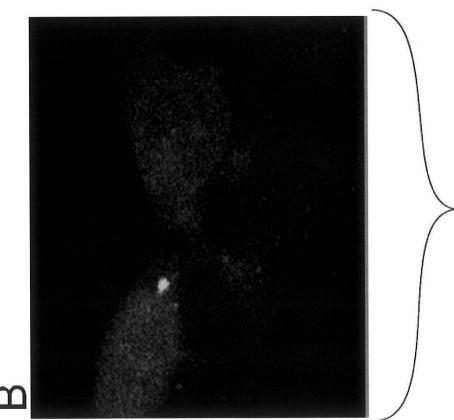
【図 1 3 A - 1 3 B】



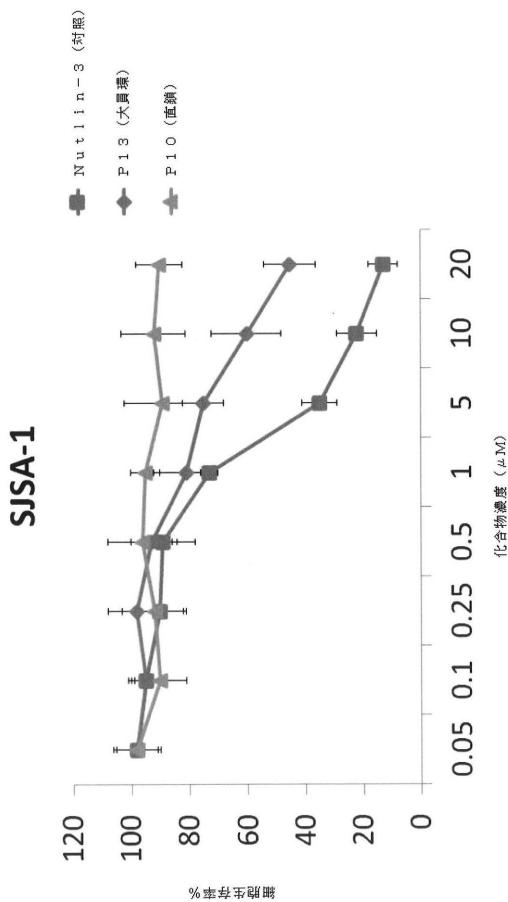
【図 1 4 A】



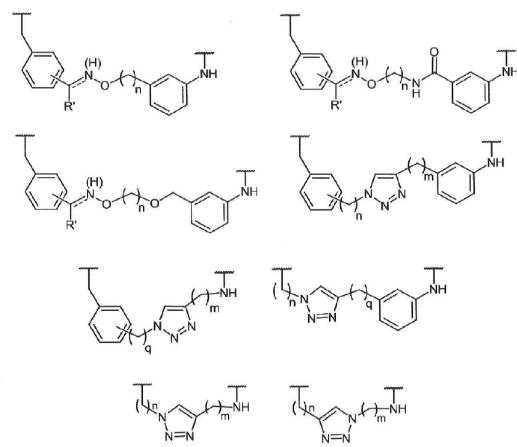
【図 1 4 B】



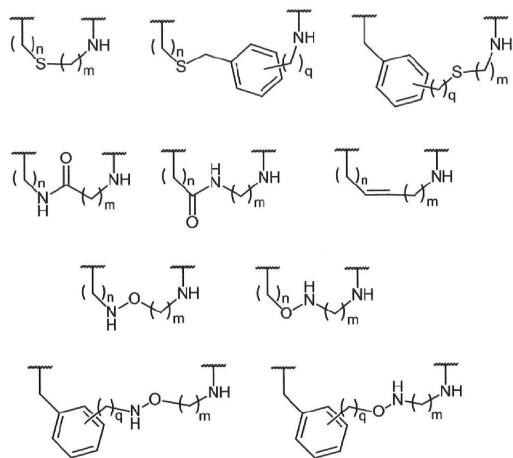
【図 1 5】



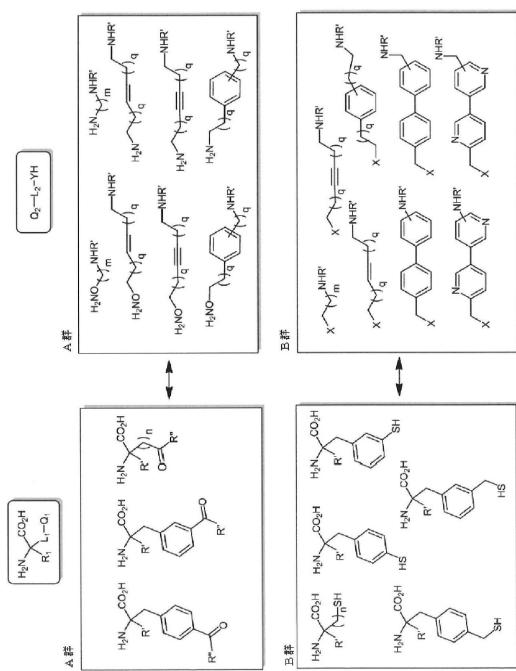
【図 1 6】



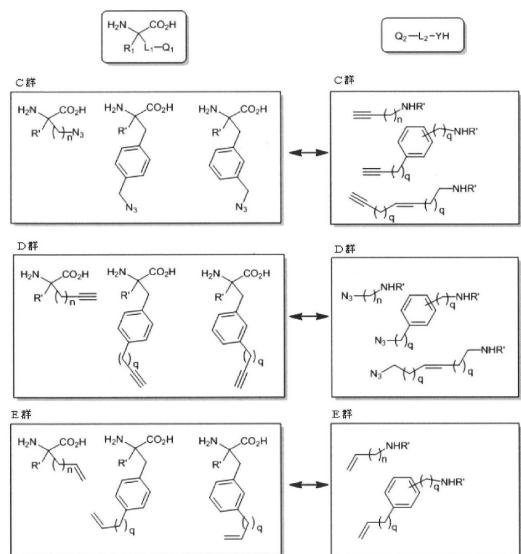
【図17】



【図18】



【図19】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	1/04	(2006.01)
A 6 1 P	1/18	(2006.01)
A 6 1 P	15/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/08	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/10	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
		A 6 1 P    1/04
		A 6 1 P    1/18
		A 6 1 P    15/00
		A 6 1 P    13/08
		A 6 1 P    17/00
		A 6 1 P    25/00
		A 6 1 P    11/00
		A 6 1 P    13/10
		A 6 1 P    35/02
		A 6 1 P    29/00
		A 6 1 P    37/06

審査官 植原 克典

## (56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0330773(US,A1)

特表2013-535514(JP,A)  
 特表2010-513314(JP,A)  
 特表2012-515172(JP,A)  
 特表2012-503025(JP,A)  
 特表2013-505300(JP,A)  
 特表2011-511076(JP,A)  
 Chem. Commun., 2014年 4月 7日, Vol.50, p.5027-5030, S1-11  
 PNAS, 2009年, Vol.106, No.12, p.4665-4670  
 Angew. Chem. Int. Ed., 2011年, Vol.50, p.5075-5080  
 Chem. Commun., 2012年, Vol.48, p.1461-1463  
 ChemBioChem, 2013年, Vol.14, p.147-160

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 K      7 / 00  
 C 12 N      15 / 00 - 15 / 90  
 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 ( S T N )