



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102203126 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 28

(21) 申请号 200980142517. 1

A61K 38/17(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 09. 22

(30) 优先权数据

61/099, 099 2008. 09. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/057931 2009. 09. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02010/034032 EN 2010. 03. 25

(71) 申请人 爱勒让治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 H·M·纳什 M·雅丹扎 C·雷泰瑟

川端 纪之

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 45 页

(54) 发明名称

用于制备纯化的多肽组合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及纯化的拟肽大环化合物。本发明还提供制备和使用这种大环化合物（例如在治疗应用中）的方法。

1. 制备纯化的拟肽大环化合物组合物的方法,包括:
 - a) 使含有至少两个能够发生复分解反应的部分的拟肽前体与含有金属的复分解催化剂接触,以产生粗制的拟肽大环化合物;
 - b) 纯化粗的拟肽大环化合物以得到含有小于 30ppm 重量的金属的纯化拟肽大环化合物组合物。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述纯化步骤包括用 DMSO 洗涤。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述纯化步骤还包括至少两个色谱纯化步骤,例如通过 HPLC。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述纯化步骤不包括结晶。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物组合物含有少于 20、10、5 或 1ppm 重量的金属。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物包含螺旋,例如其中所述螺旋是 α -螺旋。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物包含 BCL-2 族成员的 α -螺旋结构域,例如其中所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物包含表 1、2、3 或 4 中的一序列的至少 60%、70%、80% 或 90%。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物包含将第一氨基酸连接至第二氨基酸的交联连接体。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物包含约 18 个原子到约 26 个原子、或约 29 个原子到约 37 个原子的环。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物在 pH7.4 下携带净正电荷。
12. 权利要求 9 的方法,其中所述第一氨基酸和第二氨基酸由 3 或 6 个氨基酸分隔。
13. 权利要求 9 的方法,其中所述交联连接体包含 6 到 14 个连续的键,或 8 到 16 个连续的键。
14. 权利要求 9 的方法,其中所述交联连接体跨越 α -螺旋的 1 到 5 个圈。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述交联连接体的长度为 α -螺旋的每一圈约 5Å 到约 9Å。
16. 权利要求 9 的方法,其中所述第一或第二氨基酸的 α 位另外被取代。
17. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物包含含有一个或多个治疗剂、卤素、烷基、荧光部分、亲和标记、靶向部分或放射性同位素的部分。
18. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物组合物含有浓度为约 0.5ppm 到约 10ppm 重量的金属。
19. 权利要求 1 的方法,其中所述复分解催化剂包括钨或钼催化剂。
20. 权利要求 1 的方法,其中所述复分解催化剂包含一个或多个取代基,其选自碘、溴、氯、苯基、碳烯、环己基、膦、三环己基膦、咪唑或苯亚甲基。
21. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽前体结合到固体载体上。
22. 权利要求 1 的方法,其中所述复分解催化剂结合到固体载体上。
23. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物组合物包含拟肽大环化合物的药学

可接受的盐,例如盐酸盐或醋酸盐。

24. 权利要求 1 的方法,其中所述拟肽大环化合物组合物可安全地施用于受试者。

25. α -螺旋拟肽大环化合物组合物,含有:

- a) α -螺旋拟肽大环化合物,其包含连接第一氨基酸至第二氨基酸的交联连接体;和
- b) 钨或钼,其浓度为约 0.5ppm 到约 30ppm 重量。

26. 权利要求 25 的组合物,进一步地其中所述氨基酸中的至少一个是 α , α -二取代氨基酸,例如其中所述第一或第二氨基酸是 α , α -二取代的。

27. 权利要求 25 的组合物,其中所述第一氨基酸和第二氨基酸由 3 个氨基酸分隔。

28. 权利要求 27 的组合物,其中所述交联连接体包含 6 到 14 个连续的键,或 8 到 12 个连续的键。

29. 权利要求 25 的组合物,其中所述第一氨基酸和第二氨基酸由 6 个氨基酸分隔。

30. 权利要求 29 的组合物,其中所述交联连接体包含 8 到 16 个连续的键,或 10 到 13 个连续的键。

31. 权利要求 25 的组合物,其中所述交联连接体跨越 α -螺旋的 1 到 5 个圈,例如 α -螺旋的 1 或 2 个圈。

32. 权利要求 31 的组合物,其中所述交联连接体的长度为 α -螺旋的每一圈约 5 Å 到约 9 Å。

33. 权利要求 32 的组合物,其中所述拟肽大环化合物在 pH7.4 下携带净正电荷。

34. 权利要求 25 的组合物,其中所述拟肽大环包含一种或多种治疗剂、卤素、烷基、荧光部分、亲和标记、靶向部分或放射性同位素。

35. 权利要求 25 的组合物,其中所述金属包括复分解催化剂或复分解催化剂的衍生物。

36. 权利要求 35 的组合物,其中所述复分解催化剂包含碘、溴、氯、苯基、碳烯、环己基、膦、三环己基膦、咪唑或苯亚甲基。

37. 权利要求 25 的组合物,包含总浓度小于约 30、20、10、5 或 1ppm 重量的金属。

38. 权利要求 25 的组合物,其中所述拟肽大环化合物包括其药学可接受的盐,例如盐酸盐或醋酸盐。

用于制备纯化的多肽组合物的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 9 月 22 日提交的美国临时申请 No. 61/099,099 的权益,该申请以引用方式合并于此。

背景技术

[0003] 肽在生物过程中是重要的。例如,肽可作为激素、酶抑制剂、底物、神经递质、神经介质以及发挥许多其他功能。肽可以与受体或酶结合并因此影响细胞间通讯和控制重要的细胞功能,例如代谢、免疫防御和繁殖 (Babine 等, Chem. Rev. 1997, 97, 1359)。因此,肽在药物化学中用作治疗剂以及在药物应用中的受到关注。

[0004] 使用未修饰的肽作为治疗剂和药剂受到若干因素的限制。这些限制包括差的代谢稳定性如对肽酶降解的敏感性、差的细胞渗透性和由于构象柔性而缺乏结合特异性。已经描述了改善这些限制特性的尝试,包括通过各种方法产生环肽和拟肽,所述方法包括二硫键形成、酰胺键形成和碳碳键形成 (Jackson 等 (1991), J. Am. Chem. Soc. 113 : 9391-9392 ;Phelan 等 (1997), J. Am. Chem. Soc. 119 :455-460 ;Taylor (2002), Biopolymers 66 :49-75 ;Brunel 等 (2005), Chem. Commun. (20) :2552-2554 ;Hiroshige 等 (1995), J. Am. Chem. Soc. 117 :11590-11591 ;Blackwell 等 (1998), Angew. Chem. Int. Ed. 37 :3281-3284 ;Schafmeister 等 (2000), J. Am. Chem. Soc. 122 :5891-5892)。这些方法仍然受到一些因素的限制,包括差的代谢稳定性 (二硫键和酰胺键)、差的细胞渗透性 (二硫键和酰胺键) 以及潜在毒性金属的使用 (用于碳碳键形成)。尤其是,毒性金属杂质的存在可能对经由需要这种金属 (例如以催化剂形式) 的化学反应制备得到的多肽药物的临床使用形成重大挑战。因此,需要纯化拟肽化合物的方法和通过这类方法产生的纯组合物。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明旨在满足这些和其他需要。在一个方面,本发明提供一种制备纯化的拟肽大环化合物的组合物。在一个实施方式中,该方法包括接触拟肽前体并纯化粗制的拟肽大环化合物以产生纯化的拟肽大环化合物组合物。在该实施方式中,所述拟肽前体可含有至少两个能够与复分解催化剂进行复分解反应的部分,以制备粗的拟肽大环化合物。

[0007] 根据本发明公开的方法纯化的拟肽大环化合物组合物可包含金属。在一个实施方式中,所述组合物含有小于约 75、20、10、5 或 1ppm 重量的金属。在另一个实施方式中,纯化的拟肽大环化合物组合物含有可安全给药予受试者 (例如人类受试者) 的金属浓度。

[0008] 本发明也提供含有拟肽大环化合物 (其含有将第一氨基酸连接至第二氨基酸的交联连接体) 和浓度为约 0.5ppm 至约 1、5、10、20 或 75ppm 重量的金属的组合物。在一个实施方式中,该组合物包含含有将第一氨基酸连接至第二氨基酸的交联连接体的拟肽大环化合物,其中所述氨基酸中的至少一个是 α , α -二取代氨基酸,且进一步其中所述组合物的金属浓度小于约 1、5、10、20 或 75ppm 重量。在相关实施方式中,所述组合物包含交联连接体,其中所述第一氨基酸是 α , α -二取代的。在另一个相关实施方式中,所述组合物包含交联连接体,其中第二氨基酸是 α , α -二取代的。

[0009] 在一些实施方式中,所述拟肽大环化合物含有螺旋、 α -螺旋、BCL-2 家族成员的 α -螺旋结构域、或 BH3 结构域。该拟肽大环化合物可以与表 1、2、3 或 4 中的肽序列同源。在一个实施方式中,该拟肽大环化合物与表 1 中序列之间的同源性可以是至少 60%或至少 80%。

[0010] 拟肽大环化合物优选包括将第一氨基酸连接到第二氨基酸的交联连接体。在一个实施方式中,所述第一氨基酸和第二氨基酸通过三个氨基酸分隔。在另一个实施方式中,所述第一氨基酸和第二氨基酸通过六个氨基酸分隔。

[0011] 在一个实施方式中,所述交联连接体包含 6 至 14 个连续的键。在另一个实施方式中,所述交联连接体包含 8 至 16 个连续的键。在另一个实施方式中,所述交联连接体包含 8 至 12 个连续的键。在另一个实施方式中,所述交联连接体包含 10 至 13 个连续的键。

[0012] 所述拟肽大环化合物优选包含螺旋结构。该螺旋结构可以含有一圈或多圈的 α -螺旋。例如,该交联连接体可包括含有 1 圈、2 圈或更多圈的 α -螺旋。在一个实施方式中,该交联连接体跨越 α -螺旋的 1 到 5 圈。在另一个实施方式中,所述交联连接体的长度为 α -螺旋的每一圈约 5Å 到约 9Å。

[0013] 在交联连接体的一个方面,第一氨基酸或第二氨基酸的 α 位可被取代。在一个实施方式中,第一氨基酸的 α 位被另外取代。在另一个实施方式中,第二氨基酸的 α 位被另外取代。

[0014] 在一个实施方式中,所述拟肽大环化合物含有约 18 个原子到约 26 个原子的环。在另一个实施方式中,所述拟肽大环化合物含有约 29 个原子到约 37 个原子的环。

[0015] 所述拟肽大环化合物可以在比用该拟肽大环化合物治疗的受试者的生理 pH 低或高 5% 的 pH 下带净正电荷。在一个实施方式中,所述拟肽大环化合物在约 7.4 的 pH 下可以带净正电荷。

[0016] 所述拟肽大环化合物可以包含含有一个或多个卤素、烷基、荧光部分、亲和标记、靶向部分或放射性同位素的部分。

[0017] 所述拟肽大环化合物可用作治疗剂。在一个实施方式中,本发明拟肽大环化合物以用于治疗癌症的治疗剂提供。在另一个实施方式中,本发明拟肽大环化合物以处于临床试验评估中的治疗剂提供。

[0018] 本发明的拟肽大环化合物组合物可以含有金属。用于合成拟肽大环化合物组合物的金属的浓度和种类可以改变。用于本发明的金属浓度(按重量计算)的非限制性的例子包括小于约 1ppm、小于约 2ppm、小于约 2.5ppm、约 0.5ppm、约 1ppm、约 10ppm、约 1 到约 5、10、20、75ppm、或约 0.5 到约 5、10、20 或 75ppm。

[0019] 在一个方面,拟肽大环化合物的金属是钪或钇。在一个实施方式中,该组合物含有的钪总浓度小于约 1、5、10、20 或 75ppm 重量。在另一个实施方式中,该组合物含有的钪总浓度为约 0.5ppm 到约 5、10、20 或 75ppm 重量。

[0020] 本发明使用一种或多种复分解反应以制备拟肽大环化合物。在一个实施方式中,复分解催化剂包含钪或钇催化剂。在相关实施方式中,该复分解催化剂包含一个或多个取代基,其是碘、溴、氯、苯基、碳烯、环己基、膦、三环己基膦、咪唑或苯亚甲基。在一个实施方式中,该复分解催化剂结合到固体载体上。

[0021] 本发明拟肽大环化合物组合物可包含赋形剂。在一个实施方式中,该拟肽大环化

合物还含有药学可接受的载体。该拟肽大环化合物组合物可以在有或没有溶剂的情况下以多种形式存在,例如粉末、盐、液体或冻干形式。在一个实施方式中,该拟肽大环化合物组合物包括拟肽大环化合物的药学可接受的盐。该拟肽的药学可接受盐可以包括例如盐酸盐或醋酸盐。

[0022] 以引用方式的合并

[0023] 本说明书提到的所有出版物、专利和专利申请通过引用合并于此,如同具体并单独地指出各单个的出版物、专利和专利申请通过引用合并一样。

[0024] 发明详述

[0025] 定义

[0026] 如本文所使用,术语“大环化合物”指的是具有包括由至少 9 个共价结合的原子形成的环或环形的化学结构的分子。

[0027] 如本文所使用,术语“拟肽大环化合物”或“交联多肽”指的是含有由多个肽键连接的多个氨基酸残基和至少一个大环形成连接体(或者“交联连接体”)的化合物,该大环形成连接体在相同分子内的第一天然存在或非天然存在的氨基酸残基(或类似物)和第二天然存在或非天然存在的氨基酸残基(或类似物)之间形成大环。拟肽大环化合物包括其中大环形成连接体将第一氨基酸残基(或者类似物)的 α 碳连接到第二氨基酸残基(或者类似物)的 α 碳上的实施方式。所述拟肽大环化合物任选地包括一个或多个氨基酸残基和/或氨基酸类似物残基之间的一个或多个非肽键,并且除了形成大环的任何残基之外,任选地包括一个或多个非天然存在的氨基酸残基或氨基酸类似物残基。

[0028] 如本文所使用,术语“稳定性”指的是通过由圆二色光谱、NMR 或其他生物物理学测量测得的本发明拟肽大环化合物在溶液中维持特定的二级结构,或在体外或体内对蛋白水解降解的抗性。本发明预期的二级结构的非限制性例子是 α -螺旋、 β -转角和 β -折叠片。

[0029] 如本文所使用,术语“螺旋稳定性”指的是通过由圆二色光谱或 NMR 测得的本发明拟肽大环化合物维持 α 螺旋结构。例如,在一些实施方式中,相比于缺少 R-取代基的相应大环化合物,由圆二色光谱测定的本发明拟肽大环化合物的 α -螺旋度显示至少 1.25、1.5、1.75 或 2 倍的增加。

[0030] 术语“ α -氨基酸”或简称为“氨基酸”指的是含有与被称为 α -碳的碳结合的氨基和羧基的分子。适当的氨基酸包括但不限于:天然存在的氨基酸的 D 和 L-异构体以及由有机合成或其他代谢途径制备的非天然存在的氨基酸。除非上下文另外指出,本文使用的术语氨基酸用来包括氨基酸类似物。

[0031] 术语“天然存在的氨基酸”指的是通常在天然合成的肽中发现的二十种氨基酸中的任何一种,单字母缩写为 A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 和 V。

[0032] 术语“氨基酸类似物”或“非天然氨基酸”指的是结构上类似于氨基酸且可以代替氨基酸形成拟肽大环化合物的分子。氨基酸类似物包括但不限于:除了在氨基和羧基之间包含一个或多个额外的亚甲基(例如, α -氨基 β -羧酸),或用相似的反应性基团替代氨基或羧基(例如,用仲胺或叔胺替代伯胺,或用酯替代羧基),结构上和本发明定义的氨基酸相同的化合物。

[0033] “非必需的”氨基酸残基是可以由多肽(例如,BH3 结构域或 p53MDM2 结合结构域)

的野生型序列发生改变,而不消除或实质改变其基本生物学或生物化学活性(例如,受体结合或活化)的残基。“必需的”氨基酸残基是,当由多肽的野生型序列发生改变时,导致多肽的主要生物学或生物化学活性消除或基本上消除的残基。

[0034] “保守的氨基酸置换”是用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的氨基酸置换。现有技术已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如, K、R、H)、酸性侧链(例如, D、E)、不带电的极性侧链(例如, G、N、Q、S、T、Y、C)、非极性侧链(例如, A、V、L、I、P、F、M、W)、 β -分支侧链(例如, T、V、I)和芳香族侧链(例如, Y、F、W、H)的氨基酸。因此,例如, BH3 多肽中的预计的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代。可接受的置换的其他例子是基于电子等排考虑(例如正亮氨酸替代甲硫氨酸)或其他性质(例如 2-噻吩丙氨酸替代苯丙氨酸)的置换。

[0035] 本文使用的与大环化合物或大环形成连接体结合的术语“元”指的是形成或者可以形成大环的原子,排除取代基或侧链原子。以此类推,环癸烷、1,2-二氟-环癸烷和 1,3-二甲基环癸烷都被认为是十元大环化合物,因为氢或氟取代基或甲基侧链不参与形成大环。

[0036] 符号“”当用作分子结构的一部分时指的是单键或反式或顺式双键。

[0037] 术语“氨基酸侧链”指的是连接于氨基酸的 α -碳的部分。例如,丙氨酸的氨基酸侧链是甲基,苯丙氨酸的氨基酸侧链是苯甲基,半胱氨酸的氨基酸侧链是硫代甲基,天冬氨酸的氨基酸侧链是羧甲基,酪氨酸的氨基酸侧链是 4-羟苯甲基,等等。也包括其他非天然存在的氨基酸侧链,例如,存在于自然界中的那些(例如,氨基酸代谢物)或通过合成制备的那些(例如, α , α -二取代氨基酸)。

[0038] 术语“ α , α -二取代氨基酸”指的是含有与连接于两个天然或非天然氨基酸侧链的碳(α -碳)的氨基和羧基的分子或部分。

[0039] 术语“多肽”包括两个或更多个通过共价键(例如酰胺键)连接的天然或非天然存在的氨基酸。本文描述的多肽包括全长蛋白质(例如,完全加工的蛋白质)以及较短的氨基酸序列(例如,天然存在的蛋白质片段或合成的多肽片段)。

[0040] 本文所使用的术语“大环化试剂”或“大环形成试剂”指的是可以通过介导两个反应性基团之间的反应来制备本发明拟肽大环化合物的任何试剂。反应性基团可以是例如末端烯类。在这种实施方式中,大环化试剂或大环化试剂是复分解催化剂,包括但不限于:稳定的后过渡金属碳烯络合催化剂,例如第 VIII 族过渡金属碳烯催化剂。例如,这样的催化剂是具有 +2 氧化态、电子数 16 和五配位的钨和钼金属中心。其他的催化剂公开在 Grubbs 等,“Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis” Acc. Chem. Res. 1995, 28, 446-452、美国专利 No. 5, 811, 515、美国专利 No. 6, 111, 121 和美国专利 No. 6, 921, 735 中。在再其他的例子中,反应性基团是硫醇基。在这种实施方式中,大环化试剂例如是用两个硫醇反应性基团(例如卤素基团)官能化的连接体。

[0041] 术语“卤”或“卤素”指的是氟、氯、溴或碘或其根。

[0042] 术语“烷基”指的是包含指定数目碳原子的直链或支链烃链。例如, C_1 - C_{10} 表示其中具有 1 到 10(包含)个碳原子的基团。在没有指定任何数字的情况下,“烷基”是其中具有 1 到 20(包含)个碳原子的链(直链或支链)。

[0043] 术语“亚烷基”指的是二价烷基(即 $-R-$)。

[0044] 术语“链烯基”指的是具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链的烃链。链烯基部分包含指定数目的碳原子。例如, C_2-C_{10} 表示其中具有 2 到 10(包含)个碳原子的基团。术语“低级链烯基”指的是 C_2-C_6 链烯基链。在没有指定任何数字的情况下,“链烯基”是其中具有 2 到 20(包含)个碳原子的链(直链或支链)。

[0045] 术语“炔基”指的是具有一个或多个碳-碳三键的直链或支链的烃链。炔基部分包含指定数目的碳原子。例如, C_2-C_{10} 表示其中具有 2 到 10(包含)个碳原子的基团。术语“低级炔基”指的是 C_2-C_6 炔基链。在没有指定任何数字的情况下,“炔基”是其中具有 2 到 20(包含)个碳原子的链(直链或支链)。

[0046] 术语“芳基”指的是 6-碳单环或 10-碳二环的芳环系统,其中各环的 0、1、2、3 或 4 个原子被取代基取代。芳基的例子包括苯基、萘基等等。术语“芳基烷基”或术语“芳烷基”指的是被芳基取代的烷基。术语“芳基烷氧基”指的是被芳基取代的烷氧基。

[0047] “烷基芳基”指的是其中芳基的一个氢原子被如上定义的 C_1-C_5 烷基取代的如上定义的芳基。烷基芳基的典型例子包括但不限于:2-甲基苯基、3-甲基苯基、4-甲基苯基、2-乙基苯基、3-乙基苯基、4-乙基苯基、2-丙基苯基、3-丙基苯基、4-丙基苯基、2-丁基苯基、3-丁基苯基、4-丁基苯基、2-戊基苯基、3-戊基苯基、4-戊基苯基、2-异丙基苯基、3-异丙基苯基、4-异丙基苯基、2-异丁基苯基、3-异丁基苯基、4-异丁基苯基、2-仲丁基苯基、3-仲丁基苯基、4-仲丁基苯基、2-叔丁基苯基、3-叔丁基苯基和 4-叔丁基苯基。

[0048] “酰胺基芳基”指的是其中芳基的一个氢原子被一个或多个 $-C(O)NH_2$ 基团取代的如上定义的芳基。酰胺基芳基的典型例子包括 2- $C(O)NH_2$ -苯基、3- $C(O)NH_2$ -苯基、4- $C(O)NH_2$ -苯基、2- $C(O)NH_2$ -吡啶基、3- $C(O)NH_2$ -吡啶基和 4- $C(O)NH_2$ 吡啶基。

[0049] “杂环基烷基”指的是其中 C_1-C_5 烷基的一个氢原子被杂环取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。杂环基烷基的典型例子包括但不限于: $-CH_2CH_2-$ 吗啉、 $-CH_2CH_2-$ 哌啶、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 吗啉和 $-CH_2CH_2CH_2-$ 咪唑。

[0050] “酰胺基烷基”指的是其中 C_1-C_5 烷基的一个氢原子被 $-C(O)NH_2$ 取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。酰胺基烷基的典型例子包括但不限于: $-CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_3$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2CH_3$ 和 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH=CH_2$ 。

[0051] “羟烷基”指的是其中 C_1-C_5 烷基的一个氢原子被羟基取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。羟烷基基团的典型例子包括但不限于: $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2OH$ 。

[0052] “羧基烷基”指的是其中 C_1-C_5 烷基的一个氢原子被 $-COOH$ 取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。羧基烷基的典型例子包括但不限于: $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(COOH)CH_2CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2COOH$ 。

[0053] 本文使用的术语“环烷基”包括饱和的和部分未饱和的环烃基团,其含有 3 到 12 个碳,优选 3 到 8 个碳,更优选 3 到 6 个碳,其中环烷基基团还可任选地被取代。一些环烷基包括但不限于:环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基和环辛基。

[0054] 术语“杂芳基”指的是芳香族 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环系统,

如果是单环,含有 1-3 个杂原子,如果是二环,含有 1-6 个杂原子,或如果是三环,含有 1-9 个杂原子,所述杂原子选自 O、N 或 S(例如,如果是单环、二环或三环,分别为碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 的杂原子),其中各环的 0、1、2、3 或 4 个原子被取代基取代。杂芳基的例子包括吡啶基、呋喃基(furyl)或呋喃基(furanyl)、咪唑基、苯并咪唑基、噻吩基、苯硫基或噻吩基、喹啉基、吲哚基、噻唑基等等。

[0055] 术语“杂芳基烷基”或“杂芳烷基”指的是被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”指的是被杂芳基取代的烷氧基。

[0056] 术语“杂芳基烷基”或“杂芳烷基”指的是被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”指的是被杂芳基取代的烷氧基。

[0057] 术语“杂环基”指的是非芳香性的 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环系统,如果是单环,含有 1-3 个杂原子,如果是二环,含有 1-6 个杂原子,或如果是三环,含有 1-9 个杂原子,所述杂原子选自 O、N 或 S(例如,如果是单环、二环或三环,分别为碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 的杂原子),其中各环的 0、1、2 或 3 个原子被取代基取代。杂环基的例子包括哌嗪基、吡咯烷基、二氧杂环己基、吗啉基、四氢呋喃基等等。

[0058] 术语“取代基”指的是替代任何分子、化合物或部分上的另一原子或基团(例如氢原子)的基团。适当的取代基包括但不限于:卤素、羟基、巯基、氧代、硝基、卤烷基、烷基、烷芳基、芳基、芳烷基、烷氧基、硫代烷氧基、芳氧基、氨基、烷氧羰基、酰胺基、羧基、链烷磺酰基、烷基羰基和氰基。

[0059] 在一些实施方式中,本发明化合物包含一个或多个不对称中心且因此作为外消旋体和外消旋混合物、单个对映体、单个非对映体和非对映混合物存在。除非另有说明,这些化合物的所有这些异构体形式包括在本发明中。在一些实施方式中,本发明化合物也以多种互变异构形式存在。在这种情况下,本发明包括本文描述的化合物的所有互变异构形式(例如,如果环状系统的烷基化导致多个位点上的烷基化,本发明包括所有这些反应产物)。除非另有说明,这些化合物的所有这种异构体形式都包括在本发明中。除非另有说明,本文描述的化合物的所有晶形包括在本发明中。

[0060] 如本文所使用,术语“增加”和“减少”分别指引起统计上显著的(即 $p < 0.1$)至少 5% 的增加或减少。

[0061] 如本文所使用,提及变量的数值范围意味着表示本发明可以用等于那些范围内的任何值的该变量来实施。因此,对于本身分散的变量而言,该变量等于该数值范围内的任何整数值,包括该范围的端点。类似地,对于本身连续的变量而言,该变量等于该数值范围内的任何实值,包括该范围的端点。作为非限制性例子,被描述为具有 0-2 之间的值的变量,如果该变量本身是分散的,其为 0、1 或 2,如果该变量本身是连续的,其是 0.0、0.1、0.01、0.001 或任何其他 ≥ 0 且 ≤ 2 的实值。

[0062] 如本文所使用,除非另有说明,措辞“或”用来表示“和 / 或”的包含性含义,而非“任一 / 或”的排它性含义。

[0063] 术语“平均”表示由对各数据点进行至少三个独立的重复而获得的平均值。

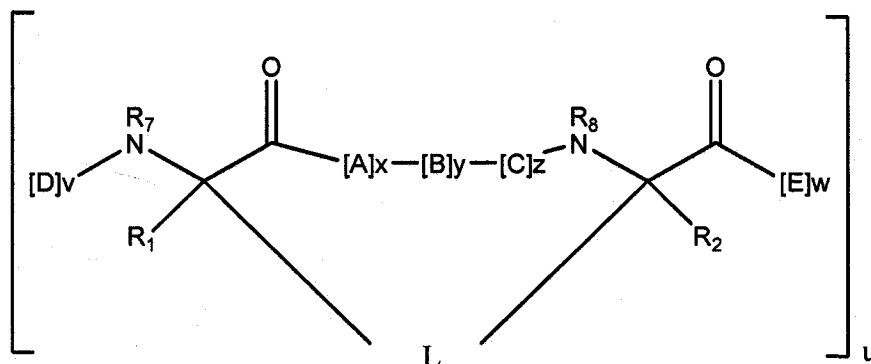
[0064] 术语“生物活性”包括本发明大环化合物的结构和功能性质。例如,生物活性是结构稳定性、 α -螺旋性、靶标亲合性、对蛋白水解降解的抗性、细胞渗透性、细胞内稳定性、体内稳定性或者其任何组合。

[0065] 本发明一个或多个具体实施方式的细节在附图中列出并在下文中描述。本发明的其他特征、目标和优点将从说明书和附图以及权利要求书中变得明显。

[0066] 本发明的拟肽大环化合物

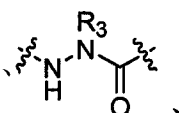
[0067] 在一些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物具有以下通式 (I) :

[0068]



[0069] 通式 (I)

[0070] 其中,各 A、C、D 和 E 独立地代表天然或非天然的氨基酸 ;

[0071] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、、

[0072] $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

[0073] R_1 和 R_2 独立为 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的 ;

[0074] R_3 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基 (cycloaryl) 或杂环芳基 (heterocycloaryl),任选被 R_5 取代 ;

[0075] L 是通式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体 ;

[0076] L_1 和 L_2 独立为亚烷基、亚链烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$,各基团任选被 R_5 取代 ;

[0077] 各 R_4 是亚烷基、亚链烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基 ;

[0078] 各 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃ ;

[0079] 各 R_5 独立为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂 ;

[0080] 各 R_6 独立为 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂 ;

[0081] R_7 是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,各基团任选被 R_5 ,或者是与 D 残基的环结构的部分 ;

[0082] R_8 是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,各基团任选被 R_5 ,或者是与 E 残基的环结构的部分 ;

[0083] v 和 w 独立为 1-1000 的整数 ;

[0084] u、x、y 和 z 独立为 0-10 的整数 ;

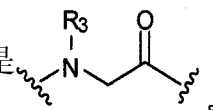
[0085] n 是 1-5 的整数。

[0086] 在一个实施例中,至少一个 R_1 和 R_2 是未取代或被卤素取代的烷基。在另一个实施例中, R_1 和 R_2 独立为未取代或被卤素取代的烷基。在一些实施方式中, R_1 和 R_2 中的至少一个是甲基。在其他实施方式中, R_1 和 R_2 是甲基。

[0087] 在本发明的一些实施方式中, $x+y+z$ 至少是 3。在本发明的其他实施方式中, $x+y+z$ 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。本发明的大环化合物或大环化合物前体中的 A、B、C、D 或 E 的各事件是独立选择的。例如,当 x 是 3 时,通式 $[A]_x$ 表示的序列包括其中氨基酸不相同的实施方式,例如, Gln-Asp-Ala, 以及其中氨基酸相同的实施方式,例如, Gln-Gln-Gln。这适用于指定范围中的 x 、 y 或 z 的任何值。类似地,当 u 大于 1,本发明的各化合物可包括相同或不同的拟肽大环化合物。例如,本发明化合物可包括含有不同连接体长度或者化学组成的拟肽大环化合物。

[0088] 在一些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物包含二级结构(其是 α -螺旋)且 R_3 是 -H,从而允许螺旋内氢键。在一些实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个是 α , α -二取代氨基酸。在一个实施例中,B 是 α , α -二取代氨基酸。例如,A、B、C、D 或 E 中的至少

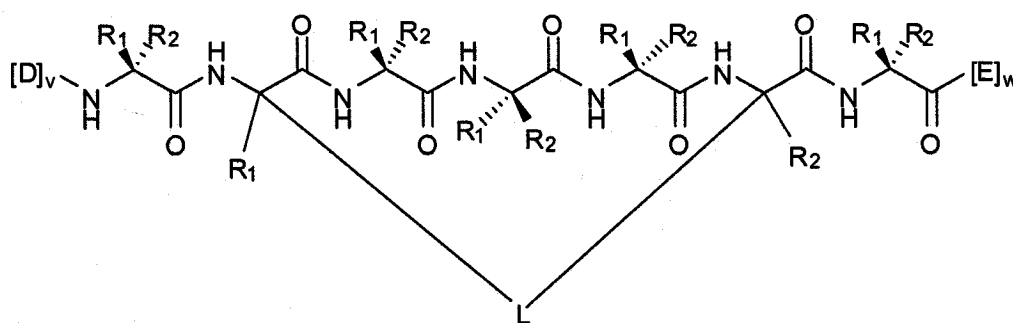
一个是 2-氨基异丁酸。在其他实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个是



[0089] 在其他实施方式中,选择从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测得的大环形成连接体 L 的长度以稳定所需的二级肽结构,例如由拟肽大环化合物的残基(包括但不限于第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 之间的那些)形成的 α -螺旋。

[0090] 在一个实施方式中,通式 (I) 的拟肽大环化合物是:

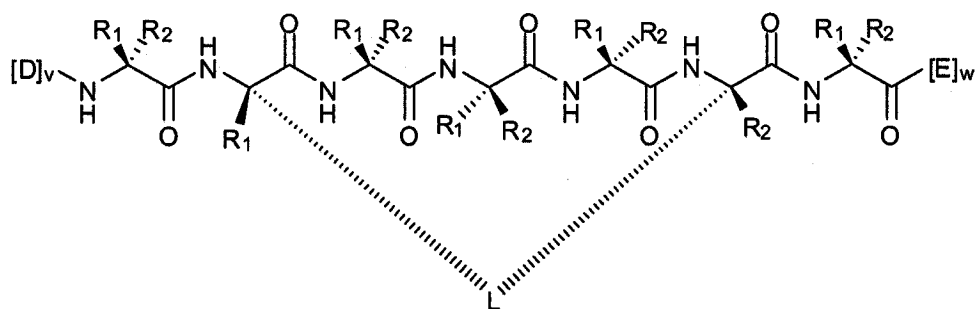
[0091]



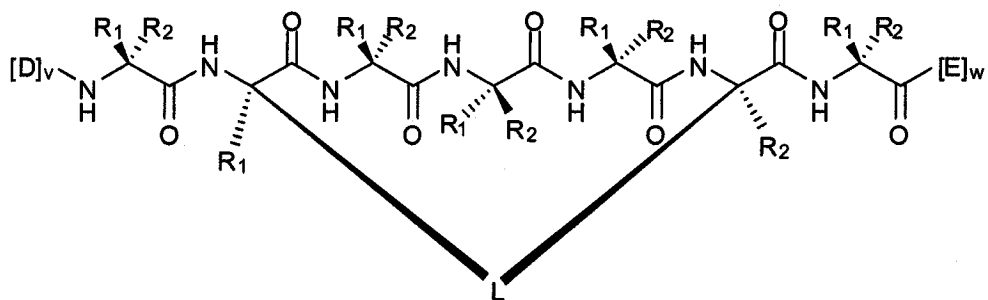
[0092] 其中各 R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的。

[0093] 在相关实施方式中,通式 (I) 的拟肽大环化合物是:

[0094]

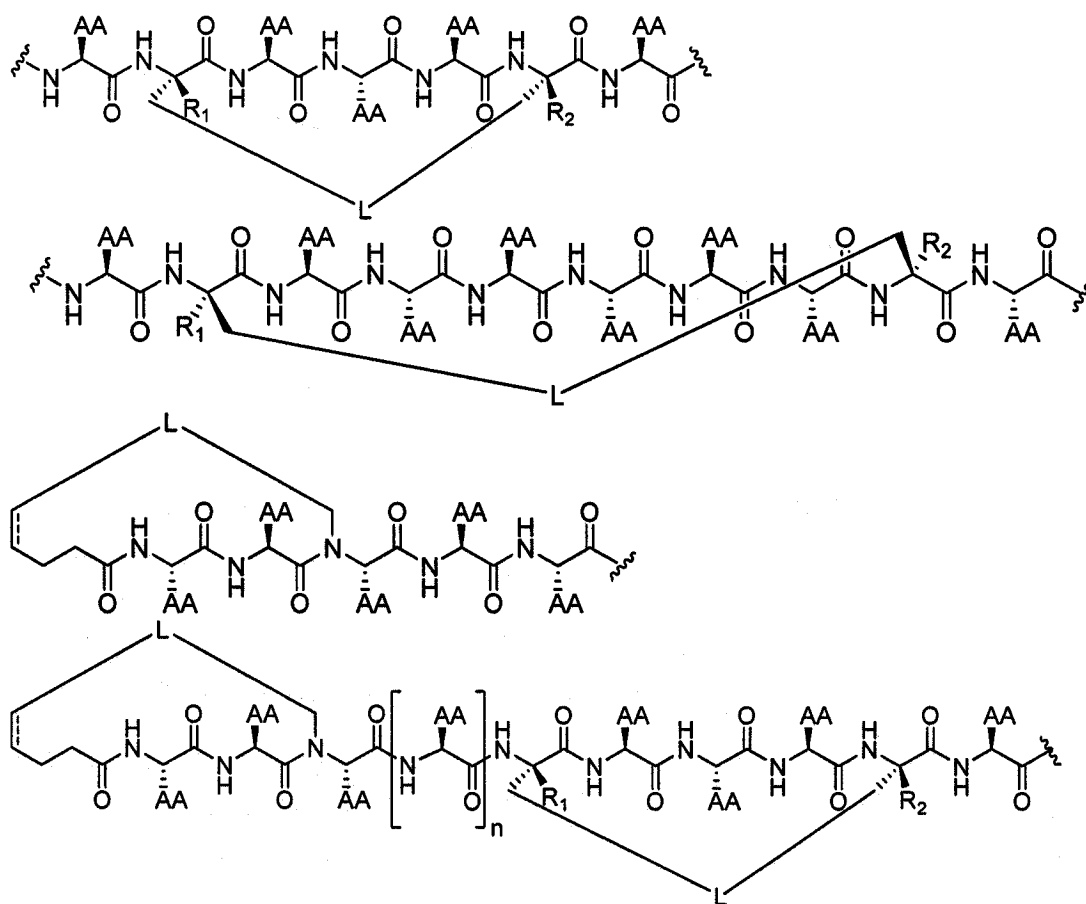


或

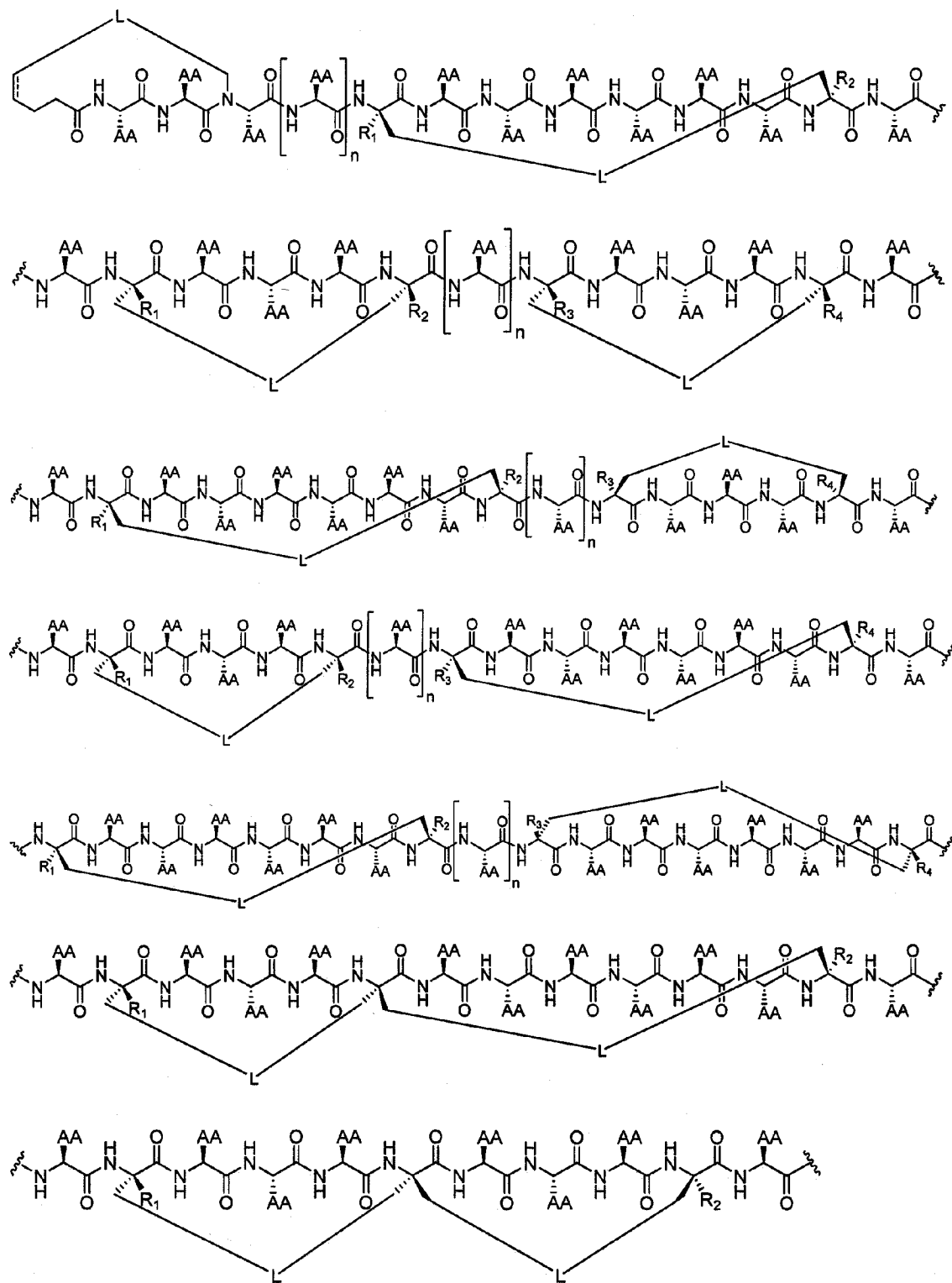


[0095] 在其他实施方式中,通式(I)的拟肽大环化合物是以下任何一式的化合物:

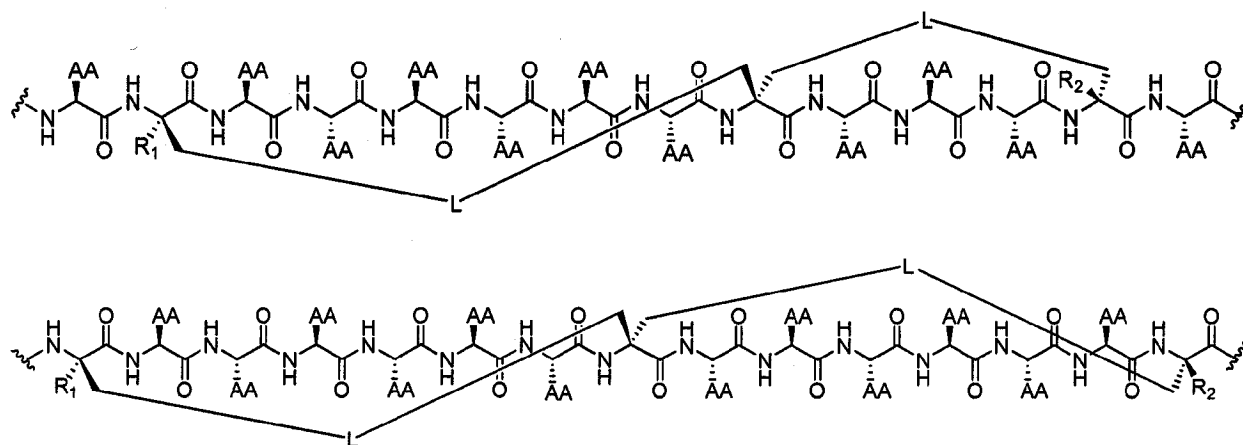
[0096]



[0097]



[0098]



[0099] 其中“AA”表示任何天然或非天然氨基酸侧链且“ AA ”是如上定义的 $[D]_v$ 、

[0100] $[E]_w$ ，且 n 是 0 到 20、50、100、200、300、400 或 500 之间的整数。在一些实施方式中， n 是 0。在其他实施方式中， n 小于 50。

[0101] 大环形成连接体 L 的典型实施方式如下所示。

[0102]

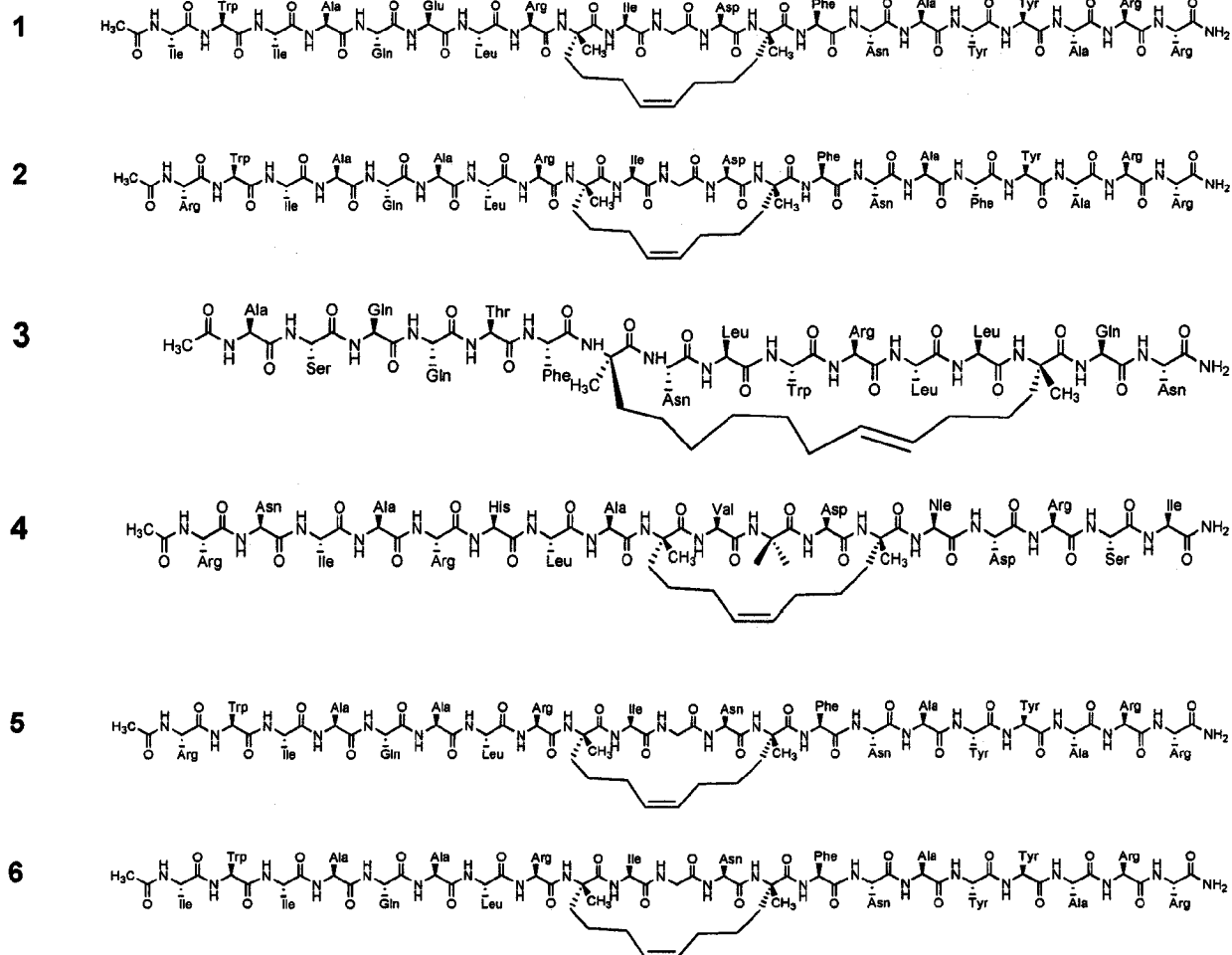


其中 X 、 $Y = -CH_2-$ 、 O 、 S 或 NH ，
 m 、 n 、 o 、 $p = 0-10$

其中 X 、 $Y = -CH_2-$ 、 O 、 S 或 NH ，
 m 、 n 、 o 、 $p = 0-10$

[0103] 本发明拟肽大环化合物的典型实施方式如下所示：

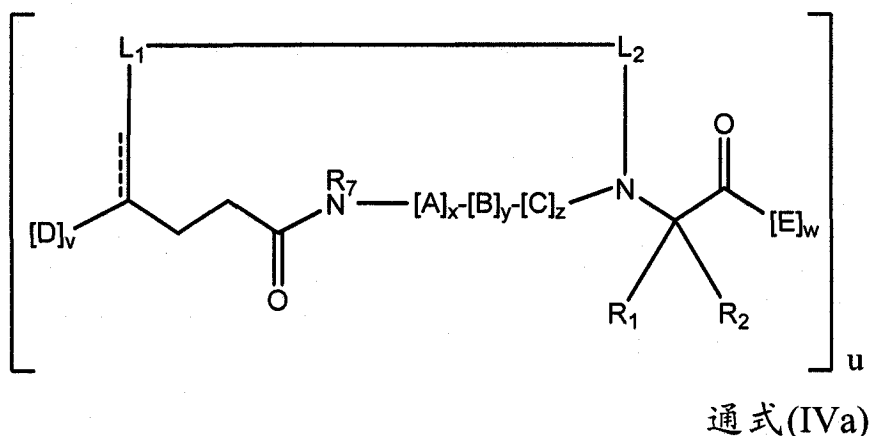
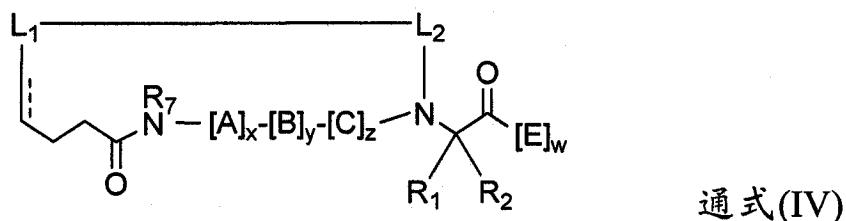
[0104]



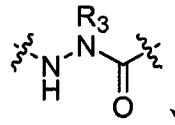
通式 IV/IVa

[0105] 在其他实施方式中,本发明提供通式 (IV) 或 (IVa) 的拟肽大环化合物:

[0106]



[0107] 其中,各 A、C、D 和 E 独立为天然或非天然氨基酸;

[0108] B 是天然或非天然氨基酸、氨基酸类似物、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

[0109] R_1 和 R_2 独立为 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,其为未取代的或被卤素取代的,或者是与 E 残基的环结构的部分;

[0110] R_3 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基,任选被 R_5 取代;

[0111] L 是式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体;

[0112] L_1 和 L_2 独立为亚烷基、亚链烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$,各基团任选被 R_5 取代;

[0113] 各 R_4 是亚烷基、亚链烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

[0114] 各 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

[0115] 各 R_5 独立为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

[0116] 各 R_6 独立为 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

[0117] R_7 是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,各基团任选被 R_5 取代;

[0118] v 和 w 独立为 1-1000 的整数;

[0119] u、x、y 和 z 独立为 0-10 的整数;

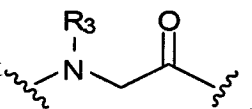
[0120] n 是 1-5 的整数。

[0121] 在一个实施例中,至少一个 R_1 和 R_2 是未取代或被卤素取代的烷基。在另一个实施例中, R_1 和 R_2 独立地为未取代或被卤素取代的烷基。在一些实施方式中, R_1 和 R_2 中的至少一个是甲基。在其他实施方式中, R_1 和 R_2 是甲基。

[0122] 在通式 IV 或 IVa 化合物的一些实施方式中, $x+y+z$ 是 1。在本发明的一些实施方式中, $x+y+z$ 是 2。在本发明的其他实施方式中, $x+y+z$ 是 3、4、5、6、7、8、9 或 10。本发明大环化合物或大环化合物前体中的 A、B、C、D 或 E 的各事件是独立选择的。例如,当 x 是 3 时,通式 $[A]_x$ 表示的序列包括其中氨基酸不相同的实施方式,例如, Gln-Asp-Ala, 以及其中氨基酸相同的实施方式,例如, Gln-Gln-Gln。这适用于指定范围中的 x 、 y 或 z 的任何值。

[0123] 在一些实施方式中,本发明拟肽大环化合物包含二级结构,其是 α -螺旋且 R_8 是 -H, 可以是螺旋内氢键。在一些实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个是 α , α -二取代氨基酸。在一个实施方式中,B 是 α , α -二取代氨基酸。例如,A、B、C、D 或 E 中的至少一个

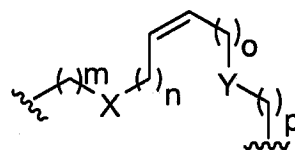
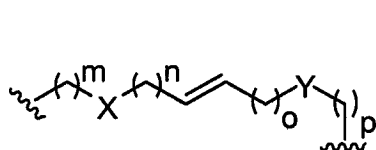
是 2-氨基异丁酸。在其他实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个是



[0124] 在其他实施方式中,选择从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测得的大环形成连接体的长度以稳定所需的二级肽结构,例如由拟肽大环化合物的残基(包括但不限于第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 之间的那些)形成的 α -螺旋。

[0125] 大环形成连接体 L 的典型实施方式如下所示。

[0126]



其中 X 、 Y = $-\text{CH}_2-$ 、 O 、 S 或 NH ,
 m 、 n 、 o 、 p = 0-10

其中 X 、 Y = $-\text{CH}_2-$ 、 O 、 S 或 NH ,
 m 、 n 、 o 、 p = 0-10

[0127] 本发明拟肽大环化合物的设计

[0128] 任何包含被认为赋予生物活性的二级结构的具有已知的初级氨基酸序列的蛋白或多肽可以用作拟肽前体。例如,可以分析多肽序列,且包含与大环化试剂反应的基团的氨基酸类似物可以在适当位置进行置换。适当的位置通过确定二级结构的哪个分子表面是生物活性所需要的并因此确定本发明大环形成连接体可以在哪些另外的表面上形成大环而不在空间上阻挡生物活性所需要的表面来确定。这种确定使用例如二级结构和天然结合伴侣之间的复合物的 X-射线结晶分析(或其他结构方法)以显现对于活性关键的残基(和表面)临界值来进行;通过二级结构中的残基的顺序诱变以在功能上鉴别对于活性关键的残基(和表面)来进行;或通过其他方法进行。通过这种确定,用本发明的氨基酸类似物和大环形成连接体来替换适当的氨基酸。例如,对于 α -螺旋二级结构,螺旋的一个表面(例如,沿着螺旋轴纵向且绕着螺旋轴径向 45 - 135° 延伸的分子表面)可能是与体内或体外另一个生物分子接触以获得生物活性所需要的。在这种情况下,大环形成连接体设计用于连接螺旋的两个 α 碳,而沿着活性不直接需要的那些表面部分中的螺旋表面纵向延伸。

[0129] 在一些实施方式中,肽序列衍生自 BCL-2 家族蛋白。BCL-2 家族由称为 BH1、BH2、

BH3 和 BH4 的最多四个保守 BCL-2 同源 (BH) 结构域的存在而形成,其都包括 α -螺旋片断 (Chittenden 等. (1995),EMBO 14 :5589 ;Wang 等 (1996),Genes Dev. 10 :2859)。抗凋亡蛋白,例如 BCL-2 和 BCL-X_L,在所有 BH 结构域中显示出序列保守性。促凋亡蛋白被分成“多结构域”家族成员 (例如,BAK、BAX),其在 BH1、BH2 和 BH3 结构域具有同源性,和“仅 BH3- 结构域”家族成员 (例如,BID、BAD、BIM、BIK、NOXA、PUMA),其仅包含 BH3 两亲性 α -螺旋片断中具有序列同源性。BCL-2 家族成员具有形成同型二聚物和异二聚物的能力,表明促凋亡和抗凋亡蛋白水平之间的竞争性结合和比率决定对死亡刺激的敏感性。抗凋亡蛋白的功能是保护细胞免于促凋亡过多,即,过多的程序性细胞死亡。额外的“安全性”措施包括调节促凋亡蛋白的转录并维持其作为非活性的构象异构体,从而需要蛋白水解活化、脱磷酸作用或配体诱导的构象变化以激活促死亡功能。在某些细胞种类中,在质膜处收到的死亡信号引发经由线粒体途径的细胞凋亡。所述线粒体可以通过隔离细胞色素 c (激活胱天蛋白酶 (caspase)9 的胞浆复合体从而导致关键的下游蛋白水解事件的关键组分)而作为细胞死亡的看门人。多结构域蛋白例如 BCL-2/BCL-X_L 和 BAK/BAX 在线粒体膜处起到保护者和执行者的竞争作用,它们的活性进一步通过上游 BCL-2 家族的仅 BH3 成员来调节。例如,BID 是促凋亡蛋白的仅 BH3- 结构域家族的成员,且将质膜处收到的死亡信号发送至线粒体膜处的效应物促凋亡蛋白。BID 具有与促凋亡和抗凋亡蛋白相互作用的能力,因而在由胱天蛋白酶 8 活化时,引发细胞色素 c 释放和线粒体细胞凋亡。缺失和突变研究确定促凋亡家族成员的两亲性 α -螺旋 BH3 片断可以作为死亡结构域发挥功能并因此代表与多结构域凋亡蛋白相互作用的关键结构基序。结构研究表明 BH3 螺旋可以通过插入由 BH1、2 和 3 结构域的界面形成的疏水沟槽而与抗凋亡蛋白相互作用。活化的 BID 可被抗凋亡蛋白 (例如 BCL-2 和 BCL-X_L) 结合并隔离,并可以引发促凋亡蛋白 BAX 和 BAK 的活化,导致细胞色素 c 释放和线粒体细胞凋亡程序。BAD 也是仅 BH3- 结构域促凋亡家族成员,其表达引发 BAX/BAK 的活化。然而,与 BID 相反,BAD 显示与抗凋亡家族成员 BCL-2 和 BCL-X_L 的优先结合。尽管 BADBH3 结构域显示结合 BCL-2 的高亲和力,BAD BH3 肽不能在体外激活线粒体释放细胞色素 c,提示 BAD 不是 BAX/BAK 的直接激活剂。过度表达 BCL-2 的线粒体抵抗 BID 诱导的细胞色素 c 的释放,但是用 BAD 共同处理可以恢复 BID 的敏感性。通过 BAD 诱导线粒体细胞凋亡似乎由以下方式产生:(1) 由 BCL-2/BCL-X_L 结合袋移除 BAX/BAK 活化剂,例如 BID 和 BID 样蛋白,或者 (2) 由 BAD 选择性占据 BCL-2/BCL-X_L 结合袋以阻止抗凋亡蛋白隔离 BID 样蛋白。因此,出现两类仅 BH3- 结构域蛋白:直接激活线粒体细胞凋亡的 BID 样蛋白和能够通过占领多结构域抗凋亡蛋白的结合袋而使线粒体对 BID 样促凋亡蛋白敏感的 BAD 样蛋白。已经公开了可适应于本文公开的方法的 BCL-2 家族成员蛋白的各种 α -螺旋结构域 (Walensky 等 (2004),Science 305 :1466 ;和 Walensky 等,美国专利公布说明书 No. 2005/0250680,其全部公开以引用方式合并于此)。

[0130] 在其他实施方式中,肽序列衍生自与癌基因蛋白 MDM2 结合的肿瘤抑制剂 p53 蛋白。MDM2 结合位点位于形成 α 螺旋的 p53 肿瘤抑制剂的区域内。在全部内容以引用方式合并于此的美国专利 7,083,983 中,Lane 等公开了负责结合至 MDM2 的 p53 区域约由成熟的人类 p53 蛋白的氨基酸 13-31 (PLSQETFSDLWKLLPENNV) 表示。Lane 公开的其他修饰序列也包括在本发明中。而且,p53 和 MDM2 之间的相互作用已由 Shair 等人 (1997),Chem. & Biol. 4 : 791 论述,其所有内容以引用方式合并于此,且事实上在所有报告的癌症病例中的一半确认

了 p53 基因的突变。当应激施加在细胞上, p53 被认为安排了导致细胞周期阻滞和 DNA 修复或者程序性细胞死亡的应答。除了直接改变 p53 蛋白功能的 p53 基因中的突变, p53 可以通过 MDM2 中的变化改变。MDM2 蛋白显示与 p53 结合并通过与 p53 的反式激活结构域结合而干扰转录激活。例如, 衍生自 p53 的反式激活结构域的 11 个氨基酸的肽形成插入 MDM2 裂隙的 2.5 圈的两亲性 α -螺旋。因此, 在一些实施方式中, 由本发明方法产生的新颖的 α -螺旋结构通过工程化产生与螺旋受体紧密结合并干扰天然蛋白-蛋白相互作用的结构。然后使用高通量技术筛选这些结构以鉴定优化的小分子肽。所述干扰 MDM2 相互作用的新结构可具有许多用途, 包括但不限于, 控制软组织肉瘤 (其在野生型 p53 存在下过度表达 MDM2)。然后, 在一些实施方式中, 这些癌症保持在截断 MDM2 的小分子的控制中, 从而阻止 p53 的抑制。因此, 在一些实施方式中, MDM2-p53 相互作用的小分子干扰剂用作辅佐治疗, 以帮助控制和调整传统化学治疗中的 p53 依赖性细胞凋亡应答的程度。

[0131] 用于本发明的适当的肽序列的非限制性示例列表在下表 1-4 中给出。

[0132] 表 1: 靶向 BH3 结合位点并涉及癌症、自身免疫疾病、代谢疾病及其他人类疾病状态的示例性人类序列

[0133]

名称	序列 (粗体= 关键残基)	交联序列 (<u>X</u> = x-连接的残基)
BH3 肽		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLA Q V G D S M D R S I P P	QEDIIRNIARHLA <u>X</u> V <u>G</u> D <u>X</u> M <u>D</u> R <u>S</u> I <u>P</u> P
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIG D E F N A Y Y A R	DNRPEIWIAQELR <u>X</u> I <u>G</u> D <u>X</u> F N A Y A R
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRR S D E F V D S F K K	NLWAAQRYGRELR <u>X</u> M <u>S</u> D <u>X</u> F V D S F K K
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMAD D L N AQ Y E R	EEQWAREIGAQLR <u>X</u> MAD <u>X</u> L N AQ Y E R
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL G D E L H Q R T M	RSSAAQLTAARLK <u>X</u> L G D <u>X</u> L H Q R T M
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRKIG D K V Y C T W	AELPPEFAAQLR <u>X</u> I <u>G</u> D <u>X</u> V Y C T W
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIG D K V N L R Q K L	VPADLKDECAQLR <u>X</u> I <u>G</u> D <u>X</u> V N L R Q K L
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIAD Q F H R L H T	QHRAEVQIARKLQ <u>X</u> IAD <u>X</u> F H R L H T
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL G D E L H Q R T	SSAAQLTAARLK <u>X</u> L G D <u>X</u> L H Q R T
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIG D E M D V S L R A	CMEGSDALALRLA <u>X</u> I <u>G</u> D <u>X</u> M D V S L R A
Bnip3	DIERRKEVESILK K N S D W I W D W S S	DIERRKEVESILK <u>X</u> N S D <u>X</u> I W D W S S
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL G D E L E M I R P	GRLAEVCAVLL <u>X</u> L G D <u>X</u> L E M I R P
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIG D E L D S N M E L	PQDASTKKSECLK <u>X</u> I <u>G</u> D <u>X</u> L D S N M E L
BAK-BH3	PSSTMGVGRQLA I G D D I N R R	PSSTMGVGRQLA <u>X</u> I <u>G</u> D <u>X</u> I N R R
BCL2L1-BH3	KQALREAG D E F E L R	KQALR <u>X</u> A G D <u>X</u> F E L R
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAG D D F S R R	LSPPVVHLALALR <u>X</u> A G D <u>X</u> F S R R
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG D E F E L R Y	EVIPMAAVKQALR <u>X</u> A G D <u>X</u> F E L R Y
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG D E F E T R F	PADPLHQAMR <u>X</u> A G D <u>X</u> F E T R F
MCL1-BH3	ATSRKLETLRRV G D G V Q R N H E T A	ATSRKLETLR <u>X</u> V <u>G</u> D <u>X</u> V Q R N H E T A
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL G D E L E Q I R	LAEVCTVLL <u>X</u> L G D <u>X</u> L E Q I R
MAP-1-BH3	MTVGELSRA L G H E N G S L D P	MTVGELSRA L G <u>X</u> E N G <u>X</u> L D P
NIX-BH3	VVEGEKEVEAL K S A D W V S D W S	VVEGEKEVEAL <u>X</u> S A D <u>X</u> V S D W S
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLV I Q G D D R M K L	SMARDPQRYLV <u>X</u> Q G D <u>X</u> R M K L

[0134]

[0135] 表 2 : 靶向 BH3 结合位点并涉及癌症、自身免疫疾病、代谢疾病及其他人类疾病状态的示例性人类序列

[0136]

名称	序列 (粗体 = 关键残基)	交联序列 (X = x-连接的残基)
BH3 肽		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLA Q V G DSMDRSIPP	QEDIIRNI X RHL X QV G DSMDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIG D EFNAYYAR	DNRPEIW I X QEL X RIG D EFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRRMS D EFVDSFKK	NLWAAQRY X REL X RMS D EFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREI X AQL X RMADDLNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL G DELHQRTM	RSSAAQLT X ARL X AL G DELHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRKIG D KVYCTW	AELPPEF X AQL X KIG D KVYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIG D KVNL R QKL	VPADLKDE X AQL X RIG D KVNL R QKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIAD Q FHRLHT	QHRAEVQ I X RKL X CIAD Q FHRLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL G DELHQRT	SSAAQLT X ARL X AL G DELHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIG D EMDVSLRA	CMEGSDAL X LRL X CIG D EMDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILK K NSDWIWDWSS	DIERRKEV X SIL X K K NSDWIWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL G DELEMIRP	GRLAEV X AVL X RL G DELEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIG D ELDSNMEL	PQDASTKK X ECL X RIG D ELDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAI G DDINRR	PSSTMGQV X RQL X I G DDINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAG D EFELR	X QAL X EAG D EFELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAG D DFSRR	LSPPVVHL X LAL X QAG D DFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG D EFELRY	EVIPMAAV X QAL X EAG D EFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG D EFETRF	PADPL X QAM X AAG D EFETRF
MCL1-BH3	ATSRKLETLLRRV G DGVQRNHETA	ATSRK X ETL X RV G DGVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL G DELEQIR	LAEV X TVL X RL G DELEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRALGHENGSLDP	MTVGEL X RAL X HENGSLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKE X EAL X KSADWVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLVIQ G DDRMKL	SMARDP X RYL X IQ G DDRMKL

[0137] 表 3 : 靶向 MDM2/X 的 p53 结合位点并涉及癌症的示例性人类序列

[0138]

名称	序列 (粗体 = 关键残基)	交联序列 (<u>X</u> = x-连接的残基)
P53 肽		
hp53 肽 1	LSQET F SDLWKLLPEN	LSQET F S <u>D</u> WKL L PE <u>X</u>
hp53 肽 2	LSQET F SDLWKLLPEN	LSQ <u>E</u> F S <u>D</u> LWKL L PE <u>N</u>
hp53 肽 3	LSQET F SDLWKLLPEN	LSQ <u>X</u> T FSDLWKL L PE <u>N</u>
hp53 肽 4	LSQET F SDLWKLLPEN	LSQET F <u>X</u> DLWKLL X EN
hp53 肽 5	LSQET F SDLWKLLPEN	QSQQ T <u>F</u> X NLWRL L <u>X</u> QN

[0139] 表 4: 靶向人类 G 蛋白 - 偶联受体并涉及许多人类疾病状态的示例性序列

[0140]

名称	序列 (粗体 = 关键残基)	交联序列 (<u>X</u> = x-连接的残基)
GPCR 肽配体		
血管紧张素 II	DRVYI H PF	DR <u>X</u> Y <u>X</u> H P F
铃蟾素	EQRLGNQWAVGHLM	EQRLGN <u>X</u> WAVGH L <u>X</u>
缓激肽	RPPGF S PFR	RPP <u>X</u> F S PFR <u>X</u>
C5a	ISHKDM Q LGR	ISHKDM <u>X</u> LGR X
C3a	ARASH L GLAR	ARASH <u>L</u> X LAR <u>X</u>
α -黑素细胞刺激激素	SYSMEHFRWGKPV	SYSM <u>X</u> HFRW X KPV

[0141] 拟肽大环化合物和大环化合物前体的制备

[0142] 通常, 制备本发明拟肽大环化合物的第一步是合成包含具有能够进行复分解的部分的氨基酸的拟肽前体。合成之后, 所述拟肽前体可以纯化或不纯化。下一步是使拟肽前体和大环形成试剂例如闭环复分解催化剂接触, 以生成在两个氨基酸之间含有至少一个交联的粗的拟肽大环化合物。接着, 纯化粗的拟肽大环化合物以除去杂质和金属, 例如来源于催化剂的金属残留。

[0143] 粗的拟肽大环化合物或大环化合物前体可通过多种已经公开的方法中任何一种制备。用于合成所需拟肽前体的标准脱保护和偶联反应是已知的。例如, 它们可以通过液相或固相法合成, 且可以含有天然存在和非天然存在的氨基酸 (例如, 参见 Hunt, "The Non-Protein Amino Acids" in Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, G. C. Barrett 编辑, Chapman and Hall, 1985)。可以使用化学合成方法, 例如在 Fields 等, Synthetic Peptides: A User's Guide, 第 3 章, Grant, W. H. 编辑 Freeman & Co., New York, N. Y., 1992, p. 77 中所描述的。因此, 例如, 在例如自动化肽合成仪 (例如, Applied Biosystems (Foster City, CA), Model 430A、431 或 433) 上, 使用利用通过 tBoc 或 Fmoc 化学保护的胺的固相合成自动化 Merrifield 技术用侧链保护的氨基酸来合成肽。

[0144] 液相肽合成偶联方案的一个例子包括使用 N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)/1-羟基苯并三氮唑 (HOBt) 作为肽偶联剂 (参见 M. Bordansky, Peptide Chemistry, Springer Verlag, N. Y., 1988, pp. 55-146, 其全部内容以引用方式合并于此)。其他肽合成技术已经

广泛论述在本文引用的“Bioorganic Chemistry”中。

[0145] 制备本文描述的拟肽前体和拟肽大环化合物的一种方法使用固相肽合成 (SPPS)。C 末端氨基酸经由与连接体分子的酸不稳定的键连接在交联的聚苯乙烯树脂上。该树脂不溶于用于合成的溶剂,从而使得洗去过量试剂和副产物相对简单和快速。N 末端用 Fmoc 基团保护,其在酸中稳定,但可通过碱除去。侧链官能团根据需要用碱稳定、酸不稳定的基团进行保护。

[0146] 例如,较长的拟肽前体通过使用天然化学连接结合单个合成肽来制备。或者,较长的合成肽通过众所周知的重组 DNA 和蛋白质表达技术生物合成。这种技术提供于众所周知的包括详细方法的标准手册中。为构建编码拟肽前体的基因,反向翻译氨基酸序列以获得编码该氨基酸序列的核酸序列,优选使用对将表达该基因的有机体而言优化的密码子。其次,如有必要,通常通过合成编码该肽的寡核苷酸和任何调节元件来制备合成基因。该合成基因插入适当的克隆载体并转染入宿主细胞中。然后在适合于选定的表达系统和宿主的适宜条件下表达该肽。该肽被纯化并以标准方法鉴定。

[0147] 所述拟肽前体例如也可以利用例如高通量多通道组合合成仪(例如,来自 CreoSalus, Louisville, KY 的 Thuramed TETRAS 多通道肽合成仪或来自 AAPPTEC, Inc., Louisville, KY 的 Apex 396 型多通道肽合成仪)以高通量组合方式来制备。

[0148] 在一些实施方式中,氨基酸的 -NH 部分使用包括但不限于 -Fmoc 和 -Boc 的保护基进行保护。在其他实施方式中,氨基酸在合成拟肽大环化合物之前不进行保护。

[0149] 特定合成技术的选择取决于要合成的特定结构。替换可选择的但等效的保护基、离去基团或试剂,且按照可选择的序列或顺序进行特定合成步骤以制备所需化合物。用于合成本文描述的化合物的合成化学转换和保护基方法(保护和脱保护)包括,例如 Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers(1989);Greene 和 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., John Wiley and Sons(1991);Fieser 和 Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1994) 和 Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1995),及其后续版本所描述的那些。

[0150] 可以预期拟肽前体和拟肽大环化合物的变型。在一些实施方式中,序列残基的变化是可能的。例如,拟肽大环化合物和大环前体的制备可以包括用能够与相同分子中的第二残基或该残基的前体形成交联连接体的残基置换表 1、2、3 或 4 中“X”表示的任何一个残基。

[0151] 拟肽大环化合物和拟肽前体可以包含天然和非天然氨基酸。所述天然氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。也可以使用其他通常较少发现的天然氨基酸,例如硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸 (pyrrolysine)。有超过 700 种已知的非天然氨基酸,其中任何一种可以包括在用于本发明的肽前体中。这些也包括天然和非天然氨基酸的类似物(例如参见 S. Hunt, The Non-Protein Amino Acids: In Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, G. C. Barrett 编辑, Chapman and Hall, 1985)。非天然氨基酸的一些例子是 L- 炔丙基甘氨酸、 β - 丙氨酸、D- 丙氨酸、4- 羟基脯氨酸、锁链赖氨酸 (desmosine)、D- 谷氨酸、 γ - 氨基丁

酸、 β -氰丙氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、叔-亮氨酸、 α -氨基丁酸、4-(E)-丁烯基-4(R)-甲基-N-甲基-L-苏氨酸、N-甲基-L-亮氨酸和 Statine。拟肽大环化合物和拟肽前体也可以包含能够 π 堆积 (pi-stacking) 的氨基酸如 ϵ -(3,5-二硝基苯甲酰基)-赖氨酸。

[0152] 适合使用的拟肽前体也可以衍生化以包括羟基化、磷酸化、磺化、糖基化、成二硫键或以另外的方式衍生的氨基酸。所述氨基酸也可以包含官能团。官能团的非限制性例子包括烷基、醇、硫醇、酮、醛、酯、醚、胺、亚胺、酰胺、硝酸、羧酸、二硫化物、碳酸酯、烷氧基羧酸 (carboalkoxy acid)、异氰酸酯、碳二亚胺、烷氧羰基和卤素官能团。

[0153] 在其他实施方式中,使用 α , α -二取代氨基酸 (例如 α -甲基或 α -乙烯基氨基酸) 作为前体以用于形成交联连接体。 α -甲基, α -烷基烯氨基酸的合成和一些例子在美国专利 No. 7, 192, 713 中论述。例如, 甲基碘和四甲基二甲硅烷基叠氮化钠可用于处理市场上可买到的内酯以生成甲基化内酯。随后在四甲基二甲硅烷基叠氮化钾的存在下用高烯丙基碘进行处理将生成高烯丙基噁嗪酮。金属钠还原、酸水解和用 Fmoc-NHS 保护可以产生用于合成拟肽的受保护的 α -甲基, α -烷基烯。

[0154] 在一些实施方式中,可以利用多种高烯丙基试剂产生具有不同烯链长度的氨基酸,其可进一步用包括但不限于支链或直链烷基部分、羟基部分、硫醇部分、胺、羧基部分和取代或非取代芳基部分 (仅举几个例子) 的部分官能化。

[0155] 在一些实施方式中,氨基酸和氨基酸类似物为 D 构型。在其他实施方式中它们是 L 构型。在另一个实施方式中,可以使用具有 D-构型和 L-构型组合的天然和非天然氨基酸。

[0156] 拟肽大环化合物和前体可以含有一个或多个部分例如荧光部分、亲和标记、靶向部分或放射性同位素。例如,大环化合物或前体的氨基端可以进一步用标记 (例如异硫氰酸荧光素 (FITC) 或生物素偶联的赖氨酸) 衍生化,以分别生成用于细胞渗透性研究和生化试验的标记拟肽大环化合物。其他有用的变形包括但不限于添加到大环化合物或前体的 C 末端的荧光氨基酸 (例如色氨酸) 以作为用于纯化和浓度测定目的的 UV 标记或者消除 N 末端谷氨酸以提高大环化合物或前体的总 pI,从而潜在地促进细胞渗透。用于拟肽大环化合物和前体的其他部分包括治疗剂。治疗剂的非限制性的例子包括小分子、肽、抗体、核糖酶和反义寡核苷酸。

[0157] 为促进细胞摄取,在一些实施方式中,进一步修饰本发明化合物中的 D 和 / 或 E。例如,在一些实施方式中,脂质化或 PEG 化拟肽大环化合物促进细胞摄取、提高生物利用度、增加血液循环、改变药代动力学、降低免疫原性和 / 或减少所需的给药频率。在其他实施方式中,本发明化合物中 [D] 和 [E] 的至少一个代表含有另外的大环形成连接体的部分,以致拟肽大环化合物包含至少两个大环形成连接体。在一个具体实施方式中,拟肽大环化合物包含两个大环形成连接体。

[0158] 对于拟肽大环化合物和前体,本文描述的任何大环形成连接体可以以与表 1-4 所示的任何序列任意组合的形式使用,也可以以与本文指出的任何 R-取代基任意组合使用。

[0159] 在一些实施方式中,拟肽大环化合物包含至少一个 α -螺旋基序。例如,本发明化合物中的 A、B 和 / 或 C 包含一个或多个 α -螺旋。通常, α -螺旋的每圈包含 3 至 4 个氨基酸残基。在一些实施方式中,拟肽大环化合物的 α -螺旋包括 1 至 5 个圈并因此包含 3 到 20 个氨基酸残基。在具体的实施方式中, α -螺旋包括 1 个圈、2 个圈、3 个圈、4 个圈或 5 个圈。在一些实施方式中,大环形成连接体使包括在拟肽大环化合物内的 α -螺旋基序保

持稳定。因此,在一些实施方式中,选择从第一 C α 到第二 C α 的大环形成连接体的长度 L 以提高 α -螺旋的稳定性。在一些实施方式中,大环形成连接体跨越 α -螺旋的 1 个圈到 5 个圈。在一些实施方式中,大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 1 个圈、2 个圈、3 个圈、4 个圈或 5 个圈。在一些实施方式中,大环形成连接体的长度为 α -螺旋的每一圈约 5Å 到 9Å,或者 α -螺旋的每一圈约 6Å 到 8Å。当所述大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 1 个圈时,长度等于约 5 个碳-碳键到 13 个碳-碳键,约 7 个碳-碳键到 11 个碳-碳键,或约 9 个碳-碳键。当所述大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 2 个圈时,长度等于约 8 个碳-碳键到 16 个碳-碳键,约 10 个碳-碳键到 14 个碳-碳键,或约 12 个碳-碳键。当所述大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 3 个圈时,长度等于约 14 个碳-碳键到 22 个碳-碳键,约 16 个碳-碳键到 20 个碳-碳键,或约 18 个碳-碳键。当所述大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 4 个圈时,长度等于约 20 个碳-碳键到 28 个碳-碳键,约 22 个碳-碳键到 26 个碳-碳键,或约 24 个碳-碳键。当所述大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 5 个圈时,长度等于约 26 个碳-碳键到 34 个碳-碳键,约 28 个碳-碳键到 32 个碳-碳键,或约 30 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 1 个圈时,该连接包含约 4 个原子到 12 个原子,约 6 个原子到 10 个原子,或约 8 个原子。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 2 个圈时,该连接包含约 7 个原子到 15 个原子,约 9 个原子到 13 个原子,或约 11 个原子。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 3 个圈时,该连接包含约 13 个原子到 21 个原子,约 15 个原子到 19 个原子,或约 17 个原子。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 4 个圈时,该连接包含约 19 个原子到 27 个原子,约 21 个原子到 25 个原子,或约 23 个原子。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 5 个圈时,该连接包含约 25 个原子到 33 个原子,约 27 个原子到 31 个原子,或约 29 个原子。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 1 个圈时,所得的大环形成含有约 17 元到 25 元,约 19 元到 23 元,或约 21 元的环。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 2 个圈时,所得的大环形成含有约 29 元到 37 元,约 31 元到 35 元,或约 33 元的环。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 3 个圈时,所得的大环形成含有约 44 元到 52 元,约 46 元到 50 元,或约 48 元的环。当大环形成连接体跨越 α -螺旋的约 4 个圈时,所得的大环形成含有约 59 元到 67 元,约 61 元到 65 元,或约 63 元的环。当大环形成连接物跨越 α -螺旋的约 5 个圈时,所得的大环形成含有约 74 元到 82 元,约 76 元到 80 元,或约 78 元的环。

[0160] 例如,通式 I 拟肽大环化合物的制备描述在 Schafmeister 等, J. Am. Chem. Soc. 122 :5891-5892(2000) ;Schafmeister & Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122 :5891(2005) ;Walensky 等, Science 305 :1466-1470(2004) ;美国专利 No. 7,192,713 和 PCT 申请 WO 2008/121767 中。引用文献中公开的 α , α -二取代氨基酸和氨基酸前体可用于合成拟肽大环化合物前体多肽。将这种氨基酸结合入前体多肽后,末端烯与复分解催化剂反应,导致生成拟肽大环化合物。

[0161] 在其他实施方式中,本发明拟肽大环化合物具有通式 IV 或 IVa。这种大环化合物的制备方法例如描述在美国专利 No. 7,202,332 中,其全部合并在此。

[0162] 在本发明的拟肽大环化合物中, R₁ 和 R₂ 的至少一个为烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的;在一些实施方式中, R₁ 和 R₂ 独立地为烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的。在一些实施方式中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个是

α , α -二取代氨基酸。在一个例子中, B 是 α , α -二取代氨基酸。例如, A、B、C、D 或 E 中的至少一个是 2-氨基异丁酸。

[0163] 例如, R_1 和 R_2 的至少一个为未取代或被卤素取代的烷基。在另一个例子中, R_1 和 R_2 两者独立地为未取代或被卤素取代的烷基。在一些实施方式中, R_1 和 R_2 的至少一个为甲基。在其他实施方式中, R_1 和 R_2 为甲基。大环化试剂可以是 Cu 试剂或者 Ru 试剂。

[0164] 在一些实施方式中, 在接触步骤之前纯化拟肽前体。在其他实施方式中, 在接触步骤之后纯化拟肽大环化合物。在再其它的实施方式中, 在接触步骤之后重折叠拟肽大环化合物。该方法可以在溶液中进行, 或者, 该方法可以在固体载体上进行。

[0165] 本文也预期在结合拟肽前体或拟肽大环化合物的靶标大分子的存在下在有利于所述结合的条件下实施本发明的方法。在一些实施方式中, 在优先结合拟肽前体或拟肽大环化合物的靶标大分子存在下在有利于所述结合的条件下实施本方法。本方法也可以用于合成拟肽大环化合物的文库。

[0166] 在一些实施方式中, 接触步骤在选自质子溶剂、水性溶剂、有机溶剂及其混合物的溶剂中进行。例如, 溶剂可以选自下组: H_2O 、THF、THF/ H_2O 、tBuOH/ H_2O 、DMF、DIPEA、 CH_3CN 或 CH_2Cl_2 、 $ClCH_2CH_2Cl$ 及其混合物。该溶剂可以是有利于螺旋形成的溶剂。

[0167] 闭环复分解催化剂

[0168] 对于含有两个烯作为待交联的氨基酸部分的实施方式, 闭环烯复分解可用来进行环化反应。在一个实施方式中, 烯复分解反应包括闭环烯复分解反应。闭环烯复分解利用烯复分解反应以形成大环。在该反应中, 链内的两个双键被连接。

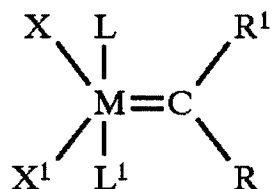
[0169] 用于生成拟肽大环化合物的适当催化剂包括能够催化拟肽前体的闭环复分解的任何催化剂。适当催化剂的非限制性例子包括美国专利 No. 5, 312, 940 ; 5, 342, 909 ; 5, 811, 515 ; 6, 111, 121 ; 6, 921, 735 ; 欧洲专利 EP1180108B1 中讨论的钌和钨碳烯络合物, 每个专利通过引用方式合并于此。适当的催化剂包括稳定的后过渡金属碳烯络合物催化剂, 例如第 VIII 族过渡金属碳烯催化剂, 其包括钌和钨碳烯催化剂。对于钌和钨金属碳烯催化剂, 钌和钨金属中心处于 +2 氧化态, 电子数为 16, 且是五配位的。可以使用其他适当的闭环复分解催化剂。复分解反应的讨论可在 Grubbs 等, " Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis " Acc.Chem.Res. 1995, 28, 446-452 ; Hoveyda 等, " Ru Complexes Bearing Bidentate Carbenes : From Innocent Curiosity to Uniquely Effective Catalysts for Olefin Metathesis, " Org.Biomol.Chem. 2 : 8-23(2004) ; Tmka 等, " The Development of $L_2X_2Tu = CHR$ Olefin Metathesis Catalysts : An Organometallic Success Story, " Accounts Chem.Res. 34 : 18-29(2001) 中发现, 其以引用方式全部合并于此。

[0170] 金属中心可具有包括阴离子配体和中性或者供电子配体的配体环境。阴离子配体可以是当从其闭合的壳层电子组态 (closed shell electron configuration) 中的金属中心移除时具有负电荷的任何配体。配体的非限制性例子包括含卤素的基团 ; 烷基 ; 芳基 ; 链烯基 ; 烷基芳基 ; 芳基烷基 ; 氢羧基 (hydrocarboxy) ; 酰胺 ; 磷化物 ; 硫化物 ; 甲硅烷基烷基 ; 二酮 ; 硼氢化物 ; 和羧化物 ; 膦, 磺化膦 (sulfonated phosphine), 亚磷酸, 氧膦 (phosphinite), 亚膦酸, 胂, 铈化氢, 醚, 胺, 酰胺, 亚胺, 亚砷, 羧基, 亚硝酰基, 吡啶和硫醚。金属碳烯催化剂的溶解性可通过选择疏水或亲水的配体来控制。在多种官能团和各种不同

溶剂存在下,催化剂可以显示出稳定性,因此许多催化剂可用于催化在水性、质子或者有机溶剂或其混合物中进行的反应。

[0171] 钌碳烯催化剂的例子包括但不限于 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 或 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen 等 (2007), Org. Lett. 9 :5337-5339 ;Zhang 等 (2005), J. Am. Chem. Soc. 127 :15998-15999)。其他例子包括以下通式的催化剂:

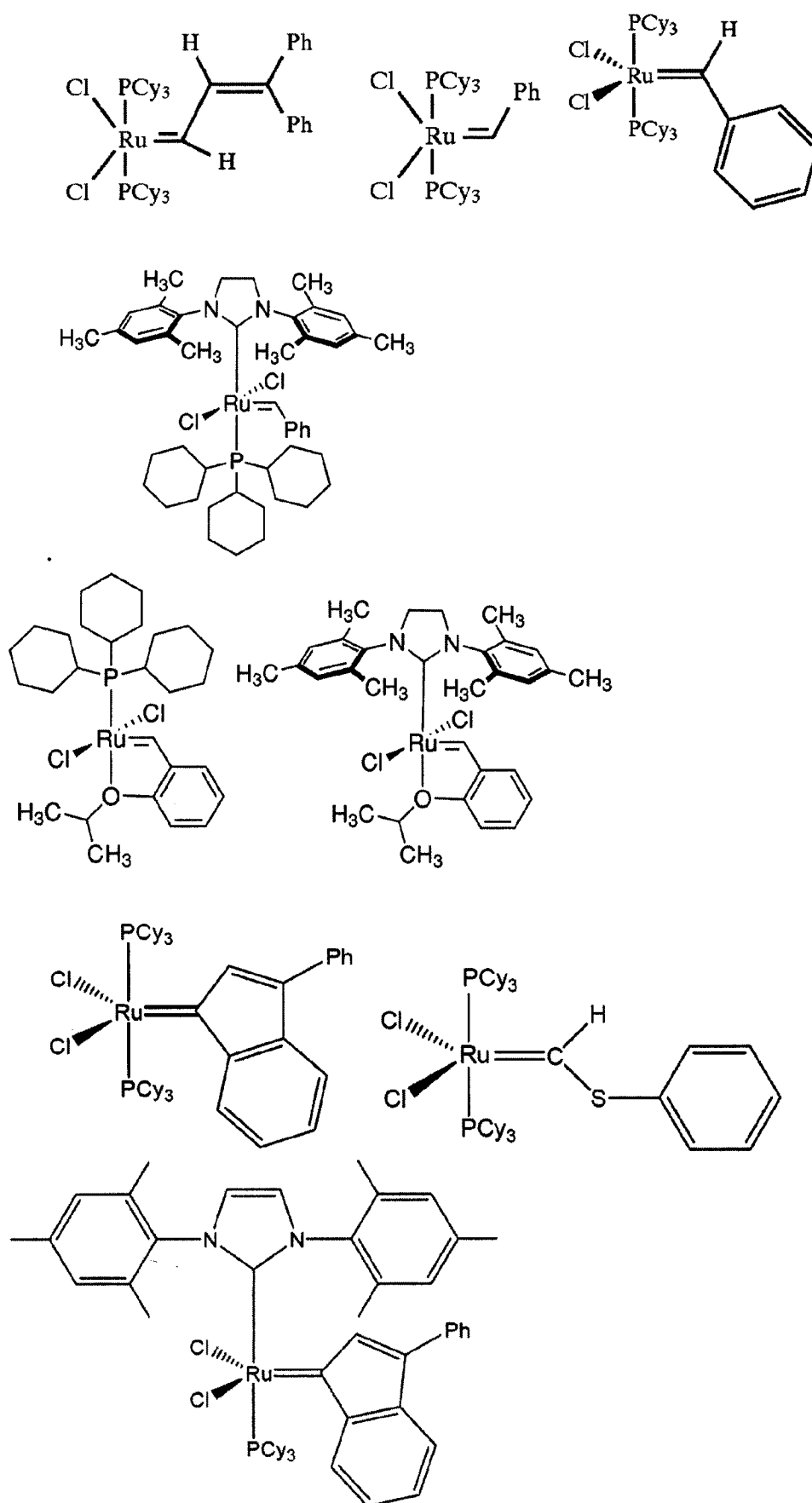
[0172]



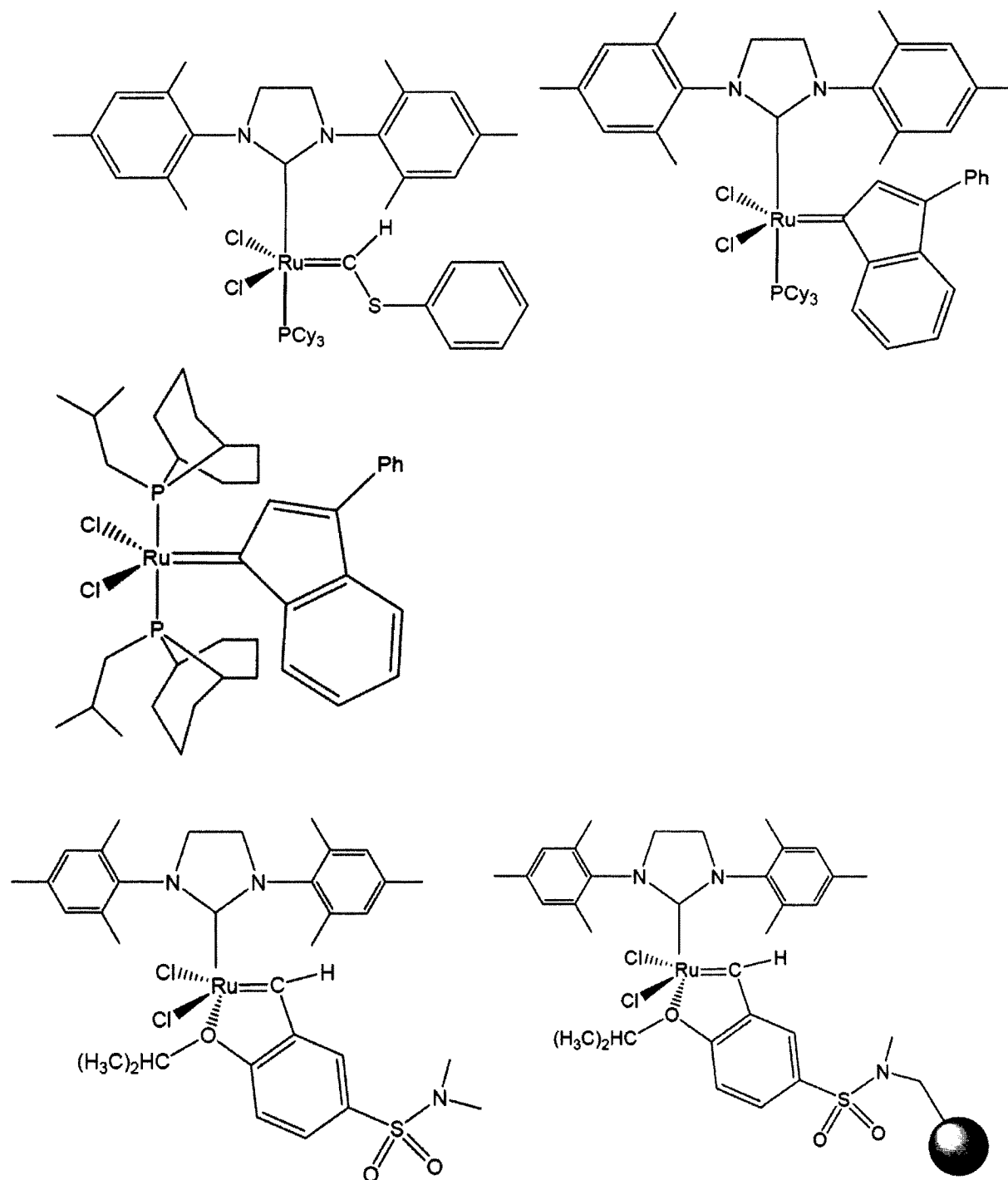
[0173] 其中:M选自钌和钌;R和R¹独立地选自氢和官能团;X和X¹是阴离子配体;L和L¹是中性电子供体。更具体地说,L和L¹可以是式PR³R⁴R⁵的膦,其中R³选自仲烷基(secondary alkyl)和环烷基,且R⁴和R⁵独立地选自芳基、C₁-C₁₀伯烷基(primary alkyl)、仲烷基和环烷基。N-杂环配体例如咪唑啉和三唑啉配体(例如Grubbs催化剂,第二代)也是合适的。其他例子还包括由Strem Chemicals公司和Zannan Pharma公司出售的复分解催化剂。

[0174] 该通式的具体实施方式包括但不限于以下催化剂:

[0175]



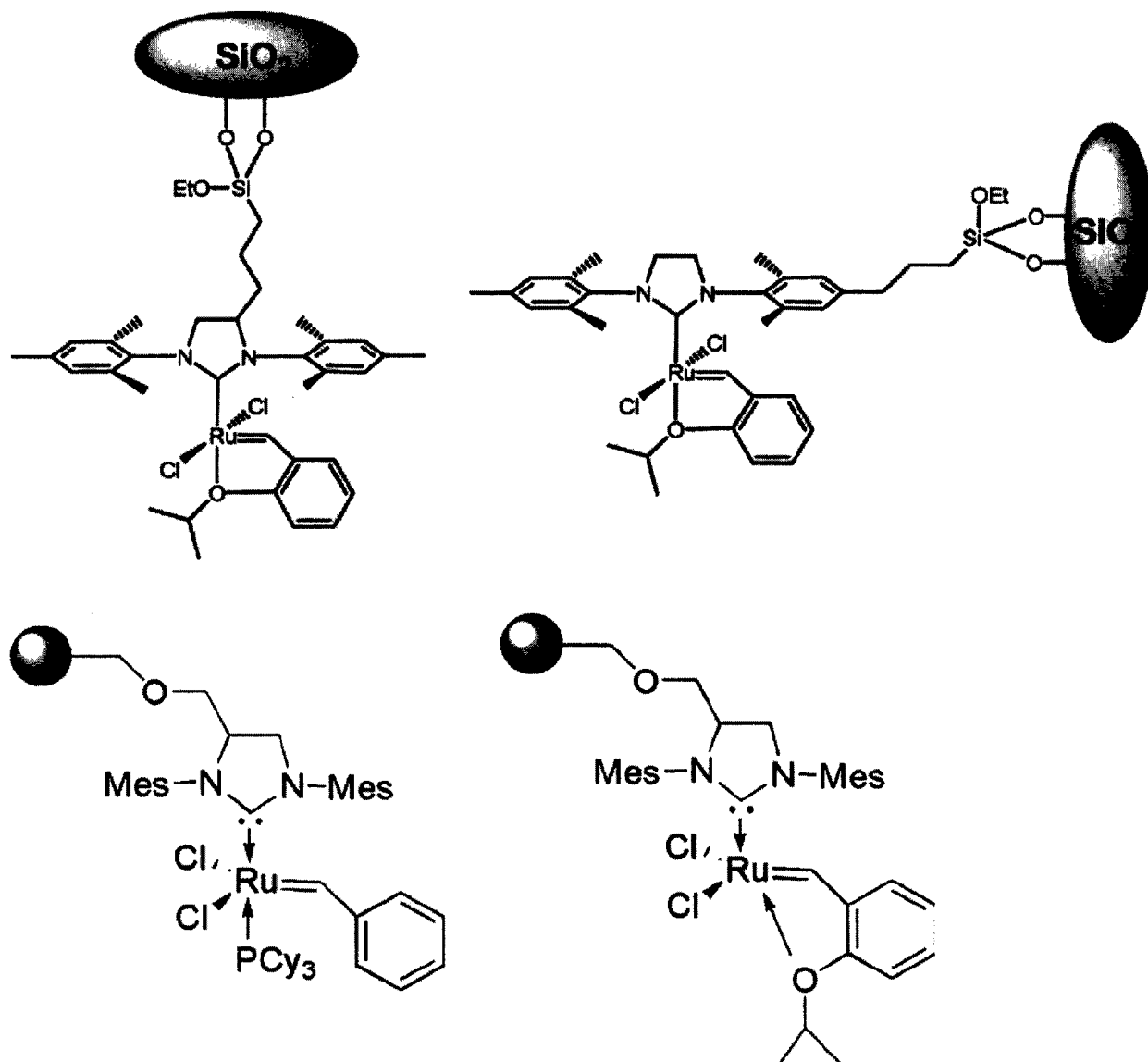
[0176]



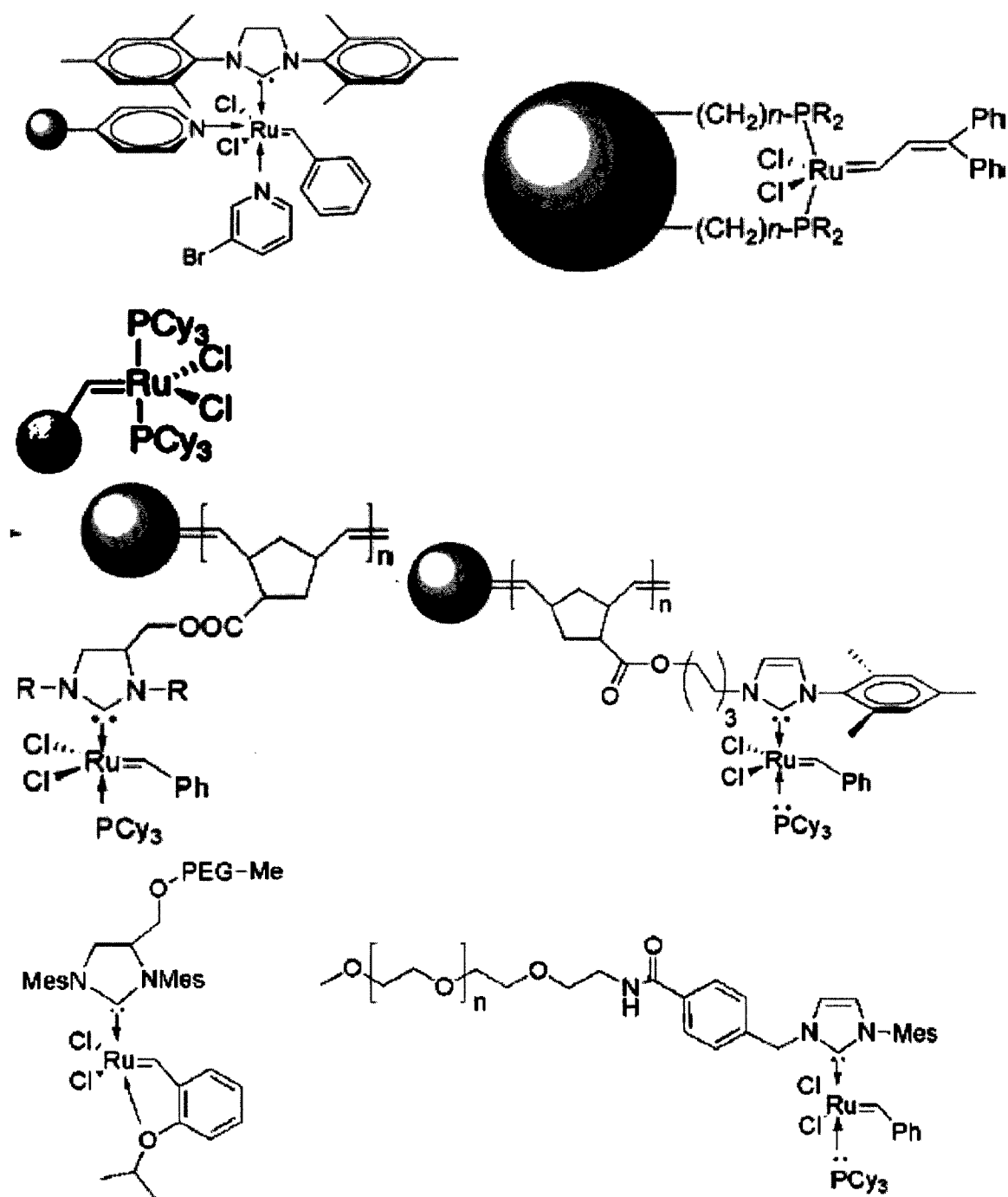
[0177] 其他的催化剂描述在美国专利 No. 6,407,190 ;EP 993465 ;美国专利 No. 6,635,768 ;CN1907992A ;美国申请 No. 2007/0043180A1 中,其全部以引用方式合并。

[0178] 与聚合或无机载体(其允许通过过滤除去)结合的复分解催化剂已有论述(参见例如 K.C Hultsch, J.A Jernelius, A.H Hoveyda and R.R Schrock, *Angew. Chem., Int. Ed.* 41(2002), p. 589 ;M Ahmed, A.G.M Barrett, D.C Braddock, S.M Cramp 和 R.A Procopiou, *Tetrahedron Lett.* 40(1999), pp. 8657-8662 ;D.P.Allen 等, *Org. Lett.* 11, 1261-1264(2009) ;或 M.R.Baumeister, *Chem. Rev.* 109,303-321(2009) 及其中的参考文献)。这一类型的催化剂的非限制性例子是：

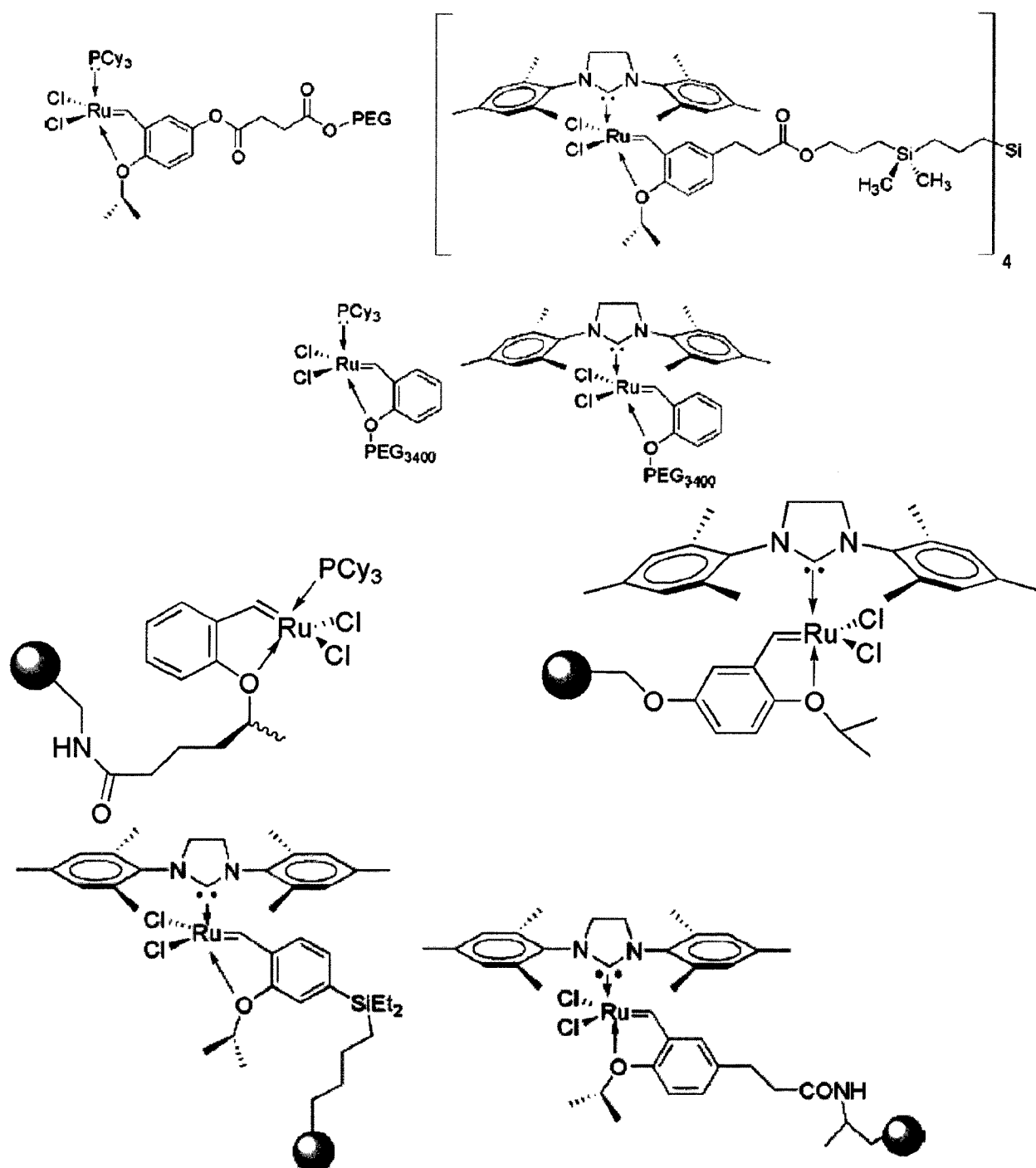
[0179]



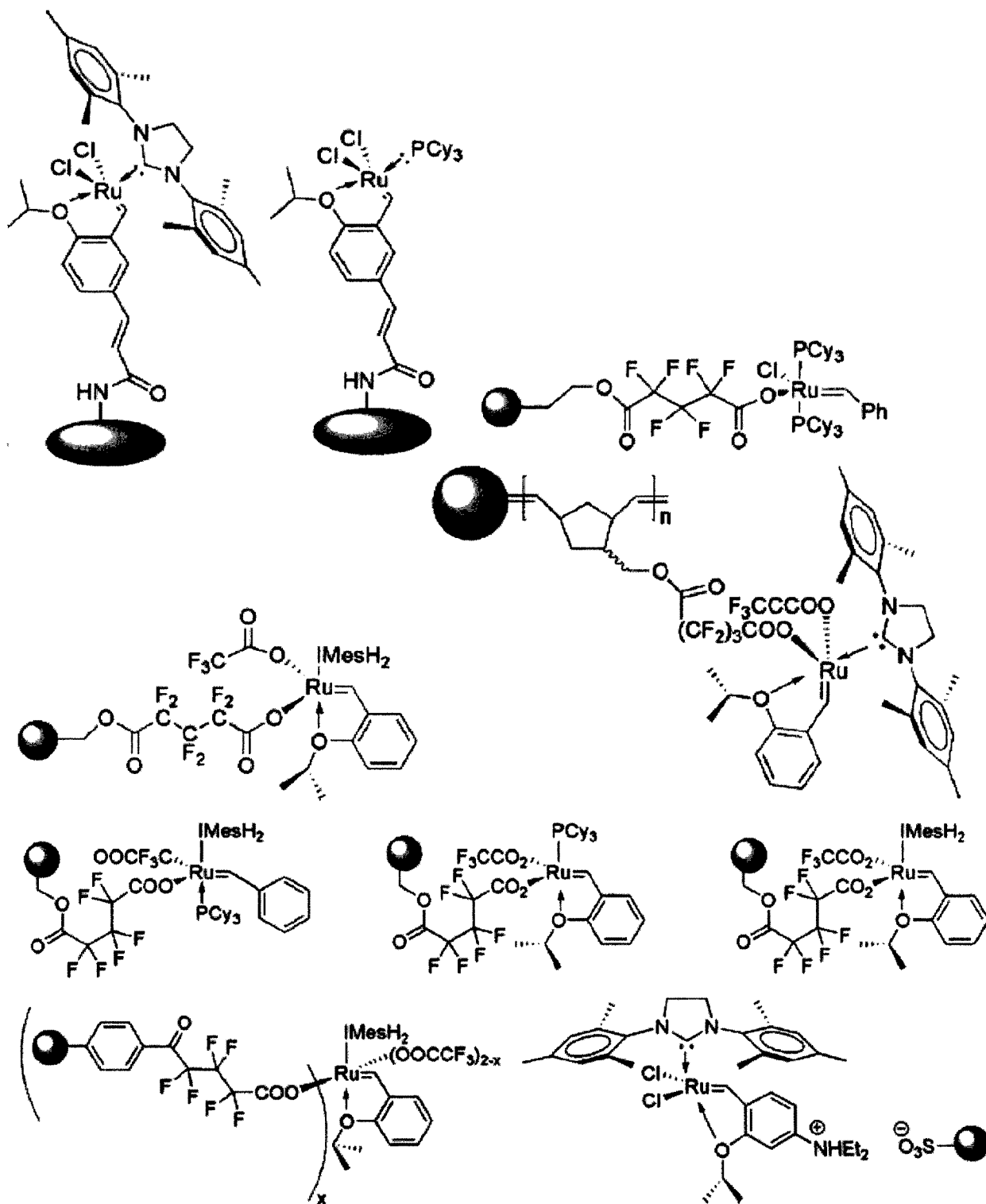
[0180]



[0181]



[0182]



[183] 适当的催化剂可以通过多种不同方法制备,例如美国专利 No. 5, 312, 940 ; 6, 921, 735 ;P. Schwab 等, J. Am. Chem. Soc. 118, 100 (1996) ;D. P. Allen 等, Org. Lett. 11, 1261-1264 (2009) 或 M. R. Baumeister, Chem. Rev. 109, 303-321 (2009) 及其中的参考文献描述的方法,其以引用方式合并于此。

[0184] 复分解反应例如可以在约 25℃ 到 110℃, 或在约 50℃ 的温度下进行。复分解反应可以利用有机溶剂例如二氯甲烷、二氯乙烷、三氯乙烷、甲苯、二甲基甲酰胺、乙腈、四氢呋喃进行。

[0185] 本文公开的反应例如可以在固体载体上进行。适当的固体载体包括颗粒、丝线(strand)、沉淀物、凝胶、薄板、管道、球体、容器、毛细管、衬垫、薄片、薄膜、板、载玻片、圆盘、膜等。这些固体载体可以通过各种各样的原料制备,包括聚合物、塑料、陶器、多糖、二氧化硅或硅基材料、碳、金属、无机玻璃、膜或其复合物。基底优选是平的,但可以采用多种可选择的表面构型。例如,基底可以包含凸起或者凹陷的区域,合成在该区域上进行。基底及其表面优选形成本文描述的反应在其上进行的刚性载体。也可以使用其他基底材料。

[0186] 拟肽大环化合物的纯化

[0187] 通常,本发明拟肽大环化合物使用组合的纯化步骤纯化。在本发明的一些实施方式中,拟肽大环化合物前体在固相载体上合成。环化后,可以分离固相载体并将其悬浮在溶剂例如 DMSO、DMSO/二氯甲烷混合物或者 DMSO/NMP 混合物的溶液中。DMSO/二氯甲烷或者 DMSO/NMP 混合物可以包含约 30%、40%、50% 或 60% 的 DMSO。在具体实施方式中,使用 50% /50% 的 DMSO/NMP 溶液。该溶液可以温育 1、6、12 或 24 小时,然后例如用二氯甲烷或 NMP 冲洗树脂。在一个实施方式中,该树脂用 NMP 冲洗。可以进行振摇和将惰性气体吹入溶液中。

[0188] 在一些实施方式中,温育步骤后在溶剂存在下用清除剂(scavenger)处理。如果该催化剂连接在固相(例如树脂、小珠)上,则可以使用过滤将反应混合物与固相分离来回回收催化剂。

[0189] 典型的清除剂包括丙胺、二氨基乙烷、N1-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺、三聚硫氰酸、乙二硫醇(ethanedithiol)、苯硫酚、二乙基硫脲、三苯基氧磷或者 2-巯基烟酸。温育可在室温下或在较高温度(例如 35、50 或 65℃)下进行。可以重复清除剂处理步骤,例如一次、两次或三次。在一些实施方式中,清除剂处理由相同或不同溶剂进行的额外冲洗步骤分隔或清除剂处理后用相同或不同溶剂进行额外的冲洗步骤。

[0190] 其他清除剂可从商业来源(例如 Reaxa、Engelhard、Johnson Matthey、Sigma-Aldrich)获得。金属清除剂的非限制性例子是来自 Degussa AG 的 Deloxan 金属清除剂,例如 Deloxan THP II 和 Deloxan MP。它们是大孔有机官能聚硅氧烷并能够从活性药物成分和化学过程除去 Pd、Pt、Rh、Ag、Au、Zn、Cu 及其他过渡金属。Deloxan THP II 携带硫脲作为官能团,而 Deloxan MP 携带硫醇官能团。这些清除剂可被用于分批模式或管塞-流模式。在分批反应器中,将 Deloxan 金属清除剂添加到反应混合物中,搅拌并过滤掉。在管塞-流反应器操作模式中,将 Deloxan 金属清除剂投入固定床柱中,并取消了过滤步骤。

[0191] 采用各种不同官能性的金属特异性清除剂适于纯化拟肽大环化合物。具有官能性的清除剂的非限制性例子包括来自 Reaxa 的 QuadraPure 清除树脂,例如 QuadraPure TU,其是带有硫脲官能团的大孔珠。可使用的来自 Reaxa 的其他非限制性清除产品包括 QuadraPure IDA(具有亚氨基二乙酸官能团的小珠)、AMPA(具有氨甲基膦酸官能团的小珠)、BZA(具有苄胺官能团的小珠)、BDZ(具有咪唑官能团的小珠)、EDA(具有胺官能团的小珠)、DET(具有硫醇官能团的小珠)、IMDAZ(具有咪唑基丙基氨基官能团的小珠)、MPA(具有巯基苯基氨基官能团的小珠)、AEA(具有氨乙基氨基官能团的小珠)、AK(具有活性酮官能团例如 2,4-丁二酮的小珠)。

[0192] 其他金属清除剂包括以商品名 QuadraSil 制造的 Reaxa 化合物,其基于具有限定的孔隙率的球状二氧化硅小珠,并可被用于水性或有机溶液中以及用于批或流式工艺中。

具体的例子包括 QuadraSi1 AP(具有氨基丙基官能团的小珠)、MP(具有巯基丙基官能团的小珠)、MTU(具有甲基硫脲官能团的小珠)、TA(具有三胺官能团的小珠)。

[0193] 也可以使用其他金属清除剂,例如由 Engelhard 提供的清除剂。这些试剂是由无机基质(包括二氧化硅、氧化铝和活性碳)制备的自由流动的粉末,并能够清除不同的金属。它们设计成用于固定床或使用水性和有机溶剂的浆料应用。清除剂的另一个例子是来自 Johnson Matthey 的 Smopex[®],其是纤维状金属清除系统。Smopex-111 是苯乙烯基硫醇接枝的聚烯烃纤维,其可以除去钯、铂、铑和铜。类似地,Smopex-105 是乙烯基吡啶接枝的聚烯烃纤维,其可以拾取阴离子铂基团金属和复合物,和 Smopex-102 是丙烯酸接枝的纤维,用于镍、铁或铬的阳离子消除。0.3-mm- 长的 Smopex 纤维在机械和化学上是非常稳定的。聚合物结合的螯合膦(例如在 Tetrahedron Letters :45(2004),3141-3142(其以引用方式合并于此)中论述的一种螯合膦)也适于作为清除剂。其他清除剂试剂包括 SiliaBond DMT(二巯基三嗪)和三(羟甲基)膦。

[0194] 在该第一冲洗步骤后,通过将拟肽大环化合物从固体载体上分离而制得粗的拟肽大环化合物。然后进一步纯化该粗的拟肽大环化合物制品。大环化合物以及由复分解反应得到的副产物可以通过任何合适技术包括层析(例如色谱法,例如反相 HPLC)或者过滤来回收或者分离。在一些实施方式中,该拟肽大环化合物经过一个、两个或三个反相 HPLC 步骤。例如,使用两个反相 HPLC 步骤。在一个实施方式中,至少一个所述 HPLC 步骤使用酸性溶剂例如 H₂O 和 / 或乙腈中的稀释 TFA(例如,0.05-0.5%)进行。或者,处于酸性 pH 的四乙基磷酸铵 (TEAP) 可以用作缓冲系统。在一个实施方式中,酸性溶剂包含稀释的 TFA。在另一实施方式中,该溶剂包含 TEAP。在本发明方法的一个实施方式中,使用两个反相 HPLC 步骤,其中一个步骤使用稀释的 TFA 作为溶剂且第二步使用不含 TFA 的 H₂O 和 / 或乙腈作为溶剂。在本发明方法的另一个实施方式中,使用两个反相 HPLC 步骤,其中两个步骤都使用稀释的 TFA 作为溶剂。在再另一个实施方式中,使用两个反相 HPLC 步骤,其中一个步骤使用稀释的 TFA 作为溶剂,而另一步骤使用 TEAP 作为溶剂。在再另一个实施方式中,至少一个反相 HPLC 纯化步骤使用在 H₂O 和 / 或乙腈中的稀释甲酸作为溶剂来进行。在另一方面,本发明提供一种不需要进行结晶步骤的纯化粗的拟肽大环化合物的方法,从而获得高纯度(例如小于 30、20、10、5 或 1ppm 的钯或钌含量)拟肽大环化合物。

[0195] 在另一个方面,本发明提供测定并评估杂质水平的方法。可用于分析杂质的仪器的非限制性例子包括分析技术例如核感应耦合等离子体 (nuclear inductively coupled plasma) 分析 (ICP)、核感应耦合等离子体质谱分析 (ICP-MS)、磁共振波谱法、红外光谱法、质谱法、气相色谱法和高效液相色谱法。

[0196] 在评估杂质时,用几种方式评价分析仪器的特异性。在一个实施方式中,通过符合由食品药品监督管理局出版的管理指南的方法来评价与本发明组合物有关的杂质水平。例如,对于用来评估杂质的设备的阳性测试,用已知杂质的第一分析物与具有未知量杂质的结构上类似于第一分析物的第二分析物比较。在可能干扰杂质检测的第三种试剂的存在下进行设备的类似测试,以估计该设备的分析能力。滴定可用于测试以获得与杂质相对于活性成分的百分比有关的药物释放的药代动力学参数。进行关于辅料 (excipients) 在组合物的释放和活性方面的效果的杂质测试,以评估杂质对拟肽大环化合物组合物的影响。其他分析测试包括热、光、热、湿度、酸 / 碱水解和氧化对与杂质水平成比例的拟肽大环化合物组合

物的影响。

[0197] 测量并评估杂质的另一个方面是测量的线性度。使用几个浓度范围在合理的数据点误差或变异限度内由大多数的数据点对可提供用于数学线性的范围内的杂质进行评估。可以应用数据点的数学转换（例如回归分析）来确定测量的线性度。

[0198] 在测试杂质对本发明的影响时，加上或减去 20% 的可接受杂质进行该测试。同样，对于本发明的浓度范围，含有 70% 到 130% 产量范围的组合物进行杂质测试。

[0199] 在定量杂质时，评估来自工艺、生产环境和活性成分降解的化学产物水平。在一个实施方式中，使用质谱仪设备以获得测试样品的化学特征。为实现数据的准确性和可靠性，在覆盖指定范围的最少 3 个浓度水平上使用最少 9 个测定（例如，对于每一总的分析过程，3 个浓度 / 3 次重复）来重复杂质评估。准确性可以通过样品中已知添加量的分析物的测试以回收率百分比记录，或记录为平均值和接受的真实值之间的差加上置信区间。同样，为确保再现性，盲 - 标记样品进行实验室间试验。另外，可以将已知浓度的活性成分与空白样品对比测量基线信噪比水平。考虑用于评估杂质的其他变型的非限制性例子包括分析溶液的稳定性和提取时间。在液相色谱情况下，这种例子包括流动相中 pH 变异的影响、流动相组成变异的影响、不同的柱（不同的批号和 / 或供应商）、温度和流速。在气相色谱情况下，典型变型的例子是不同的柱（不同的批号和 / 或供应商）、温度和流速。

[0200] 分析

[0201] 本发明拟肽大环化合物的性质例如通过使用如下所述方法来分析。在一些实施方式中，本发明拟肽大环化合物较之没有本文描述的取代基的相应多肽具有改善的生物学性质。

[0202] 测定 α - 螺旋度的试验

[0203] 在溶液中，具有 α - 螺旋结构域的多肽的二级结构将在无规卷曲结构和 α - 螺旋结构之间达到动态平衡，通常表示为“百分螺旋度”。因此，例如，未修饰的促凋亡 BH3 结构域在溶液中主要是无规卷曲， α - 螺旋的含量通常低于 25%。另一方面，例如，具有优化连接体的拟肽大环化合物具有的 α - 螺旋度比没有 R- 取代基的相应大环化合物至少高两倍。在一些实施方式中，本发明的大环化合物具有的 α - 螺旋度大于 50%。为测试本发明拟肽大环化合物（例如 BH3 结构域基的大环化合物）的螺旋度，将化合物溶液在水性溶液中（例如 pH7 的 50mM 磷酸钾溶液，或蒸馏水，浓度达到 25-50 μ M）。使用标准测量参数（例如温度，20 $^{\circ}$ C；波长，190-260nm；步进分辨率，0.5nm；速度，20nm/sec；累积，10；响应，1sec；带宽，1nm；路径长度，0.1cm）在分光偏振计（例如 Jasco J-710）上获得圆二色性（CD）光谱。通过将平均残基椭圆率（例如 $[\Phi]_{222\text{obs}}$ ）除以模型螺旋十肽的报道值计算各肽的 α - 螺旋含量（Yang 等（1986），Methods Enzymol. 130 :208）。

[0204] 测定熔融温度（T_m）的试验

[0205] 例如，具有二级结构（例如 α - 螺旋）的本发明拟肽大环化合物比没有 R- 取代基的相应大环化合物显示较高的熔融温度。通常本发明拟肽大环化合物的 T_m > 60 $^{\circ}$ C，表明在水性溶液中的高度稳定结构。为测试大环形成对熔融温度的影响，将拟肽大环化合物或未修饰的肽溶解在蒸馏水（例如最终浓度为 50 μ M）中，并通过使用标准参数（例如波长 222nm；步进分辨率，0.5nm；速度，20nm/sec；累积，10；响应，1sec；带宽，1nm；温度升高速率：1 $^{\circ}$ C /min；路径长度，0.1cm）在分光偏振计（例如，Jasco J-710）上测量温度范围（例

如 4 到 95°C) 内椭圆率的变化来测定 T_m 。

[0206] 蛋白酶抗性试验

[0207] 肽骨架的酰胺键容易被蛋白酶水解, 因此使得肽化合物在体内易被快速降解。然而, 肽螺旋形成通常包埋酰胺骨架, 因此可以保护它不被蛋白水解裂解。本发明拟肽大环化合物可以进行体外胰蛋白酶蛋白水解, 以评估较之没有 R- 取代基的相应大环化合物的降解速度的变化。例如, 拟肽大环化合物和没有 R- 取代基的相应大环化合物与胰蛋白酶琼脂糖一直温育, 并在多个时间点通过离心来终止反应以及随后进行 HPLC 注射以通过在 280nm 的紫外吸收定量残留的底物。简言之, 拟肽大环化合物和拟肽前体 (5mcg) 用胰蛋白酶琼脂糖 (Pierce) (S/E ~ 125) 温育 0、10、20、90 和 180 分钟。以高速台式离心终止反应; 分离的上清液中残留的底物用 280nm 处的基于 HPLC 的峰值检测定量。蛋白水解反应显示一级动力学, 且速率常数 k 由 $\ln[S]$ 对时间 ($k = -1 \times \text{slope}$) 的曲线图来确定。

[0208] 体外稳定性试验

[0209] 具有优化连接体的拟肽大环化合物的体外半衰期比没有 R- 取代基的相应大环化合物长至少两倍, 其体外半衰期为 12 小时或更长。多种试验可用于体外血清稳定性研究。例如, 拟肽大环化合物和没有 R- 取代基的相应大环化合物 (2mcg) 与新鲜的小鼠、大鼠和 / 或人血清 (2mL) 一起在 37°C 温育 0、1、2、4、8 和 24 小时。为测定完整化合物的水平, 可以使用以下过程: 通过将 100 μ l 血清转移到 2mL 离心管中, 然后添加 10 μ l 的 50% 甲酸和 500 μ l 乙腈并在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 下以 14,000RPM 离心 10min 来提取样品。然后将上清液转移到新的 2mL 管中并在 $N_2 < 10\text{psi}$, 37°C 下在 Turbopap 上蒸发。然后在 100 μ L 的 50 : 50 的乙腈: 水中重构样品, 并进行 LC-MS/MS 分析。

[0210] 体外结合试验

[0211] 为评估拟肽大环化合物和拟肽前体与受体蛋白的结合和亲合力, 例如使用荧光偏振试验 (FPA)。FPA 技术使用偏振光和荧光示踪剂测定分子定向和运动性。当用偏振光激发时, 与具有高表观分子量的分子 (例如与大蛋白结合的 FITC- 标记的肽) 结合的荧光示踪剂 (例如, FITC) 由于其较之与较小分子 (例如在溶液中处理游离状态的 FITC- 标记的肽) 结合的荧光示踪剂具有较慢的转速而发出高水平的偏振荧光。

[0212] 例如, 荧光标记的拟肽大环化合物 (25nM) 与受体蛋白 (25-1000nM) 在室温下在结合缓冲液 (140mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.4) 中温育 30 分钟。例如, 在发光分光光度计 (例如 Perkin-Elmer LS50B) 上通过荧光偏振测定结合活性。例如, 可以使用 Graphpad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 通过非线性回归分析测定 K_d 值。在有些情况下, 本发明拟肽大环化合物显示与没有 R- 取代基的相应大环化合物相似或较低的 K_d 。

[0213] 例如, 该试验可以使用 BH3- 肽的受体蛋白如 BCL-2、BCL-X_L、BAX 或 MCL1。该试验也可以使用 p53 肽的受体蛋白如 MDM2 或 MDMX。

[0214] 体外置换试验以鉴定肽 - 蛋白相互作用的拮抗剂

[0215] 为评估拮抗肽 (例如 BH3 肽或 p53 肽) 和受体蛋白之间的相互作用的化合物的结合和亲合力, 例如使用利用由拟肽前体序列获得的荧光标记的拟肽大环化合物的荧光偏振试验 (FPA)。FPA 技术使用偏振光和荧光示踪剂测定分子定向和运动性。当用偏振光激发时, 与具有高表观分子量的分子 (例如与大蛋白结合的 FITC- 标记的肽) 结合的荧光示踪

剂（例如，FITC）由于较之与较小分子（例如在溶液中处理游离状态的 FITC- 标记的肽）结合的荧光示踪剂具有较慢的转速而发出高水平的偏振荧光。在竞争性结合 FPA 实验中检测拮抗荧光标记的拟肽大环化合物和受体蛋白之间的相互作用的化合物。

[0216] 例如，假定的拮抗剂化合物（1nM 到 1mM）和荧光标记的拟肽大环化合物（25nM）与受体蛋白（50nM）一起在室温下在结合缓冲液（140mM NaCl, 50mM Tris-HCL, pH 7.4）中温育 30 分钟。例如，在发光分光光度计（例如 Perkin-Elmer LS50B）上通过荧光偏振测定拮抗剂结合活性。例如，使用 Graphpad Prism 软件（GraphPad Software, Inc., San Diego, CA）通过非线性回归分析测定 Kd 值。

[0217] 任何种类的分子，例如小的有机分子、肽、寡核苷酸或蛋白质可以在该试验中作为假定拮抗剂进行检验。该试验可以使用 BH3- 肽的受体蛋白如 BCL-2、BCL-XL、BAX 或 MCL1。该试验也可以使用 p53 肽的受体蛋白如 MDM2 或 MDMX。

[0218] 完整细胞中的结合试验

[0219] 可以通过免疫沉淀实验测定肽或拟肽大环化合物与其在完整细胞中的天然受体的结合。例如，完整细胞与荧光标记的（FITC- 标记）化合物一起在不存在血清的情况下温育 4 小时，然后补充血清，再温育 4-18 小时。然后使细胞沉淀并在溶解缓冲液（50mM Tris [pH 7.6], 150mM NaCl, 1% CHAPS 和蛋白酶抑制剂混合物）中在 4℃ 温育 10 分钟。提取物以 14,000rpm 的速度离心 15 分钟，收集上清液并用 10 μl 山羊抗 -FITC 抗体温育 2 小时，在 4℃ 旋转，然后在 4℃ 与蛋白 A/G Sepharose（50 μl 的 50% 珠浆料）再温育 2 小时。快速离心后，用含有递增盐浓度（例如，150、300、500mM）的溶解缓冲液洗涤沉淀。然后珠子在 150mM NaCl 中再平衡，然后添加含有 SDS 的样品缓冲液并煮沸。离心后，上清液任选使用 4% -12% 梯度的 Bis-Tris 凝胶进行电泳，随后转移入 Immobilon-P 膜。封闭后，印迹任选与检测 FITC 的抗体以及检测与拟肽大环化合物结合的蛋白（包括 BCL2、MCL1、BCL-XL、A1、BAX、BAK、MDM2 或 MDMX）的一种或多种抗体一起温育。

[0220] 细胞渗透性试验

[0221] 例如，拟肽大环化合物的细胞渗透性比没有 R- 取代基的相应大环化合物好。在一些实施方式中，拟肽大环化合物的细胞渗透性比没有 R- 取代基的相应大环化合物好。例如，具有优化的连接体的拟肽大环化合物的细胞渗透性比没有 R- 取代基的相应大环化合物高至少两倍，且通常观察到 20% 或以上的所应用的拟肽大环化合物在 4 小时后渗透细胞。为测定拟肽大环化合物和没有 R- 取代基的相应大环化合物的细胞渗透性，完整细胞与荧光标记的拟肽大环化合物或没有 R- 取代基的相应大环化合物（10 μM）一起在不含血清的培养基中在 37℃ 下温育 4 小时，用培养基洗涤两次，并与胰蛋白酶（0.25%）在 37℃ 温育 10min。细胞再次洗涤并再悬浮在 PBS 中。例如，使用 FACSCalibur 流式细胞仪或 Cellomics' KineticScan® HCS 阅读器分析细胞荧光。

[0222] 细胞效力试验

[0223] 例如，使用多种致癌的和非致癌的细胞系和源自人或小鼠细胞群的原代细胞以基于细胞的杀伤试验来测定某些拟肽大环化合物的效力。例如，在与拟肽大环化合物（0.5 到 50 μM）一起温育 24-96 小时的时间内监测细胞存活力，以识别以 $EC_{50} < 10 \mu M$ 杀死细胞的那些。测定细胞存活力的几种标准试验是商业可获得的，且任选用于评估拟肽大环化合物的效力。另外，测定膜联蛋白 V 和胱天蛋白酶活化的试验任选地用于评估拟肽大环化合物

是否通过激活细胞凋亡机制来杀死细胞。例如,使用 Cell Titer-glo 试验,其测定随细胞内 ATP 浓度变化的细胞存活力。

[0224] 体内稳定性试验

[0225] 为研究拟肽大环化合物的体内稳定性,例如,将化合物以 0.1 到 50mg/kg 的浓度通过 IV、IP、PO 或吸入途径给药于小鼠和 / 或大鼠,并在注射后 0'、5'、15'、30'、1 小时、4 小时、8 小时和 24 小时抽取血液样本。然后通过上述 LC-MS/MS 测定 25 μ L 新鲜血清中的完整化合物的水平。

[0226] 动物模型中的体内效果

[0227] 为测定本发明拟肽大环化合物在体内的抗致癌活性,例如,单独施用 (IP、IV、PO、通过吸入或经鼻途径) 该化合物或与亚最佳剂量的相关化疗剂 (例如,环磷酰胺、亚德利亚霉素、依托泊苷) 联合施用。在一个实施例中,在 NOD-SCID 小鼠经受全身照射 3 小时后,将稳定表达荧光素酶的 5x 10⁶ RS4 ;11 细胞 (从患有急性淋巴母细胞性白血病的病人骨髓中建立) 通过尾静脉注射入小鼠体内。如果不进行处理,该种白血病在该模型中在 3 周内是致命的。例如,通过将 D- 荧光素 (60mg/kg) 注入小鼠并对麻醉的动物成像 (例如, Xenogen In Vivo Imaging System, Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA) 来容易地监测白血病。利用动态图像软件 (Living Image Software) (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA) 通过光子通量 (光子 / 秒) 和积分来定量全身生物荧光。例如,将拟肽大环化合物单独地或与亚最佳剂量的相关化疗剂组合通过尾静脉或 IP 途径以 0.1mg/kg 到 50mg/kg 的剂量给药于白血病小鼠 (注射 / 实验的第 1 天之后 10 天,在 14-16 的生物荧光范围内) 7 到 21 天。任选地,在整个实验期间中,小鼠每隔一天成像,并在实验过程中每天监测存活率。在实验结束,死亡的小鼠任选进行尸检。另一个动物模型是稳定表达荧光素酶的 DoHH2 (源自人滤泡性淋巴瘤的细胞系) 植入 NOD-SCID 小鼠。这些体内试验任选产生初步的药代动力学、药效学和毒理学数据。

[0228] 临床试验

[0229] 为测定本发明拟肽大环化合物用于人类治疗的适用性,进行了临床试验。例如,选择诊断为患癌症并需要治疗的病人,并分成治疗组和一个或多个对照组,其中治疗组给予本发明的拟肽大环化合物,而对照组接受安慰剂或已知的抗癌药。因此,通过在例如存活率和生活质量的因素方面进行患者组的比较,可以评估本发明拟肽大环化合物的治疗安全性和效力。在该实施例中,用拟肽大环化合物治疗的患者组比用安慰剂治疗的患者对照组具有提高的长期存活率。

[0230] 药物组合物和给药途径

[0231] 本发明拟肽大环化合物也包含其药学可接受的衍生物或前药。“药学可接受的衍生物”指的是本发明化合物的任何药学可接受的盐、酯、酯的盐、前药或其他衍生物,它们在给药于接受者时能够提供 (直接或间接) 本发明化合物。特别有利的药学可接受的衍生物是当给药于哺乳动物时提高本发明化合物的生物利用度 (例如,通过增加口服给药化合物进入血液的吸收) 的那些,或相对于母体物质提高活性化合物至生物区室 (例如,脑或淋巴系统) 的递送的那些。一些药学可接受衍生物包括增加水溶性或通过胃肠黏膜的主动转运的化学基团。

[0232] 在一些实施方式中,通过共价或非共价结合适当的官能团修饰本发明拟肽大环化

合物,以提高选择性生物学性质。这种修饰包括提高进入预定的生物区室(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)的生物渗透、提高口服利用度、提高溶解度以允许注射给药、改变代谢作用和改变排泄速度的那些。

[0233] 本发明化合物的药学可接受的盐包括由药学可接受的无机和有机酸和碱衍生的那些盐。适当的酸式盐的例子包括醋酸盐、己二酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、甲酸盐、富马酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、棕榈酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和十一酸盐。由适当的碱衍生的盐包括碱金属(例如,钠)盐、碱土金属(例如,镁)盐、铵盐和N-(烷基) 4^+ 盐。

[0234] 本发明药物组合物包含本文描述的拟肽大环化合物或其药学可接受盐、其他试剂包括例如吗啡或可待因和任何药学可接受的载体、辅料或赋形剂(vehicle)。或者本发明的替代组合物包含本文描述的拟肽大环化合物或其药学可接受盐及药学可接受的载体、辅料或赋形剂。本文描述的组合物含有有效实现疾病或疾病症状的调节的量的本文描述的拟肽大环化合物以及其他治疗剂(如果存在),所述疾病或疾病症状包括BCL-2家族成员介导的疾病或其症状。

[0235] 术语“药学可接受的载体或辅料”指的是可以和本发明化合物一起给药于病人且不破坏该化合物的药理活性的载体或辅料,并且当其以足以递送治疗量化合物的剂量施用时无毒的。

[0236] 可以使用于本发明药物组合物中的药学可接受的载体、辅料和赋形剂包括但不限于:离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、自乳化药物递送系统(SEDDS)例如d- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸盐、用于药物剂型中的表面活性剂例如吐温或其他类似聚合递送基质、血清蛋白质例如人血清白蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电离质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-ne-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。也可以有利地使用环糊精例如 α -、 β -和 γ -环糊精以提高本发明描述的通式化合物的递送。

[0237] 为制备本发明化合物的药物组合物,药学可接受的载体包括固体或液体载体。固体形式的制剂包括粉末、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、栓剂和分散颗粒。固体载体可以是一种或多种物质,其也用作稀释剂、调味剂、粘合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包封材料。制剂和给药的技术细节描述在科学和专利文献中,例如参见Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA 的最新版本。

[0238] 在粉剂中,载体是精细粉碎的固体,其与精细粉碎的有效成分混合。在片剂中,有效成分和具有必要粘合性的载体以适当比例混合,并压成所需形状和大小。

[0239] 适当的固体赋形剂是碳水化合物或蛋白质填充剂,包括但不限于糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;来自玉米、小麦、水稻、马铃薯或其他植物的淀粉;纤维素例如甲基纤维素、羟丙甲基纤维素或羧甲基纤维素钠;和树胶,包括阿拉伯胶和黄芪胶;以及蛋白质,例如明胶和胶原蛋白。如果需要,加入崩解剂或增溶剂,例如交联聚乙烯基吡咯烷酮、琼脂、藻酸或其盐,例如海藻酸钠。

[0240] 液体形式制剂包括溶液、悬浮液和乳液,例如,水或水 / 丙二醇溶液。对于胃肠外注射,液体制剂可以在水性聚乙二醇溶液中配制成溶液。

[0241] 例如,本文描述的拟肽大环化合物可以通过静脉内、动脉内、真皮下、腹膜内、肌内或皮下注射给药;或经口服、经口腔、经鼻、经粘膜、局部、以眼科制剂或通过吸入给药,剂量为约 0.001 到约 100mg/kg 体重,或根据特定药物的要求。本发明方法预期给予有效量的化合物或化合物组合物以达到所需或所规定的效果。通常,本发明的药物组合物以每天约 1 到约 6 次给药,或以连续输注给药。这种给药可用于慢性或急性治疗。可以与载体材料结合以制备单一剂型的活性成分量将根据被治疗的宿主和特定的给药方式变化。典型制剂包含约 5% 到约 95% 的活性化合物 (w/w)。或者,这种制剂包含约 20% 到约 80% 的活性化合物。

[0242] 可能需要比以上所述剂量更低或更高的剂量。用于任何特定病人的具体剂量和治疗方案将取决于多种因素,包括所使用的具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康状态、性别、饮食、给药时间、排泄速度、药物组合、疾病、病症或症状的严重程度和病程、病人对疾病、病症或症状的倾向以及治疗医师的判断。

[0243] 一旦病人的病症改善,如有必要,可以给予本发明化合物、组合物或其组合的维持剂量。随后,给药的剂量或频率或两者可以根据症状减少到保持改善的状态的水平。然而,在出现疾病症状的任何复发时,病人可能需要长期的间歇治疗。

[0244] 本发明药物组合物可以经口服、胃肠外、通过吸入喷雾、局部、经直肠、经鼻、经口腔、经阴道或经由植入贮库给药,优选通过口服或注射给药。本发明药物组合物可以包含任何常用的非毒性药学可接受的载体、辅料或赋形剂。在某些情况下,制剂的 pH 可通过药学可接受的酸、碱或缓冲剂调节,以提高所配制的化合物或其递送形式的稳定性。本文使用的术语“胃肠外”包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内 (intrasternal)、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0245] 所述药物组合物可以是无菌可注射制剂形式,例如,作为无菌可注射水性或油性悬浮液。可使用适当的分散或润湿剂 (例如吐温 80) 和悬浮剂根据本领域已知的技术配制该悬浮液。无菌可注射制剂也可以是无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如,作为 1,3- 丁二醇中的溶液。可使用的可接受赋形剂和溶剂包括甘露醇、水、Ringer's 溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的非挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的非挥发油,包括合成的单甘油酯或甘油二酯。脂肪酸 (例如油酸) 和其甘油酯衍生物可用于制备可注射制剂,也可以使用天然的药学可接受的油,例如橄榄油或蓖麻油,特别是其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液也可以包含长链醇稀释剂或分散剂,或羧甲基纤维素或类似的分散剂,其通常用于配制药学可接受的剂型例如乳剂和悬浮液。通常用于制备药学可接受的固体、液体或其他剂型的其他常用的表面活性剂例如吐温或司盘和 / 或其他类似的乳化剂或生物利用度增强剂也可用于配制目的。

[0246] 本发明药物组合物可以以任何口服可接受的剂型口服给药,包括但不限于胶囊、片剂、乳剂和水性悬浮液、分散体和溶液。对于用于口服使用的片剂,常用载体包括乳糖和玉米淀粉。通常也添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于以胶囊形式的口服给药,有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服给予水性悬浮液和 / 或乳剂时,活性成分可以悬浮或溶解在结合有乳化剂和 / 或悬浮剂的油相中。如果需要,可以添加某些增甜和 / 或调味和 / 或

着色剂。

[0247] 本发明药物组合物也可以用于直肠给药的栓剂形式给药。可以通过将本发明化合物与适当的非刺激性赋形剂混合来制备这些组合物,所述赋形剂在室温下是固体但在直肠温度下是液体,因此能在直肠中熔融并释放活性成分。这种材料包括但不限于可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0248] 本发明药物组合物可通过鼻气雾剂或吸入给药。这种组合物根据药物制剂领域公知的技术制备,并可使用苯甲醇或其他适当防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其他增溶或分散剂制备成盐水溶液。

[0249] 药物制剂优选是单位剂型的形式。在这种形式中,制剂细分成含有适当量有效成分的单元剂量。单位剂型可以是包装制剂,所述包装含有不连续量的制剂,例如包装的片剂、胶囊和小瓶或安瓿中的粉末。该单位剂型也可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身,或者其可以是适当数量的这些包装形式中的任何一种。

[0250] 当本发明组合物含有本文描述的通式化合物和一种或多种其他治疗剂或预防剂的组合时,该化合物和其他药剂两者都以通常在单一治疗中给药剂量的约 1 到 100% 的剂量水平存在,优选约 5 到 95% 的剂量。其他药剂可以和本发明化合物分开给药,或作为多剂量方案的一部分给药。或者,那些药剂可以是单一剂型的一部分,在单一组合物中与本发明化合物混合在一起。

[0251] 使用方法

[0252] 一方面,本发明提供新颖的拟肽大环化合物,其用于在竞争性结合试验中识别与拟肽大环化合物模拟的蛋白或肽的天然配体结合的物质。例如,在 p53MDM2 系统中,基于 p53 的标记的稳定拟肽大环化合物和竞争性结合 MDM2 的小分子一起用于 MDM2 结合试验。竞争结合研究允许快速地体外评估和确定对 p53/MDM2 系统特异性的药物候选者。类似地,在 BH3/BCL-X_L 抗细胞凋亡系统中,基于 BH3 的标记的拟肽大环化合物可以和竞争结合 BCL-X_L 的小分子一起用于 BCL-X_L 结合试验中。竞争结合研究允许快速地体外评估和测定对 BH3/BCL-X_L 系统特异性的药物候选者。本发明还提供抗拟肽大环化合物的抗体的制备。在一些实施方式中,这些抗体与拟肽大环化合物和拟肽大环化合物由其衍生的 p53 或 BH3 拟肽前体特异性结合。例如,这种抗体分别干扰 p53/MDM2 或 BH3/BCL-XL 系统。

[0253] 在其他方面,本发明提供治疗处于疾病危险(或易患疾病)或患有疾病的病人的预防和治疗方案,所述疾病与异常(例如,不足或过多)BCL-2 家族成员表达或活性(例如,外源性或内源性的细胞凋亡途径异常)有关。据信某些 BCL-2 型疾病至少部分地由一种或多种 BCL-2 家族成员的异常水平(例如,过高或过低表达)引起,或由显示异常活性的一种或多种 BCL-2 家族成员的存在引起。如此,例如,BCL-2 家族成员水平和/或活性的降低或 BCL-2 家族成员水平和/或活性的提高用于改善或减轻疾病的负面症状。

[0254] 在另一方面,本发明提供用于通过干扰肿瘤细胞中 p53 和 MDM2 之间的相互作用或结合从而治疗或预防过度增殖性疾病的方法。这些方法包括将有效量的本发明化合物给药于温血动物包括人,或施用于含有野生型 p53 的肿瘤细胞。在一些实施方式中,本发明化合物的给药引起细胞生长抑制或细胞凋亡。在其他或进一步的实施方式中,本发明用于治疗含有升高的 MDM2 水平的疾病和/或肿瘤细胞。本文使用的升高水平的 MDM2 指的是 MDM2 水平高于含有多于 MDM2 的正常拷贝数(2)的细胞中发现的水平或高于每细胞约 10,000 分

子MDM2(如通过ELISA和类似试验(Picksley等(1994),Oncogene 9,25232529)测得)的水平。

[0255] 如本发明所使用,术语“治疗”定义为将治疗剂应用或给药于病人,或将治疗剂应用或给药于来自病人的分离组织或细胞系,所述病人患有疾病、病症或患疾病的倾向,治疗目的是治愈、恢复、减轻、缓解、改变、解除、改善、提高或影响该疾病、病症或疾病倾向。

[0256] 在一些实施方式中,本发明拟肽大环化合物用于治疗、预防和/或诊断癌症和肿瘤病症。如本文所使用,术语“癌症”、“过度增殖的”和“肿瘤的”指的是具有自发生长能力的细胞,也就是说,以迅速增殖的细胞生长为特征的异常状态或病症。过度增殖的和肿瘤的疾病状态可以分为病理性的,即,表现或构成疾病状态,或可以分为非病理性的,即,脱离正常但与疾病状态无关。该术语意味着包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性的组织或恶性转化细胞、组织或器官,而不管组织病理学类型或侵入阶段。转移性肿瘤可以由众多原发肿瘤类型引起,包括但不限于乳腺、肺、肝、结肠和卵巢来源的肿瘤。“病理性过度增殖”细胞发生在以恶性肿瘤生长为特征的疾病状态中。非病理性过度增殖细胞的例子包括与伤口修复有关的细胞增殖。细胞增殖和/或分化病症的例子包含癌症,例如癌瘤、肉瘤或转移性疾病。在一些实施方式中,拟肽大环化合物是用于控制乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、这些癌症的转移等的新颖治疗剂。

[0257] 癌症或肿瘤病症的例子包括但不限于:纤维肉瘤、肌肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing's瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胃癌、食道癌、直肠癌、胰癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、头颈癌、皮肤癌、脑癌、鳞状细胞癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilm's瘤、子宫颈癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、淋巴瘤或卡波西肉瘤。

[0258] 增殖性疾病的例子包括造血系统肿瘤疾病。如本文所使用,术语“造血系统肿瘤疾病”包括涉及造血系统来源的增生性/肿瘤性细胞或其前体细胞的疾病,例如,由骨髓、淋巴或红细胞谱系产生。优选地,疾病由分化不良急性白血病产生,例如,成红细胞白血病和急性成巨核细胞白血病。其他示例性的骨髓疾病包括但不限于,急性早幼粒细胞白血病(APML)、急性髓性白血病(AML)和慢性粒细胞性白血病(CML)(参见Vaickus(1991),Crit Rev. Oncol./Hematol. 11:267-97的综述);淋巴恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴母细胞性白血病(ALL),其包括B-谱系ALL和T-谱系ALL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、幼淋巴细胞性白血病(PLL)、毛细胞白血病(HLL)和Waldenstrom's巨球蛋白血症(WM)。其他形式的恶性淋巴瘤包括但不限于非霍奇金淋巴瘤和其变体、外周T细胞淋巴瘤、成人T细胞性白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞性淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞性白血病(LGF)、霍奇金氏症和Reed-Stenberg病。

[0259] 乳腺的细胞增殖性和/或分化疾病的例子包括但不限于,增殖性的乳腺疾病例如包括,上皮细胞增生、硬化性腺病和小管乳头状瘤;肿瘤,例如,基质肿瘤如纤维性瘤、叶状肿瘤和肉瘤,和上皮细胞瘤例如大管乳头状瘤;乳腺的癌包括原位(非侵袭性)癌,包括导管原位癌(包括Paget's病)和小叶原位癌,和侵袭性(浸润性)癌,包括但不限于,浸润

性导管癌、浸润性小叶癌、髓样癌、胶样（粘液）癌、管状癌和浸润性乳头状癌、和混杂性的恶性肿瘤。男性乳腺疾病包括但不限于男子乳腺发育症和癌。

[0260] 肺的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于, 支气管癌, 包括副肿瘤综合征、细支气管肺泡癌、神经内分泌肿瘤, 例如支气管类癌瘤、混杂性肿瘤和转移性肿瘤; 胸膜病变包括炎性胸腔积液、非炎性胸腔积液、气胸和胸膜肿瘤, 包括孤立性纤维性肿瘤（胸膜纤维瘤）和恶性间皮瘤。

[0261] 结肠的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于非肿瘤息肉、腺瘤、家族性综合征、结肠直肠癌形成、结肠直肠癌和类癌瘤。

[0262] 肝的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于结节性增生、腺瘤和恶性肿瘤, 包括肝原发癌和转移性肿瘤。

[0263] 卵巢的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于, 卵巢肿瘤, 例如体腔上皮肿瘤、浆液性肿瘤、粘液瘤、子宫骨膜样肿瘤、透明细胞腺癌、囊腺纤维瘤、卵巢布伦纳氏瘤、表面上皮细胞瘤; 生殖细胞肿瘤例如成熟（良性）畸胎瘤、单胚层性畸胎瘤、未成熟恶性畸胎瘤、无性细胞瘤、内胚窦瘤、绒毛膜癌; 生殖索-间质肿瘤例如粒层-卵泡膜细胞瘤、卵泡膜细胞纤维瘤、男性细胞瘤、hill 细胞瘤和性腺母细胞瘤; 以及转移性肿瘤例如 Krukenberg 瘤。

[0264] 在其他或进一步的实施方式中, 本文描述的拟肽大环化合物用于治疗、预防或诊断以过度活跃的细胞死亡或由于生理损伤的细胞死亡等为特征的病症。以过早或不需要的细胞死亡或者不需要的或过多的细胞增殖为特征的病症的一些例子包括但不限于细胞过少 / 细胞减生的、非细胞的 / 再生障碍的或细胞过多 / 增生性的病症。一些例子包括血液系统疾病, 包括但不限于 fanconi 贫血、再生障碍性贫血、地中海贫血、先天性嗜中性白血球减少症、脊髓发育不良。

[0265] 在其他或进一步的实施方式中, 用于降低细胞凋亡的本发明拟肽大环化合物用于治疗与不合需要的细胞死亡水平有关的疾病。因此, 在一些实施方式中, 抗细胞凋亡的本发明拟肽大环化合物用于治疗例如导致与病毒感染有关的细胞死亡的疾病, 例如, 与人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染有关的疾病。多种神经系统疾病的特征在于特定集合的神经元的逐渐丧失, 且在一些实施方式中, 本发明抗细胞凋亡的拟肽大环化合物用于治疗这些疾病。这些疾病包括阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、色素性视网膜炎、脊髓性肌萎缩和各种形式的小脑变性。这些疾病中的细胞损失不导致炎性反应, 且细胞凋亡似乎是细胞死亡的机制。另外, 许多血液疾病与血细胞生成减少有关。这些疾病包括与慢性病有关的贫血、再生障碍性贫血、慢性嗜中性白血球减少症和脊髓发育不良综合征。血细胞生成疾病, 例如脊髓发育不良综合征和再生障碍性贫血的一些形式, 与骨髓内增加的细胞凋亡性细胞死亡有关。这些疾病可以由促进细胞凋亡的基因的活化、基质细胞或造血存活因子的获得性缺陷、或毒素和免疫反应介质的直接作用引起。与细胞死亡有关的两种常见疾病是心肌梗死和中风。在这两种疾病中, 在发生急性失血情况下产生的缺血中心区内的细胞看起来由于坏死而迅速死亡。然而, 在缺血中心区以外, 细胞在更长的周期内死亡且形态上看起来死于细胞凋亡。在其他或进一步的实施方式中, 本发明抗细胞凋亡的拟肽大环化合物用于治疗与不合需要的细胞死亡有关的所有这类疾病。

[0266] 用本文描述的拟肽大环化合物治疗的免疫疾病的一些例子包括但不限于器官移

植排异、关节炎、狼疮、IBD、克罗恩氏症、哮喘、多发性硬化、糖尿病等。

[0267] 用本文描述的拟肽大环化合物治疗的神经疾病的一些例子包括但不限于阿尔茨海默氏症、唐氏综合症、荷兰型遗传性脑出血淀粉样变性、反应性淀粉样变性、带有荨麻疹和耳聋的家族性淀粉样肾病、Muckle-Wells 综合症、特发性骨髓瘤；巨球蛋白血症相关的骨髓瘤、家族性淀粉样多发性神经病、家族性淀粉样心肌病、孤立性心脏性淀粉状蛋白、全身性老年性淀粉样变性、成人发作性糖尿病、胰岛细胞癌、孤立性心房淀粉状蛋白、甲状腺髓样癌、家族性淀粉样变性、遗传性脑出血合并淀粉样变性、家族性淀粉样多发性神经病、瘙痒病、Creutzfeldt-Jacob 病、Gerstmann Straussler-Scheinker 综合症、牛海绵状脑炎、朊病毒介导的疾病和亨廷顿氏病。

[0268] 用本文描述的拟肽大环化合物治疗的内分泌疾病的一些例子包括但不限于糖尿病、甲状腺机能减退、垂体功能缺失、甲状旁腺机能减退、性腺功能减退等。

[0269] 用本发明拟肽大环化合物治疗或预防的心血管性疾病（例如炎症性疾病）的一些例子包括但不限于动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、血栓形成、动脉瘤、心力衰竭、缺血性心脏病、心绞痛、心源性猝死、高血压性心脏病；非冠状血管疾病，例如小动脉硬化、小血管病、肾病、高甘油三酯血症、高胆固醇血症、高脂血症、黄瘤症、哮喘、高血压、肺气肿和慢性肺病；或与介入过程（“过程性血管损伤”）有关的心血管病症，例如血管成形术和分流管、支架、合成或天然的切除移植物、留置导管、阀或其他可植入装置的放置后的再狭窄。优选的心血管疾病包括动脉粥样硬化、心肌梗死、动脉瘤和中风。

实施例

[0270] 实施例 1：拟肽大环化合物的合成

[0271] 如 Walensky 等 (2004), Science 305:1466 和 Walensky 等, 美国专利公布 No. 2005/0250680 所描写的, 在固体载体上制备拟肽大环化合物。以下进一步说明该方法。

[0272]

1	Ac-IWIAQELR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2646.43	882.82	882.82	883.15 (M+3H)/3
2	Ac-RWIAQALR\$IGD\$FNAFYARR-NH2	2615.45	872.49	872.49	872.64 (M+3H)/3
3	Ac-ASQQTFSr8NLWRLL\$QN-NH2	2052.13	1026.62	684.72	1026.84 (M+2H)/2
4	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$NleDRSI-NH2	2139.25	1070.13	713.76	713.79 (M+3H)/3
5	Ac-RWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH2	2630.45	1315.73	877.48	877.36 (M+3H)/3
6	Ac-IWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH2	2587.43	1294.22	863.14	863.00 (M+3H)/3

[0273] 用于合成线性肽的一般过程：使用商业可获得的用于合成的 Fmoc-氨基酸 (Creosalus, Advanced Chemtech, EMD Biosciences), 并正向 (orthogonally) 保护为：Fmoc-Arg (Pbf)-OH、Fmoc-Tyr (t-Bu)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Asp (t-Bu)-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-Trp (Boc)-OH。HCTU (2-(6-氯代-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸铵) 用作所有天然氨基酸的初级偶联剂，HATU (2-(7-氮杂-1H-苯并三

唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸脲)用于 α , α -二取代氨基酸。使用固相肽化学以0.65mmol/g的载量在Rink Amide AM树脂(EMD biosciences)上进行线型肽的合成。使用NMP中的25%哌啶溶液实现Fmoc保护基的去除。相对于树脂使用NMP中的5当量的氨基酸、5当量的HCTU和10当量的二异丙基乙胺进行氨基酸的偶联。使用HATU或HCTU以2.5 : 2.5 : 5的NMP中的氨基酸-HATU或HCTU-DIPEA的比例相对于树脂上的载量偶联 α , α -二取代氨基酸。典型的偶联时间是1h。用5当量的乙酸酐和10当量的二异丙基乙胺完成最后的N端酰化。

[0274] 在以上序列中,使用以下命名法:

[0275] \$ α -Me S5 烯氨基酸

[0276] \$r8 α -Me R8 烯氨基酸

[0277] 用于线性肽复分解的一般过程:以4mg/mL的浓度在二氯甲烷中包含二(三环己基膦)亚苄基二氯化钨(IV)(Grubbs催化剂)的溶液总体积相对于树脂载量等于15mol%。4h后树脂过滤并用二氯甲烷洗涤。根据需要重复复分解以达到>95%的复分解(如HPLC分析的)。

[0278] 实施例2:拟肽大环化合物的纯化

[0279] 用于将钨从树脂结合的螺旋肽清除的一般过程:向含有在NMP溶胀的树脂上的螺旋形复分解肽的悬浮液中添加DMSO以得到NMP-DMSO的1:1混合物。振摇所得混合物16h,过滤并用三份NMP、三份二氯甲烷和三份二乙醚洗涤,并在减压下干燥。

[0280] 用于从树脂中切割肽的一般过程:用含有90:5:5的三氟乙酸-水-三异丙基硅烷的溶液处理树脂。4h后,过滤树脂并将所得溶液倒入冷(-78°C)二乙醚中。收集所得固体,溶解在1:1的乙腈-水中,冷冻并冻干。

[0281] 用于切割肽的一般纯化过程:方法A:冻干的粗肽溶解在3:1的DMSO-乙腈中,达到0.1M的最终浓度,并通过0.45 μ m的尼龙针筒式过滤器。使用Varian Pursuit XRs C18(250mm x 50mm,10 μ m)柱在室温下通过反相HPLC以1mmol的批次纯化化合物。使用的HPLC流动相为0.1%的三氟乙酸的水溶液和0.1%的三氟乙酸的乙腈溶液,流速为50mL/min。使用80分钟内的45-65%B的洗脱梯度。方法B:冻干的粗肽溶解在3:1的DMSO-乙腈中,使得最终浓度为0.1M,并通过0.45 μ m的尼龙针筒式过滤器。使用Varian Pursuit XRs C18(250mm x 50mm,10 μ m)柱在室温下通过反相HPLC以1mmol的批式纯化化合物。使用的HPLC流动相为0.1%的三氟乙酸的水溶液和0.1%的三氟乙酸的乙腈溶液,流速为50mL/min。使用Varian Pursuit XRs C18(250mm x 50mm,10 μ m)柱在室温下进行无酸纯化。使用的HPLC流动相为A)H₂O和B)乙腈,流速50mL/min。装载化合物并保持在95:5等浓度10个柱体积,然后用每分钟1%的梯度坡度洗脱。分离纯的级分并合并用于最后冻干。方法C:使用C8介质**120 Å**,10 μ m纯化粗物质。在纯化过程的阶段1中,pH为2.3的TEAP用作缓冲系统。在纯化过程的阶段2中,0.1%的TFA用作缓冲系统。使用稀释HCl进行产物浓缩和盐交换。方法D:使用Varian Pursuit XRs C18(250mm x 50mm,10 μ m)柱在室温下通过HPLC纯化粗物质。使用的HPLC流动相为0.1%的甲酸的水溶液和0.1%的甲酸的乙腈溶液,流速是50mL/min。

[0282]

化合物	w/o 纯化	1x HPLC	仅 DMSO	DMSO + 1x HPLC	DMSO + 2x HPLC
1	802 ppm	ND	244 ppm	75 ppm (方法 A)	17 ppm (方法 B)
2	ND	446 ppm	355 ppm	ND	6.1 ppm (方法 B)
3	ND	138 ppm	ND	ND	5.2 ppm (方法 B)
4	ND	ND	ND	ND	32 ppm (方法 C)
5	ND	ND	ND	ND	7.1 ppm (方法 B)
6	ND	ND	ND	ND	7.6 ppm (方法 B)

[0283] “W/O 纯化”表示无 DMSO 清除的分析或 HPLC 纯化。“1x HPLC”表示单次通过 HPLC 柱（方法 A）w/o DMSO 清除。“仅 DMSO”表示在切割前用 NMP 中的 25% 的 DMSO 温育 16h。“DMSO+1x HPLC”表示 DMSO 洗涤 16 小时后进行单次纯化（方法 A），“DMSO+2x HPLC”表示 DMSO 洗涤后进行两次后续的 HPLC 纯化；方法 B 和方法 C 分别在上文描述并注解。“ND”表示“未确定”。

[0284] 用硅基树脂结合的清除剂净化切割的螺旋肽的一般过程：向含有经 DMSO 洗涤的肽的 1 : 1 的水 - 乙腈溶液中添加 5 当量的 Si-DMT (Silicycle, 部件 #R79030B) 树脂并在 50°C 振摇 16h。过滤所得混合物，用 3mL 的 1 : 1 水 - 乙腈溶液洗涤树脂。冷冻并冻干所得溶液得到白色固体。

[0285]

化合物	DMSO*	DMSO+Si-DMT
2	355ppm	58ppm

[0286] “DMSO*”表示与 25% 的 DMSO 的 NMP 溶液一起在树脂上温育 16h，“DMSO+Si-DMT”表示 DMSO 洗涤后，肽与 5 当量的 Si-DMT 树脂一起在 50°C 温育 16h。

[0287] 用聚苯乙烯基树脂结合的净化剂净化切割的螺旋肽的一般过程：向含有经 DMSO 洗涤的肽并经过单次纯化（方法 D）的 DMF 中肽（起始钌含量为 146ppm）的溶液中添加 5 当量的 PS-TMT (Polymer Labs, 部件 #PL3527) 或 5 当量的 PS- 硫脲 (Polymer Labs, 部件 #PL350B) 树脂并在室温下振摇 16h。过滤所得混合物，用 DMF 洗涤树脂。减压下浓缩所得溶液，溶解在 1 : 1 的水 - 乙腈中，冷冻并冻干所得溶液得到白色固体。

[0288]

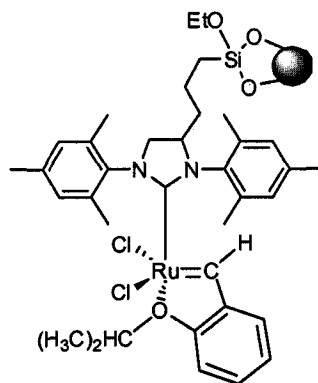
化合物	PS-TMT	PS- 硫脲
化合物 1- 初始 Ru 146ppm (方法 D)	53ppm	85ppm

[0289] “PS-TMT”表示在 DMF 中的 5 当量 PS-TMT 树脂 16h。“PS- 硫脲”表示在 DMF 中的 5 当量 PS- 硫脲 16h。

[0290] 使用树脂结合的复分解催化剂复分解保护的肽的方法：在酸不稳定的 Sieber 酰胺树脂 (EMD biosciences) 上使用 Fmoc- 合成策略进行未装订 (unstapled) 肽的合成。用

1%的 TFA- 二氯甲烷 (10x 2min) 处理所得树脂,并且该溶液用 10%的吡啶的甲醇溶液处理。减压下浓缩所得溶液。使用二氯甲烷到 9 : 1 二氯甲烷 - 甲醇的梯度洗脱在快速硅胶上进行层析。收集含有所需产物的级分并减压浓缩。将所得肽溶解在二氯甲烷中并用 5mol% 的硅结合复分解催化剂 (Daryl P. Allen, Matthew M. Van Wingerden 和 Robert H. Grubbs Org. Lett., 2009, 11(6), pp 1261-1264) 处理。

[0291]



[0292] 所得混合物振摇 16h。过滤混合物,并用二氯甲烷洗涤硅结合的催化剂。减压浓缩所得溶液。用 20mL 的 90 : 5 : 5 三氟乙酸 - 水 - 三异丙基硅烷溶液处理所得产物。4h 后,过滤树脂,将所得溶液倒入 250mL 的冷 (-78℃) 二乙醚中。

[0293] 尽管此处显示和描述了本发明的优选实施方式,本领域技术人员将了解,这种实施方式仅以举例形式提供。本领域技术人员将在不脱离本发明的前提下进行众多变化、改变和替换。应该理解,对此处描述的本发明的实施方式的各种替换可用于实施本发明。以下权利要求限定了本发明的范围,并且也覆盖这些权利要求及其等同范围内的方法和结构。