



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104144695 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201380009773. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 02. 14

A61K 38/12 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/599, 362 2012. 02. 15 US

61/599, 365 2012. 02. 15 US

61/723, 767 2012. 11. 07 US

61/723, 762 2012. 11. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/026241 2013. 02. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/123267 EN 2013. 08. 22

(71) 申请人 爱勒让治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 V·格拉维斯 C·R·康利

S·P·伦蒂尼

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

权利要求书12页 说明书133页

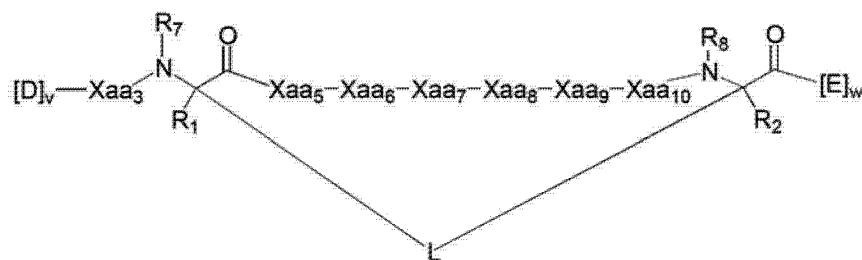
(54) 发明名称

三唑交联的和硫醚交联的拟肽大环化合物

(57) 摘要

本文提供了拟肽大环化合物以及使用此类大环化合物治疗疾病的方法。

1. 下式的拟肽大环化合物：



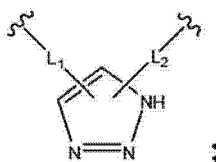
其中：

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸，其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸，其中各个 X 为氨基酸；

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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；或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L'；

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L₁ 和 L₂ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R₅ 取代；

各个 R₃ 独立地为氢、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代；

各个 R₄ 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

各个 R₇ 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

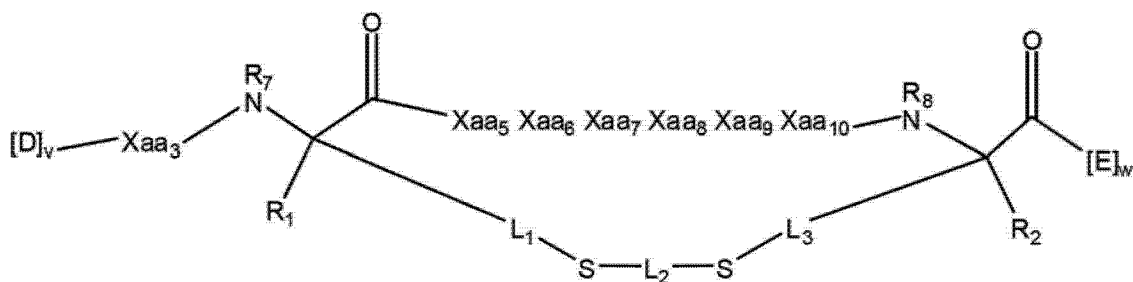
各个 R₈ 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

n 为 1-5 的整数。

2. 下式的拟肽大环化合物：



其中：

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸，其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸，其中各个 X 为氨基酸；

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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；或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L'；

各个 L 或 L' 独立地为式 -L₁-L₂- 的大环形成连接体；

L₁ 和 L₂ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 [-R₄-K-R₄]_n，它们各自任选地被 R₅ 取代；

R₃ 为氢、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代；

L₁、L₂ 和 L₃ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 [-R₄-K-R₄]_n，它们各自是未取代的或被 R₅ 取代；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R₄ 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

R₇ 为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

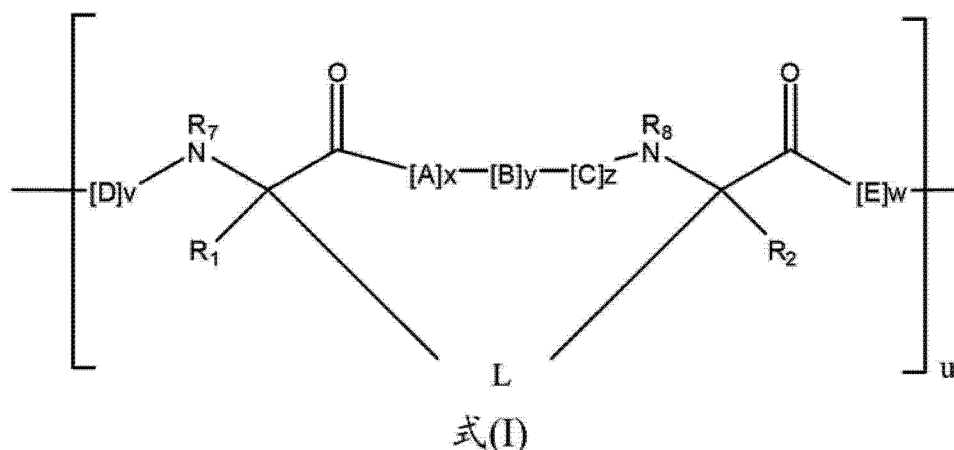
R₈ 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

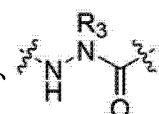
n 为 1-5 的整数。

3. 一种拟肽大环化合物，其包含与选自表 4、4a 或 4b 中的氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60% 相同的氨基酸序列，其中该拟肽大环化合物具有下式：



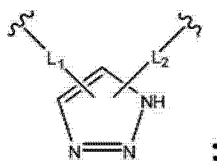
其中：

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸；

B 为氨基酸、、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$ ；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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；或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ；

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L_1 、 L_2 和 L_3 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代；

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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；

各个 R_7 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

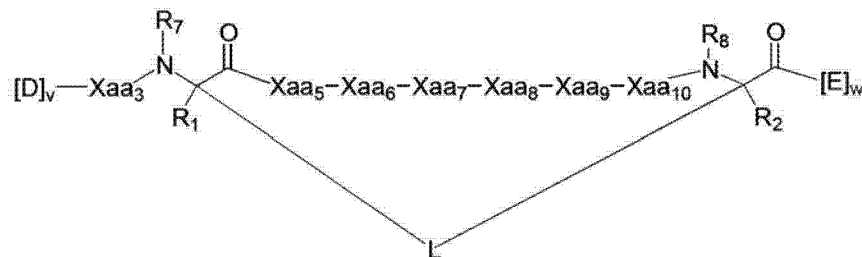
各个 R_8 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

u 为 1-10 的整数，例如 1-5、1-3 或 1-2；

x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数,例如 $x+y+z$ 之和为 2、3 或 6 ;且
n 为 1-5 的整数。

4. 下式的拟肽大环化合物 :



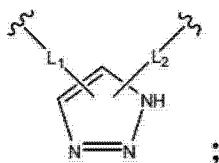
其中 :

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸,其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸,其中各个 X 为氨基酸 ;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸 ;

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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 ;或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体 :



L₁ 和 L₂ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R₅ 取代 ;

R₃ 为氢、烷基、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,它们任选地被 R₅ 取代 ;

各个 R₄ 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基 ;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃ ;

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂 ;

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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 ;

R₇ 为 -H、烷基、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,它们任选地被 R₅ 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分 ;

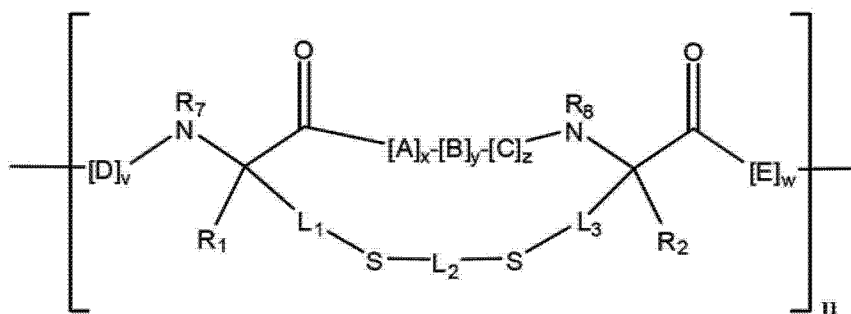
R₈ 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R₅ 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分 ;

v 为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10 ;

w 为 3-1000 的整数,例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10 ;且

n 为 1-5 的整数。

5. 一种拟肽大环化合物, 其包含与选自表 6 或 6a 中的氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60% 相同的氨基酸序列, 其中该拟肽大环化合物具有下式:



式 (I)

其中:

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、 $\begin{array}{c} \text{R}_3 \\ | \\ \text{H}-\text{N}-\text{C}(=\text{O}) \\ | \\ \text{O} \end{array}$, $[-\text{NH}-\text{L}_4-\text{CO}-]$, $[-\text{NH}-\text{L}_4-\text{SO}_2-]$ 或 $[-\text{NH}-\text{L}_4-]$;

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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; 或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

R_3 为氢、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代;

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-\text{R}_4-\text{K}-\text{R}_4-]_n$, 它们各自是未取代的或被 R_5 取代;

各个 K 为 O、S、SO、 SO_2 、CO、 CO_2 或 CONR_3 ;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-\text{OR}_6$ 、 $-\text{N}(\text{R}_6)_2$ 、 $-\text{SR}_6$ 、 $-\text{SOR}_6$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_6$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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;

R_7 为 -H、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

R_8 为 -H、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数, 例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

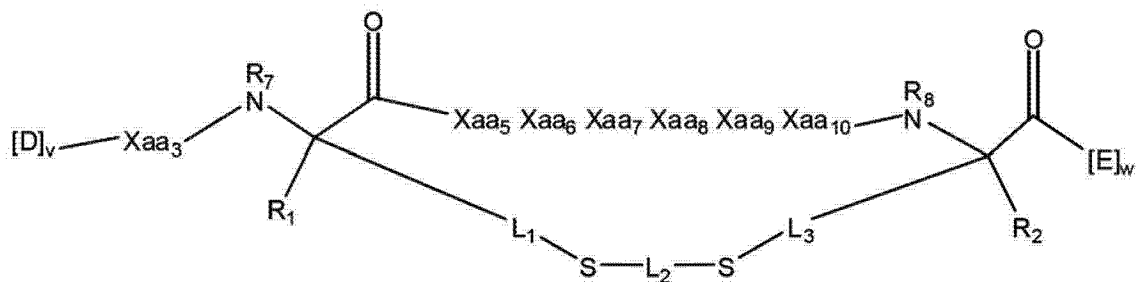
u 为 1-10 的整数, 例如 1-5、1-3 或 1-2;

x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数, 例如 x+y+z 之和为 2、3 或 6; 且

n 为 1-5 的整数,

其中该拟肽大环化合物不是表 7、表 7a 或表 7b 的拟肽大环化合物。

6. 下式的拟肽大环化合物：



其中：

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸，其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸，其中各个 X 为氨基酸；

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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；或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L'；

L₁、L₂ 和 L₃ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 [-R₄-K-R₄]_n，它们各自是未取代的或被 R₅ 取代；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

R₃ 为氢、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代；

各个 R₄ 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

R₇ 为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

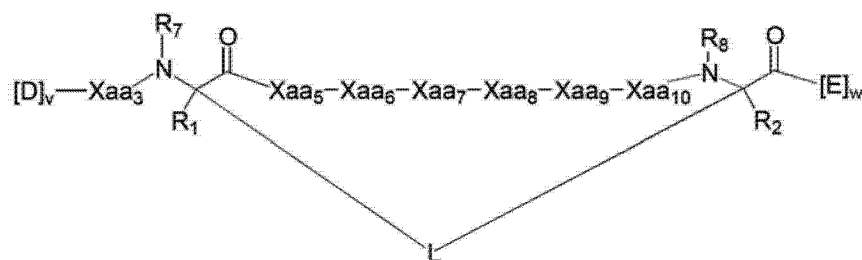
R₈ 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

n 为 1-5 的整数。

7. 下式的拟肽大环化合物：



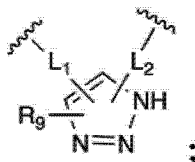
其中：

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸，其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸，其中各个 X 为氨基酸；

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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；或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L'；

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L₁ 和 L₂ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 [-R₄-K-R₄-]_n，它们各自任选地被 R₅ 取代；

各个 R₃ 独立地为氢、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代；

各个 R₄ 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

各个 R₇ 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

各个 R₈ 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

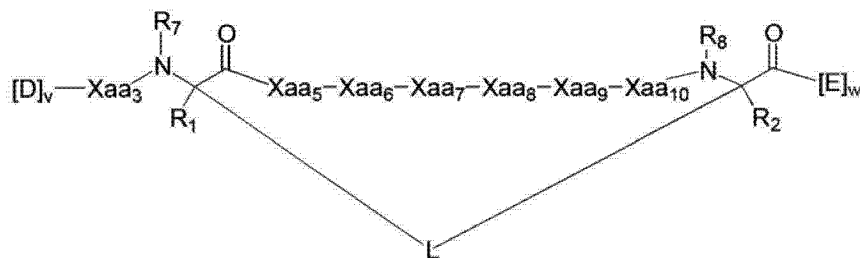
各个 R₉ 独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地被 R_a 和 / 或 R_b 取代；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

n 为 1-5 的整数。

8. 下式的拟肽大环化合物：



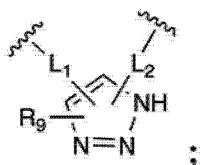
其中：

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸，其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸，其中各个 X 为氨基酸；

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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；或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L'；

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L₁ 和 L₂ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 [-R₄-K-R₄]_n，它们各自任选地被 R₅ 取代；

R₃ 为氢、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代；

各个 R₄ 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

R₇ 为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

R₈ 为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

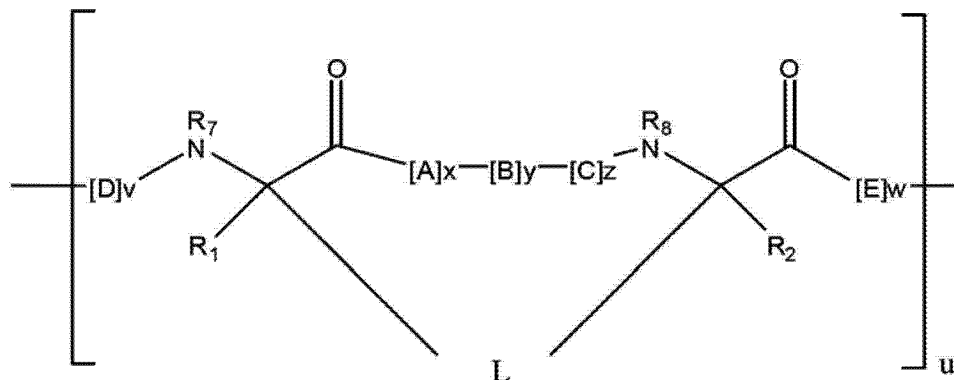
各个 R₉ 独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地被 R_a 和 / 或 R_b 取代；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

n 为 1-5 的整数。

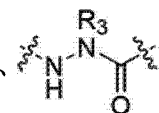
9. 一种拟肽大环化合物, 其包含与选自表 4、4a 或 4b 中的氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60% 相同的氨基酸序列, 其中该拟肽大环化合物具有下式:



式(I)

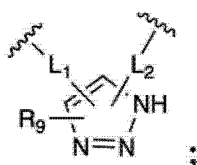
其中:

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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; 或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体:



L_1 、 L_2 和 L_3 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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;

各个 R_7 独立地为 -H、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

各个 R_8 独立地为 -H、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

各个 R_9 独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基,它们是未取代的或任选地被 R_a 和 / 或 R_b 取代;

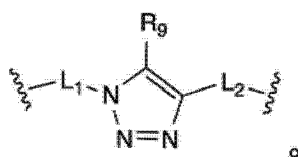
v 和 w 独立地为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

u 为 1-10 的整数,例如 1-5、1-3 或 1-2;

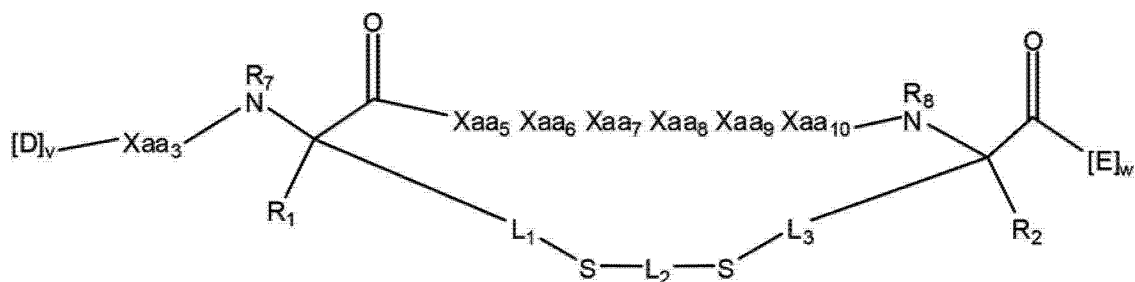
x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数,例如 x+y+z 之和为 2、3 或 6;且

n 为 1-5 的整数。

10. 如权利要求 7、8 或 9 所述的拟肽大环化合物,其中各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体:



11. 下式的拟肽大环化合物:



其中:

Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的每一个单独地为氨基酸,其中 Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的至少三个是与序列 $Phe_3-X_4-His_5-Tyr_6-Trp_7-Ala_8-Gln_9-Leu_{10}-X_{11}-Ser_{12}$ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸,其中各个 X 为氨基酸;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸;

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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;或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L';

各个 L 或 L' 独立地为式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体;

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

R_3 为氢、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代;

L_1 、 L_2 和 L_3 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自是未取代的或被 R_5 取代;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳

基；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 $-H$ 、烷基、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；

R_7 为 $-H$ 、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

R_8 为 $-H$ 、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

n 为 1-5 的整数。

12. 如权利要求 1、2、4、6、7、8 或 11 所述的拟肽大环化合物，其中 Xaa_5 为 Glu 或其氨基酸类似物。

13. 如权利要求 12 所述的拟肽大环化合物，其中 Xaa_5 为 Glu 或其氨基酸类似物，并且其中该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa_5 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的性质，如改善的结合亲和力、改善的溶解度、改善的细胞效力、改善的螺旋度、改善的细胞透性、改善的体内或体外抗肿瘤效力，或改善的凋亡诱导。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的对 MDM2 或 MDMX 的结合亲和力。

15. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有降低的 MDMX 结合亲和力与 MDM2 结合亲和力之比。

16. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤细胞系的体外抗肿瘤效力。

17. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物在 p53 阳性肿瘤细胞系中显示出改善的体外凋亡诱导。

18. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤细胞系与针对 p53 阴性或突变肿瘤细胞系的体外抗肿瘤效力比。

19. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤的体内抗肿瘤效力。

20. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物在 p53 阳性肿瘤中具有改善的体内凋亡诱导。

21. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的细胞透性。

22. 如权利要求 1-13 中任一项所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物相对于

其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的溶解度。

23. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中各个 E 独立地为选自 Ala(丙氨酸)、D-Ala(D-丙氨酸)、Aib(α -氨基异丁酸)、Sar(N-甲基甘氨酸)和 Ser(丝氨酸)的氨基酸。

24. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中 $[D]_v$ 为 $-\text{Leu}_1-\text{Thr}_2$ 。

25. 如权利要求 12-24 中任一项所述的拟肽大环化合物,其中 w 为 3-10。

26. 如权利要求 25 所述的拟肽大环化合物,其中 w 为 3-6。

27. 如权利要求 25 所述的拟肽大环化合物,其中 w 为 6-10。

28. 如权利要求 27 所述的拟肽大环化合物,其中 w 为 6。

29. 如权利要求 12-24 中任一项所述的拟肽大环化合物,其中 v 为 1-10。

30. 如权利要求 24 所述的拟肽大环化合物,其中 v 为 2-10。

31. 如权利要求 25 所述的拟肽大环化合物,其中 v 为 2-5。

32. 如权利要求 26 所述的拟肽大环化合物,其中 v 为 2。

33. 如权利要求 1-24 中任一项所述的拟肽大环化合物,其中 w 为 3-1000,例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10。

34. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中该拟肽大环化合物不是表 5、表 7、表 7a 或表 7b 的大环化合物。

35. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中各个 E 是 Ser 或 Ala 或其类似物。

36. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其包含至少一种为氨基酸类似物的氨基酸。

37. 一种治疗受试者的癌症的方法,其包括向该受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

38. 一种调节受试者中的 p53 和 / 或 MDM2 和 / 或 MDMX 活性的方法,其包括向该受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

39. 一种拮抗受试者中的 p53 与 MDM2 之间和 / 或 p53 与 MDMX 蛋白之间的相互作用的方法,其包括向该受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

三唑交联的和硫醚交联的拟肽大环化合物

背景技术

人转录因子蛋白质 p53 响应于 DNA 损伤和细胞应激而诱导细胞周期停滞和凋亡,从而在保护细胞免于恶性转化方面发挥关键作用。E3 遍在蛋白连接酶 MDM2 (也称为 HDM2) 通过中和 p53 反式激活活性的直接结合相互作用而负调节 p53 的功能,导致 p53 蛋白质从核输出,并经由遍在蛋白化-蛋白酶体途径使 p53 降解。由缺失、突变或 MDM2 过表达而引起的 p53 活性丧失是人类癌症的最常见缺陷。表达野生型 p53 的肿瘤易受到稳定或提高活性 p53 浓度的药剂的攻击。在此背景下,已出现了对 MDM2 活性的抑制,作为经过验证的、用于在体外和体内恢复 p53 活性并使癌细胞再次对凋亡敏感的方法。MDMX (MDM4) 最近已被鉴定为 p53 的相似的负调节剂,并且研究显示在 MDM2 和 MDMX 的 p53 结合界面之间具有显著的结构同源性。p53-MDM2 和 p53-MDMX 的蛋白质-蛋白质相互作用由 p53 的同一个 15 个残基的 α 螺旋反式激活域介导,所述 α 螺旋反式激活域插入 MDM2 和 MDMX 的表面上的疏水性裂隙内。p53 的这个域内的三个残基 (F19、W23 和 L26) 对与 MDM2 和 MDMX 的结合至关重要。

对于能够与 p53、MDM2 和 / 或 MDMX 结合并调节其活性的化合物存在相当大的需求。本文提供了能调节 p53 活性的基于 p53 的拟肽大环化合物。本文还提供了能抑制 p53、MDM2 和 / 或 MDMX 蛋白之间相互作用的基于 p53 的拟肽大环化合物。此外,本文提供了能够用于治疗包括但不限于癌症和其它高增生性疾病的疾病的基于 p53 的拟肽大环化合物。

发明内容

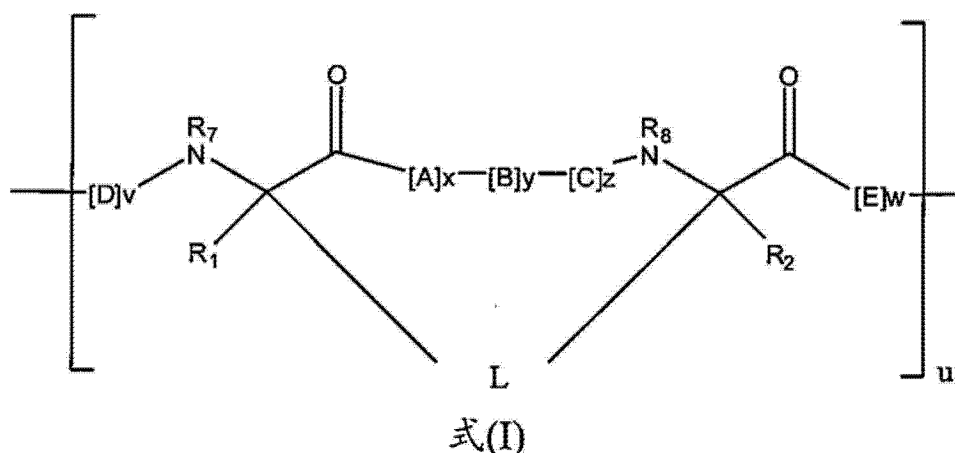
本文描述了与人 p53 的一部分相关的稳定交联的肽 (“p53 拟肽大环化合物”)。这些交联的肽含有至少两个经修饰的氨基酸,这些氨基酸一起形成分子内交联,该分子内交联可帮助稳定被认为对于 p53 与 MDM2 的结合和 p53 与 MDMX 的结合至关重要的 p53 一部分的 α 螺旋二级结构。因此,本文描述的交联多肽可具有相对于对应的非交联多肽改善的生物活性。据认为,p53 拟肽大环化合物干扰 p53 与 MDM2 和 / 或 p53 与 MDMX 的结合,从而释放功能性 p53 并抑制其破坏。本文描述的 p53 拟肽大环化合物可治疗性地使用,例如用来治疗以不希望的低 p53 水平或低 p53 活性为特征的癌症和其它病症,以及 / 或者用来治疗以不希望的高水平 MDM2 或 MDMX 活性为特征的癌症和其它病症。p53 拟肽大环化合物也可用于治疗与遭到破坏的 p53 转录途径的调节相关的任何病症 (这种遭到破坏的调节早致过量细胞存活和增殖的病状,如癌症和自身免疫病),以及不适当的细胞周期停滞和凋亡的病状,如神经变性和免疫缺陷。在一些实施方案中,p53 拟肽大环化合物与 MDM2 (例如, **GenBank®** 登录号 :228952 ;GI :228952) 和 / 或 MDMX (也被称为 MDM4 ;**GenBank®** 登录号 :88702791 ;GI :88702791) 结合。

在一个方面,本文提供一种拟肽大环化合物,其包含的氨基酸序列与选自表 4、表 4a、表 4b 或表 5 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60%、80%、90% 或 95% 相同。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物不是如表 6、表 6a、表 7、表 7a 或表 7b 所示的肽。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物具有选自表 4 的氨基酸序列。在一些实施方案中,该拟肽大环化合

物具有选自表 4a 的氨基酸序列。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物具有选自表 4b 的氨基酸序列。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物具有选自表 5 的氨基酸序列。

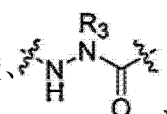
或者,所述拟肽大环化合物的氨基酸序列如上所述进行选择,并且进一步其中该大环化合物不包括全碳交联或三唑。在一些实施方案中,拟肽大环化合物包含螺旋,如 α -螺旋。在其它实施方案中,拟肽大环化合物包含 α , α -二取代的氨基酸。拟肽大环化合物可包含连接至少两个氨基酸的 α -位的交联体 (crosslinker)。所述两个氨基酸中的至少一个可以是 α , α -二取代的氨基酸。

在一些实施方案中,提供了下式的拟肽大环化合物:

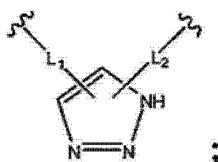


其中:

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体:



L_1 、 L_2 和 L_3 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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;

各个 R_7 独立地为 -H、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

u 为 1-10 的整数,例如 1-5、1-3 或 1-2;

x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数,例如 x+y+z 之和为 2、3 或 6;且

n 为 1-5 的整数。

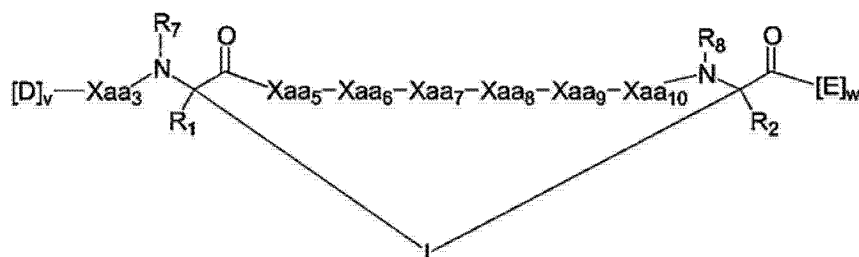
在一些实施方案中,v 和 w 为 1-30 的整数。在一些实施方案中,w 为 3-1000 的整数,例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10。

在一些实施方案中,x+y+z 之和为 3 或 6。在一些实施方案中,x+y+z 之和为 3。在其它实施方案中,x+y+z 之和为 6。

在一些实施方案中,请求保护该拟肽大环化合物的条件是,当 $u = 1$ 且 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸不是精氨酸(R),并且/或者由 E 代表的第二 C-末端氨基酸不是苏氨酸(T)。例如,当 $u = 1$ 且 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸和/或第二 C-末端氨基酸不包含带正电荷的侧链或不带电荷的极性侧链。在一些实施方案中,当 $u = 1$ 且 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸和/或第二 C-末端氨基酸包含疏水性侧链。例如,当 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸和/或第二 N-末端氨基酸包含疏水性侧链,例如大的疏水性侧链。

在一些实施方案中,w 为 3-1000。例如,由 E 代表的第三氨基酸包含大的疏水性侧链。

还提供了下式的拟肽大环化合物:



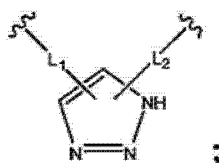
其中:

Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的每一个单独地为氨基酸,其中 Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的至少三个是与序列 $Phe_3-X_4-His_5-Tyr_6-Trp_7-Ala_8-Gln_9-Leu_{10}-X_{11}-Ser_{12}$ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸,其中各个 X 为氨基酸;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸;

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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;或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体:



L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 独立地为 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 CO 、 CO_2 或 $CONR_3$;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 $-H$ 、烷基、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;

各个 R_7 独立地为 $-H$ 、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

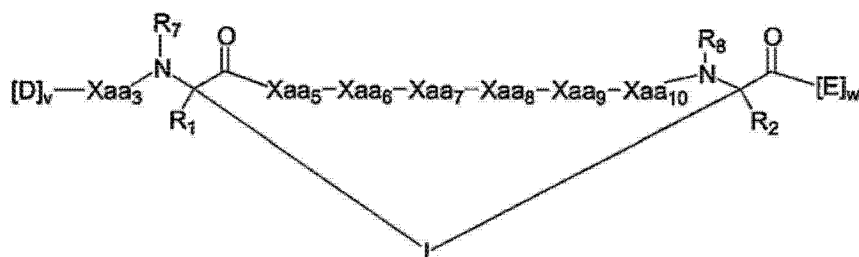
各个 R_8 独立地为 $-H$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 为 1-1000 的整数, 例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

w 为 3-1000 的整数, 例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10; 且

n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中, 该拟肽大环化合物具有下式:



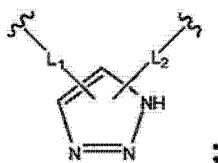
其中:

Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的每一个单独地为氨基酸, 其中 Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的至少三个是与序列 $Phe_3-X_4-Glu_5-Tyr_6-Trp_7-Ala_8-Gln_9-Leu_{10}/Cba_{10}-X_{11}-Ala_{12}$ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸, 其中每个 X 为氨基酸;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸;

R_1 和 R_2 独立地为 $-H$ 、烷基、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; 或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L ;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体:



L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

R_3 为氢、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 为 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 CO 、 CO_2 或 $CONR_3$;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 $-H$ 、烷基、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;

R_7 为 $-H$ 、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

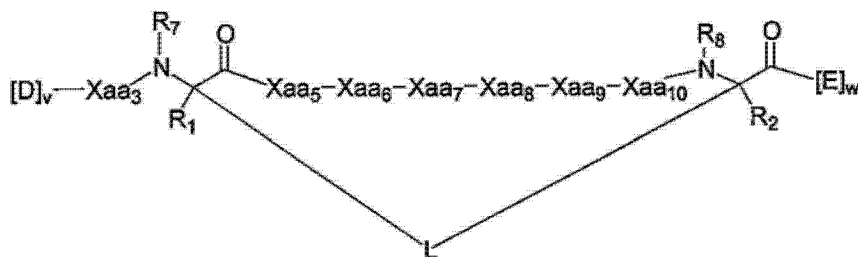
R_8 为 $-H$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R_5 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

w 为 3-1000 的整数,例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10;且

n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中,提供了式 I 的拟肽大环化合物:



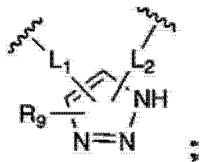
其中:

Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的每一个单独地为氨基酸,其中 Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的至少三个是与序列 $Phe_3-X_4-His_5-Tyr_6-Trp_7-Ala_8-Gln_9-Leu_{10}-X_{11}-Ser_{12}$ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸,其中各个 X 为氨基酸;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸;

R_1 和 R_2 独立地为 $-H$ 、烷基、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;或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体:



L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或

亚杂芳基；

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

各个 R₇ 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

各个 R₈ 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

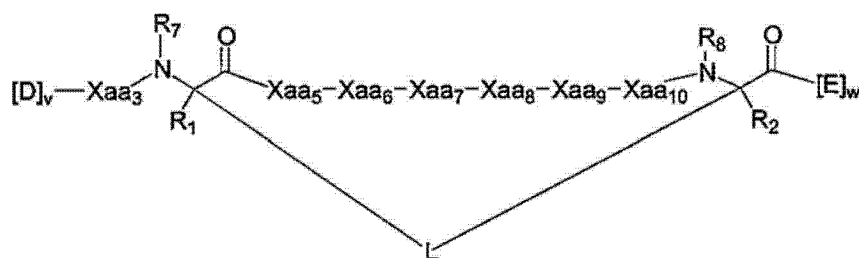
各个 R₉ 独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地被 R_a 和 / 或 R_b 取代；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中，提供了式 I 的拟肽大环化合物：



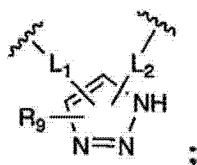
其中：

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸，其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸，其中各个 X 为氨基酸；

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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；或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L'；

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L₁ 和 L₂ 独立地为亚烷基、亚烯基、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 [-R₄-K-R₄-]_n，它们各自任选地被 R₅ 取代；

R₃ 为氢、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代；

各个 R₄ 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳

基；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R₅ 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

R₇ 为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

R₈ 为 -H、烷基、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，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

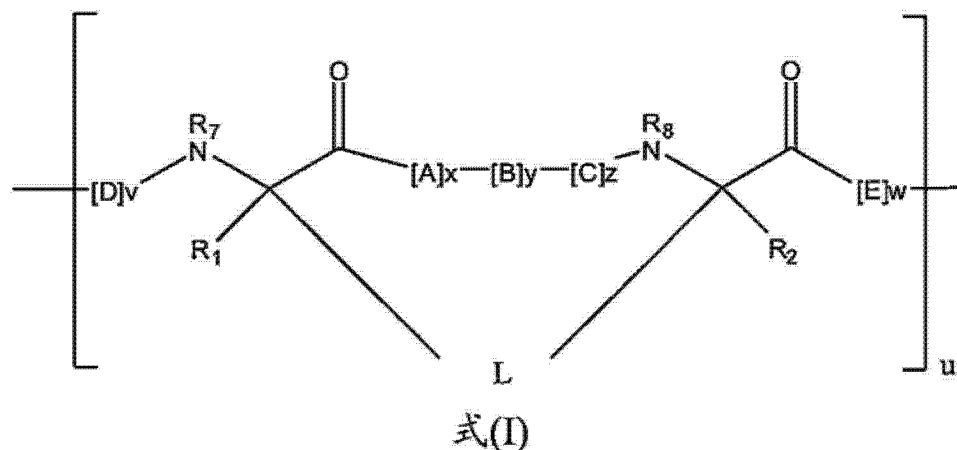
各个 R₉ 独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地被 R_a 和 / 或 R_b 取代；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

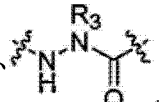
n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中，提供了式 I 的拟肽大环化合物，其包含与选自表 4、4a 或 4b 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60% 相同的氨基酸序列，其中该拟肽大环化合物具有下式：



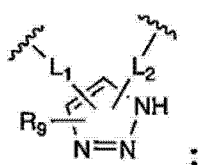
其中：

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸；

B 为氨基酸、 [-NH-L₃-CO-]、[-NH-L₃-SO₂-] 或 [-NH-L₃-]；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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；或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L'；

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L_1 、 L_2 和 L_3 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代；

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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；

各个 R_7 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

各个 R_8 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

各个 R_9 独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地被 R_a 和 / 或 R_b 取代；

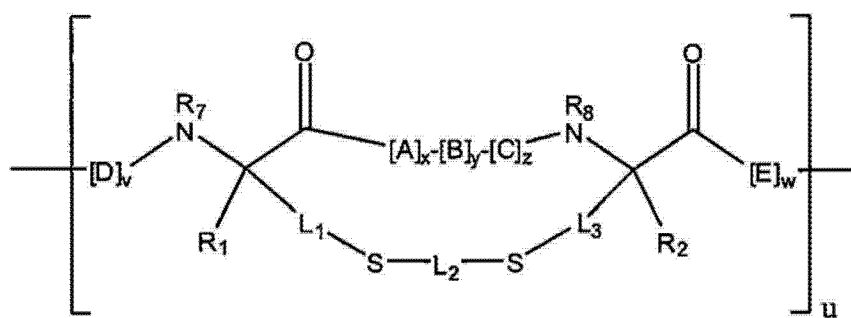
v 和 w 独立地为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

u 为 1-10 的整数，例如 1-5、1-3 或 1-2；

x 、 y 和 z 独立地为 0-10 的整数，例如 $x+y+z$ 之和为 2、3 或 6；且

n 为 1-5 的整数。

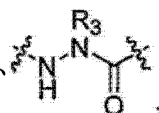
在一些实施方案中，提供了式 II 的拟肽大环化合物：



式(II)

其中：

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸；

B 为氨基酸、 $[-NH-L_4-CO-]$ 、 $[-NH-L_4-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_4-]$ ；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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；或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ；

R_3 为氢、烷基、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

基,它们是未取代的或被卤素-取代的;或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自是未取代的或被 R_5 取代;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

R_3 为氢、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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;

R_7 为 -H、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

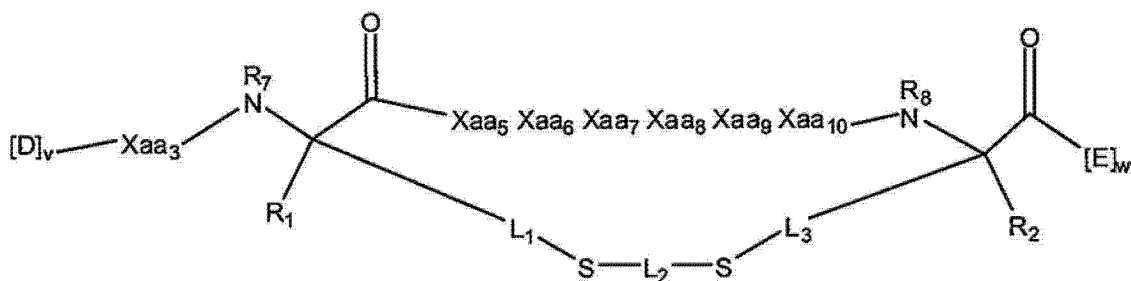
R_8 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R_5 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

w 为 3-1000 的整数,例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10;且

n 为 1-5 的整数。

还提供了下式的拟肽大环化合物:



其中:

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸,其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸,其中各个 X 为氨基酸;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸;

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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;或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自是未取代的或被 R_5 取代;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

R_3 为氢、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 $-H$ 、烷基、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;

R_7 为 $-H$ 、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

R_8 为 $-H$ 、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

w 为 3-1000 的整数,例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10;且

n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中,各个 E 独立地为选自 Ala(丙氨酸)、D-Ala(D-丙氨酸)、Aib(α -氨基异丁酸)、Sar(N-甲基甘氨酸)和 Ser(丝氨酸)的氨基酸。在一些实施方案中, $[D]_v$ 为 $-Leu_1-Thr_2$ 。

在一些实施方案中, w 为 3-10 的整数,例如 3-6、3-8、6-8 或 6-10。在一些实施方案中, w 为 3。在其它实施方案中, w 为 6。在一些实施方案中, v 为 1-10 的整数,例如 2-5。在一些实施方案中, v 为 2。

在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的对 MDM2 或 MDMX 的结合亲和力。在其它情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有降低的 MDMX 结合亲和力与 MDM2 结合亲和力之比。在另外其它的情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤细胞系的体外抗肿瘤效力。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物在 p53 阳性肿瘤细胞系中显示出改善的体外凋亡诱导。在其它情况下,权利要求 1 的拟肽大环化合物,其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤细胞系与针对 p53 阴性或突变肿瘤细胞系的体外抗肿瘤效力比。在一些情况下,该改善的体外效力比为 1-29、 $\geq 30-49$ 或 ≥ 50 。在另外其它的情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤的体内抗肿瘤效力。在一些情况下,该改善的体内效力比为 -29 、 $\geq 30-49$ 或 ≥ 50 。在另外其它的情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物在 p53 阳性肿瘤中具有改善的体内凋亡诱导。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的细胞透性。在其它情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的溶解度。

在一些实施方案中, Xaa_5 为 Glu 或其氨基酸类似物。在一些实施方案中, Xaa_5 为 Glu 或其氨基酸类似物,并且其中该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa_5 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的性质,如改善的结合亲和力、改善的溶解度、改善的细胞效力、改善的细胞透

性、改善的体内或体外抗肿瘤效力,或改善的凋亡诱导。

在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的对 MDM2 或 MDMX 的结合亲和力。在其它实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有降低的 MDMX 结合亲和力与 MDM2 结合亲和力之比。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的溶解度,或者该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的细胞效力。

在一些实施方案中,Xaa₅ 为 Glu 或其氨基酸类似物,并且其中该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的生物活性,如改善的结合亲和力、改善的溶解度、改善的细胞效力、改善的螺旋度、改善的细胞透性、改善的体内或体外抗肿瘤效力,或改善的凋亡诱导。

在一些实施方案中,该拟肽大环化合物具有针对 p53+/+ 细胞系的活性,该活性为针对 p53-/- 细胞系的结合亲和力的至少 2 倍、3 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、50 倍、70 倍或 100 倍。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物具有针对 p53+/+ 细胞系的活性,该活性为针对 p53-/- 细胞系的结合亲和力的 1-29 倍、30-49 倍或 ≥ 50 倍。例如,活性可以作为 IC₅₀ 值进行测定。例如,该 p53+/+ 细胞系为 SJSA-1、RK0、HCT-116 或 MCF-7,且该 p53-/- 细胞系为 RK0-E6 或 SW-480。在一些实施方案中,该肽具有小于 1 μ M 的针对 p53+/+ 细胞系的 IC₅₀。

在一些实施方案中,Xaa₅ 为 Glu 或其氨基酸类似物,并且该拟肽大环化合物具有的针对 p53+/+ 细胞系的活性至少为其针对 p53-/- 细胞系的结合亲和力的 10 倍。

另外,提供了一种治疗受试者的癌症的方法,包括向该受试者施用拟肽大环化合物。还提供了一种调节受试者中的 p53 或 MDM2 或 MDMX 的活性的方法,包括向该受试者施用拟肽大环化合物,或者一种拮抗受试者中的 p53 与 MDM2 和 / 或 MDMX 蛋白质之间的相互作用的方法,包括向该受试者施用这样的拟肽大环化合物。

援引并入

本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,如同明确地和分别地指出各个单独的出版物、专利或专利申请通过引用并入本文。

发明详述

如本文所用的,术语“大环化合物”是指这样一种分子,该分子具有包括由至少 9 个共价键合的原子形成的环或环形的化学结构。

如本文所用的,术语“拟肽大环化合物”或“交联的多肽”是指包含通过多个肽链连接的多个氨基酸残基和至少一个大环形成连接体的化合物,所述大环形成连接体在第一天然存在的或非天然存在的氨基酸残基(或类似物)与同一分子内的第二天然存在的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(或类似物)的 α 碳连接至第二氨基酸残基(或类似物)的 α 碳的实施方案。拟肽大环化合物任选地包含处于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,且除了形成大环化合物的任意残基外,任选地还包含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。当在拟肽大环化合物的背景下提及,“相应的非交联多肽”被理解为涉及与该大环化合物长度相同并且包含对应于该大环化合物的野生型序列的等同天然氨基酸的多肽。

如本文所用的,术语“稳定性”是指如通过圆二色性、NMR 或另一种生物物理测量法测量的,拟肽大环化合物在溶液中维持确定的二级结构,或在体外或体内对蛋白水解降解作用的抗性。本文预期的二级结构的非限制性例子是 α -螺旋、 3_{10} 螺旋、 β -转角和 β -折叠。

如本文所用的,术语“螺旋稳定性”是指如通过圆二色性或 NMR 测量的,拟肽大环化合物维持 α -螺旋结构。例如,在一些实施方案中,与相应的非交联的大环化合物相比,如通过圆二色性确定的,拟肽大环化合物在 α -螺旋度上表现出至少 1.25、1.5、1.75 或 2 倍的增加。

术语“氨基酸”是指同时含有氨基和羧基的分子。合适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,以及通过有机合成或其它代谢途径制备的非天然存在的氨基酸。本文所用的术语氨基酸包括但不限于 α -氨基酸、天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物。

术语“ α -氨基酸”是指含有的氨基和羧基都结合到被指定为 α -碳的碳上的分子。

术语“ β -氨基酸”是指含有均为 β 构型的氨基和羧基的分子。

术语“天然存在的氨基酸”是指在自然界合成的肽中通常发现的 20 种氨基酸中的任一种,已知其单字母缩写为 A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 和 V。

下表示出了天然氨基酸的性质一览：

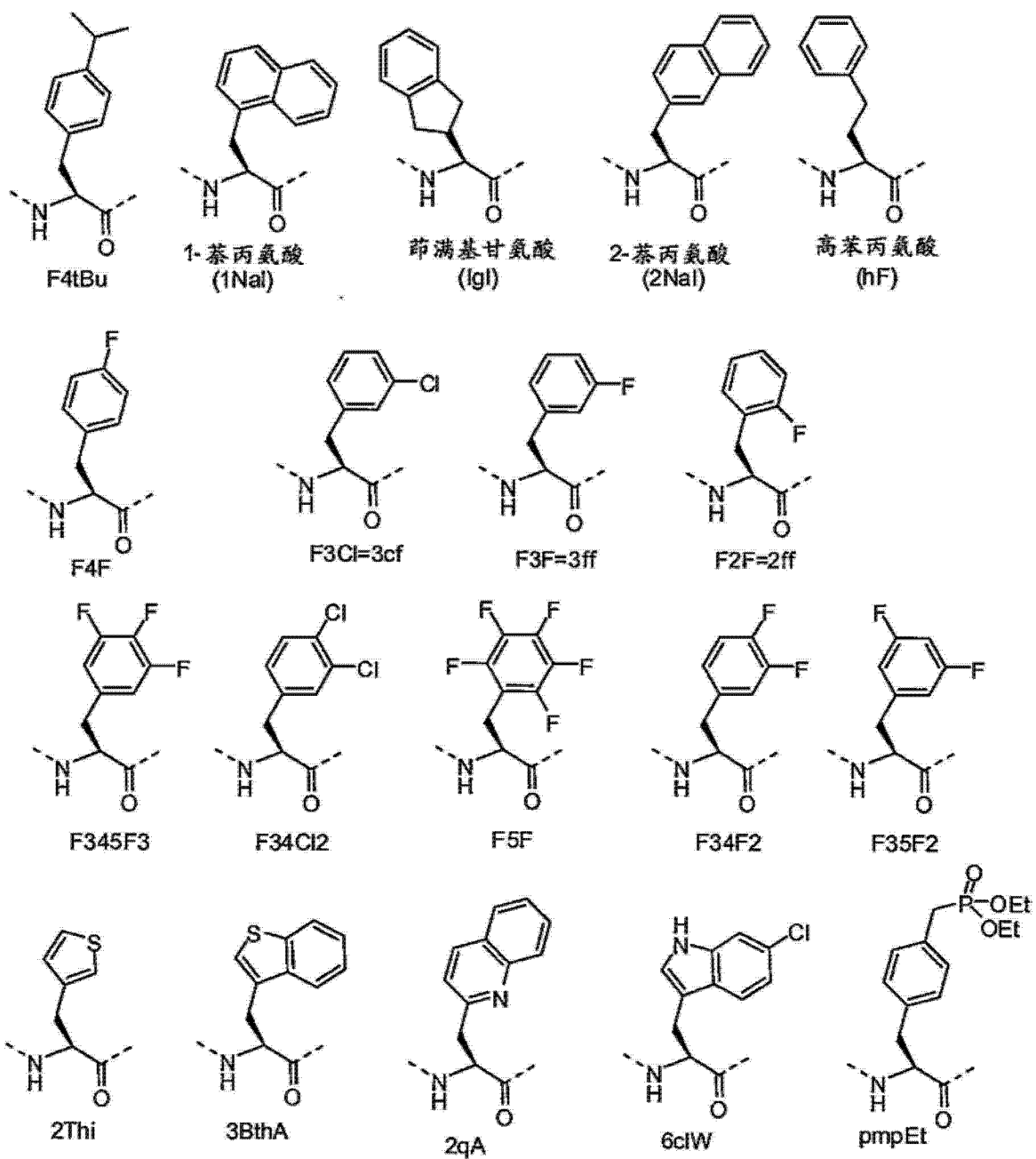
氨基酸	3 字母 代码	1 字母 代码	侧链 极性	侧链电荷 (pH 7.4)	亲水 指数
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	1.8
精氨酸	Arg	R	极性	正	-4.5
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
天冬氨酸	Asp	D	极性	负	-3.5
半胱氨酸	Cys	C	极性	中性	2.5
谷氨酸	Glu	E	极性	负	-3.5
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	-0.4
组氨酸	His	H	极性	正(10%) 中性(90%)	-3.2
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	4.5
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	3.8
赖氨酸	Lys	K	极性	正	-3.9

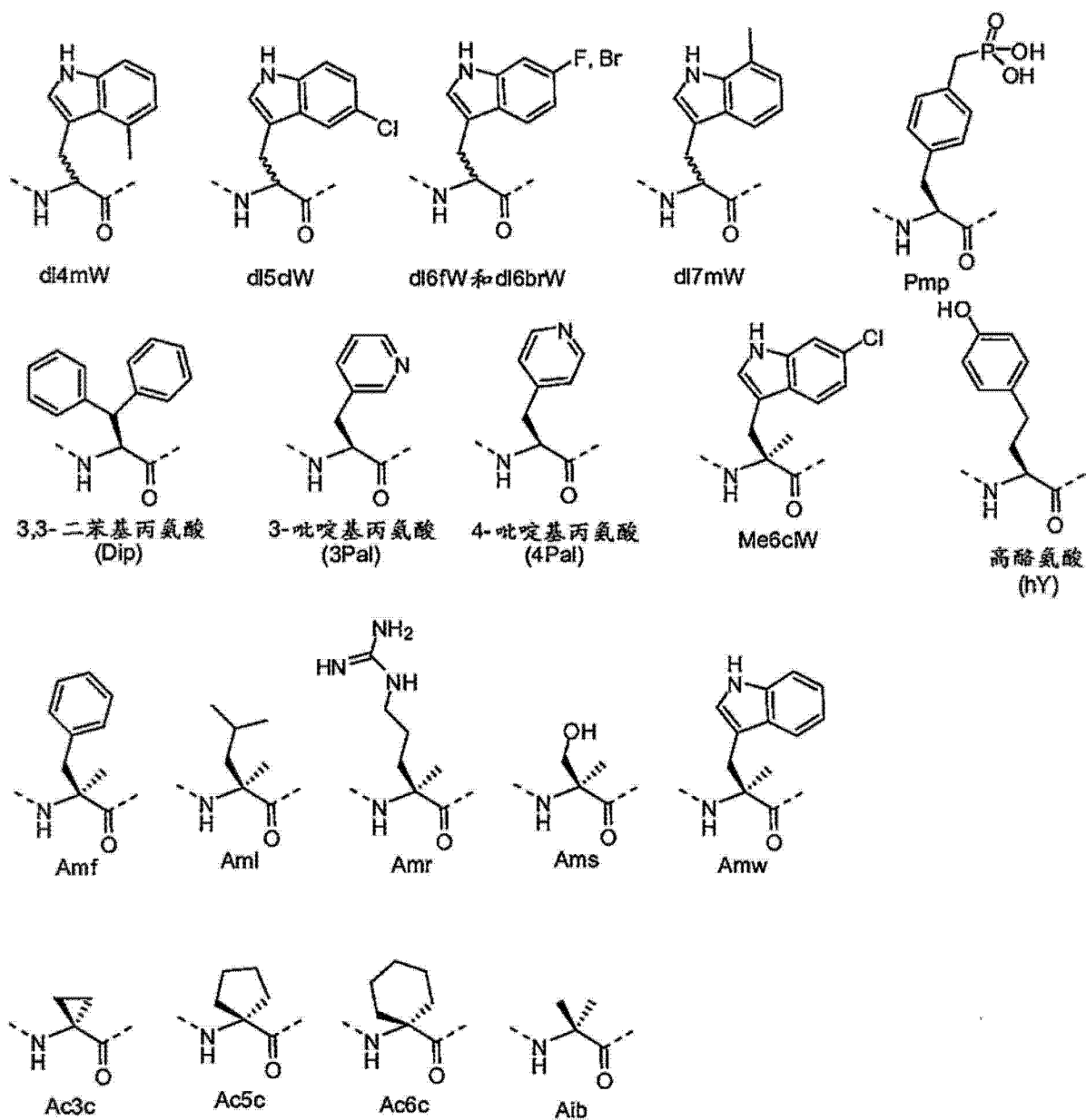
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	1.9
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	2.8
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	-1.6
丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	-0.9
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	4.2

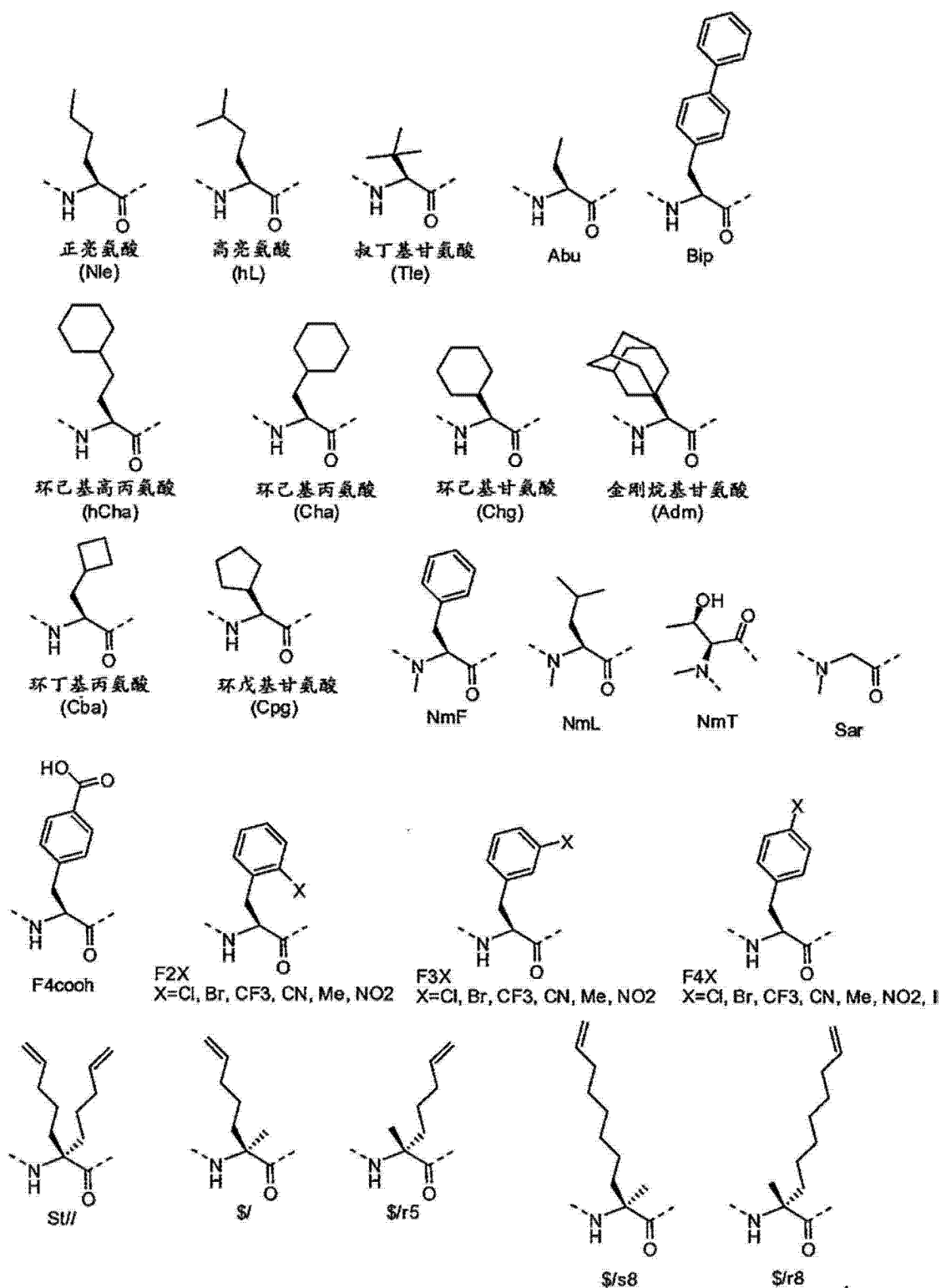
“疏水性氨基酸”包括但不限于小疏水性氨基酸和大疏水性氨基酸。“小疏水性氨基酸”为甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸及其类似物。“大疏水性氨基酸”为缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸及其类似物。“极性氨基酸”为丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、酪氨酸及其类似物。“带电氨基酸”为赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸及其类似物。

术语“氨基酸类似物”是指在结构上类似于氨基酸并且在拟肽大环化合物的形成中可代替氨基酸的分子。氨基酸类似物包括但不限于 β -氨基酸和其中氨基或羧基被相似反应性的基团取代（例如，用仲胺或叔胺取代伯胺，或用酯取代羧基）的氨基酸。

术语“非天然氨基酸”是指并非在自然界合成的肽中通常发现的二十种氨基酸（已知其单字母缩写为 A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 和 V）之一的氨基酸。非天然氨基酸或氨基酸类似物包括但不限于根据以下的结构：







氨基酸类似物包括 β -氨基酸类似物。 β -氨基酸类似物的实例包括但不限于：环状 β -氨基酸类似物； β -丙氨酸；(R)- β -苯丙氨酸；(R)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-乙酸；(R)-3-氨基-4-(1-萘基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2,4-二氯苯基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-氯苯基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-氰基苯基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-氟苯基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-呋喃基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-甲苯基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-萘基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-噻吩基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(2-三氟甲苯基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(3,4-二氯苯基)-丁酸；(R)-3-氨基-4-(3,

4-二氟苯基)丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-吡啶基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-溴苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-碘苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-硝基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-吡啶基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-五氟-苯基丁酸;(R)-3-氨基-5-己烯酸;(R)-3-氨基-5-己炔酸;(R)-3-氨基-5-苯基戊酸;(R)-3-氨基-6-苯基-5-己烯酸;(S)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-乙酸;(S)-3-氨基-4-(1-萘基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2,4-二氯苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-呋喃基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-萘基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3,4-二氯苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(3,4-二氟苯基)丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-吡啶基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-溴苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-碘苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-硝基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-吡啶基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-五氟-苯基丁酸;(S)-3-氨基-5-己烯酸;(S)-3-氨基-5-己炔酸;(S)-3-氨基-5-苯基戊酸;(S)-3-氨基-6-苯基-5-己烯酸;1,2,5,6-四氢吡啶-3-甲酸;1,2,5,6-四氢吡啶-4-甲酸;3-氨基-3-(2-氯苯基)-丙酸;3-氨基-3-(2-噻吩基)-丙酸;3-氨基-3-(3-溴苯基)-丙酸;3-氨基-3-(4-氯苯基)-丙酸;3-氨基-3-(4-甲氧苯基)-丙酸;3-氨基-4,4,4-三氟-丁酸;3-氨基己二酸;D-β-苯丙氨酸;β-亮氨酸;L-β-高丙氨酸;L-β-高天冬氨酸 γ-苄酯;L-β-高谷氨酸 δ-苄酯;L-β-高异亮氨酸;L-β-高亮氨酸;L-β-高甲硫氨酸;L-β-高苯丙氨酸;L-β-高脯氨酸;L-β-高色氨酸;L-β-高缬氨酸;L-Nω-苄氧羰基-β-高赖氨酸;Nω-L-β-高精氨酸;O-苄基-L-β-高羟脯氨酸;O-苄基-L-β-高丝氨酸;O-苄基-L-β-高苏氨酸;O-苄基-L-β-高酪氨酸;γ-三苯甲基-L-β-高天冬酰胺;(R)-β-苯丙氨酸;L-β-高天冬氨酸 γ-叔丁酯;L-β-高谷氨酸 δ-叔丁酯;L-Nω-β-高赖氨酸;Nδ-三苯甲基-L-β-高谷氨酰胺;Nω-2,2,4,6,7-五甲基-二氢苯并呋喃-5-磺酰基-L-β-高精氨酸;O-叔丁基-L-β-高羟基-脯氨酸;O-叔丁基-L-β-高丝氨酸;O-叔丁基-L-β-高苏氨酸;O-叔丁基-L-β-高酪氨酸;2-氨基环戊烷羧酸;和2-氨基环己烷羧酸。

氨基酸类似物包括丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸或亮氨酸的类似物。丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸或亮氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下;α-甲氧基甘氨酸;α-烯丙基-L-丙氨酸;α-氨基异丁酸;α-甲基-亮氨酸;β-(1-萘基)-D-丙氨酸;β-(1-萘基)-L-丙

氨酸; β -(2-萘基)-D-丙氨酸; β -(2-萘基)-L-丙氨酸; β -(2-吡啶基)-D-丙氨酸; β -(2-吡啶基)-L-丙氨酸; β -(2-噻吩基)-D-丙氨酸; β -(2-噻吩基)-L-丙氨酸; β -(3-苯并噻吩基)-D-丙氨酸; β -(3-苯并噻吩基)-L-丙氨酸; β -(3-吡啶基)-D-丙氨酸; β -(3-吡啶基)-L-丙氨酸; β -(4-吡啶基)-D-丙氨酸; β -(4-吡啶基)-L-丙氨酸; β -氯-L-丙氨酸; β -氰基-L-丙氨酸; β -环己基-D-丙氨酸; β -环己基-L-丙氨酸; β -环戊烯-1-基-丙氨酸; β -环戊基-丙氨酸; β -环丙基-L-Ala-OH·二环己基铵盐; β -叔丁基-D-丙氨酸; β -叔丁基-L-丙氨酸; γ -氨基丁酸; L- α , β -二氨基丙酸; 2,4-二硝基-苯基甘氨酸; 2,5-二氢-D-苯基甘氨酸; 2-氨基-4,4,4-三氟丁酸; 2-氟-苯基甘氨酸; 3-氨基-4,4,4-三氟-丁酸; 3-氟-缬氨酸; 4,4,4-三氟-缬氨酸; 4,5-脱氢-L-leu-OH·二环己基铵盐; 4-氟-D-苯基甘氨酸; 4-氟-L-苯基甘氨酸; 4-羟基-D-苯基甘氨酸; 5,5,5-三氟-亮氨酸; 6-氨基己酸; 环戊基-D-Gly-OH·二环己基铵盐; 环戊基-Gly-OH·二环己基铵盐; D- α , β -二氨基丙酸; D- α -氨基丁酸; D- α -叔丁基甘氨酸; D-(2-噻吩基)甘氨酸; D-(3-噻吩基)甘氨酸; D-2-氨基己酸; D-2-茚满基甘氨酸; D-烯丙基甘氨酸·二环己基铵盐; D-环己基甘氨酸; D-正缬氨酸; D-苯基甘氨酸; β -氨基丁酸; β -氨基异丁酸; (2-溴苯基)甘氨酸; (2-甲氧基苯基)甘氨酸; (2-甲苯基)甘氨酸; (2-噻唑基)甘氨酸; (2-噻吩基)甘氨酸; 2-氨基-3-(二甲氨基)-丙酸; L- α , β -二氨基丙酸; L- α -氨基丁酸; L- α -叔丁基甘氨酸; L-(3-噻吩基)甘氨酸; L-2-氨基-3-(二甲氨基)-丙酸; L-2-氨基己酸二环己基-铵盐; L-2-茚满基甘氨酸; L-烯丙基甘氨酸·二环己基铵盐; L-环己基甘氨酸; L-苯基甘氨酸; L-炔丙基甘氨酸; L-正缬氨酸; N- α -氨基甲基-L-丙氨酸; D- α , γ -二氨基丁酸; L- α , γ -二氨基丁酸; β -环丙基-L-丙氨酸; (N- β -(2,4-二硝基苯基))-L- α , β -二氨基丙酸; (N- β -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)乙基)-D- α , β -二氨基丙酸; (N- β -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基)-L- α , β -二氨基丙酸; (N- β -4-甲基三苯甲基)-L- α , β -二氨基丙酸; (N- β -烯丙氧羰基)-L- α , β -二氨基丙酸; (N- γ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基)-D- α , γ -二氨基丁酸; (N- γ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基)-L- α , γ -二氨基丁酸; (N- γ -4-甲基三苯甲基)-D- α , γ -二氨基丁酸; (N- γ -4-甲基三苯甲基)-L- α , γ -二氨基丁酸; (N- γ -烯丙氧羰基)-L- α , γ -二氨基丁酸; D- α , γ -二氨基丁酸; 4,5-脱氢-L-亮氨酸; 环戊基-D-Gly-OH; 环戊基-Gly-OH; D-烯丙基甘氨酸; D-环己基高丙氨酸; L-1-苄基丙氨酸; L-2-氨基己酸; L-烯丙基甘氨酸; L-环己基高丙氨酸; 和 N-(2-羟基-4-甲氧基-Bzl)-Gly-OH。

氨基酸类似物进一步包括精氨酸或赖氨酸的类似物。精氨酸和赖氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下: 瓜氨酸; L-2-氨基-3-胍基丙酸; L-2-氨基-3-脒基丙酸; L-瓜氨酸; Lys(Me)₂-OH; Lys(N₃)-OH; N δ -苄氧羰基-L-鸟氨酸; N ω -硝基-D-精氨酸; N ω -硝基-L-精氨酸; α -甲基-鸟氨酸; 2,6-二氨基庚二酸; L-鸟氨酸; (N δ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代-环己-1-亚基)乙基)-D-鸟氨酸; (N δ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代-环己-1-亚基)乙基)-L-鸟氨酸; (N δ -4-甲基三苯甲基)-D-鸟氨酸; (N δ -4-甲基三苯甲基)-L-鸟氨酸; D-鸟氨酸; L-鸟氨酸; Arg(Me)(Pbf)-OH; Arg(Me)₂-OH(不对称的); Arg(Me)₂-OH(对称的); Lys(ivDde)-OH; Lys(Me)₂-OH·HCl; Lys(Me)₃-OH氯化物; N ω -硝基-D-精氨酸; 和 N ω -硝基-L-精氨酸。

氨基酸类似物包括天冬氨酸或谷氨酸的类似物。天冬氨酸和谷氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下： α -甲基-D-天冬氨酸； α -甲基-谷氨酸； α -甲基-L-天冬氨酸； γ -亚甲基-谷氨酸；(N- γ -乙基)-L-谷氨酰胺；[N- α -(4-氨基苯甲酰基)]-L-谷氨酸；2,6-二氨基庚二酸；L- α -氨基辛二酸；D-2-氨基己二酸；D- α -氨基辛二酸； α -氨基庚二酸；亚氨基二乙酸；L-2-氨基己二酸；苏- β -甲基-天冬氨酸； γ -羧基-D-谷氨酸 γ ， γ -二-叔丁酯； γ -羧基-L-谷氨酸 γ ， γ -二-叔丁酯；Glu(OAl1)-OH；L-Asu(OtBu)-OH；和焦谷氨酸。

氨基酸类似物包括半胱氨酸和甲硫氨酸的类似物。半胱氨酸和甲硫氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于 Cys(法呢基)-OH、Cys(法呢基)-OMe、 α -甲基-甲硫氨酸、Cys(2-羟乙基)-OH、Cys(3-氨基丙基)-OH、2-氨基-4-(乙硫基)丁酸、丁硫氨酸、丁硫氨酸亚砷胺、乙硫氨酸、甲硫氨酸甲基钨氯化物、硒代甲硫氨酸、磺丙氨酸、[2-(4-吡啶基)乙基]-DL-青霉胺、[2-(4-吡啶基)乙基]-L-半胱氨酸、4-甲氧苄基-D-青霉胺、4-甲氧苄基-L-青霉胺、4-甲基苄基-D-青霉胺、4-甲基苄基-L-青霉胺、苄基-D-半胱氨酸、苄基-L-半胱氨酸、苄基-DL-高半胱氨酸、氨甲酰基-L-半胱氨酸、羧乙基-L-半胱氨酸、羧甲基-L-半胱氨酸、二苯基甲基-L-半胱氨酸、乙基-L-半胱氨酸、甲基-L-半胱氨酸、叔丁基-D-半胱氨酸、三苯基甲基-L-高半胱氨酸、三苯基甲基-D-青霉胺、胱硫醚、高胱氨酸、L-高胱氨酸、(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸、硒代-L-胱氨酸、胱硫醚、Cys(StBu)-OH 和乙酰氨基-D-青霉胺。

氨基酸类似物包括苯丙氨酸和酪氨酸的类似物。苯丙氨酸和酪氨酸的氨基酸类似物的实例包括 β -甲基-苯丙氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、 α -甲基-3-甲氧基-DL-苯丙氨酸、 α -甲基-D-苯丙氨酸、 α -甲基-L-苯丙氨酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸、2,4-二氯-苯丙氨酸、2-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、2-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、2-溴-D-苯丙氨酸、2-溴-L-苯丙氨酸、2-氯-D-苯丙氨酸、2-氯-L-苯丙氨酸、2-氰基-D-苯丙氨酸、2-氰基-L-苯丙氨酸、2-氟-D-苯丙氨酸、2-氟-L-苯丙氨酸、2-甲基-D-苯丙氨酸、2-甲基-L-苯丙氨酸、2-硝基-D-苯丙氨酸、2-硝基-L-苯丙氨酸、2,4,5-三羟基-苯丙氨酸、3,4,5-三氟-D-苯丙氨酸、3,4,5-三氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-D-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、3,4-二氟-D-苯丙氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二羟基-L-苯丙氨酸、3,4-二甲氧基-L-苯丙氨酸、3,5,3'-三碘-L-甲状腺原氨酸、3,5-二碘-D-酪氨酸、3,5-二碘-L-酪氨酸、3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸、3-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、3-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、3-氨基-L-酪氨酸、3-溴-D-苯丙氨酸、3-溴-L-苯丙氨酸、3-氯-D-苯丙氨酸、3-氯-L-苯丙氨酸、3-氯-L-酪氨酸、3-氰基-D-苯丙氨酸、3-氰基-L-苯丙氨酸、3-氟-D-苯丙氨酸、3-氟-L-苯丙氨酸、3-氟-酪氨酸、3-碘-D-苯丙氨酸、3-碘-L-苯丙氨酸、3-碘-L-酪氨酸、3-甲氧基-L-酪氨酸、3-甲基-D-苯丙氨酸、3-甲基-L-苯丙氨酸、3-硝基-D-苯丙氨酸、3-硝基-L-苯丙氨酸、3-硝基-L-酪氨酸、4-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、4-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、4-氨基-D-苯丙氨酸、4-氨基-L-苯丙氨酸、4-苯甲酰基-D-苯丙氨酸、4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、4-双(2-氯乙基)氨基-L-苯丙氨酸、4-溴-D-苯丙氨酸、4-溴-L-苯丙氨酸、4-氯-D-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、4-氰基-D-苯丙氨酸、4-氰基-L-苯丙氨酸、4-氟-D-苯丙氨酸、4-氟-L-苯丙氨酸、4-碘-D-苯丙氨酸、4-碘-L-苯丙氨酸、高苯丙氨酸、甲状腺氨酸、3,3'-二苯丙氨酸、甲状腺原氨酸、乙

基-酪氨酸和甲基-酪氨酸。

氨基酸类似物包括脯氨酸的类似物。脯氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于 3, 4-脱氢-脯氨酸、4-氟-脯氨酸、顺-4-羟基-脯氨酸、噻唑烷-2-甲酸和反-4-氟-脯氨酸。

氨基酸类似物包括丝氨酸和苏氨酸的类似物。丝氨酸和苏氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于 3-氨基-2-羟基-5-甲基己酸、2-氨基-3-羟基-4-甲基戊酸、2-氨基-3-乙氧丁酸、2-氨基-3-甲氧丁酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸、2-氨基-3-苄氧丙酸、2-氨基-3-苄氧丙酸、2-氨基-3-乙氧丙酸、4-氨基-3-羟基丁酸和 α -甲基丝氨酸。

氨基酸类似物包括色氨酸的类似物。色氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下： α -甲基-色氨酸； β -(3-苯并噻吩基)-D-丙氨酸； β -(3-苯并噻吩基)-L-丙氨酸；1-甲基-色氨酸；4-甲基-色氨酸；5-苄氧基-色氨酸；5-溴-色氨酸；5-氯-色氨酸；5-氟-色氨酸；5-羟基-色氨酸；5-羟基-L-色氨酸；5-甲氧基-色氨酸；5-甲氧基-L-色氨酸；5-甲基-色氨酸；6-溴-色氨酸；6-氯-D-色氨酸；6-氯-色氨酸；6-氟-色氨酸；6-甲基-色氨酸；7-苄氧基-色氨酸；7-溴-色氨酸；7-甲基-色氨酸；D-1,2,3,4-四氢-去甲哈尔满-3-甲酸；6-甲氧基-1,2,3,4-四氢去甲哈尔满-1-甲酸；7-氮杂色氨酸；L-1,2,3,4-四氢-去甲哈尔满-3-甲酸；5-甲氧基-2-甲基-色氨酸；和 6-氯-L-色氨酸。

在一些实施方案中，氨基酸类似物是外消旋的。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的 D 型异构体。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的 L 型异构体。在其它实施方案中，氨基酸类似物包含为 R 或 S 构型的手性中心。在又一些其它实施方案中， β -氨基酸类似物的氨基基团被诸如叔丁氧羰基 (BOC 基团)、9-苄氧羰基 (Fmoc)、甲苯磺酰基等保护基团取代。在一些其它实施方案中， β -氨基酸类似物的羧酸官能团例如作为其酯衍生物被保护。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的盐。

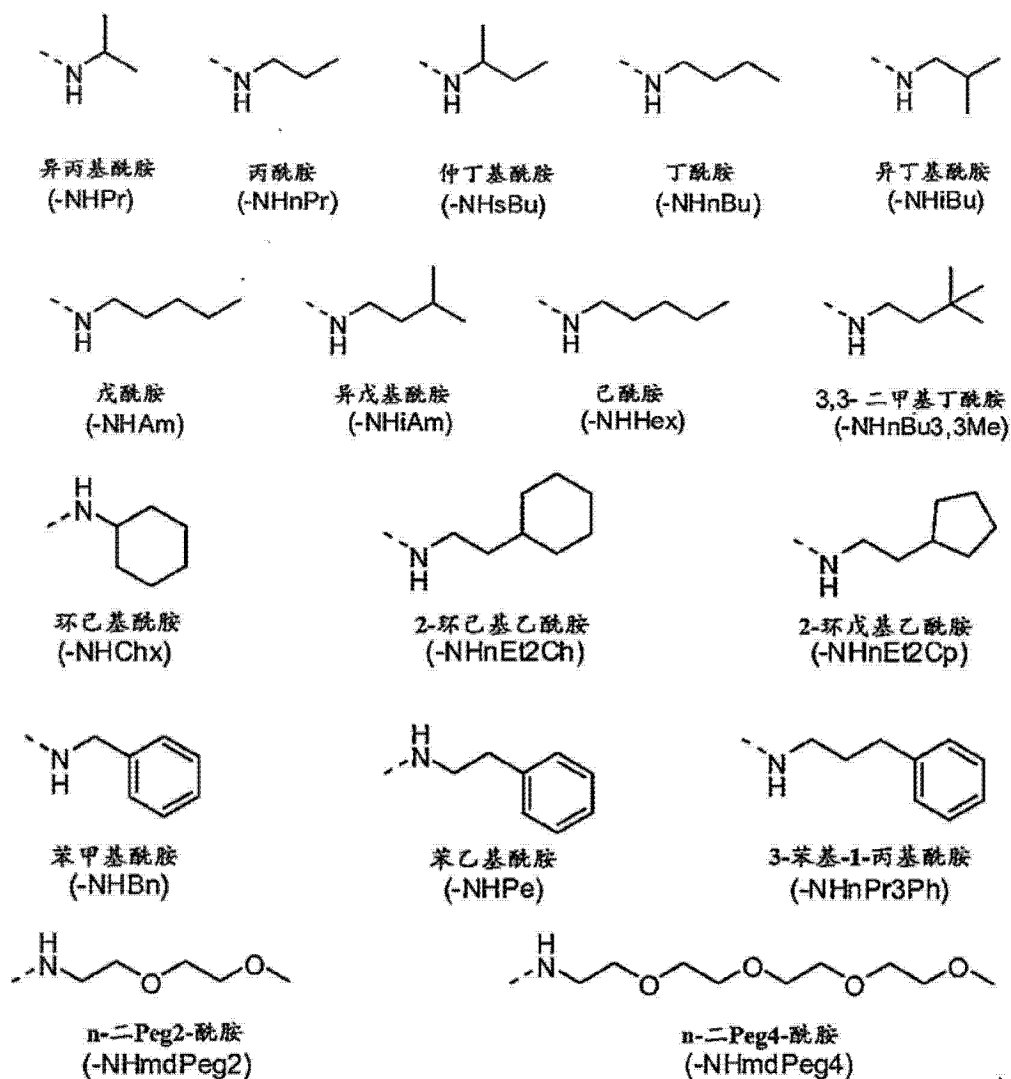
如本文所用的，“非必需”氨基酸残基是在多肽的野生型序列中存在的氨基酸残基，其能够发生改变而不会消除或基本不改变该多肽的基本生物学或生物化学活性（例如，受体结合或激活）。

如本文所用的，“必需”氨基酸残基是在多肽的野生型序列中存在的氨基酸残基，当其改变时导致该多肽的基本生物学或生物化学活性（例如，受体结合或激活）的消除或大幅降低。

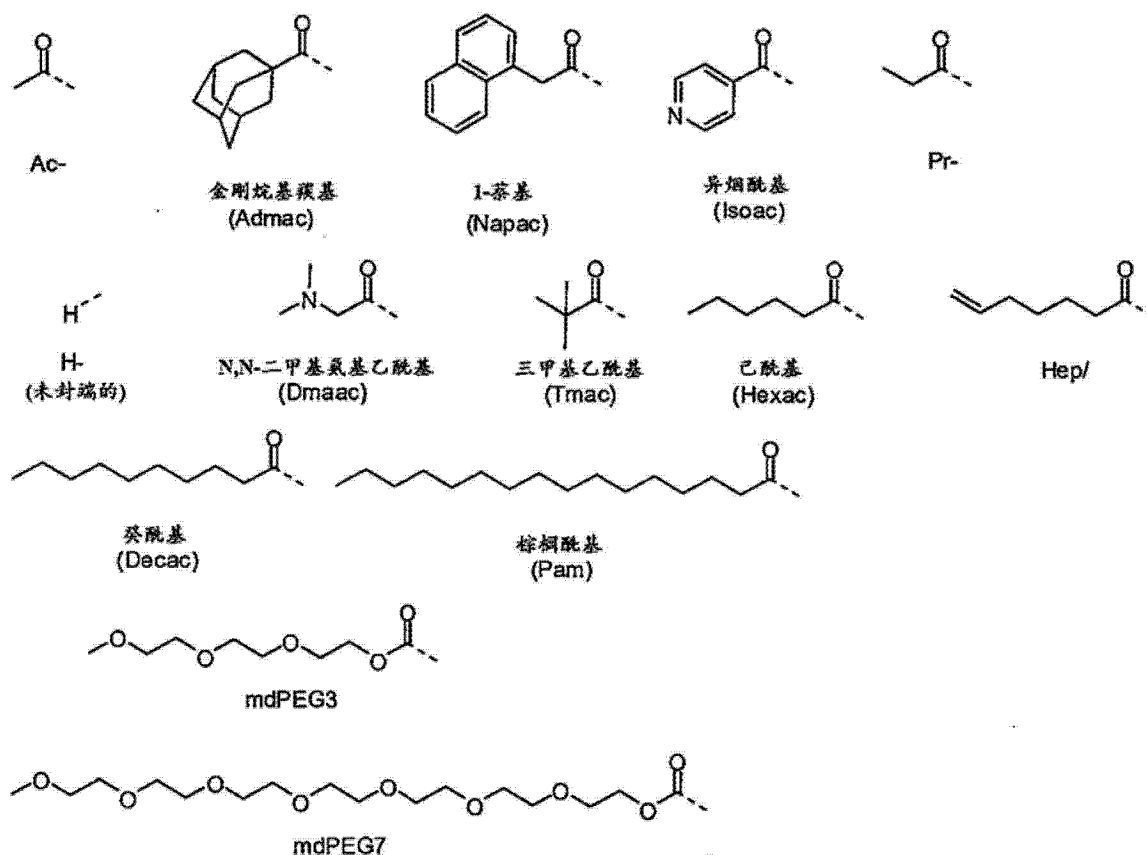
“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的不同氨基酸残基所替代的氨基酸置换。本领域中已定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如，K、R、H）、具有酸性侧链的氨基酸（例如，D、E）、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸（例如，G、N、Q、S、T、Y、C）、具有非极性侧链的氨基酸（例如，A、V、L、I、P、F、M、W）、具有 β 分支的侧链的氨基酸（例如，T、V、I）和具有芳香族侧链的氨基酸（例如，Y、F、W、H）。因此，多肽中预测的非必需氨基酸残基例如被来自同一侧链家族的另一种氨基酸残基所替代。可接受的置换的其它例子是基于电子等排考虑（例如，正亮氨酸取代甲硫氨酸）或其它性质（如 2-噻吩丙氨酸取代苯丙氨酸，或 6-Cl-色氨酸取代色氨酸）的置换。

术语“封端基团”是指出现在本发明拟肽大环化合物的多肽链的羧基末端或氨基末端的化学部分。羧基末端的封端基团包括未修饰的羧酸（即 -COOH）或具有取代基的羧酸。例

如,羧基末端可被氨基取代,从而在C末端产生羧酰胺。各种取代基包括但不限于伯胺和仲胺,仲胺包括聚乙二醇化的仲胺。用于C末端的代表性的仲胺封端基团包括:



氨基末端的封端基团包括未修饰的胺(即 -NH_2)或具有取代基的胺。例如,氨基末端可被酰基取代,从而在N-末端生成羧酰胺。各种取代基包括但不限于取代的酰基,包括 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 羰基、 $\text{C}_7\text{-C}_{30}$ 羰基和聚乙二醇化的氨基甲酸酯。用于N-末端的代表性封端基团包括:



在本文中与大环化合物或大环形成连接体一起使用的术语“元”是指形成或可以形成大环的原子，并且不包括取代基或侧链原子。以此类推，环癸烷、1,2-二氟-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都没有参与形成大环。

当用作分子结构的一部分时，符号“ --- ”是指单键或者反式或顺式双键。

术语“氨基酸侧链”是指连接到氨基酸中的 α -碳（或另一个骨架原子）上的部分。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-羟基苯甲基，等等。也包括其它非天然存在的氨基酸侧链，例如，自然产生的氨基酸侧链（例如，氨基酸代谢物）或合成制备的氨基酸侧链（例如， α ， α -二取代的氨基酸）。

术语“ α ， α -二取代的氨基酸”是指包含的氨基和羧基都结合到碳（ α -碳）上而该碳（ α -碳）连接到两个天然或非天然氨基酸侧链上的分子或部分。

术语“多肽”包括通过共价键（例如，酰胺键）连接的两个或更多个天然或非天然存在的氨基酸。本文所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，天然存在的蛋白质的片段或合成的多肽片段）。

本文所用的术语“大环化试剂”或“大环形成试剂”是指任何可以用来通过介导两个反应性基团之间的反应而制备拟肽大环化合物的试剂。该反应性基团可以是，例如，叠氮和炔，在这种情况下，大环化试剂包括但不限于 Cu 试剂，如提供反应性 Cu(I) 物质的试剂，如 CuBr、CuI 或 CuOTf，以及通过加入诸如抗坏血酸或抗坏血酸钠的还原剂可以原位转化为活性 Cu(I) 试剂的 Cu(II) 盐，如 Cu(CO₂CH₃)₂、CuSO₄ 和 CuCl₂。大环化试剂另外还可以包括，例如，本领域已知的 Ru 试剂，如 Cp*RuCl(PPh₃)₂、[Cp*RuCl]₄，或其它可以提供反应性

Ru(II) 物质的 Ru 试剂。在其它情况下,反应性基团为末端烯烃。在这样的实施方案中,大环化试剂或大环形成试剂为复分解催化剂,包括但不限于稳定的后过渡金属卡宾络合物催化剂,如 VIII 族过渡金属卡宾催化剂。例如,这样的催化剂为具有 +2 氧化态、电子计数为 16 且五配位的 Ru 和 Os 金属中心。在其它实例中,催化剂具有 W 或 Mo 中心。各种催化剂在 Grubbs 等人, " Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis " Acc. Chem. Res. 1995, 28, 446-452, 美国专利号 5,811,515; 美国专利号 7,932,397; 美国申请号 2011/0065915; 美国申请号 2011/0245477; Yu 等人, " Synthesis of Macrocyclic Natural Products by Catalyst-Controlled Stereoselective Ring-Closing Metathesis, " Nature 2011, 479, 88; 和 Peryshkov 等人, " Z-Selective Olefin Metathesis Reactions Promoted by Tungsten Oxo Alkylidene Complexes, " J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 20754 中公开。在另外其它的情况下,反应性基团为巯基。在这样的实施方案中,大环化试剂为,例如,用两个巯基反应性基团如卤素基团官能化的连接体。

术语“卤代”或“卤素”是指氟、氯、溴或碘或其基团。

术语“烷基”是指含有指定数目的碳原子的直链或支链烃链。例如, C_1-C_{10} 表示该基团中具有 1-10 (含端值) 个碳原子。在没有指定任何数值时,“烷基”是其中具有 1-20 (含端值) 个碳原子的链 (直链或支链)。

术语“亚烷基”是指二价烷基 (即, $-R-$)。

术语“烯基”是指具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃链。烯基部分含有指定数目的碳原子。例如, C_2-C_{10} 表示该基团中具有 2-10 (含端值) 个碳原子。术语“低级烯基”是指 C_2-C_6 烯基链。在没有指定任何数值时,“烯基”是其中具有 2-20 (含端值) 个碳原子的链 (直链或支链)。

术语“炔基”是指具有一个或多个碳-碳叁键的直链或支链烃链。炔基部分含有指定数目的碳原子。例如, C_2-C_{10} 表示该基团中具有 2-10 (含端值) 个碳原子。术语“低级炔基”是指 C_2-C_6 炔基链。在没有指定任何数值时,“炔基”是其中具有 2-20 (含端值) 个碳原子的链 (直链或支链)。

术语“芳基”是指 6 碳单环或 10 碳双环的芳香环系,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。术语“芳基烷氧基”是指被芳基取代的烷氧基。

“烷基芳基 (arylalkyl)”是指其中芳基的氢原子中的一个被如上定义的 C_1-C_5 烷基取代的如上定义的芳基。烷基芳基的代表性例子包括但不限于: 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。

“酰胺基芳基 (arylamido)”是指其中芳基的氢原子中的一个被一个或多个 $-C(O)NH_2$ 基团取代的如上定义的芳基。酰胺基芳基的代表性例子包括: 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。

“杂环基烷基 (alkylheterocycle)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被杂环

取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。杂环基烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2CH_2-$ 吗啉、 $-CH_2CH_2-$ 哌啶、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 吗啉和 $-CH_2CH_2CH_2-$ 咪唑。

“酰胺基烷基 (alkylamido)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被 $-C(O)NH_2$ 基团取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。酰胺基烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_3$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3-CH_3$ 和 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH=CH_2$ 。

“羟烷基 (alkanol)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被羟基取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。羟烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2OH$ 。

“羧基烷基 (alkylcarboxy)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被 $-COOH$ 基团取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。羧基烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(COOH)CH_2CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2COOH$ 。

本文使用的术语“环烷基”包括具有 3-12 个碳、优选 3-8 个碳、更优选 3-6 个碳的饱和的和部分不饱和的环烷基团，其中环烷基另外任选地被取代。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。

术语“杂芳基”是指芳香族的 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环系，其如果是单环则具有 1-3 个杂原子，如果是双环则具有 1-6 个杂原子，或者如果是三环则具有 1-9 个杂原子，所述杂原子选自 O、N 或 S（例如，如果是单环、双环或三环，分别为碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 杂原子），其中各个环的 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 furanyl)、咪唑基、苯并咪唑基、噻吩基、噻吩基 (thiophenyl 或 thienyl)、喹啉基 (quinolinyl)、吲哚基、噻唑基等。

术语“杂芳基烷基”或术语“杂芳烷基”是指被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”是指被杂芳基取代的烷氧基。

术语“杂芳基烷基”或术语“杂芳烷基”是指被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”是指被杂芳基取代的烷氧基。

术语“杂环基”是指非芳香族的 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环系，其如果是单环则具有 1-3 个杂原子，如果是双环则具有 1-6 个杂原子，或者如果是三环则具有 1-9 个杂原子，所述杂原子选自 O、N 或 S（例如，如果是单环、双环或三环，分别为碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 杂原子），其中各个环的 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。

术语“取代基”是指取代任何分子、化合物或部分上的第二原子或基团如氢原子的基团。合适的取代基包括但不限于卤素、羟基、巯基、氧代、硝基、卤代烷基、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。

在一些实施方案中，本文公开的一种或多种化合物包含一个或多个不对称中心，因而作为外消旋体或外消旋混合物、单一对映异构体、单独的非对映异构体和非对映体混合物存在。在一个实施方案中，除非另外明确地指出，本发明包括这些化合物的异构体形式。在

一些实施方案中,本文公开的一种或多种化合物也呈现为多种互变异构形式,在这些情况下,所述一种或多种化合物包括本文所述化合物的所有互变异构形式(例如,如果环系的烷基化作用导致在多个位置发生烷基化,那么所述一种或多种化合物包括所有这些反应产物)。除非另外明确地指出,本发明包括这些化合物的所有这些异构体形式。除非另外明确地指出,本发明包括本文所述化合物的所有晶形。

如本文所用的,术语“增加”和“减少”分别意味着导致至少 5% 的统计学显著的(即, $p < 0.1$) 增加或减少。

如本文所用的,提及变量的数值范围旨在表示本发明能够用等于该范围内的任意值的变量实施。因此,对于本身不连续的变量,该变量等于该数值范围内的任意整数值,包括该范围的端点。类似地,对于本身连续的变量,该变量等于该数值范围内的任意实值,包括该范围的端点。作为例子,而不是限制,如果变量本身是不连续的,描述为具有 0-2 之间的值的变量取 0、1 或 2 的值;而如果变量本身是连续的,则取 0.0、0.1、0.01、0.001 的值或 ≥ 0 且 ≤ 2 的其它任何实值。

如本文所用的,除非另外特别指出,单词“或”以“和 / 或”的包含性含义使用,而非“任一 / 或”的排它性的含义。

术语“平均”表示对于每个数据点通过进行至少 3 次独立的重复而获得的平均值。

术语“生物活性”包括大环化合物的结构和功能性质。生物活性是,例如,结构稳定性、 α -螺旋性、对靶标的亲和性、对蛋白水解降解的抗性、细胞透性、细胞内稳定性、体内稳定性或其任意组合。

术语“结合亲和力”是指结合相互作用的强度,例如拟肽大环化合物与靶标之间的结合相互作用的强度。结合亲和力可以表示为,例如,平衡解离常数 (“ K_D ”),其表示单位为浓度的量度(例如 M、mM、 μ M、nM 等)。在数字上,结合亲和力和 K_D 值相反地变化,从而使得较低的结合亲和力对应于较高的 K_D 值,而较高的结合亲和力对应于较低的 K_D 值。在需要高结合亲和力的情况下,“改善的”结合亲和力是指较高的结合亲和力,因此指较低的 K_D 值。

术语“结合亲和力之比”是指第一结合相互作用(分子)与第二结合相互作用(分母)的解离常数(K_D 值)之比。因此,针对靶标 1 相比于靶标 2 的“降低的结合亲和力之比”是指较低的表示为 K_D (靶标 1)/ K_D (靶标 2) 的比值。此概念也可被表征为针对靶标 1 相比于靶标 2 的“改善的选择性”,这可能是由于针对靶标 1 的 K_D 值的降低,也可能是由于针对靶标 2 的 K_D 值的升高。

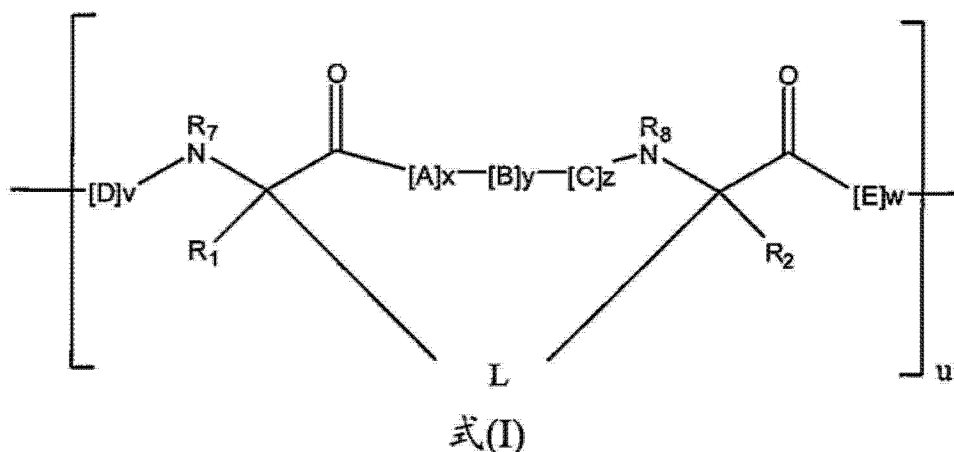
术语“体外效力”是指测试化合物如拟肽大环化合物在体外测试系统或试验中产生有益结果的程度。例如,体外效力可以测量为“ IC_{50} ”或“ EC_{50} ”值,其表示测试化合物在测试系统中产生 50% 的最大效应的浓度。

术语“体外效力之比”或“体外效力比”是指来自第一试验(分子)与来自第二试验(分母)的 IC_{50} 或 EC_{50} 值的比值。因此,针对试验 1 相比于试验 2 的改善的体外效力比是指较低的表示为 IC_{50} (试验 1)/ IC_{50} (试验 2) 或 EC_{50} (试验 1)/ EC_{50} (试验 2) 的比值。此概念也可表征为在试验 1 中相比于在试验 2 中的“改善的选择性”,这可能是由于针对靶标 1 的 IC_{50} 或 EC_{50} 值的降低,也可能是由于针对靶标 2 的 IC_{50} 或 EC_{50} 值的升高。

在下面的附图和描述中阐述了本发明的一个或多个具体实施方案的细节。从说明书、附图和权利要求书可以明显看出本发明的其它特征、目的和优势。

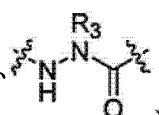
拟肽大环化合物

在一些实施方案中,拟肽大环化合物具有式(I):

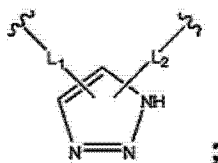


其中:

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体:



L_1 、 L_2 和 L_3 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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;

各个 R_7 独立地为 -H、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

各个 R_8 独立地为 -H、烷基、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, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

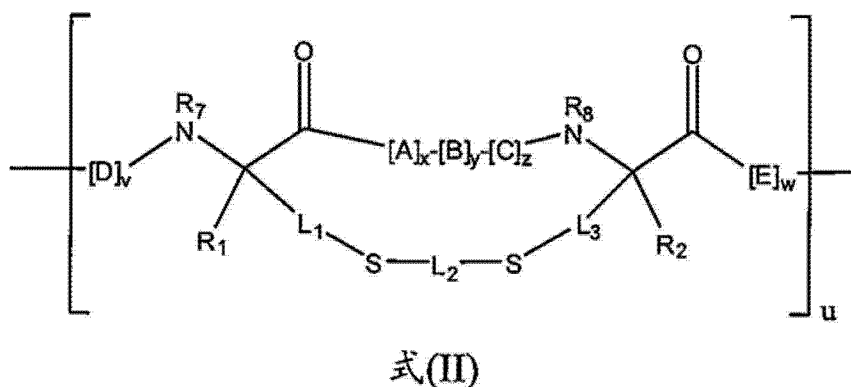
v 和 w 独立地为 1-1000 的整数, 例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

u 为 1-10 的整数, 例如 1-5、1-3 或 1-2;

x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数, 例如 x+y+z 之和为 2、3 或 6; 且

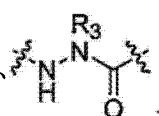
n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中,拟肽大环化合物具有下式:



其中:

各个 A、C、D 和 E 独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、 $[-NH-L_4-CO-]$ 、 $[-NH-L_4-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_4-]$;

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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;或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

R_3 为氢、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代;

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$,它们各自是未取代的或被 R_5 取代;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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;

R_7 为 -H、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

R_8 为 -H、烷基、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,它们任选地被 R_5 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10;

u 为 1-10 的整数,例如 1-5、1-3 或 1-2;

x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数,例如 x+y+z 之和为 2、3 或 6;且

n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中,v 和 w 为 1-30 的整数。在一些实施方案中,w 为 3-1000 的整数,例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10。

在一些实施方案中,请求保护该拟肽大环化合物的条件是,当 $u = 1$ 且 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸不是精氨酸 (R),并且 / 或者由 E 代表的第二 C-末端氨基酸不是苏氨酸 (T)。例如,当 $u = 1$ 且 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸和 / 或第二 C-末端氨基酸不包含带正电荷的侧链或不带电荷的极性侧链。在一些实施方案中,当 $u = 1$ 且 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸和 / 或第二 C-末端氨基酸包含疏水性侧链。例如,当 $w = 2$ 时,由 E 代表的第一 C-末端氨基酸和 / 或第二 N-末端氨基酸包含疏水性侧链,例如大的疏水性侧链。

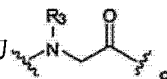
在一些实施方案中, w 为 3-1000。例如,由 E 代表的第三氨基酸包含大的疏水性侧链。

在式 I 拟肽大环化合物的一些实施方案中, L_1 和 L_2 单独地或组合地不形成全烃链或硫醚。在式 II 拟肽大环化合物的其它实施方案中, L_1 和 L_2 单独地或组合地不形成全烃链或三唑。

在一个实例中, R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素 - 取代的烷基。在另一个实例中, R_1 和 R_2 二者均独立地为未取代的或被卤素 - 取代的烷基。在一些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个为甲基。在其它实施方案中, R_1 和 R_2 为甲基。

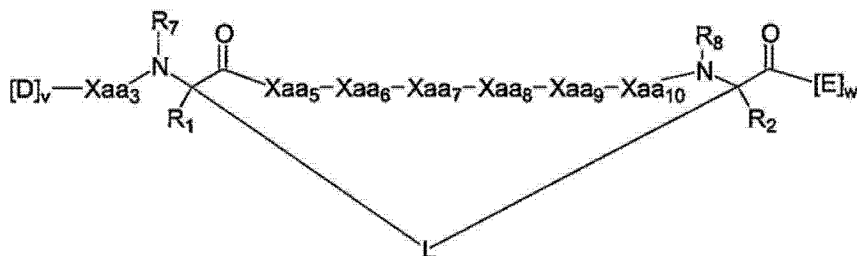
在一些实施方案中, $x+y+z$ 至少为 3。在其它实施方案中, $x+y+z$ 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些实施方案中, $x+y+z$ 之和为 3 或 6。在一些实施方案中, $x+y+z$ 之和为 3。在其它实施方案中, $x+y+z$ 之和为 6。大环化合物或大环化合物前体中每次出现的 A、B、C、D 或 E 独立地选择。例如,由式 $[A]_x$ 表示的序列,当 x 为 3 时,包括其中氨基酸不相同的实施方案,例如 Gln-Asp-Ala,以及其中氨基酸相同的实施方案,例如 Gln-Gln-Gln。这适用于 x 、 y 或 z 在指定范围内的任意值。类似地,当 u 大于 1 时,各个化合物可包含相同或不同的拟肽大环化合物。例如,化合物可以包含含有不同连接体长度或化学组成的拟肽大环化合物。

在一些实施方案中,拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构且 R_8 为 -H,从而允许螺旋内氢键键合。在一些实施方案中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个实例中,B 为 α , α -二取代的氨基酸。例如,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其它实施方案中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



在其它实施方案中,选择从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测量的大环形成连接体 L 的长度,以稳定希望的二级肽结构,例如由拟肽大环化合物的残基 (包括但不是必须限于第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 之间的残基) 形成的 α -螺旋。

还提供了下式的拟肽大环化合物:



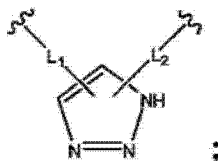
其中:

Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的每一个单独地为氨基酸,其中 Xaa_3 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 和 Xaa_{10} 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸,其中各个 X 为氨基酸;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、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；或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ；

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

各个 R_3 独立地为氢、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代；

各个 R_4 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、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；

各个 R_7 独立地为 -H、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

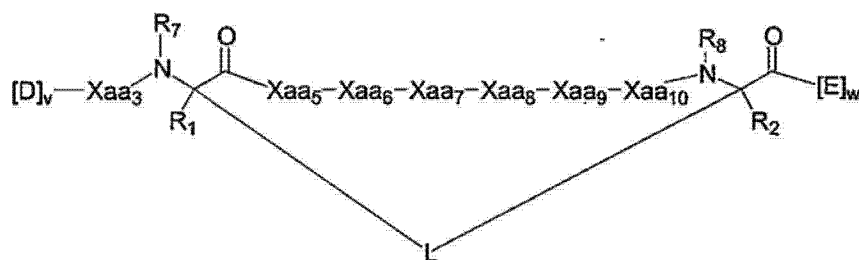
各个 R_8 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

n 为 1-5 的整数。

在一些实施方案中，该拟肽大环化合物具有下式：



其中：

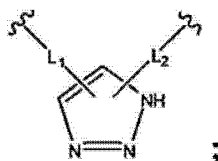
Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸，其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-Glu₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀/Cba₁₀-X₁₁-Ala₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸，其中各个 X 为氨基酸；

各个 D 和 E 独立地为氨基酸；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基

基,它们是未取代的或被卤素-取代的;或者 R_1 和 R_2 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E 氨基酸之一的 α 位置的大环形成连接体 L' ;

各个 L 和 L' 独立地为下式的大环形成连接体：



L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

R₃ 为氢、烷基、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,它们任选地被 R₅ 取代;

各个 R₄ 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 为 0、S、S0、S0₂、C0、C0₂ 或 CONR₂;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R₆ 独立地为 -H、烷基、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；

R₇ 为 -H、烷基、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,它们任选地被 R₅ 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

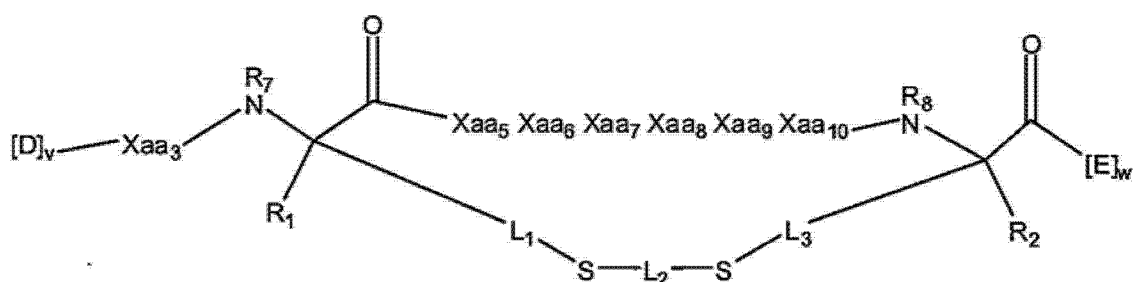
R₈ 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R₅ 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 为 1-1000 的整数,例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10 ;

w 为 3-1000 的整数, 例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10 ; 且

n 为 1-5 的整数。

还提供了下式的拟肽大环化合物：



其中：

Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的每一个单独地为氨基酸,其中 Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉ 和 Xaa₁₀ 中的至少三个是与序列 Phe₃-X₄-His₅-Tyr₆-Trp₇-Ala₈-Gln₉-Leu₁₀-X₁₁-Ser₁₂ 的相应位置处的氨基酸相同的氨基酸,其中各个 X 为氨基酸;

各个 D 和 E 独立地为氨基酸：

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、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; 或者 R₁ 和 R₂ 中的至少一个形成连接至所述 D 或 E

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 $-H$ 、烷基、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；

R_7 为 $-H$ 、烷基、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，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

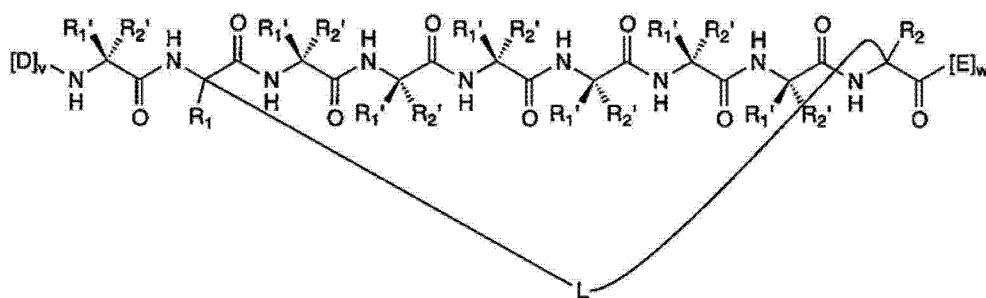
R_8 为 $-H$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-30、1-20 或 1-10；

w 为 3-1000 的整数，例如 3-500、3-200、3-100、3-50、3-30、3-20 或 3-10；且

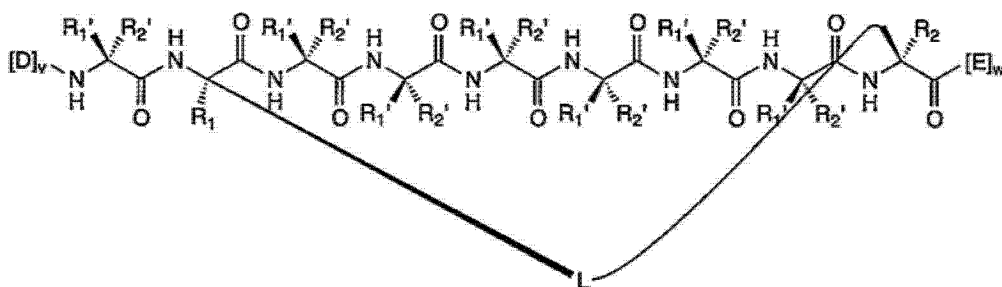
n 为 1-5 的整数。

在一个实施方案中，该拟肽大环化合物为：



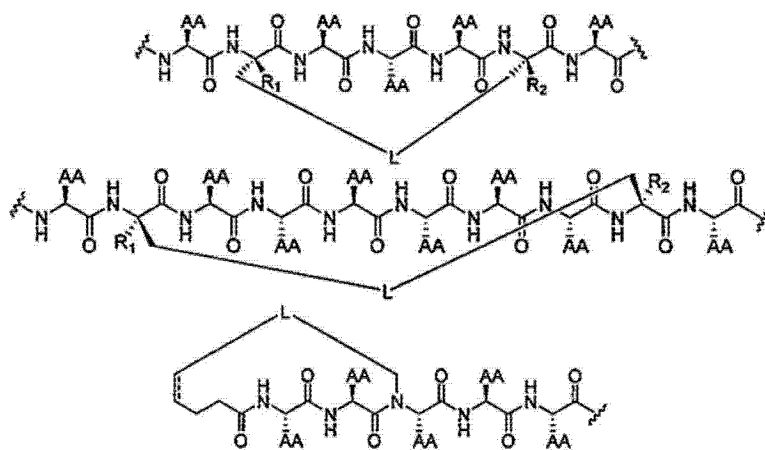
其中各个 R_1 和 R_2 独立地为 $-H$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素取代的。

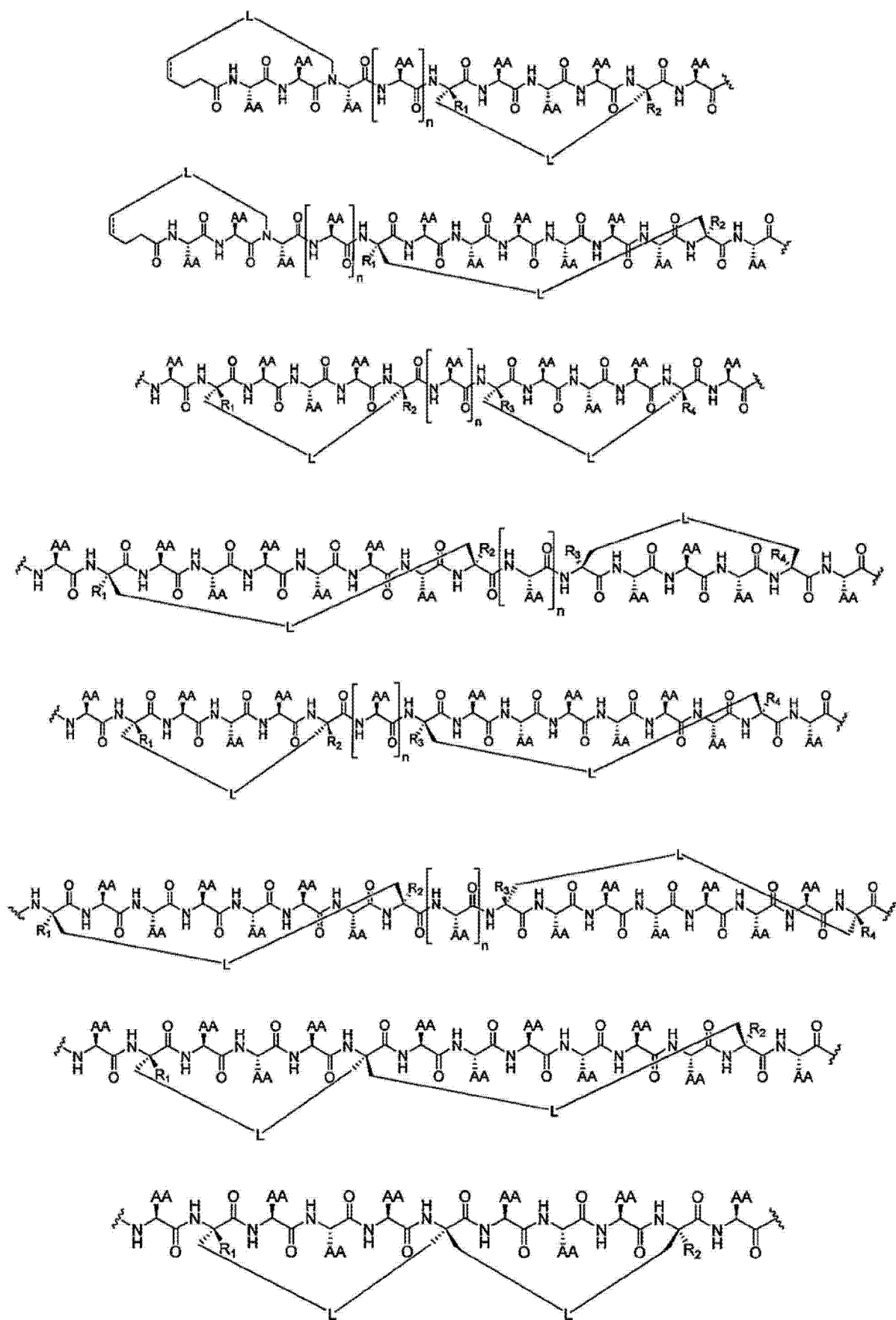
在相关的实施方案中，该拟肽大环化合物为：

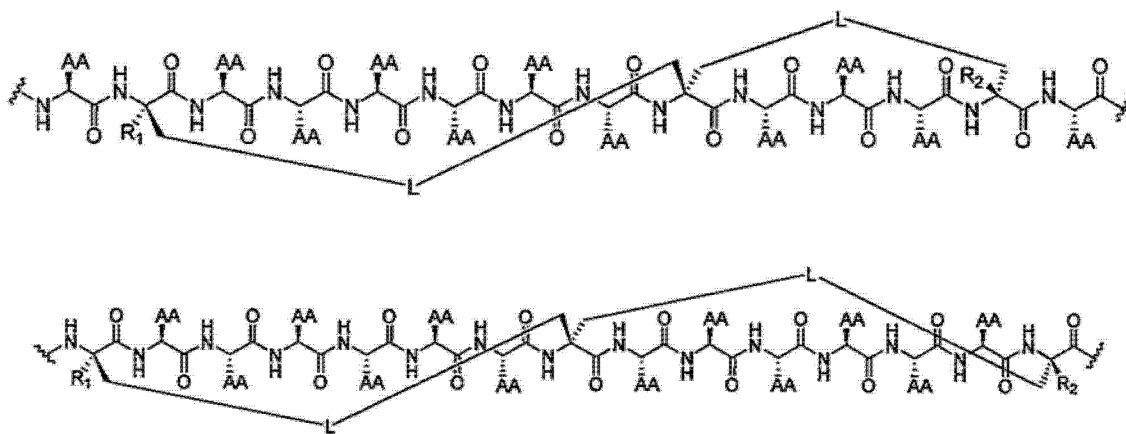


其中各个 R_1' 和 R_2' 独立地为氨基酸。

在其它实施方案中，该拟肽大环化合物是以下所示通式中的任一个的化合物：

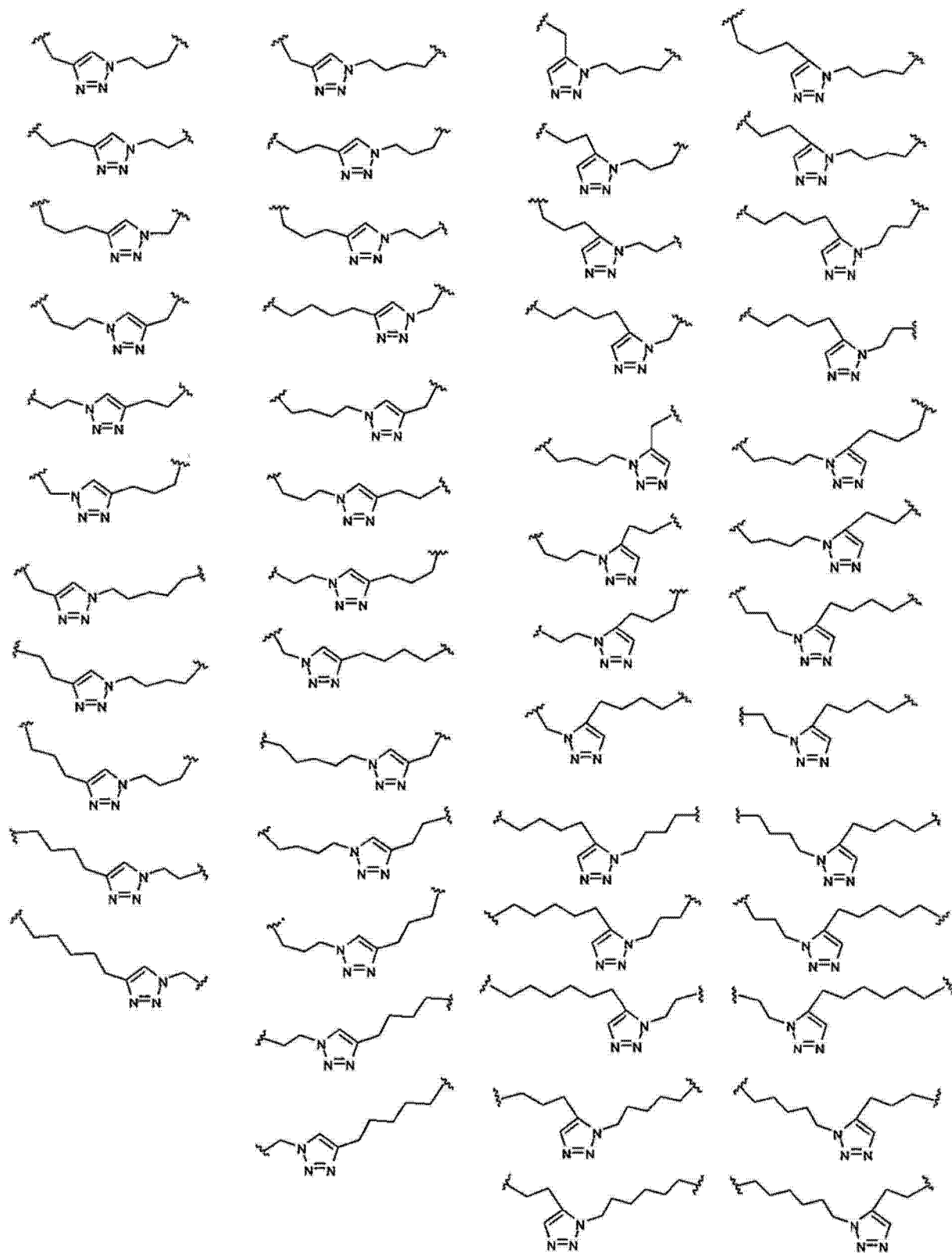


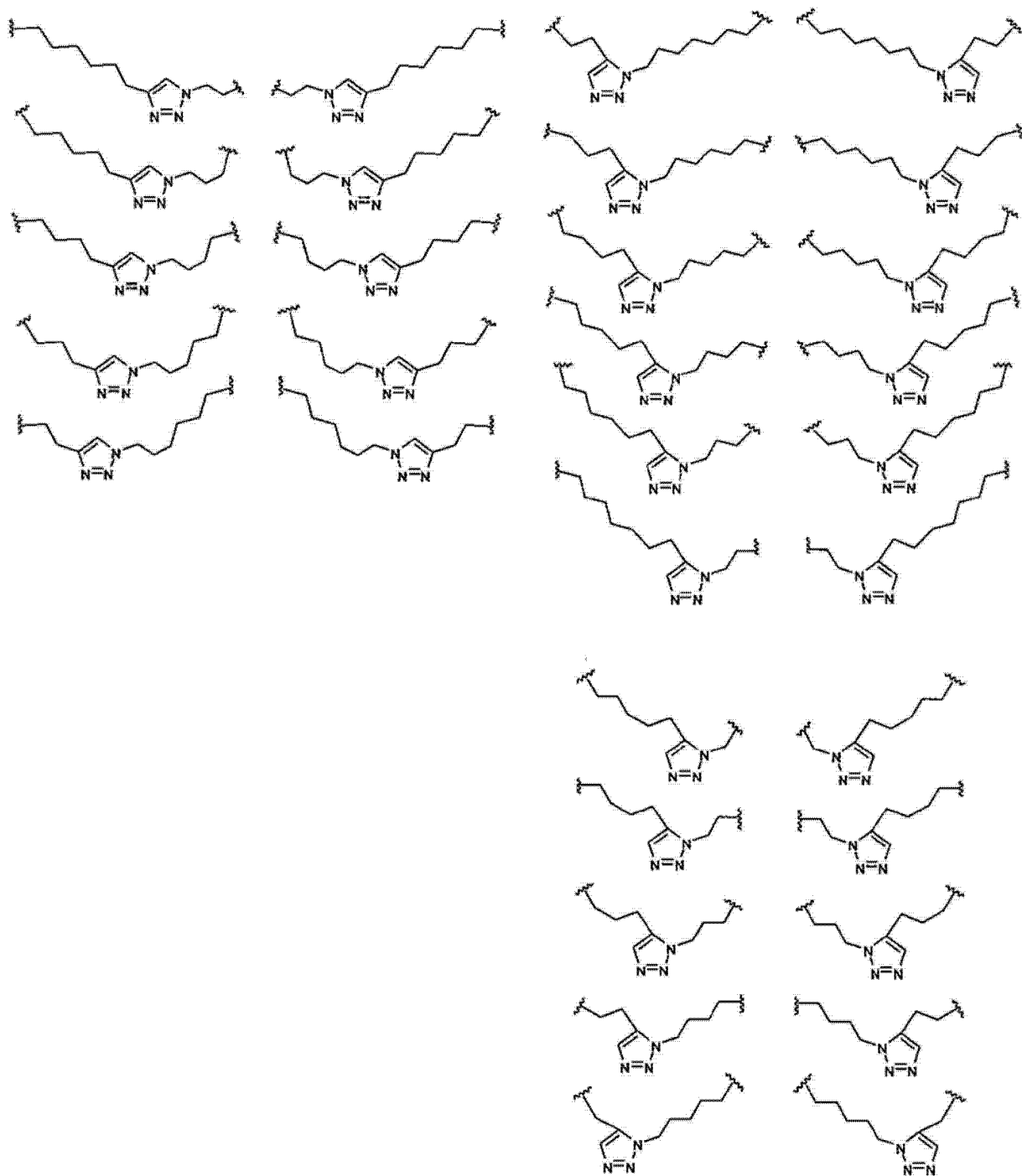


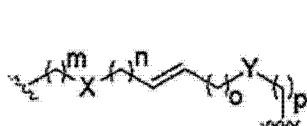


其中“AA”表示任何天然或非天然氨基酸侧链，且“ AA_n ”为如上定义的 $[\text{D}]_v$ 、 $[\text{E}]_w$ ，且 n 为 0 至 20、50、100、200、300、400 或 500 的整数。在一些实施方案中， n 为 0。在其它实施方案中， n 小于 50。

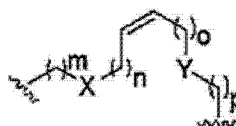
用于式 I 的拟肽大环化合物的大环形成连接体 L 的示例性实施方案如下所示。



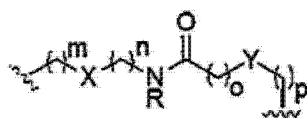




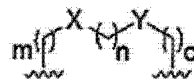
其中 $X, Y = S$
 $m, n, o, p = 0-10$



其中 $X, Y = S$
 $m, n, o, p = 0-10$



其中 $X, Y = S$
 $m, n, o, p = 0-10$
 $R = H, \text{烷基}, \text{其它取代基}$



其中 $X, Y = S$
 $m, n, o = 0-10$

在其它实施方案中,为了促进细胞摄取,进一步修饰式 I 或 II 化合物中的 D 和 / 或 E。在一些实施方案中,将拟肽大环化合物脂质化 (lipidating) 或 PEG 化有利于细胞摄取、提高生物利用度、增强血液循环、改变药代动力学、降低免疫原性和 / 或降低所需的给药频率。

在其它实施方案中,式 I 或 II 化合物中的 [D] 和 [E] 中的至少一个代表包含另外的大环形成连接体的部分,使得该拟肽大环化合物包含至少两个大环形成连接体。在特定实施方案中,拟肽大环化合物包含两个大环形成连接体。在一个实施方案中, u 为 2。

在一些实施方案中,本文所述的任何大环形成连接体可以与表 4、4a、4b、6 和 6a 中所示的任何序列任意组合使用,也可以与本文所述的任何 R- 取代基任意组合使用。

在一些实施方案中,拟肽大环化合物包含至少一个 α -螺旋基序。例如,式 I 或 II 化合物中的 A、B 和 / 或 C 包含一个或多个 α -螺旋。一般来说, α -螺旋每圈包含 3 至 4 个氨基酸残基。在一些实施方案中,拟肽大环化合物的 α -螺旋包括 1 至 5 圈,因此包含 3 至 20 个氨基酸残基。在特定实施方案中, α -螺旋包括 1 圈、2 圈、3 圈、4 圈或 5 圈。在一些实施方案中,大环形成连接体稳定化在拟肽大环化合物内包含的 α -螺旋基序。因此,在一些实施方案中,选择大环形成连接体 L 从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 的长度,以提高 α -螺旋的稳定性。在一些实施方案中,大环形成连接体跨越 α -螺旋的 1 圈至 5 圈。在一些实施方案中,大环形成连接体跨越 α -螺旋的大约 1 圈、2 圈、3 圈、4 圈或 5 圈。在一些实施方案中,大环形成连接体的长度为每圈 α -螺旋大约 $5 \text{ \AA}$ 至 $9 \text{ \AA}$,或每圈 α -螺旋大约 $6 \text{ \AA}$ 至 $8 \text{ \AA}$ 。当大环形成连接体跨越大约 1 圈 α -螺旋时,长度等于大约 5 个碳-碳键至 13 个碳-碳键,大约 7 个碳-碳键至 11 个碳-碳键,或大约 9 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 2 圈 α -螺旋时,长度等于大约 8 个碳-碳键至 16 个碳-碳键,大约 10 个碳-碳键至 14 个碳-碳键,或大约 12 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 3 圈 α -螺旋时,长度等于大约 14 个碳-碳键至 22 个碳-碳键,大约 16 个碳-碳键至 20 个碳-碳键,或大约 18 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 4 圈 α -螺旋时,长度等于大约 20 个碳-碳键至 28 个碳-碳键,大约 22 个碳-碳键至 26 个碳-碳键,或大约 24 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 5 圈 α -螺旋时,长度等于大约 26 个碳-碳键至 34 个碳-碳键,大约 28 个碳-碳键至 32 个碳-碳键,或大约 30 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 1 圈 α -螺旋时,连

接含有大约 4 个原子至 12 个原子,大约 6 个原子至 10 个原子,或大约 8 个原子。当大环形成连接体跨越大约 2 圈 α -螺旋时,连接含有大约 7 个原子至 15 个原子,大约 9 个原子至 13 个原子,或大约 11 个原子。当大环形成连接体跨越大约 3 圈 α -螺旋时,连接含有大约 13 个原子至 21 个原子,大约 15 个原子至 19 个原子,或大约 17 个原子。当大环形成连接体跨越大约 4 圈 α -螺旋时,连接含有大约 19 个原子至 27 个原子,大约 21 个原子至 25 个原子,或大约 23 个原子。当大环形成连接体跨越大约 5 圈 α -螺旋时,连接含有大约 25 个原子至 33 个原子,大约 27 个原子至 31 个原子,或大约 29 个原子。当大环形成连接体跨越大约 1 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 17 元至 25 元、大约 19 元至 23 元或大约 21 元的环。当大环形成连接体跨越大约 2 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 29 元至 37 元、大约 31 元至 35 元或大约 33 元的环。当大环形成连接体跨越大约 3 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 44 元至 52 元、大约 46 元至 50 元或大约 48 元的环。当大环形成连接体跨越大约 4 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 59 元至 67 元、大约 61 元至 65 元或大约 63 元的环。当大环形成连接体跨越大约 5 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 74 元至 82 元、大约 76 元至 80 元或大约 78 元的环。

除非另外说明,任何化合物(包括拟肽大环化合物、大环化合物前体和其它组合物)也意在包括仅是在是否存在一个或多个同位素富集的原子方面不同的化合物。例如,本文涉及除了用氘或氚替代氢或者用 ^{13}C - 或 ^{14}C - 富集的碳替代碳以外具有所述结构的化合物。

在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的对 MDM2 或 MDMX 的结合亲和力。在其它情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有降低的 MDMX 结合亲和力与 MDM2 结合亲和力之比。在另外其它的情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤细胞系的体外抗肿瘤效力。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物在 p53 阳性肿瘤细胞系中显示出改善的体外凋亡诱导。在其它情况下,权利要求 1 的拟肽大环化合物,其中该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤细胞系与针对 p53 阴性或突变肿瘤细胞系的体外抗肿瘤效力比。在另外其它的情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的针对 p53 阳性肿瘤的体内抗肿瘤效力。在另外其它的情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物在 p53 阳性肿瘤中具有改善的体内凋亡诱导。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的细胞透性。在其它情况下,该拟肽大环化合物相对于其中 w 为 0、1 或 2 的对应拟肽大环化合物具有改善的溶解度。

在一些实施方案中, Xaa_5 为 Glu 或其氨基酸类似物。在一些实施方案中, Xaa_5 为 Glu 或其氨基酸类似物,并且其中该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa_5 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的性质,如改善的结合亲和力、改善的溶解度、改善的细胞效力、改善的细胞透性、改善的体内或体外抗肿瘤效力,或改善的凋亡诱导。

在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa_5 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的对 MDM2 或 MDMX 的结合亲和力。在其它实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa_5 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有降低的 MDMX 结合亲和力与 MDM2 结合亲和力

之比。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的溶解度,或者该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的细胞效力。

在一些实施方案中,Xaa₅ 为 Glu 或其氨基酸类似物,并且其中该拟肽大环化合物相对于其中 Xaa₅ 为 Ala 的对应拟肽大环化合物具有改善的生物活性,如改善的结合亲和力、改善的溶解度、改善的细胞效力、改善的螺旋度、改善的细胞透性、改善的体内或体外抗肿瘤效力,或改善的凋亡诱导。

在一个实施方案中,本文公开的化合物可以在构成此类化合物的一个或多个原子处含有非自然比例的原子同位素。例如,该化合物可以用诸如例如氚 (³H)、碘 -125 (¹²⁵I) 或碳 -14 (¹⁴C) 的放射性同位素进行放射性标记。在另一个实施方案中,本文公开的化合物可以有一个或多个碳原子被硅原子替代。本文涉及本文公开的化合物的所有同位素变化,无论是放射性的还是非放射性的。

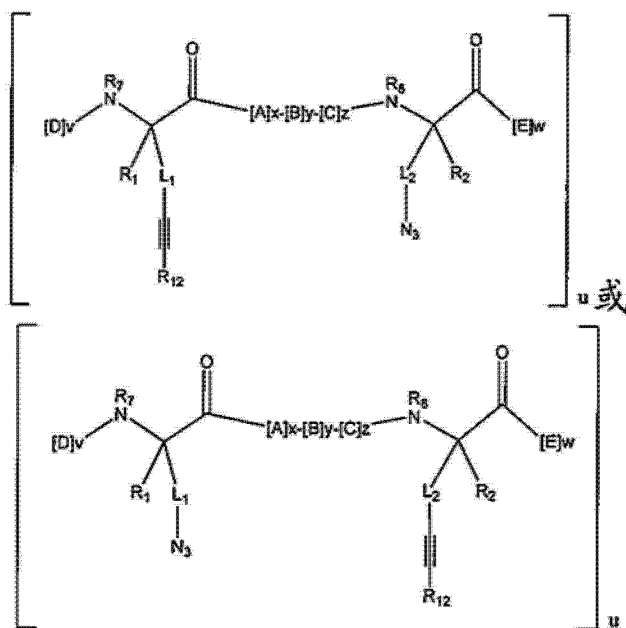
拟肽大环化合物的制备

式 I 和 II 的拟肽大环化合物可以通过本领域已知的众多方法中的任意方法来制备。例如,具有在表 4、表 4a 或表 4b 中由“\$4rn6”或“\$4a5”表示的残基的式 I 拟肽大环化合物可以被替换为能够与同一分子中的第二残基形成交联体的残基或这样的残基的前体。

在一些实施方案中,这些拟肽大环化合物的合成涉及多步骤的过程,该过程的特征在于:合成含有叠氮部分和炔部分的拟肽前体;然后将该拟肽前体与大环化试剂接触以产生三唑连接的拟肽大环化合物。这样的方法例如在 2008 年 2 月 25 日提交的美国申请 12/037,041 中描述。大环化合物或大环化合物前体例如通过溶液相或固相方法合成,并且可以包含天然存在的和非天然存在的氨基酸两者。参见,例如,Hunt, " The Non-Protein Amino Acids", 于 Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, G. C. Barrett 编著, Chapman and Hall, 1985。

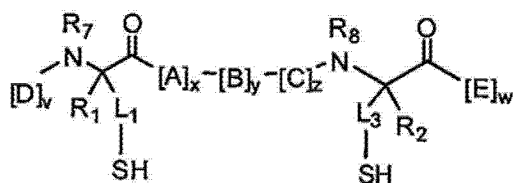
在式 I 的大环化合物的一些实施方案中,叠氮部分连接到残基的 α-碳上,炔连接到另一个残基的 α-碳上。在一些实施方案中,叠氮部分是氨基酸 L-赖氨酸、D-赖氨酸、α-甲基-L-赖氨酸、α-甲基-D-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-鸟氨酸、α-甲基-L-鸟氨酸或 α-甲基-D-鸟氨酸的叠氮基类似物。在另一个实施方案中,炔部分是 L-炔丙基甘氨酸。在另外其它的实施方案中,炔部分是选自下组的氨基酸:L-炔丙基甘氨酸、D-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸和 (R)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸。

在一些实施方案中,本文提供一种合成式 I 的拟肽大环化合物的方法,该方法包括将下式的拟肽前体与大环化试剂接触的步骤:



其中, v 、 w 、 x 、 y 、 z 、 A 、 B 、 C 、 D 、 E 、 R_1 、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 L_1 和 L_2 如以上所定义;当大环化试剂是 Cu 试剂时, R_{12} 为 $-H$, 当大环化试剂是 Ru 试剂时, R_{12} 为 $-H$ 或烷基;并且进一步地, 其中所述接触步骤导致在前体中的炔部分和叠氮部分之间形成共价连接。例如, 当大环化试剂是 Ru 试剂时, R_{12} 可以是甲基。

在一些实施方案中, 本文提供一种合成式 II 的拟肽大环化合物的方法, 该方法包括将下式的拟肽前体与式 $X-L_2-Y$ 的化合物接触的步骤:



其中, v 、 w 、 x 、 y 、 z 、 A 、 B 、 C 、 D 、 E 、 R_1 、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 L_1 和 L_2 如针对式 II 化合物所定义;并且 X 和 Y 各自独立地为能够与巯基反应的反应基团;

并且进一步地, 其中所述接触步骤导致在式 III 中的两个巯基之间形成共价连接。

在本文公开的拟肽大环化合物中, R_1 和 R_2 中的至少一个为烷基、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。在一些实施方案中, R_1 和 R_2 均独立地为烷基、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。在一些实施方案中, A 、 B 、 C 、 D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个实例中, B 为 α , α -二取代的氨基酸。例如, A 、 B 、 C 、 D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。

例如, R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素取代的烷基。在另一个实例中, R_1 和 R_2 均独立地为未取代的或被卤素取代的烷基。在一些实施方案中, R_1 和 R_2 中的至少一个为甲基。在其它实施方案中, R_1 和 R_2 为甲基。大环化试剂可以为 Cu 试剂或 Ru 试剂。

在某些实施方案中, 拟肽前体在接触步骤之前纯化。在其它实施方案中, 拟肽大环化合物在接触步骤之后纯化。在另外其它的实施方案中, 拟肽大环化合物在接触步骤之后重折叠。该方法可以在溶液中进行, 或者, 可选择地, 该方法可以在固体载体上进行。

本文还设想在结合拟肽前体或拟肽大环化合物的靶大分子的存在下,在有利于所述结合的条件下进行本文公开的方法。在某些实施方案中,在优先结合拟肽前体或拟肽大环化合物的靶大分子的存在下,在有利于所述结合的条件下进行本发明的方法。该方法也可应用于合成拟肽大环化合物的文库。

在一些实施方案中,用于制备式 I 化合物的拟肽前体的炔部分是选自下组的氨基酸的侧链:L-炔丙基甘氨酸、D-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸和(R)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸。在其它实施方案中,用于制备式 I 化合物的拟肽前体的叠氮部分是选自下组的氨基酸的侧链: ϵ -叠氮基-L-赖氨酸、 ϵ -叠氮基-D-赖氨酸、 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸、 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸、 δ -叠氮基- α -甲基-L-鸟氨酸和 δ -叠氮基- α -甲基-D-鸟氨酸。

在一些实施方案中,用于制备式 II 化合物的拟肽前体的巯基是氨基酸的侧链,该氨基酸选自:L-半胱氨酸、D-半胱氨酸、L-N-甲基半胱氨酸、D-N-甲基半胱氨酸、L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-N-甲基高半胱氨酸、D-N-甲基高半胱氨酸、 α -甲基-L-半胱氨酸、 α -甲基-D-半胱氨酸、 α -甲基-L-高半胱氨酸、 α -甲基-D-高半胱氨酸、L-青霉胺、D-青霉胺、L-N-甲基青霉胺、D-N-甲基青霉胺和所有针对液相或固相肽合成适当保护的形式。

在一些实施方案中, $x+y+z$ 为 3,并且 A、B 和 C 独立地是天然或非天然氨基酸。在其它实施方案中, $x+y+z$ 为 6,且 A、B 和 C 独立地是天然或非天然氨基酸。

在一些实施方案中,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 H_2O 、THF、THF/ H_2O 、tBuOH/ H_2O 、DMF、DIPEA、 CH_3CN 或 CH_2Cl_2 、 $ClCH_2CH_2Cl$ 或其混合物。溶剂可以是有利于螺旋形成的溶剂。

将备选的但等效的保护基团、离去基团或试剂替换,并按照替代的序列或顺序进行特定的合成步骤,以产生希望的化合物。用于合成本文所述的化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和脱保护)包括,例如,如以下文献中所述的方法:Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers(1989);Greene 和 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis,第 2 版, John Wiley and Sons(1991);Fieser 和 Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1994);和 Paquette 编著, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1995) 及其后续版本。

本文公开的拟肽大环化合物例如通过化学合成方法制备,如 Fields 等人, Synthetic Peptides: A User's Guide 中的第 3 章, Grant, W. H. 编著, Freeman & Co., New York, N. Y., 1992, 第 77 页中所述的方法。因此,例如,采用具有被 tBoc 或 Fmoc 化学部分保护的胺的自动化 Merrifield 固相合成技术,在例如自动化肽合成仪(例如, Applied Biosystems (Foster City, CA), 430A、431 或 433 型)上使用侧链保护的氨基酸合成肽。

一种产生本文所述的拟肽前体和拟肽大环化合物的方式使用固相肽合成法(SPPS)。将 C-末端氨基酸经由与连接体分子的酸不稳定的键连接到交联的聚苯乙烯树脂上。这种树脂

不溶于用于合成的溶剂,从而使得洗去过量的试剂和副产物相对简单和快速。N-末端用在酸中稳定、但可用碱去除的 Fmoc 基团保护。必要时,用碱稳定的、酸不稳定的基团保护侧链官能团。

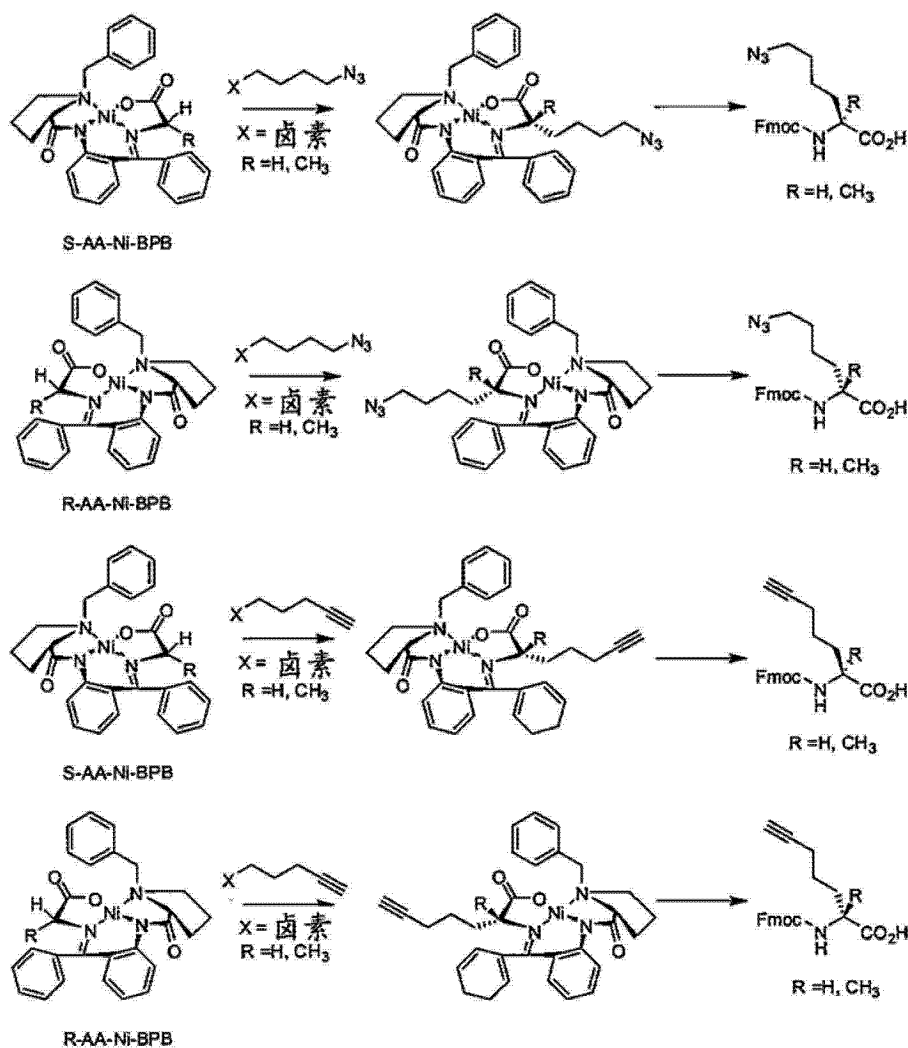
例如,通过使用天然的化学连接结合单个的合成肽来产生较长的拟肽前体。或者,通过公知的重组 DNA 和蛋白质表达技术生物合成较长的合成肽。这些技术在公知的标准手册中提供了详细方案。为了构建编码本文公开的拟肽前体的基因,逆向翻译氨基酸序列以获得编码该氨基酸序列的核酸序列,优选地使用对于将表达该基因的生物体为最佳的密码子。然后,通常通过合成编码该肽的寡核苷酸和在必要时合成任何调节元件来制备合成的基因。将合成的基因插入合适的克隆载体中,并转染到宿主细胞内。然后在适合选择的表达系统和宿主的合适条件下表达该肽。通过标准方法纯化并表征该肽。

例如,使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)以高通量的组合方式制备拟肽前体。

提供以下合成方案只是为了说明本发明,而并非意在限制如本文所述的本发明的范围。

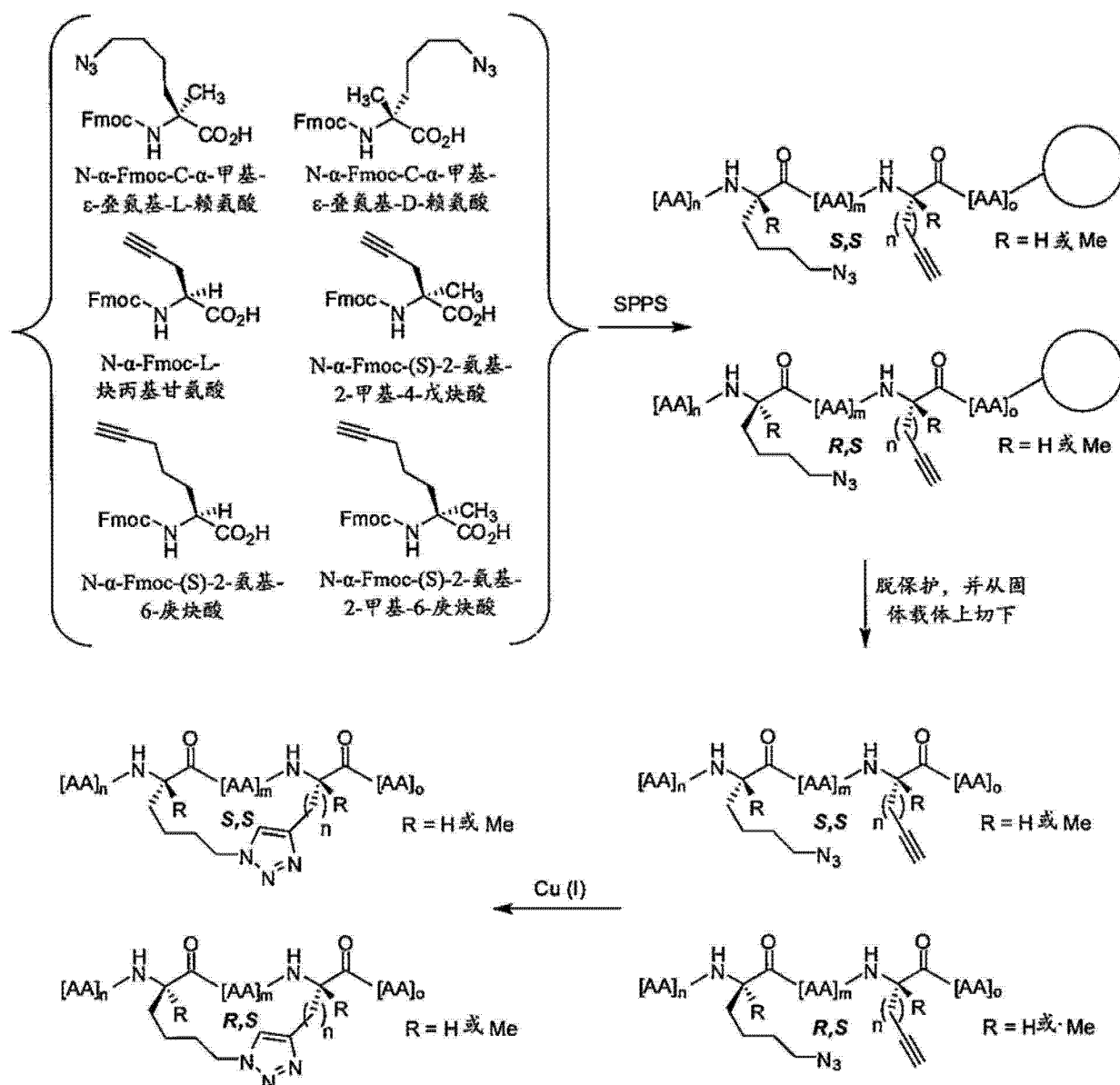
合成方案 1-5 描述了式 I 的拟肽大环化合物的制备。为了简化图片,说明性的方案显示了叠氮基氨基酸类似物 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸和 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸,以及炔基氨基酸类似物 L-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸和 (S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸。因此,在下面的合成方案中, R_1 、 R_2 、 R_7 和 R_8 各自为 -H; 各个 L_1 为 $-(CH_2)_4-$; 且各个 L_2 为 $-(CH_2)-$ 。但是,如以上整个发明详述部分所指出的,可以采用许多其它的氨基酸类似物,其中 R_1 、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 L_1 和 L_2 可以独立地选自本文公开的各种结构。

合成方案 1:



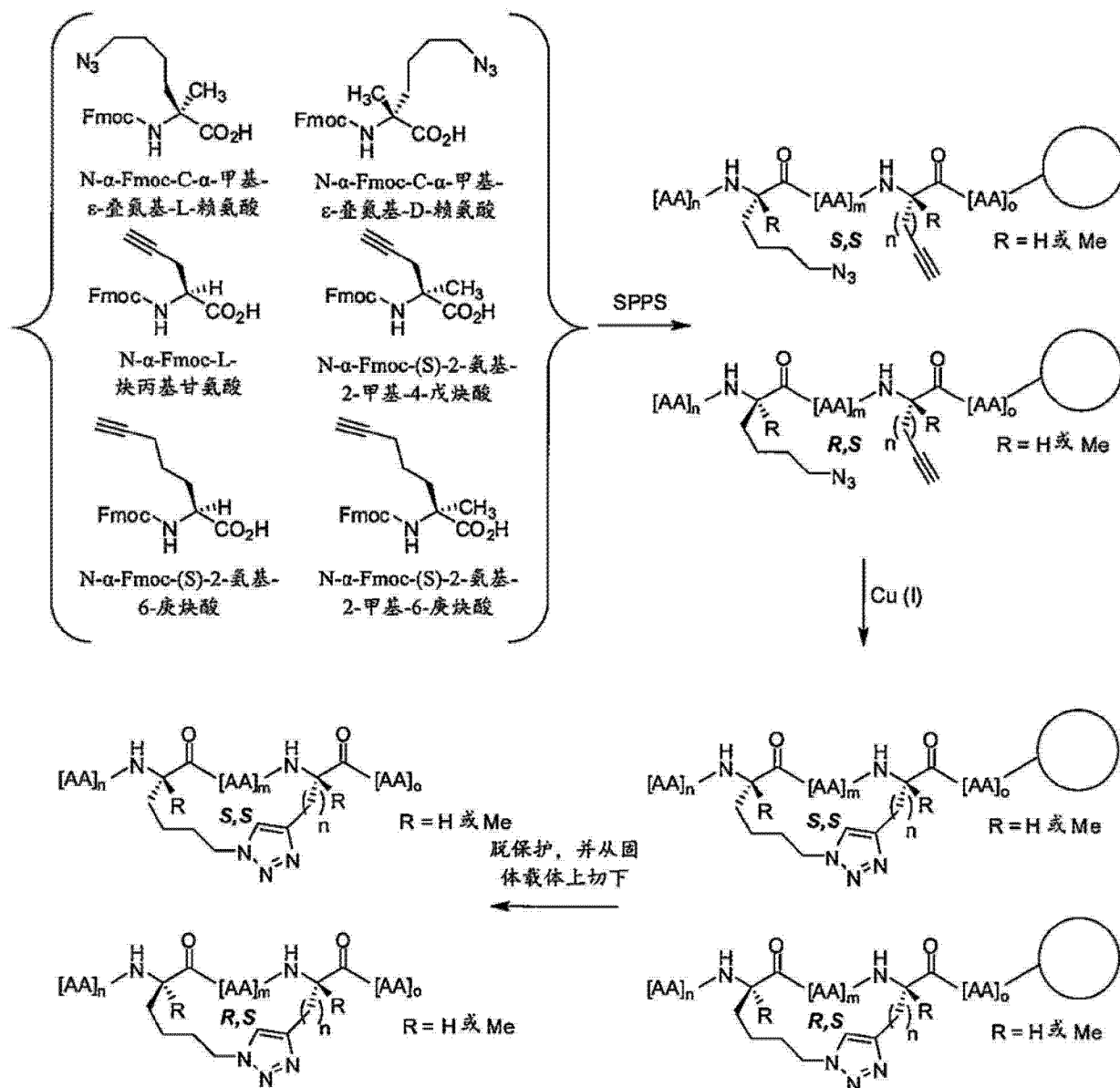
合成方案1描述了可用于制备本文公开的式I化合物的几种化合物的制备。如Belokon等人(1998), *Tetrahedron Asymm.* 9:4249-4252所述制备由手性辅剂(S)-2-[N-(N'-苄基脯氨酰)氨基]苯甲酮(BPB)衍生的席夫碱和诸如甘氨酸或丙氨酸的氨基酸的Ni(II)络合物。产生的络合物随后与包含叠氮部分或炔部分的烷基化试剂反应,以产生对映体富集的本文公开的化合物。如需要,可以对产生的化合物进行保护以用于肽合成。

合成方案2:



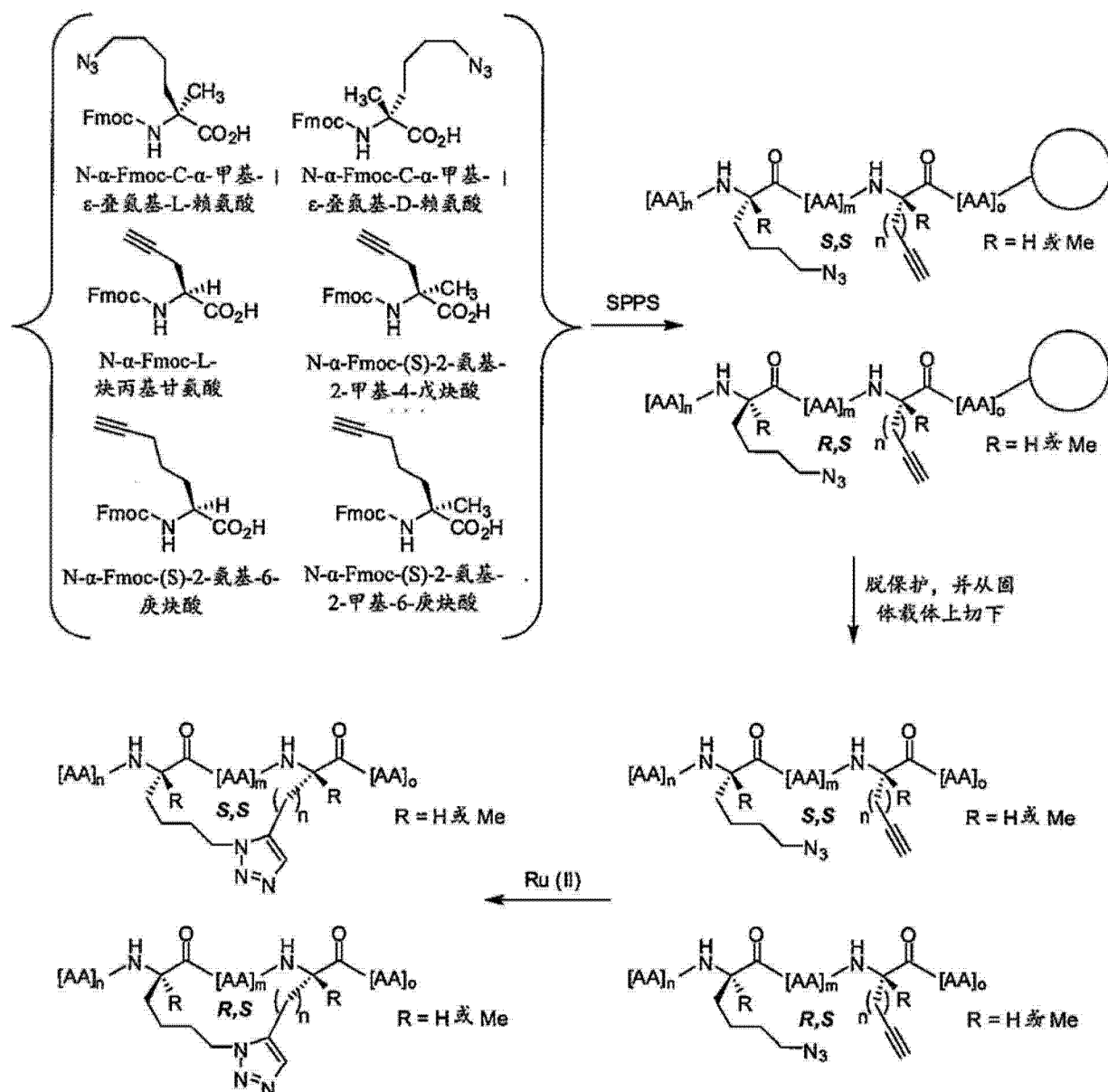
在如合成方案2所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中,拟肽前体包含叠氮部分和炔部分,并且通过溶液相或固相肽合成法(SPPS),使用可商购的氨基酸N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸以及氨基酸(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的N- α -Fmoc保护的形式合成。然后通过标准条件(例如,强酸如95% TFA)将拟肽前体脱保护并从固相树脂上切下。拟肽前体作为粗制混合物进行反应,或者在与大环化试剂如Cu(I)在有机溶液或水性溶液中反应之前进行纯化(Rostovtsev等人(2002), Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599;Torneo等人(2002), J. Org. Chem. 67:3057-3064;Deiters等人(2003), J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783;Punna等人(2005), Angew. Chem. Int. Ed. 44:2215-2220)。在一个实施方案中,在有利于 α -螺旋形成的条件下进行三唑形成反应。在一个实施方案中,在选自H₂O、THF、CH₃CN、DMF、DIPEA、tBuOH或其混合物的溶剂中进行大环化步骤。在另一个实施方案中,在DMF中进行大环化步骤。在一些实施方案中,在经缓冲的水性溶剂或部分水性溶剂中进行大环化步骤。

合成方案3:



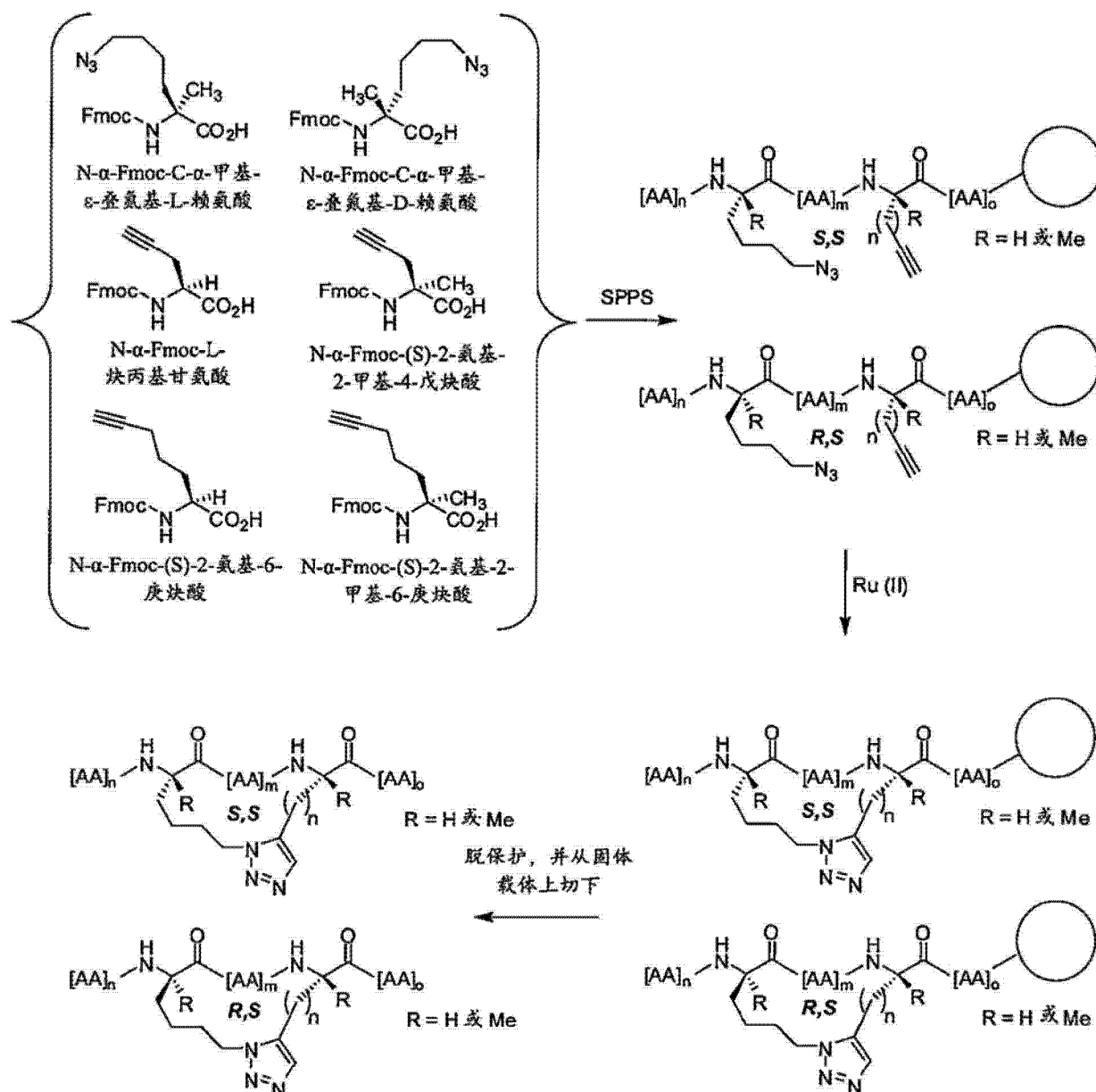
在如合成方案 3 所示的用于合成式 I 拟肽大环化合物的一般方法中,拟肽前体包含叠氮部分和炔部分,并且通过固相肽合成法 (SPPS),使用可商购的氨基酸 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-L-炔丙基甘氨酸}$ 以及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-L-赖氨酸}$ 和 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-D-赖氨酸}$ 的 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc}$ 保护的形式合成。拟肽前体作为粗制混合物与大环化试剂如 Cu(I) 试剂在树脂上反应 (Rostovtsev 等人 (2002), Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; Tornøe 等人 (2002), J. Org. Chem. 67:3057-3064; Deiters 等人 (2003), J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783; Punna 等人 (2005), Angew. Chem. Int. Ed. 44:2215-2220)。然后通过标准条件 (例如,强酸如 95% TFA) 将得到的含三唑的拟肽大环化合物脱保护并从固相树脂上切下。在某些实施方案中,在选自 CH_2Cl_2 、 $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、DMF、THF、NMP、DIPEA、2,6-二甲基吡啶、吡啶、DMSO、 H_2O 或其混合物的溶剂中进行大环化步骤。在一些实施方案中,在经缓冲的水性溶剂或部分水性溶剂中进行大环化步骤。

合成方案 4:



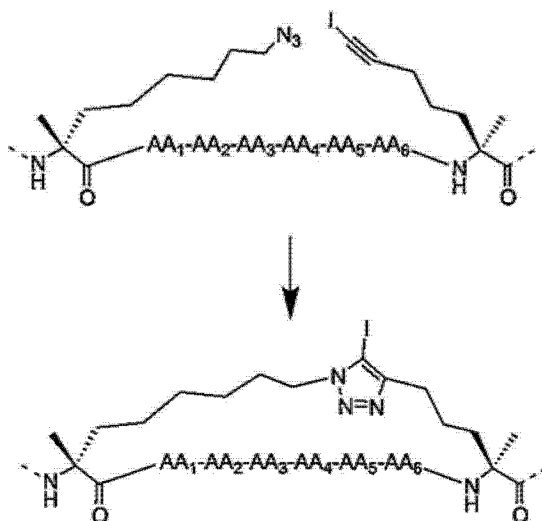
在如合成方案4所示的用于合成式I拟肽大环化合物的一般方法中,拟肽前体包含叠氮部分和炔部分,并且通过溶液相或固相肽合成法(SPPS),使用可商购的氨基酸N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸以及氨基酸(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的N- α -Fmoc保护的形式合成。然后通过标准条件(例如,强酸如95% TFA)将拟肽前体脱保护并从固相树脂上切下。拟肽前体作为粗制混合物进行反应,或者在与大环化试剂如Cu(II)试剂例如Cp*RuCl(PPh₃)₂或[Cp*RuCl]₄反应之前进行纯化(Rasmussen等人(2007), Org. Lett. 9:5337-5339; Zhang等人(2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999)。在一些实施方案中,在选自DMF、CH₃CN和THF的溶剂中进行大环化步骤。

合成方案5:

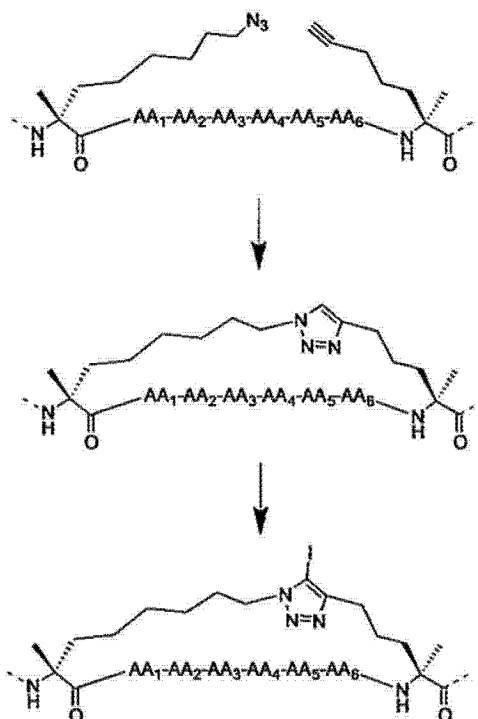


在合成方案5中所示的用于合成式I拟肽大环化合物的一般方法中,拟肽前体含有叠氮部分和炔部分,并且通过固相肽合成法(SPPS),使用可商购的氨基酸N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸以及氨基酸(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的N- α -Fmoc保护的形式进行合成。拟肽前体作为粗制混合物与大环化试剂如Ru(II)试剂在树脂上反应。例如,该试剂可以是 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 或 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen等人(2007), Org. Lett. 9:5337-5339; Zhang等人(2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999)。在一些实施方案中,在选自 CH_2Cl_2 、 $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 CH_3CN 、DMF和THF的溶剂中进行大环化步骤。

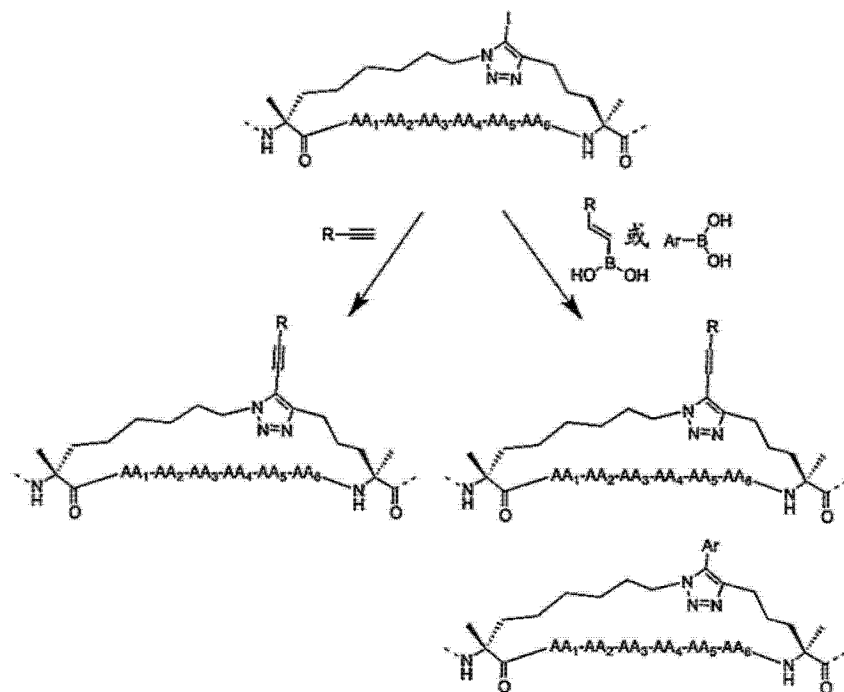
在一些实施方案中,式I的拟肽大环化合物在三唑部分上包含卤素基团取代,例如碘取代。此类拟肽大环化合物可由具有部分结构的前体并使用本文所教导的交联方法来制备。如本文所述的任何长度的交联剂可制备为包含此类取代。在一个实施方案中,拟肽大环化合物根据如下所示的方案制备。例如,在CuI和胺配体如TEA或TTTA的存在下进行反应。参见,例如Hein等人. Angew. Chem., Int. Ed. 2009, 48, 8018-8021。



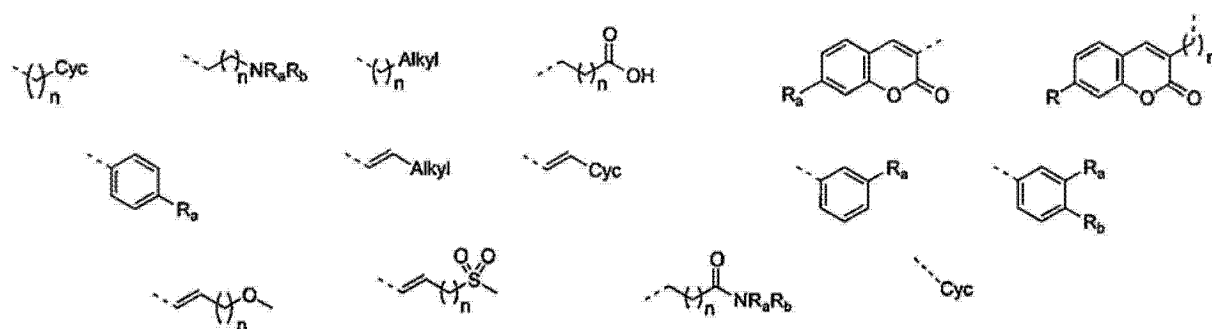
在其它实施方案中,根据以下所示的方案产生碘取代的三唑。例如,以下反应方案中的第二步骤例如使用 CuI 和 N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 在 THF 的存在下进行 (参见,例如, Zhang 等人, J. Org. Chem. 2008, 73, 3630-3633)。在其它实施方案中,以下所示的反应方案中的第二步骤例如使用 CuI 和碘化剂如 ICl 进行 (参见,例如, Wu 等人, Synthesis 2005, 1314-1318)。



在一些实施方案中,在交叉偶联反应,例如 Suzuki 或 Sonogashira 偶联中使用碘取代的三唑部分,以得到包含经取代的交联体的拟肽大环化合物。如下所示使用炔烃的 Sonogashira 偶联可例如在诸如 Pd(PPh₃)₂Cl₂ 的钯催化剂、CuI 的存在下以及诸如三乙胺的碱的存在下进行。如下所示使用芳基硼酸或经取代的烯基硼酸的 Suzuki 偶联可例如在诸如 Pd(PPh₃)₄ 的催化剂的存在下和诸如 K₂CO₃ 的碱的存在下进行。

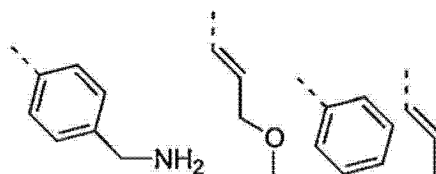


与碘取代的三唑反应的任何合适的三唑取代基均可在本文所述的 Suzuki 偶联中使用。用于 Suzuki 偶联的示例性的三唑取代基如下所示：

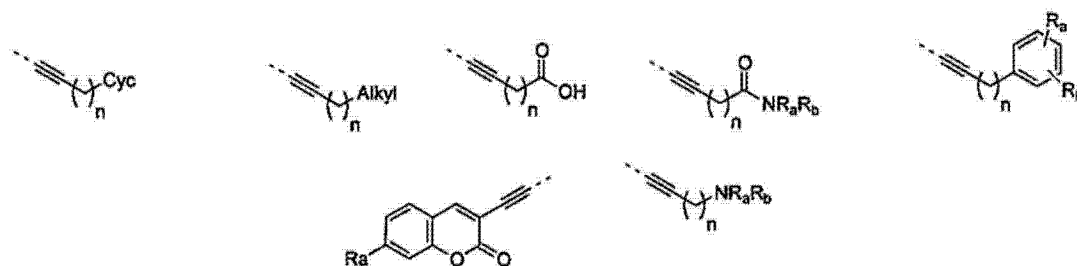


其中“Cyc”为合适的芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地被如下所述的 R_a 或 R_b 基团取代。

在一些实施方案中，所述取代基是：



与碘取代的三唑反应的任何合适的取代基均可在本文所述的 Sonogashira 偶联中使用。用于 Sonogashira 偶联的示例性的三唑取代基如下所示：

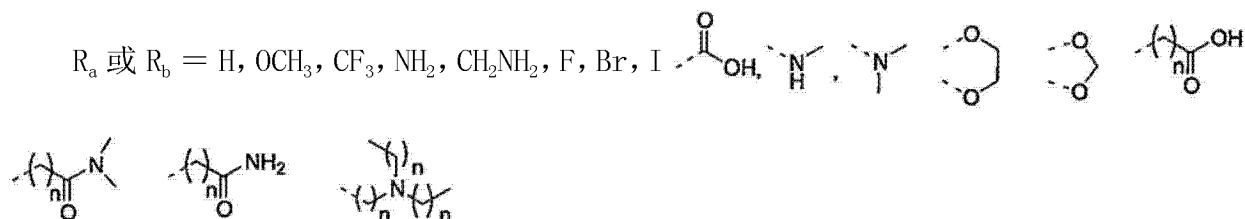


其中“Cyc”为合适的芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地被如下所述的 R_a 或 R_b 基团取代。

在一些实施方案中，所述三唑取代基为：



在一些实施方案中，以上所示的 Cyc 基团进一步被至少一个 R_a 或 R_b 取代基所取代。在一些实施方案中， R_a 和 R_b 中的至少一个独立地为：



在其它实施方案中，所述三唑取代基为 $-CH_2CH_2C(=O)NR_aR_b$ 且 R_a 和 R_b 中的至少一个为烷基

(包括氢、甲基或乙基)，或：



本发明涉及在本文所述的式 I 拟肽大环化合物的合成中使用非天然存在的氨基酸和氨基酸类似物。任何适合于用来合成稳定的含三唑拟肽大环化合物的合成方法的氨基酸或氨基酸类似物都可以用于本发明。例如，预计 L-炔丙基甘氨酸是本发明中有用的氨基酸。但是，含有不同氨基酸侧链的其它含炔的氨基酸也可用于本发明。例如，L-炔丙基甘氨酸在氨基酸的 α -碳和氨基酸侧链的炔之间含有一个亚甲基单元。本发明也涉及使用在 α -碳和炔之间具有多个亚甲基单元的氨基酸。另外，也预计氨基酸 L-赖氨酸、D-赖氨酸、 α -甲基-L-赖氨酸和 α -甲基-D-赖氨酸的叠氮类似物是本发明的有用的氨基酸。但是，含有不同的氨基酸侧链的其它末端叠氮氨基酸也可以用于本发明。例如，L-赖氨酸的叠氮类似物在氨基酸的 α -碳和氨基酸侧链的末端叠氮基之间含有 4 个亚甲基单元。本发明也涉及使用在 α -碳和末端叠氮基之间具有少于或多于 4 个亚甲基单元的氨基酸。以下表 1 显示了一些可用于制备本文公开的拟肽大环化合物的氨基酸。

表 1

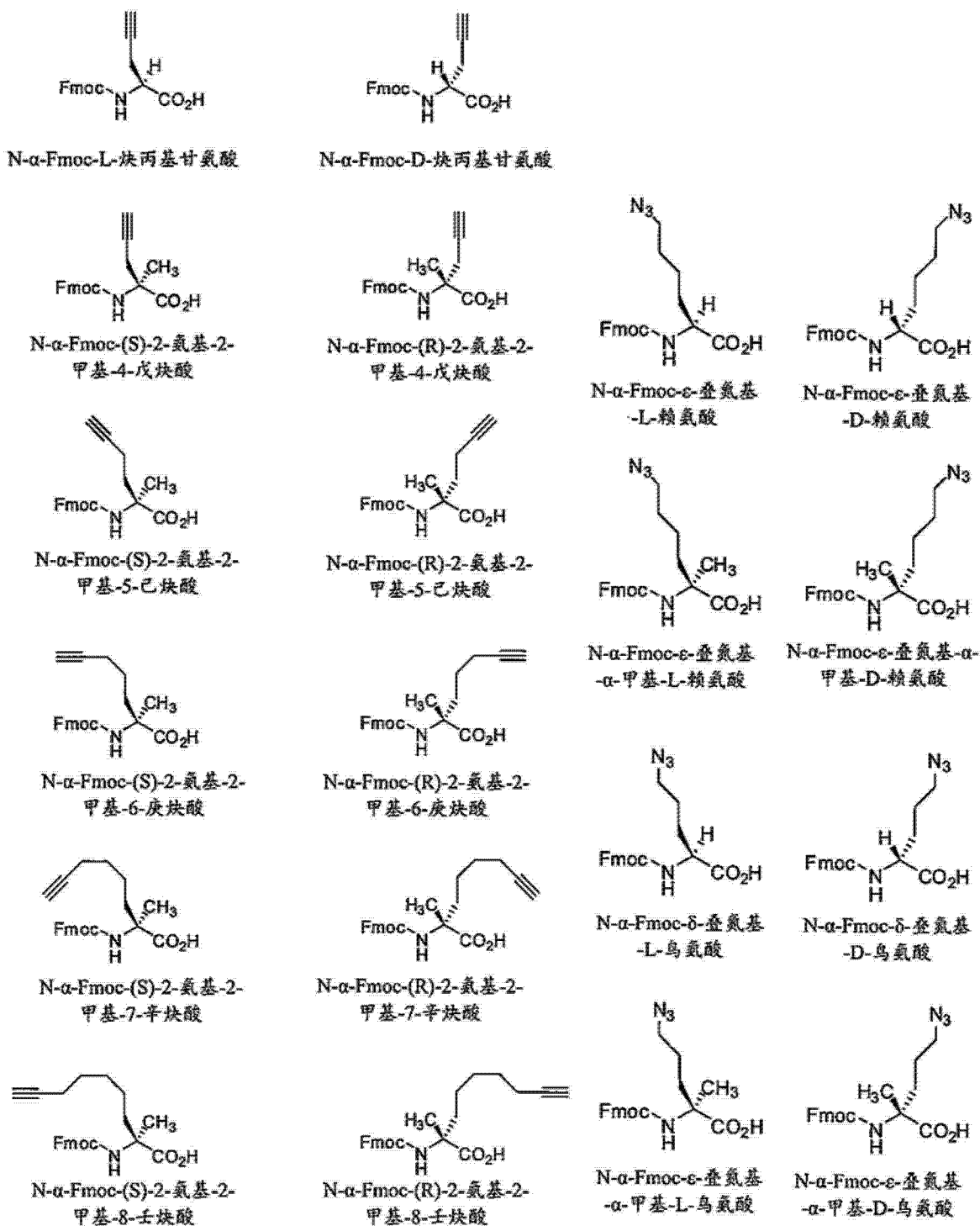
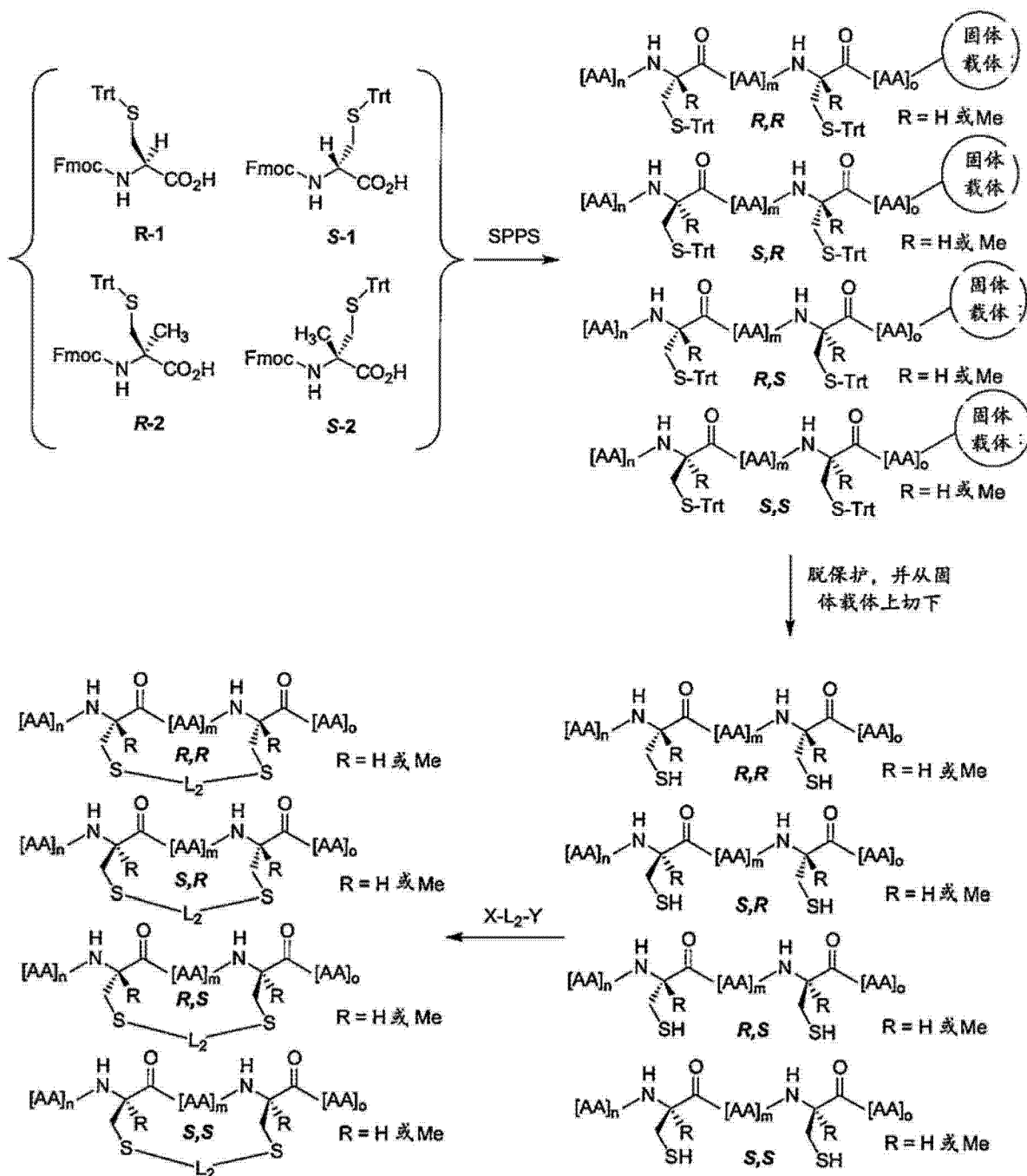


表 1 显示用于制备本文公开的拟肽大环化合物的示例性氨基酸。

在一些实施方案中,氨基酸和氨基酸类似物是 D- 构型。在其它实施方案中,它们是 L- 构型。在某些实施方案中,拟肽中包含的某些氨基酸和氨基酸类似物是 D- 构型,而某些氨基酸和氨基酸类似物是 L- 构型。在一些实施方案中,氨基酸类似物是 α , α -二取代的,如 α -甲基-L-炔丙基甘氨酸、 α -甲基-D-炔丙基甘氨酸、 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸和 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸。在一些实施方案中,氨基酸类似物是 N-烷基化的,例如, N-甲基-L-炔丙基甘氨酸、N-甲基-D-炔丙基甘氨酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸。

式 II 的大环化合物的制备例如在 2007 年 12 月 17 日提交的美国申请 11/957, 325 中有描述, 该申请通过引用并入本文。合成方案 6-9 描述了这类式 II 化合物的制备。为了简化图片, 该说明性的方案显示了由 L- 或 D- 半胱氨酸衍生的氨基酸类似物, 其中 L_1 和 L_3 都是 $-(CH_2)-$ 。但是, 如以上整个发明详述部分所指出的, 可以采用许多其它的氨基酸类似物, 其中 L_1 和 L_3 可以独立地选自本文公开的各种结构。符号“ $[AA]_m$ ”、“ $[AA]_n$ ”、“ $[AA]_o$ ”表示酰胺键连接的部分如天然或非天然氨基酸的序列。如前面所述, 每个出现的“AA”与任何其它出现的“AA”无关, 而且诸如“ $[AA]_m$ ”的通式包括, 例如, 不相同氨基酸的序列以及相同氨基酸的序列。

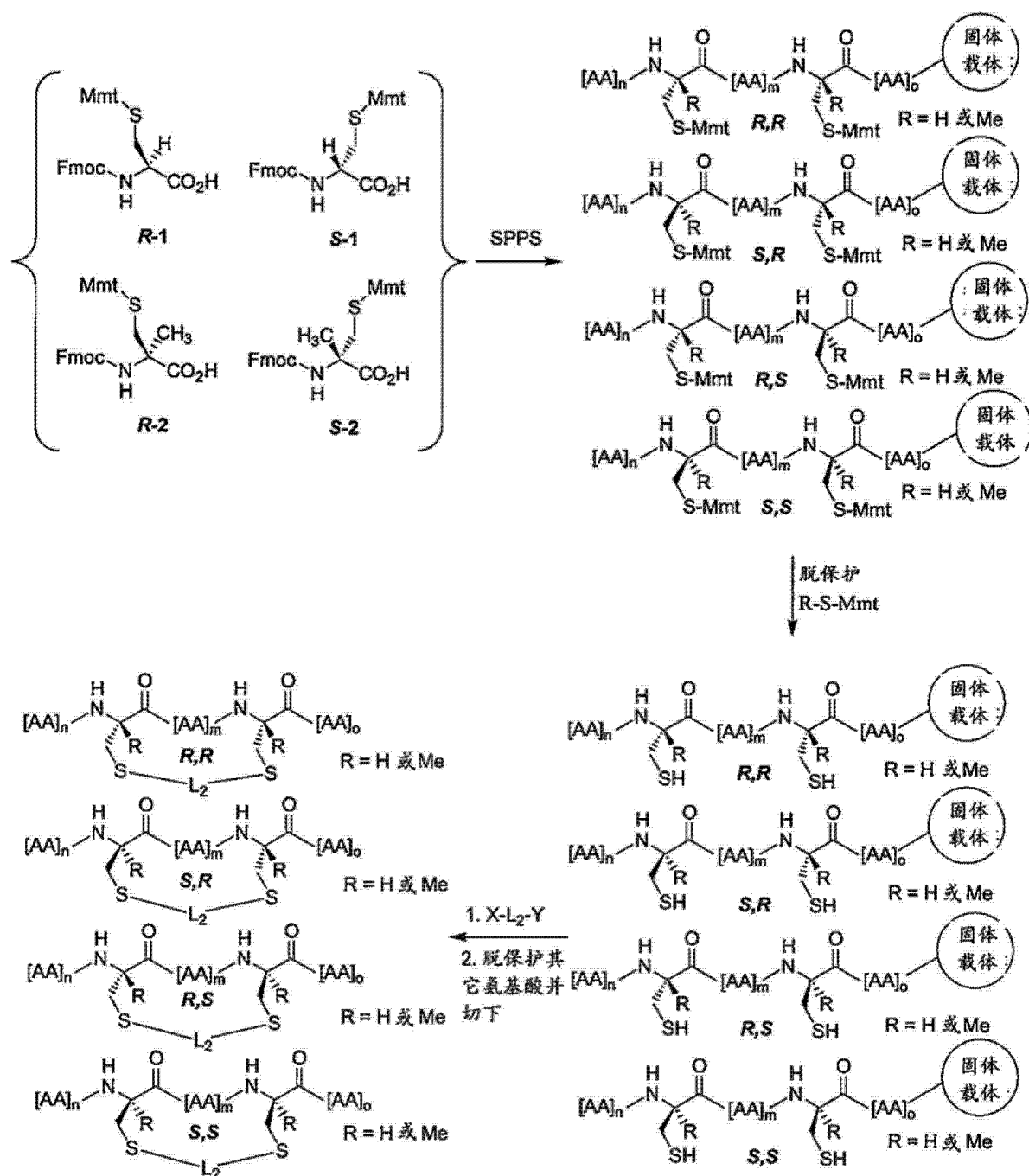
合成方案 6:



在方案 6 中, 拟肽前体含有 2 个 -SH 部分, 而且使用可商购的 N- α -Fmoc 氨基酸

如 N- α -Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸或 N- α -Fmoc-S-三苯甲基-D-半胱氨酸通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成。通过已知方法 (Seebach 等人 (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 :2708-2748 以及其中的参考文献) 产生 D-半胱氨酸或 L-半胱氨酸的 α -甲基化形式, 然后通过已知方法 (" Bioorganic Chemistry:Peptides and Proteins", Oxford University Press, New York :1998, 本文通过引用引入其完整内容) 将其转化为适当保护的 N- α -Fmoc-S-三苯甲基单体。接着通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 对前体拟肽脱保护并从固相树脂上切下。前体拟肽作为粗制混合物进行反应, 或者在有机溶液或水性溶液中与 X-L₂-Y 反应前进行纯化。在某些实施方案中, 在稀释条件 (即, 0.15mmol/L) 下进行烷基化反应, 以有利于大环化并避免聚合。在某些实施方案中, 在有机溶液如液 NH₃ 中 (Mosberg 等人 (1985), J. Am. Chem. Soc. 107 :2986-2987 ;Szewczuk 等人 (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40 :233-242)、NH₃/MeOH 中或 NH₃/DMF 中 (Or 等人 (1991), J. Org. Chem. 56 :3146-3149) 进行烷基化反应。在其它实施方案中, 在水性溶液如 pH 8 的 6M 盐酸胍中进行烷基化反应 (Brunel 等人 (2005), Chem. Commun. (20) :2552-2554)。在其它实施方案中, 用于烷基化反应的溶剂是 DMF 或二氯乙烷。

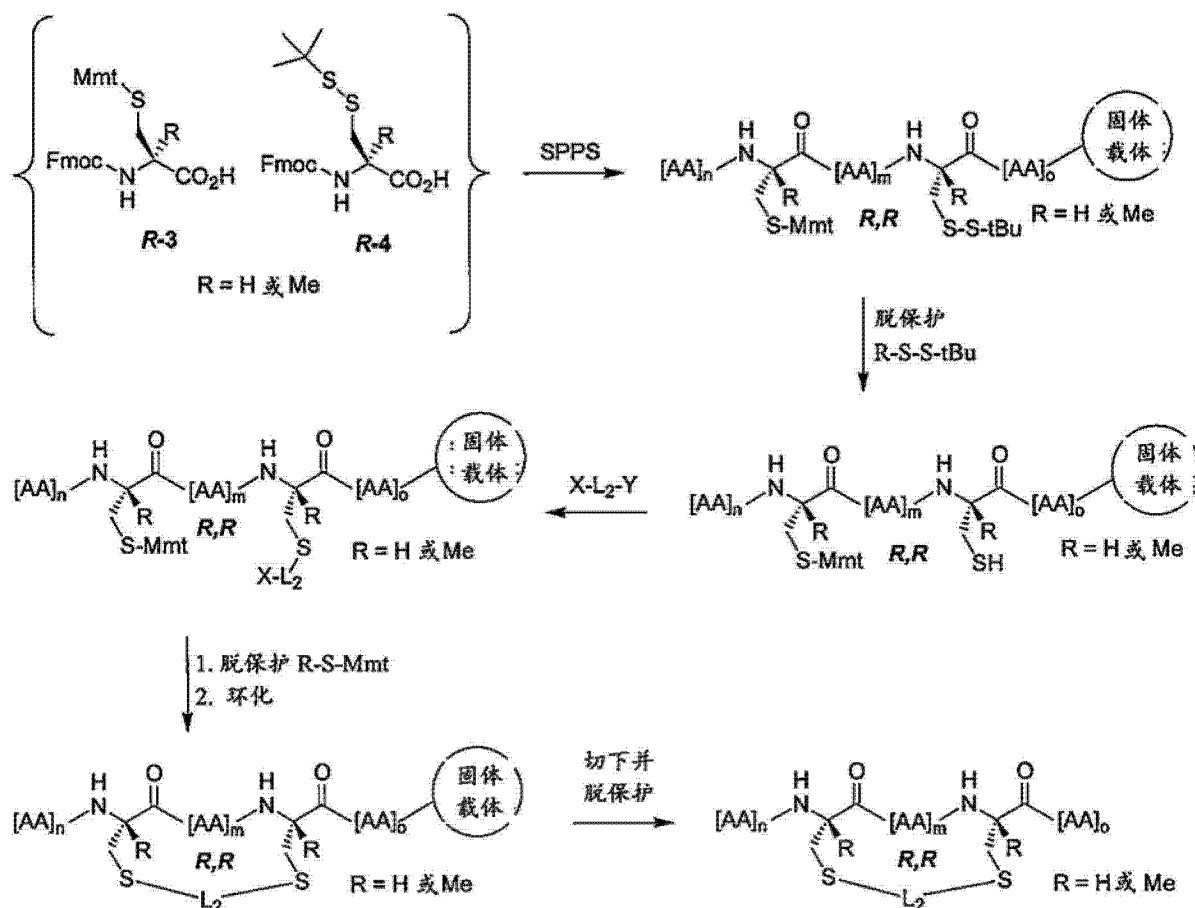
合成方案 7:



在方案7中,前体拟肽含有2个或更多个-SH部分,其中的2个特别地进行保护以允许其选择性地脱保护及随后烷基化以形成大环。通过固相肽合成法(SPPS),使用可商购的N- α -Fmoc氨基酸如N- α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基-L-半胱氨酸或N- α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基-D-半胱氨酸合成前体拟肽。通过已知方法(Seebach等人(1996), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35:2708-2748以及其中的参考文献)产生D-半胱氨酸或L-半胱氨酸的 α -甲基化形式,然后通过已知方法(*Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins*, Oxford University Press, New York:1998,其完整内容通过引用并入本文)将其转化为适当保护的N- α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基单体。然后通过标准条件(例如,弱酸,如DCM中的1% TFA)选择性地切下拟肽前体的Mmt保护基团。然后前体拟肽在树脂上与有

机溶液中的 $X-L_2-Y$ 反应。例如,该反应在受阻碱如二异丙基乙胺的存在下发生。在某些实施方案中,烷基化反应在有机溶液如液 NH_3 中 (Mosberg 等人 (1985), J. Am. Chem. Soc. 107 : 2986-2987 ;Szewczuk 等人 (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40 :233-242)、 $NH_3/MeOH$ 中或 NH_3/DMF (Or 等人 (1991), J. Org. Chem. 56 :3146-3149) 中进行。在其它实施方案中,烷基化反应在 DMF 或二氯乙烷中进行。然后通过标准条件 (例如,强酸,如 95% TFA) 将拟肽大环化合物脱保护并从固相树脂上切下。

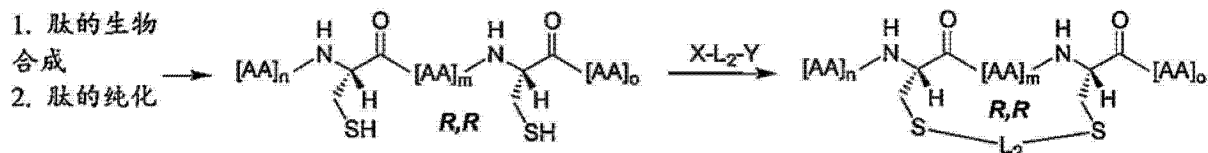
合成方案 8:



在方案 8 中,拟肽前体含有 2 个或更多个 $-SH$ 部分,其中的 2 个进行特别保护以允许其选择性地脱保护和随后烷基化以形成大环。通过固相肽合成法 (SPPS),使用可商购的 N - α -Fmoc 氨基酸如 N - α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基-L-半胱氨酸、 N - α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基-D-半胱氨酸、 N - α -Fmoc-S-S-叔丁基-L-半胱氨酸和 N - α -Fmoc-S-S-叔丁基-D-半胱氨酸合成拟肽前体。通过已知方法 (Seebach 等人 (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 :2708-2748 以及其中的参考文献) 产生 D-半胱氨酸或 L-半胱氨酸的 α -甲基化形式,然后通过已知方法 (Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins, Oxford University Press, New York :1998,其完整内容通过引用并入本文) 将其转化为适当保护的 N - α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基或 N - α -Fmoc-S-S-叔丁基单体。然后通过已知条件 (例如,DMF 中的 20% 的 2-巯基乙醇,参考文献 :Galante 等人 (2005), J. Comb. Chem. 7 : 174-177) 选择性地切下拟肽前体的 S-S-叔丁基保护基团。然后前体拟肽在树脂上与有机溶液中的摩尔过量的 $X-L_2-Y$ 反应。例如,反应在受阻碱如二异丙基乙胺的存在下发生。然后通过标准条件 (例如,弱酸,如 DCM 中的 1% TFA) 选择性地切下拟肽前体的 Mmt 保护基

团。拟肽前体然后通过用有机溶液中的受阻碱处理而在树脂上环化。在某些实施方案中,在诸如 NH_3/MeOH 或 NH_3/DMF (Or 等人 (1991), J. Org. Chem. 56 :3146-3149) 的有机溶液中进行烷基化反应。然后通过标准条件 (例如,强酸,如 95% TFA) 将拟肽大环化合物脱保护并从固相树脂上切下。

合成方案 9:



在方案 9 中,拟肽前体含有 2 个 L- 半胱氨酸部分。通过已知的活细胞中的生物表达系统或通过已知的体外无细胞表达方法合成拟肽前体。前体拟肽作为粗制混合物进行反应,或者在与 $\text{X-L}_2\text{-Y}$ 在有机溶液或水性溶液中反应之前进行纯化。在某些实施方案中,在稀释条件 (即, 0.15mmol/L) 下进行烷基化反应,以利于大环化并避免聚合。在某些实施方案中,在有机溶液如液 NH_3 中 (Mosberg 等人 (1985), J. Am. Chem. Soc. 107 :2986-2987 ; Szewczuk 等人 (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40 :233-242)、 NH_3/MeOH 中或 NH_3/DMF 中 (Or 等人 (1991), J. Org. Chem. 56 :3146-3149) 进行烷基化反应。在其它实施方案中,在水溶液如 pH 8 的 6M 盐酸胍中进行烷基化反应 (Brunel 等人 (2005), Chem. Commun. (20) : 2552-2554)。在其它实施方案中,在 DMF 或二氯乙烷中进行烷基化反应。在另一实施方案中,在非变性水溶液中进行烷基化,在再另一个实施方案中,在有利于 α -螺旋结构形成的条件下进行烷基化。在再另一个实施方案中,在有利于前体拟肽与另一种蛋白质结合的条件下进行烷基化,从而在烷基化过程中诱导结合的 α -螺旋构象的形成。

本发明设想了适合与巯基反应的 X 和 Y 的各种实施方案。通常, X 或 Y 各自独立地选自表 2 所示的总类。例如, X 和 Y 是诸如 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 或 $-\text{I}$ 的卤素。本文所述的任何大环形成连接体可以与所示的任何序列任意组合使用,也可以与本文表明的任何 R- 取代基任意组合使用。

表 2 :能够与巯基反应的反应性基团和产生的连接的实例

X 或 Y	产生的共价连接
丙烯酰胺	硫醚
卤化物 (例如, 烷基或芳基卤化物)	硫醚
磺酸酯 (sulfonate)	硫醚
氮丙啶	硫醚
环氧化物	硫醚
卤代乙酰胺	硫醚
马来酰亚胺	硫醚

磺酸酯

硫醚

本发明涉及在式 II 的拟肽大环化合物的合成中使用天然存在的和非天然存在的氨基酸和氨基酸类似物两者。任何适合用来合成稳定的含双巯基的拟肽大环化合物的合成方法的氨基酸或氨基酸类似物都可以用于本发明。例如,预计半胱氨酸是本发明中有用的氨基酸。但是,除半胱氨酸之外的含有不同氨基酸侧链的含硫氨基酸也是有用的。例如,半胱氨酸在氨基酸的 α -碳和氨基酸侧链的末端 -SH 之间含有一个亚甲基单元。本发明也涉及使用在 α -碳和末端 -SH 之间具有多个亚甲基单元的氨基酸。非限制的例子包括 α -甲基-L-高半胱氨酸和 α -甲基-D-高半胱氨酸。在某些实施方案中,氨基酸和氨基酸类似物是 D-构型。在其它实施方案中,它们是 L-构型。在某些实施方案中,拟肽中包含的某些氨基酸和氨基酸类似物是 D-构型,而某些氨基酸和氨基酸类似物是 L-构型。在某些实施方案中,氨基酸类似物是 α , α -二取代的,如 α -甲基-L-半胱氨酸和 α -甲基-D-半胱氨酸。

本发明包括其中大环形成连接体用来连接拟肽前体中的两个或多个 -SH 部分以形成本文公开的拟肽大环化合物的大环化合物。如上所述,大环形成连接体赋予构象刚性、提高代谢稳定性和/或提高细胞透性。另外,在某些实施方案中,形成大环的连接稳定拟肽大环化合物的 α -螺旋二级结构。大环形成连接体具有式 $X-L_2-Y$, 其中 X 和 Y 都是如上定义的相同或不同的部分。X 和 Y 二者都具有允许一个大环形成连接体 $-L_2-$ 使含有双巯基的拟肽前体双烷基化的化学特性。如上定义,连接体 $-L_2-$ 包括亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基或亚杂环芳基或 $-R_4-K-R_4-$, 它们都可以任选地被如上定义的 R_5 基团取代。另外,除了连接含巯基氨基酸的 -SH 的碳之外,大环形成连接体 $-L_2-$ 中的 1-3 个碳原子任选地被杂原子如 N、S 或 O 替代。

大环形成连接体 $X-L_2-Y$ 的 L_2 部分尤其根据用来形成拟肽大环化合物的两个氨基酸类似物的位置之间的距离而在长度上可以变化。另外,随着大环形成连接体的 L_1 和/或 L_3 部分的长度发生变化, L_2 的长度也可以变化,以产生具有合适的总长度的连接体以形成稳定的拟肽大环化合物。例如,如果通过向每个 L_1 和 L_3 添加另外的亚甲基单元来改变所使用的氨基酸类似物,那么 L_2 在长度上减少等同于大约两个亚甲基单元的长度,以抵消 L_1 和 L_3 的长度增加。

在一些实施方案中, L_2 是式 $-(CH_2)_n-$ 的亚烷基基团,其中, n 为大约 1 至大约 15 之间的整数。例如, n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在其它实施方案中, L_2 为亚烯基基团。在另外其它的实施方案中, L_2 为芳基。

表 3 显示 $X-L_2-Y$ 基团的另外的实施方案。

表 3. 示例性的 X-L₂-Y 基团

该表中的各个 X 和 Y 例如独立地为 Cl-、Br-或 I-。

预计为合适的形成拟肽大环化合物的另外的方法包括以下文献中公开的方法：Mustapa, M. Firouz Mohd 等人, J. Org. Chem(2003), 68, 第 8193-8198 页；Yang, Bin 等人 Bioorg Med. Chem. Lett. (2004), 14, 第 1403-1406 页；美国专利 5, 364, 851；美国专利

5,446,128 ;美国专利 5,824,483 ;美国专利 6,713,280 和美国专利 7,202,332。在这样的实施方案中,使用在 α -位含有另外的取代基 R- 的氨基酸前体。这样的氨基酸在希望的位置并入大环化合物前体中,其可以处于交联体被取代的位置,或者,备选地,在大环化合物前体序列中的其它位置。然后根据指定的方法实现前体的环化。

在一些实施方案中,使用包括但不限于 -Fmoc 和 -Boc 的保护基团保护氨基酸的 -NH 部分。在其它实施方案中,在合成拟肽大环化合物之前不保护氨基酸。

试验

例如,拟肽大环化合物的性质通过使用下面所述的方法进行分析。在一些实施方案中,拟肽大环化合物相对于缺乏本文所述的取代基的相应多肽具有改善的生物学性质。

用于测定 α -螺旋度的试验

在溶液中,具有 α -螺旋结构域的多肽的二级结构在随机卷曲结构和 α -螺旋结构之间达到动态平衡,这通常被称为“百分螺旋度”。因此,例如, α -螺旋结构域在溶液中主要是随机卷曲, α -螺旋含量通常低于 25%。另一方面,具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如至少为相应的非交联多肽的 2 倍的 α -螺旋度。在一些实施方案中,大环化合物具有高于 50% 的 α -螺旋度。为了测定拟肽大环化合物的螺旋度,将化合物溶解于水溶液(例如,pH 7 的 50mM 磷酸钾溶液或蒸馏水,达到 25-50 μ M 的浓度)。使用标准测量参数(例如,温度,20 $^{\circ}$ C ;波长,190-260nm ;步分辨率(step resolution),0.5nm ;速度,20nm/sec ;累积,10 ;响应,1 秒 ;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)谱。通过将平均残基椭圆率(例如,[Φ]222obs)除以模型螺旋十肽的报道值(Yang 等人(1986),Methods Enzymol. 130 :208)来计算各个肽的 α -螺旋含量。

用于测量解链温度(T_m)的试验

含有二级结构如 α -螺旋的拟肽大环化合物显示出例如比相应的非交联多肽更高的解链温度。通常,拟肽大环化合物显示出 > 60 $^{\circ}$ C 的 T_m,表明在水溶液中高度稳定的结构。为了分析大环形成对解链温度的影响,将拟肽大环化合物或未修饰的肽溶于蒸馏水中(例如,以 50 μ M 的终浓度),并且通过使用标准参数(例如,波长,222nm ;步分辨率,0.5nm ;速度,20nm/sec ;累积,10 ;响应,1 秒 ;带宽,1nm ;温度上升速度,1 $^{\circ}$ C / 分钟 ;路径长度,0.1cm)在分光偏振计(例如,Jasco J-710)上测量椭圆率在一定温度范围(例如,4-95 $^{\circ}$ C)内的变化来确定 T_m。

蛋白酶抗性试验

肽骨架的酰胺键易受到蛋白酶的水解,从而致使肽化合物在体内易于快速降解。但是,肽螺旋的形成通常包埋酰胺骨架,因此可以保护其免于蛋白水解裂解。拟肽大环化合物可以经历体外胰蛋白酶的蛋白水解,以评价与相应的非交联多肽相比其降解速率的任何变化。例如,拟肽大环化合物和相应的非交联多肽与胰蛋白酶琼脂糖一起温育,并在各个时间点通过离心猝灭反应,随后进行 HPLC 注入以根据 280nm 处的紫外吸收对残留的底物进行定量。简单来说,拟肽大环化合物和拟肽前体(5mcg)与胰蛋白酶琼脂糖(Pierce)(S/E ~ 125)温育 0、10、20、90 和 180 分钟。通过台式离心机高速离心猝灭反应 ;通过基于 HPLC 的在 280nm 处的峰检测对分离的上清液中残余的底物进行定量。蛋白水解反应显示出一级动力学,且速率常数 k 由 ln[S] 相对于时间的曲线确定(k = -1X 斜率)。

离体稳定性试验

具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如至少为相应的非交联多肽的 2 倍的离体半衰期,且具有 12 小时或更长的离体半衰期。对于离体血清稳定性研究,可以使用多种试验。例如,将拟肽大环化合物和相应的非交联多肽 (2mcg) 与新鲜的小鼠、大鼠和 / 或人血清 (2mL) 一起在 37°C 下温育 0、1、2、4、8 和 24 小时。为了测定完整化合物的水平,可以使用下面的程序:通过将 100 μ L 的血清转移到 2mL 离心管中,接着加入 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 10 分钟来提取样品。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 Turbovap 上蒸发。样品在 100 μ L 的 50 : 50 乙腈 : 水中重建,并进行 LC-MS/MS 分析。

体外结合试验

为了评价拟肽大环化合物和拟肽前体与受体蛋白质的结合和亲和力,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量分子取向和分子迁移率。当用偏振光激发时,由于附着在具有高表观分子量的分子 (例如,与大蛋白质结合的 FITC 标记的肽) 上的荧光示踪剂 (例如, FITC) 与附着在较小分子 (例如,在溶液中游离的 FITC 标记的肽) 上的荧光示踪剂相比具有较慢的旋转速度,附着在具有高表观分子量的分子上的荧光示踪剂发射较高水平的偏振荧光。

例如,荧光标记的 (fluoresceinated) 拟肽大环化合物 (25nM) 与受体蛋白质 (25-1000nM) 在结合缓冲液 (140mM NaCl、50mM Tris-HCL, pH 7.4) 中在室温下温育 30 分钟。例如,用发光分光光度计 (例如, Perkin-Elmer LS50B) 通过荧光偏振测定结合活性。可以使用例如 Graphpad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 通过非线性回归分析来确定 K_d 值。在一些实施方案中,拟肽大环化合物显示出与相应的非交联多肽类似的或更低的 K_d 。

用于表征肽 - 蛋白质相互作用的拮抗剂的体外置换试验

为了评价拮抗肽与受体蛋白质之间相互作用的化合物的结合和亲和力,例如,使用来源于拟肽前体序列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量分子取向和分子迁移率。当用偏振光激发时,由于附着在具有高表观分子量的分子 (例如,与大蛋白质结合的 FITC 标记的肽) 上的荧光示踪剂 (例如, FITC) 与附着在较小分子 (例如,在溶液中游离的 FITC 标记的肽) 上的荧光示踪剂相比具有较低的旋转速度,附着在具有高表观分子量的分子上的荧光示踪剂发射较高水平的偏振荧光。拮抗荧光标记的拟肽大环化合物与受体蛋白质之间相互作用的化合物将在竞争性结合 FPA 实验中进行检测。

例如,推定的拮抗剂化合物 (1nM 至 1mM) 和荧光标记的拟肽大环化合物 (25nM) 与受体蛋白质 (50nM) 一起在结合缓冲液 (140mM NaCl、50mM Tris-HCL, pH7.4) 中在室温下温育 30 分钟。例如,用发光分光光度计 (例如, Perkin-Elmer LS50B) 通过荧光偏振测定拮抗剂结合活性。可以使用例如 Graphpad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 通过非线性回归分析来确定 K_d 值。

任一类分子,如有机小分子、肽、寡核苷酸或蛋白质,可以在该试验中作为推定的拮抗剂进行检测。

通过亲和选择 - 质谱法对蛋白质 - 配体结合的分析

为了评估测试化合物对蛋白质的结合和亲和力,例如采用亲和选择 - 质谱分析试验。

按照以下对全系统对照实验概述的代表性程序,使用 $1\ \mu\text{M}$ 拟肽大环化合物加 $5\ \mu\text{M}$ hMDM2 进行蛋白质-配体结合实验。将 $40\ \mu\text{M}$ 拟肽大环化合物储备溶液的 $1\ \mu\text{L}$ DMSO 等份溶解在 $19\ \mu\text{L}$ PBS(磷酸盐缓冲盐水:含有 150mM NaCl 的 50mM , pH7.5 磷酸盐缓冲液)中。得到的溶液通过反复吸液进行混合并通过在 $10000g$ 下离心 10 分钟进行澄清。向 $4\ \mu\text{L}$ 等份得到的上清液中加入 $4\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{M}$ hMDM2 的 PBS 溶液。每个 $8.0\ \mu\text{L}$ 实验样品因此含有在 PBS 中的浓度为 $5.0\ \mu\text{M}$ 的 40pmol ($1.5\ \mu\text{g}$) 蛋白质,加 $1\ \mu\text{M}$ 拟肽大环化合物和 2.5% DMSO。针对每个浓度点如此制备的双份样品在室温下温育 60 分钟,然后冷却至 4°C ,之后进行 $5.0\ \mu\text{L}$ 注入液的大小排阻层析-LC-MS 分析。将含有靶蛋白、蛋白质-配体复合体和未结合的化合物的样品注入到 SEC 柱上,通过快速 SEC 步骤将复合体与未结合的成分在该柱上分离。采用 UV 检测器监测 SEC 柱洗脱液,以证实在 SEC 柱的外水体积中洗脱的早期洗脱的蛋白质级分从保留在柱上的未结合的成分中良好地分离出来。在含有蛋白质和蛋白质-配体复合体的峰从主 UV 检测器洗脱后,它进入样品环路,在其中从 SEC 阶段的流上截下,并通过阀门机构直接转移到 LC-MS。通过 ESI-MS 以预期的 m/z 观察拟肽大环化合物的 $(M+3H)^{3+}$ 离子,证实检测到蛋白质-配体复合体。

用于蛋白质-配体 K_d 滴定实验的分析

为了评估测试化合物对蛋白质的结合和亲和力,例如,进行蛋白质-配体 K_d 滴定实验。蛋白质-配体 K_d 滴定实验如下进行:制备连续稀释的滴定剂拟肽大环化合物储备溶液 ($5, 2.5, \dots, 0.098\text{mM}$) 的 $2\ \mu\text{L}$ DMSO 等份,然后溶解在 $38\ \mu\text{L}$ PBS 中。得到的溶液通过反复吸液进行混合并通过在 $10000g$ 下离心 10 分钟进行澄清。向 $4.0\ \mu\text{L}$ 等份得到的上清液中加入 $4.0\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{M}$ hMDM2 的 PBS 溶液。每个 $8.0\ \mu\text{L}$ 实验样品因此含有在 PBS 中的浓度为 $5.0\ \mu\text{M}$ 的 40pmol ($1.5\ \mu\text{g}$) 蛋白质,不同浓度 ($125, 62.5, \dots, 0.24\ \mu\text{M}$) 的滴定肽和 2.5% DMSO。针对每个浓度点如此制备的双份样品在室温下温育 30 分钟,然后冷却至 4°C ,之后进行 $2.0\ \mu\text{L}$ 注入液的 SEC-LC-MS 分析。通过 ESI-MS 观察 $(M+H)^{1+}$ 、 $(M+2H)^{2+}$ 、 $(M+3H)^{3+}$ 和 / 或 $(M+Na)^{1+}$ 离子;对提取的离子色谱图进行定量,然后与方程拟合,以推导出结合亲和力 K_d ,如以下文献所述:“A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures.” Annis, D. A. ;Nazef, N. ;Chuang, C. C. ;Scott, M. P. ;Nash, H. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15495-15503, 以及“ALIS: An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions”D. A. Annis, C.-C. Chuang, and N. Nazef. In Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Wanner K, Höfner G: Wiley-VCH 编著;2007:121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G(系列编者): Methods and Principles in Medicinal Chemistry。

通过亲和选择-质谱法进行竞争性结合实验的分析

为了确定测试化合物竞争性结合蛋白质的能力,例如,进行亲和选择-质谱分析试验。通过将三种化合物中每一种的 $2\ \mu\text{L}$ 等份 $400\ \mu\text{M}$ 储备液与 $14\ \mu\text{L}$ DMSO 混合制备每种成分 $40\ \mu\text{M}$ 的配体混合物。然后,将 $1\ \mu\text{L}$ 等份的该每种成分 $40\ \mu\text{M}$ 的混合物与滴定剂拟肽大环化合物连续稀释储备溶液 ($10, 5, 2.5, \dots, 0.078\text{mM}$) 的 $1\ \mu\text{L}$ DMSO 等份混合。将这些 $2\ \mu\text{L}$ 样品溶解在 $38\ \mu\text{L}$ PBS 中。得到的溶液通过反复吸液进行混合并通过在 $10000g$ 下离心 10 分钟进行澄清。向 $4.0\ \mu\text{L}$ 等份得到的上清液中加入 $4.0\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{M}$ hMDM2 蛋白的 PBS 溶液。每个

8.0 μL 实验样品因此含有在 PBS 中的浓度为 5.0 μM 的 40pmol (1.5 μg) 蛋白质,加 0.5 μM 配体、2.5% DMSO 和不同浓度 (125, 62.5, ..., 0.98 μM) 的滴定剂拟肽大环化合物。针对每个浓度点如此制备的双份样品在室温下温育 60 分钟,然后冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$,之后进行 2.0 μL 注入液的 SEC-LC-MS 分析。这些和其它方法的另外的细节在以下文献中提供:“A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures.” Annis, D. A.; Nazef, N.; Chuang, C. C.; Scott, M. P.; Nash, H. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15495-15503; 以及“ALIS: An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions” D. A. Annis, C.-C. Chuang, and N. Nazef. In Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Wanner K, Höfner G: Wiley-VCH 编著; 2007: 121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (系列编者): Methods and Principles in Medicinal Chemistry。

在完整细胞中的结合分析

有可能通过免疫沉淀实验测定肽或拟肽大环化合物与其天然受体在完整细胞中的结合。例如,完整的细胞与荧光标记的 (FITC- 标记的) 化合物在无血清的情况下温育 4 小时,接着进行血清置换并进一步温育 4-18 小时。然后使细胞沉淀,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下在裂解缓冲液 (50mM Tris [pH7.6]、150mM NaCl、1% 的 CHAPS 和蛋白酶抑制剂混合物) 中温育 10 分钟。以 14,000rpm 离心提取物 15 分钟,收集上清液,并与 10 μL 山羊抗-FITC 抗体一起温育 2 小时,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转,接着进一步在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与蛋白 A/G Sepharose (50 μL 的 50% 微珠浆) 温育 2 小时。快速离心之后,将沉淀物在含有渐增的盐浓度 (例如, 150、300、500mM) 的裂解缓冲液中洗涤。随后以 150mM NaCl 再平衡微珠,之后加入含有 SDS 的样品缓冲液并煮沸。离心之后,任选地使用 4% -12% 梯度的 Bis-Tris 凝胶对上清液进行电泳,接着转移到 Immobilon-P 膜上。封闭后,任选地将印迹与检测 FITC 的抗体一起温育,也与一种或多种检测与拟肽大环化合物结合的蛋白质的抗体一起温育。

细胞透性分析

与相应的非交联大环化合物相比,拟肽大环化合物例如具有更高的细胞透性。具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如是相应的非交联大环化合物的至少 2 倍的细胞透性,并且常常观察到 20% 或更多的应用的拟肽大环化合物在 4 小时后已渗透入细胞。为了测量拟肽大环化合物和相应的非交联大环化合物的细胞透性,将完整的细胞与荧光标记的 (例如荧光化的 (fluoresceinated)) 拟肽大环化合物或相应的非交联大环化合物 (10 μM) 一起在不含血清的培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 小时,用培养基洗涤 2 次,并与胰蛋白酶 (0.25%) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 10 分钟。再次洗涤细胞并将其重悬浮于 PBS 中。例如,通过使用 FACSCalibur 流式细胞仪或 Cellomics' **KineticScan**® HCS 读数仪分析细胞荧光。

细胞效力分析

例如,在基于细胞的杀伤试验中,使用多种致瘤和非致瘤的细胞系及源自人类或小鼠细胞群体的原代细胞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 (0.5-50 μM) 一起温育的 24-96 小时期间监测细胞的活力,以鉴定那些以 $\text{EC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ 杀死细胞的化合物。检测细胞活力的几种标准分析是可以通过商业途径得到的,并且任选地用来评价拟肽大环化合物的效力。另外,测定膜联蛋白 V 和胱天蛋白酶激活的分析任选地

用来评价拟肽大环化合物是否通过激活凋亡机制杀死细胞。例如,采用 Cell Titer-glo 试验,该试验确定随细胞内 ATP 浓度变化的细胞活力。

体内稳定性分析

为了研究拟肽大环化合物的体内稳定性,例如,向小鼠和 / 或大鼠通过静脉内、腹膜内、口服或吸入途径以 0.1–50mg/kg 的浓度施用化合物,并在注射后 0'、5'、15'、30'、1 小时、4 小时、8 小时和 24 小时抽取血样。然后如上所述通过 LC-MS/MS 测定 25 μ L 新鲜血清中的完整化合物的水平。

在动物模型中的体内效力

为了确定拟肽大环化合物在体内的抗致癌活性,例如,化合物单独给予(静脉内、腹膜内、口服、通过吸入或鼻途径)或与亚最佳剂量的相关化疗剂(例如,环磷酰胺、阿霉素、依托泊苷)联合给予。在一个实例中,在 NOD-SCID 小鼠遭受全身辐射 3 小时后,通过尾静脉注射稳定表达萤光素酶的 5×10^6 RS4;11 细胞(从急性淋巴细胞白血病患者的骨髓建立)。如果不予处理,在该模型中这种形式的白血病在 3 周内是致命的。例如,通过对小鼠注射 D-萤光素(60mg/kg)并对麻醉的动物进行成像(例如,Xenogen In Vivo Imaging System, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)可容易地监测该白血病。通过 Living Image Software(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)进行光子通量(photonic flux)(光子/秒)的积分(integration)来对全身生物发光进行定量。例如,拟肽大环化合物单独地或与亚最佳剂量的相关化学治疗剂联合地通过尾静脉或静脉内途径以 0.1mg/kg–50mg/kg 的剂量向白血病小鼠施用(注射后 10 天/实验第 1 天,生物发光范围为 14–16)7–21 天。任选地,在整个实验过程中每隔一天对小鼠成像,并在实验期间每天监测其存活。在实验结束时任选地对死亡的小鼠进行尸体检查。另一种动物模型是将稳定表达萤光素酶的 DoHH2(源自人类滤泡性淋巴瘤的细胞系)植入到 NOD-SCID 小鼠中。这些体内试验任选地产生初步的药代动力学、药效学和毒理学数据。

临床试验

为了确定拟肽大环化合物对于人类治疗的适用性,进行了临床试验。例如,可选择出被诊断为患有癌症并且需要治疗的患者并将他们分成治疗组和一个或多个对照组,其中,对治疗组施用拟肽大环化合物,而对照组接受安慰剂或已知的抗癌药物。这样,可以通过对患者组就诸如生存率和生活质量的因素进行比较来评价拟肽大环化合物的治疗安全性和有效性。在本实施例中,相比于用安慰剂治疗的患者对照组,用拟肽大环化合物治疗的患者组可以显示出提高的长期生存率。

药物组合物和给药途径

本文公开的药物组合物包含拟肽大环化合物及其药学上可接受的衍生物或前药。“药学上可接受的衍生物”意指本文公开的化合物的任何药学上可接受的盐、酯、酯的盐、前药或其它衍生物,其在向接受者施用后能够(直接或间接地)提供本文公开的化合物。尤其有利的药学上可接受的衍生物是当向哺乳动物施用时可以提高该化合物的生物利用度(例如,通过提高口服施用的化合物进入血液的吸收),或相对于母体物质增加活性化合物向生物区室(例如,脑或淋巴系统)的递送的那些衍生物。一些药学上可接受的衍生物包含提高水溶性或跨过胃肠粘膜的主动转运的化学基团。

在一些实施方案中,拟肽大环化合物通过共价或非共价地连接的合适的官能团进行修

饰,以提高选择性的生物学性质。这样的修饰包括那些提高进入给定生物区室(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)的生物学渗透性、提高口服利用度、增加溶解度以允许注射施用、改变代谢以及改变排泄率的修饰。

本文公开的化合物的药学上可接受的盐包括那些由药学上可接受的无机和有机的酸和碱衍生的盐。合适的酸式盐的例子包括乙酸盐、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、延胡索酸盐、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、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、棕榈酸盐(palmoate)、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(undecanoate)。由合适的碱衍生的盐包括碱金属盐(例如,钠盐)、碱土金属盐(例如,镁盐)、铵盐和N-(烷基)₄⁺盐。

为了由本文提供的化合物制备药物组合物,药学上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剂、片剂、丸剂、胶囊剂、扁囊剂、栓剂和分散颗粒剂。固体载体可以是一种或多种物质,其也可以作为稀释剂、调味剂、粘合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包封材料发挥作用。在科学文献和专利文献中详细描述了配制和给药技术的细节,参见,例如,最新版本Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA。

在粉剂中,载体是细碎的固体,其与细碎的活性成分混合。在片剂中,活性成分与具有必要粘合性质的载体按照适当的比例混合,并压制成需要的形状和大小。

合适的固体赋形剂是碳水化合物或蛋白质填料,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、马铃薯或其它植物的淀粉;纤维素,如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠;和树胶,包括阿拉伯树胶和黄蓍胶;以及蛋白质,如明胶和胶原蛋白。如果需要的话,加入崩解剂或增溶剂,如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐如海藻酸钠。

液体形式的制剂包括但不限于溶液、悬浮液和乳液,例如,水或水/丙二醇溶液。对于肠胃外注射,液体制剂可以在聚乙二醇水溶液中配制成溶液。

药物制剂可以为单位剂型。在这样的形式中,制剂细分为含有适量活性成分的单位剂量。单位剂型可以是包装制剂,该包装包含不连续量的制剂,如包装的片剂、胶囊和小瓶或安瓿中的粉末。另外,单位剂型也可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身,或者可以是包装形式的适当数目的这些剂型中的任一种。

当一种或多种本文公开的组合物包含拟肽大环化合物和一种或多种另外的治疗剂或预防剂的组合时,该化合物和另外的药剂都应该以通常在单一治疗方案中施用的剂量的大约1-100%的剂量水平,更优选大约5-95%的剂量水平存在。在一些实施方案中,另外的药剂作为多剂量方案的一部分与一种或多种本文公开的化合物分开施用。或者,这些药剂是单一剂型的一部分,在单一组合物中与一种或多种本文公开的化合物混合在一起。

使用方法

在一个方面,本文提供了新型拟肽大环化合物,其可在竞争性结合试验中用于鉴别可与拟肽大环化合物所模拟的蛋白质或肽的天然配体相结合的物质。例如,在p53/MDMX系统中,基于p53的标记的拟肽大环化合物可以与竞争性结合MDMX的小分子一起在MDMX结合试验中使用。竞争结合研究允许在体外快速评价及确定对于p53/MDMX系统具有特异性的候选药物。可以使用本文公开的任何拟肽大环化合物及其结合配偶体进行这类结合研究。

本文提供了抗拟肽大环化合物的抗体的生成。在一些实施方案中,这些抗体特异性地结合拟肽大环化合物和拟肽大环化合物相关的前体肽,如 p53。例如,这样的抗体破坏天然的蛋白质-蛋白质相互作用,例如 p53 与 MDMX 之间的结合。

在其它方面,本文提供了处理处于患与分子(包括 p53、MDM2 或 MDMX)的异常(例如,不足或过量)表达或活性有关的疾病的危险中(或易患所述疾病)或患有所述疾病的受试者的预防方法和治疗方法。

在另一实施方案中,疾病至少部分地是由 p53 或 MDM2 或 MDMX 的异常水平(例如,过度表达或不足表达)引起的,或由显示异常活性的 p53 或 MDM2 或 MDMX 的存在引起的。这样,由源自 p53 的拟肽大环化合物导致的 p53 或 MDM2 或 MDMX 水平和/或活性的降低或者 p53 或 MDM2 或 MDMX 水平和/或活性的提高用来例如缓解或减轻疾病的负面症状。

另一方面,本文提供了通过干扰结合配偶体之间(例如,p53 与 MDM2 或 p53 与 MDMX 之间)的相互作用或结合来治疗或预防疾病(包括过度增殖性疾病和炎症病症)的方法。这些方法包括向包括人类的温血动物施用有效量的化合物。在一些实施方案中,一种或多种本文公开的化合物的施用诱导细胞生长停滞或凋亡。

如本文所用的,术语“治疗”被定义为向患者应用或施用治疗剂,或者向从患者分离的组织或细胞系应用或施用治疗剂,所述患者患有疾病、疾病症状或具有患病倾向,其目的是治愈、恢复、减轻、解除、改变、矫正、缓解、改善或影响疾病、疾病症状或患病倾向。

在一些实施方案中,拟肽大环化合物可以用来治疗、预防和/或诊断癌症和肿瘤性疾病。如本文所用的,术语“癌症”、“过度增殖的”和“肿瘤性的”指具有自主生长能力的细胞,即以快速增殖的细胞生长为特征的异常状态或病状。过度增殖性的和肿瘤性的疾病状态可以分为病理性的,即,表现或构成疾病状态;或者可以分为非病理性的,即,偏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的细胞、组织或器官,而与组织病理类型或侵入阶段无关。转移性肿瘤可以由许多原发性肿瘤类型产生,包括但不限于:乳腺、肺、肝、结肠和卵巢源的肿瘤类型。“病理性过度增殖”细胞出现于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创伤修复有关的细胞增殖。细胞增殖和/或分化疾病的例子包括癌症,例如,癌瘤、肉瘤或转移性疾病。在一些实施方案中,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的治疗剂。

癌症或肿瘤性疾病的例子包括但不限于:纤维肉瘤、肌肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、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、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胃癌、食道癌、直肠癌、胰腺癌、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、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯肿瘤、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、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、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。

增殖性疾病的例子包括造血系统肿瘤性疾病。如本文所用,术语“造血系统肿瘤性疾病”包括涉及造血系统起源的(例如,源自骨髓、淋巴或红细胞谱系的)增生性/肿瘤性细胞或其前体细胞的疾病。该疾病可起因于分化不良的急性白血病,例如,成红细胞白血病和

急性巨核母细胞性白血病。另外的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）和慢性髓性白血病（CML）（综述见 Vaickus (1991), Crit Rev. Oncol. / Hemotol. 11 :267-97）；淋巴样恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴母细胞性白血病（ALL），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）、多毛细胞白血病（HLL）和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症（WM）。其它形式的恶性淋巴瘤包括但不限于：非何杰金淋巴瘤及其变化形式、外周 T 细胞淋巴瘤、成人 T 细胞白血病 / 淋巴瘤（ATL）、皮肤 T 细胞淋巴瘤（CTCL）、巨粒淋巴细胞白血病（LGF）、何杰金病和里德 - 斯特恩伯格病。

乳腺的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于：增生性乳腺疾病，包括，例如，上皮细胞增生、硬化性腺病和小导管乳头状瘤；肿瘤，例如，诸如纤维腺瘤、叶状瘤和肉瘤的间质肿瘤，和诸如大导管乳头状瘤的上皮肿瘤；乳腺癌，包括原位（非侵袭性）癌（包括原位导管癌（包括佩吉特病）和原位小叶癌）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、胶体（粘液）癌、小管癌和侵袭性乳头状癌）；和混杂性的恶性肿瘤。男性乳房疾病包括但不限于男性乳腺发育症和癌。

皮肤的细胞增殖性和 / 或分化性病症的实例包括但不限于增殖性皮肤病，如黑素瘤，包括粘膜黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、雀斑（例如，恶性雀斑样痣、恶性雀斑样黑素瘤或肢端着色斑性黑素瘤）、无黑色素黑素瘤、结缔组织增生性黑素瘤、具有斯皮茨痣特征的黑素瘤、具有小痣样细胞的黑素瘤、息肉状黑素瘤和软组织黑素瘤；基底细胞癌，包括小结基底细胞癌、表面基底细胞癌、结节性基底细胞癌（侵蚀性溃疡）、囊性基底细胞癌、疤痕性基底细胞癌、色素性基底细胞癌、异位基底细胞癌、浸润性基底细胞癌、痣样基底细胞癌综合征、息肉状基底细胞癌、孔样基底细胞癌和平库斯纤维上皮瘤；鳞状细胞癌，包括棘皮瘤（巨细胞棘皮瘤）、腺样鳞状细胞癌、基底细胞样鳞状细胞癌、透明细胞鳞状细胞癌、印戒细胞鳞状细胞癌、梭形细胞鳞状细胞癌、马乔林溃疡、凯拉增生性红斑和 Bowen 病；或其它皮肤或皮下肿瘤。

肺的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于：支气管原癌，包括类肿瘤综合征、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；胸膜的病状，包括炎性胸腔积液、非炎性胸腔积液、气胸和胸膜肿瘤，包括孤立性纤维瘤（胸膜纤维瘤）和恶性间皮瘤。

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

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，包括原发肝癌和转移性肿瘤。

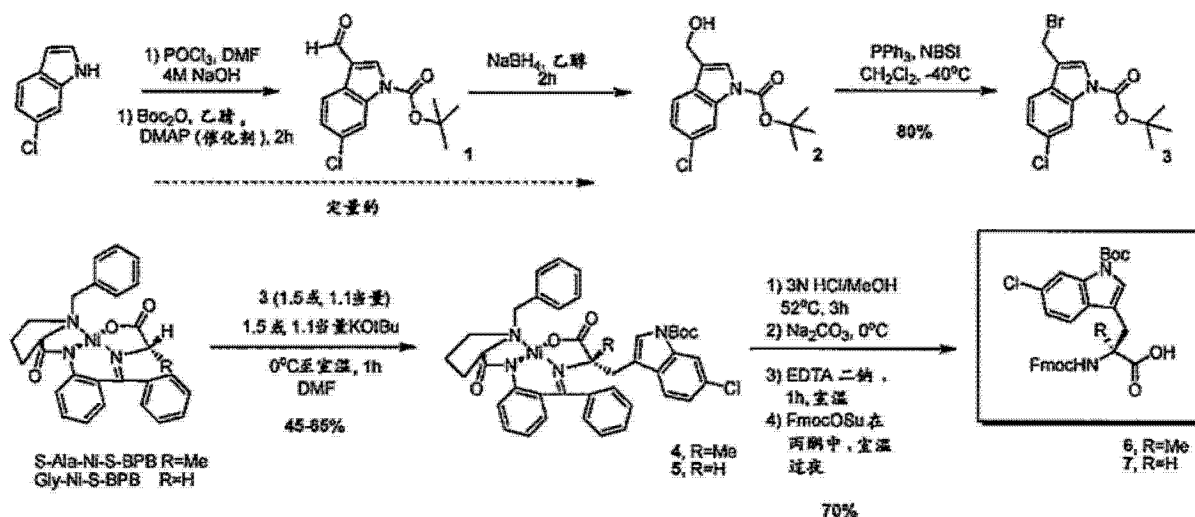
卵巢的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于：卵巢肿瘤，例如，体腔上皮肿瘤、浆液性肿瘤、粘液瘤、子宫内膜样瘤、透明细胞腺瘤、囊腺纤维瘤、布伦纳瘤、表面上皮肿瘤；生殖细胞瘤，例如，成熟（良性）畸胎瘤、单胚层畸胎瘤、不成熟的恶性畸胎瘤、无性细胞瘤、内胚层窦瘤、绒毛膜癌；性索 - 间质肿瘤（sex cord-stromal tumors），例如，粒层 - 卵泡膜细胞瘤、泡膜细胞瘤纤维瘤（thecoma fibromas）、男性母细胞瘤、希尔细胞瘤（hill cell tumors）和性腺母细胞瘤；和诸如克鲁肯贝格瘤的转移性肿瘤。

虽然本文已显示和描述了本发明的优选实施方案，但是对于本领域的技术人员显而易

见的是,这些实施方案只是以举例的方式提供的。在不背离本发明的情况下,本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应当理解,在实施本发明时,可以采用本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案。旨在用下列权利要求限定范围,并且这些权利要求范围内的方法和结构及其等效物也涵盖在本发明内。

实施例

实施例 1:6-氯色氨酸 Fmoc 氨基酸的合成



6-氯-3-甲酰基-1H-吲哚-1-甲酸叔丁酯, 1。在氩气下于 0°C 向搅拌中的干 DMF (12mL) 的溶液中逐滴加入 POCl_3 (3.92mL, 43mmol, 1.3 当量)。在同一温度下搅拌该溶液 20 分钟, 然后逐滴加入 6-氯吲哚 (5.0g, 33mmol, 1 当量) 的干 DMF (30mL) 溶液。使所得到的混合物升温至室温, 并再搅拌 2.5h。加水 (50mL), 并用 4M NaOH 水溶液 ($\text{pH} \sim 8$) 中和该溶液。滤出所得到的固体, 用水洗涤, 并在真空下干燥。这种材料无需额外的纯化而直接用于下一步骤。在 N_2 下于室温向搅拌中的粗甲酰吲哚 (33mmol, 1 当量) 的 THF (150mL) 溶液中相继添加 Boc_2O (7.91g, 36.3mmol, 1.1 当量) 和 DMAP (0.4g, 3.3mmol, 0.1 当量)。在室温下搅拌所得到的混合物 1.5h, 减压蒸发溶剂。将残留物用 EtOAc 吸收, 并用 1N HCl 洗涤, 干燥并浓缩, 从而得到白色固体甲酰吲哚 1 (经 2 步, 9g, 98%)。 ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.70 (s, Boc, 9H); 7.35 (dd, 1H); 8.21 (m, 3H); 10.07 (s, 1H)。

6-氯-3-(羟甲基)-1H-吲哚-1-甲酸叔丁酯, 2。向化合物 1 (8.86g, 32mmol, 1 当量) 的乙醇 (150mL) 溶液中加入 NaBH_4 (2.4g, 63mmol, 2 当量)。在室温下搅拌反应液 3h。浓缩反应混合物, 并将残留物倒入乙醚和水中。分离有机层, 用硫酸镁干燥并浓缩, 从而得到白色固体 (8.7g, 98%)。这种材料无需额外的纯化而直接用于下一步骤。 ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.65 (s, Boc, 9H); 4.80 (s, 2H, CH_2); 7.21 (dd, 1H); 7.53 (m, 2H); 8.16 (bs, 1H)。

3-(溴甲基)-6-氯-1H-吲哚-1-甲酸叔丁酯, 3。于 -40°C 向氩气下的化合物 2 (4.1g, 14.6mmol, 1 当量) 的二氯甲烷 (50mL) 溶液中加入三苯基膦 (4.59g, 17.5mmol, 1.2 当量) 的二氯甲烷 (50mL) 溶液。在 40°C 下再搅拌反应溶液 30 分钟。然后加入 NBS (3.38g, 19mmol, 1.3 当量)。使所得到的混合物升温至室温并搅拌过夜。蒸发二氯甲烷, 加入四氯化碳 (100mL), 搅拌混合物 1h 并过滤。将滤液浓缩, 将其装入二氧化硅柱, 并用 25% EtOAc 的己烷溶液快速洗脱。浓缩溶液, 得到白色泡沫 (3.84g, 77%)。 ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.66 (s,

Boc, 9H) ;4. 63 (s, 2H, CH₂) ;7. 28 (dd, 1H) ;7. 57 (d, 1H) ;7. 64 (bs, 1H) ;8. 18 (bs, 1H)。

α Me-6Cl-Trp (Boc)-Ni-S-BPB, 4。在氩气下向 S-Ala-Ni-S-BPB (2. 66g, 5. 2mmol, 1 当量) 和 KO-tBu (0. 87g, 7. 8mmol, 1. 5 当量) 中加入 50mL DMF。通过注射器加入溴化物衍生化合物 3 (2. 68g, 7. 8mmol, 1. 5 当量) 在 DMF (5. 0mL) 中的溶液。在环境温度下搅拌反应混合物 1h。然后用 5% 的醋酸水溶液猝灭溶液, 并用水稀释。在二氯甲烷中萃取所需产物, 干燥并浓缩。在使用 EtOAc 和己烷作为洗脱液的正相上通过快速色谱法 (固体加载) 纯化油状产物 4, 得到红色固体 (1. 78g, 45% 产率)。 α Me-6Cl-Trp (Boc)-Ni-S-BPB, 4 :M+H 计算 775. 21, M+H 观测 775. 26 ;¹H NMR (CDCl₃) δ :1. 23 (s, 3H, α Me) ;1. 56 (m, 11H, Boc+CH₂) ;1. 82-2. 20 (m, 4H, 2CH₂) ;3. 03 (m, 1H, CH_a) ;3. 24 (m, 2H, CH₂) ;3. 57 和 4. 29 (AB 系统, 2H, CH₂ (苯甲基), J = 12. 8Hz) ;6. 62 (d, 2H) ;6. 98 (d, 1H) ;7. 14 (m, 2H) ;7. 23 (m, 1H) ;7. 32-7. 36 (m, 5H) ;7. 50 (m, 2H) ;7. 67 (bs, 1H) ;7. 98 (d, 2H) ;8. 27 (m, 2H)。

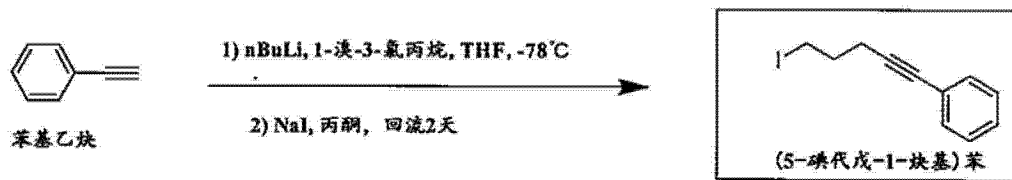
Fmoc- α Me-6Cl-Trp (Boc)-OH, 6。向 50℃ 的 3N HCl/MeOH (1/3, 15mL) 溶液中逐滴加入化合物 4 (1. 75g, 2. 3mmol, 1 当量) 的 MeOH (5ml) 溶液。原始材料在 3-4h 内消失。然后用冰浴使酸性溶液冷却至 0℃, 并用 Na₂CO₃ (1. 21g, 11. 5mmol, 5 当量) 水溶液将其猝灭。除去甲醇, 并向悬浮液中添加另外 8 当量的 Na₂CO₃ (1. 95g, 18. 4mmol)。然后添加清除镍的 EDTA 二钠盐二水合物 (1. 68g, 4. 5mmol, 2 当量), 并搅拌该悬浮液 2h。添加 Fmoc-OSu (0. 84g, 2. 5mmol, 1. 1 当量) 的丙酮 (50mL) 溶液并搅拌该反应液过夜。之后, 用乙醚和 1N HCl 稀释该反应液。然后用硫酸镁干燥有机层, 并在真空中浓缩。在正相上使用丙酮和二氯甲烷作为洗脱液纯化所需产物 6, 得到白色泡沫 (0. 9g, 70% 产率)。Fmoc- α Me-6Cl-Trp (Boc)-OH, 6 :M+H 计算 575. 19, M+H 观测 575. 37 ;¹H NMR (CDCl₃) 1. 59 (s, 9H, Boc) ;1. 68 (s, 3H, Me) ;3. 48 (bs, 2H, CH₂) ;4. 22 (m, 1H, CH) ;4. 39 (bs, 2H, CH₂) ;5. 47 (s, 1H, NH) ;7. 10 (m, 1H) ;7. 18 (m, 2H) ;7. 27 (m, 2H) ;7. 39 (m, 2H) ;7. 50 (m, 2H) ;7. 75 (d, 2H) ;8. 12 (bs, 1H)。

6Cl-Trp (Boc)-Ni-S-BPB, 5。在氩气下向 Gly-Ni-S-BPB (4. 6g, 9. 2mmol, 1 当量) 和 KO-tBu (1. 14g, 10. 1mmol, 1. 1 当量) 中加入 95mL DMF。通过注射器添加溴化物衍生化合物 3 (3. 5g, 4. 6mmol, 1. 1 当量) 在 DMF (10mL) 中的溶液。在环境温度下搅拌反应混合物 1h。然后用 5% 的醋酸水溶液猝灭溶液, 并用水稀释。在二氯甲烷中萃取所需产物, 干燥并浓缩。在正相上使用 EtOAc 和己烷作为洗脱液通过快速色谱法 (固体加载) 纯化油状产物 5, 得到红色固体 (5g, 71% 产率)。6Cl-Trp (Boc)-Ni-S-BPB, 5 :M+H 计算 761. 20, M+H 观测 761. 34 ;¹H NMR (CDCl₃) δ :1. 58 (m, 11H, Boc+CH₂) ;1. 84 (m, 1H) ;1. 96 (m, 1H) ;2. 24 (m, 2H, CH₂) ;3. 00 (m, 1H, CH_a) ;3. 22 (m, 2H, CH₂) ;3. 45 和 4. 25 (AB 系统, 2H, CH₂ (苯甲基), J = 12. 8Hz) ;4. 27 (m, 1H, CH_a) ;6. 65 (d, 2H) ;6. 88 (d, 1H) ;7. 07 (m, 2H) ;7. 14 (m, 2H) ;7. 28 (m, 3H) ;7. 35-7. 39 (m, 2H) ;7. 52 (m, 2H) ;7. 96 (d, 2H) ;8. 28 (m, 2H)。

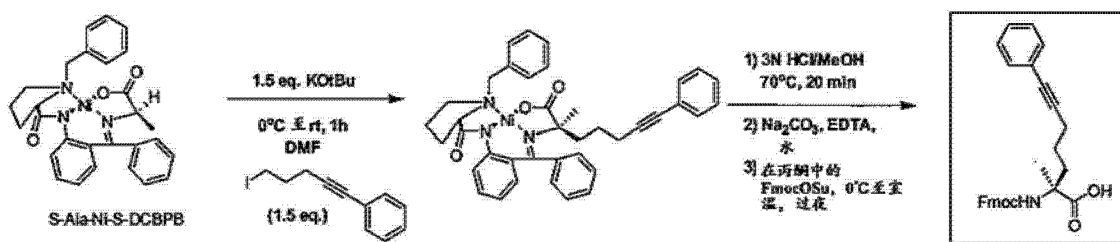
Fmoc-6Cl-Trp (Boc)-OH, 7。向 50℃ 下的 3N HCl/MeOH (1/3, 44mL) 溶液中逐滴加入化合物 5 (5g, 6. 6mmol, 1 当量) 在 MeOH (10ml) 中的溶液。原始材料在 3-4h 内消失。然后用冰浴使酸性溶液冷却至 0℃, 并用 Na₂CO₃ (3. 48g, 33mmol, 5 当量) 水溶液将其猝灭。除去甲醇, 并向悬浮液中添加另外 8 当量的 Na₂CO₃ (5. 57g, 52mmol)。然后添加清除镍的 EDTA 二钠盐二水合物 (4. 89g, 13. 1mmol, 2 当量), 并搅拌悬浮液 2h。添加 Fmoc-OSu (2. 21g, 6. 55mmol, 1. 1 当量) 在丙酮 (100mL) 中的溶液, 并搅拌反应液过夜。之后, 用乙醚和 1N HCl 稀释该反应液。然后用硫酸镁干燥有机层, 并在真空中浓缩。在正相上使用丙酮和二氯甲烷作为

洗脱液纯化所需产物 7, 得到白色泡沫 (2.6g, 69% 产率)。Fmoc-6Cl-Trp(Boc)-OH, 7 :M+H 计算 561.17, M+H 观测 561.37; ^1H NMR(CDCl_3) 1.63(s, 9H, Boc); 3.26(m, 2H, CH_2); 4.19(m, 1H, CH); 4.39(m, 2H, CH_2); 4.76(m, 1H); 5.35(d, 1H, NH); 7.18(m, 2H); 7.28(m, 2H); 7.39(m, 3H); 7.50(m, 2H); 7.75(d, 2H); 8.14(bs, 1H)。

实施例 1a: 用于合成式 I 化合物的炔烃化合物的合成



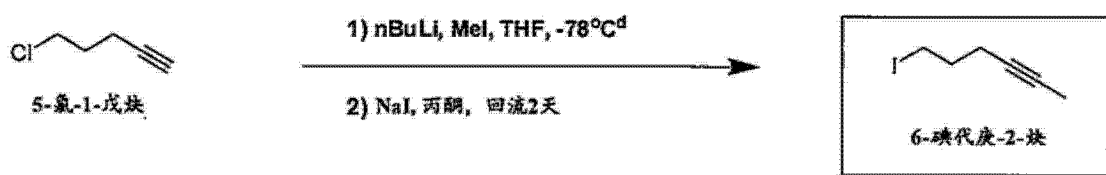
(5-碘代戊-1-炔基)苯的合成。向加入反应烧瓶的 THF 溶液 (200mL) 中加入 (5-氯代戊-1-炔基)苯苯乙炔 (10g, 97.91mmol)。然后将反应混合物在干冰浴中冷却至 -78°C 。逐滴加入 nBuLi (95.95mmol, 38.39mL) 并使其在 -78°C 下反应 0.5 小时。在 -78°C 下, 加入 1-溴-3-氯丙烷。搅拌 5 小时, 在此期间使反应物升温至室温。然后将反应物在 90°C 下回流 3 小时。将溶剂蒸出, 然后加入水 (150mL) 和乙醚 (150mL)。萃取粗产物, 蒸馏出乙醚, 并将得到的粗混合物溶解在丙酮中。将碘化钠 (22.92mmol, 3.44g) 加入到该溶液中。将连接有回流冷凝器的反应混合物加热至 70°C 保持两天。用短程蒸馏装置蒸出丙酮。加入乙醚 (150mL) 和水 (150mL) 并进行萃取。然后将乙醚经硫酸镁干燥并蒸馏除去, 得到 5.00g 产物 (收率 98%)。无需进行进一步纯化。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 2.072(m, 2H, CH_2); 2.605(t, 2H, CH_2); 3.697(m, 2H, CH_2); 7.276(m, 2H, 苯基); 7.389(m, 2H, 苯基); 7.484(m, 1H, 苯基)。



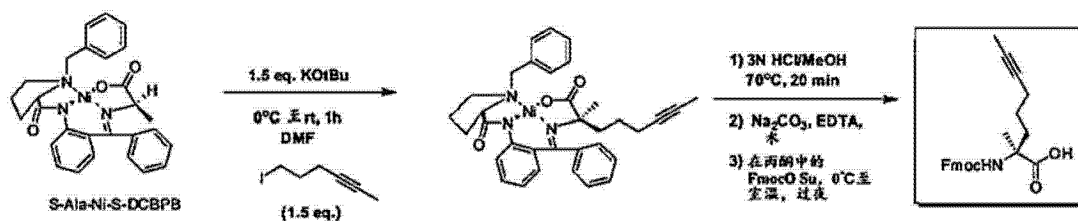
MeS5-苯基炔-Ni-S-BPB 的合成。在氩气下向 S-Ala-Ni-S-BPB (18.17mmol, 9.30g) 和 KO-tBu (27.26mmol, 3.05g) 中加入 200mL 的 DMF。通过注射器加入在 DMF 溶液 (50mL) 中的 (5-碘代戊-1-炔基)苯 (27.26mmol, 7.36g)。将反应混合物在环境温度下搅拌 1 小时。然后将溶液用乙酸 (27.26mmol, 1.58mL) 进行猝灭, 并用水 (100mL) 进行稀释。将产物用二氯甲烷 (100mL) 萃取, 分离并经硫酸镁干燥。通过正相急骤层析使用丙酮和二氯甲烷作为洗脱剂对粗产物进行纯化, 得到呈红色固体的所需产物 (9.48 克, 79.8%)。M+H 计算 654.22, M+H 实测 654.4; ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.17(s, 3H, Me(α Me-Phe)); 1.57(m, 1H, CH_2); 1.67(m, 1H, CH_2); 1.89(m, 1H, CH_2); 2.06(m, 1H, CH_2); 2.24(m, 2H, CH_2); 3.05(m, 1H); 3.18(s, 2H); 3.26(m, 1H); 3.56 和 4.31 (AB 系统, 2H, CH_2 (苯基), $J = 12.8\text{Hz}$); 6.64(m, 2H); 6.94(d, 1H); 7.12(m, 1H); 7.20(m, 1H); 7.20-7.40(m, 10H); 7.43(m, 2H); 8.01(d, 2H); 8.13(m, 1H)。

(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基氨基)-2-甲基-7-苯基庚-6-炔酸的合成。向 70°C 下的 3N 的 HCl/MeOH 溶液 (1/1, 23mL) 中逐滴加入 MeS5-苯基炔-Ni-S-BPB (14.5mmol, 9.48g) 的 MeOH (70mL) 溶液。原料在 10-20min 内消失。然后真空浓缩绿色的反应混合

物。加入水 (100mL), 并将所得的沉淀物 (S-BPB HCl 盐) 滤出。将碳酸钠 (116mmol, 12.29g) 和 EDTA (29mmol, 10.79g) 加入到母液中。将混合物在室温下搅拌 3 小时, 以清除游离的镍。加入 50mL 的丙酮后, 将反应液用冰浴冷却至 0℃。加入溶解于丙酮 (50mL) 中的 Fmoc-OSu (16.68mmol, 5.62g), 并在过夜搅拌下使反应液升温至环境温度。之后, 用乙酸乙酯 (300mL) 稀释反应物。然后分离有机层。用浓盐酸酸化水层。将所需产物用二氯甲烷 (400mL) 萃取, 经硫酸镁干燥并进行真空浓缩。通过正相急骤层析使用 10% 的 MBTE/DCM 作为洗脱剂对粗产物进行纯化, 得到呈白色固体的所需产物 (6.05g, 51%)。M+H 计算 454.53, M+H 实测 454.2; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.50 (bs, 2H, CH_2); 1.60 (bs, 3H, CH_3); 2.05 (bs, 1H, CH_2); 2.30 (bs, 1H, CH_2); 2.42 (bs, 2H, CH_2); 4.20 (m, 1H, CH); 4.40 (bs, 2H, CH_2); 5.58 (s, 1H, NH); 7.26 (m, 3H); 7.32 (m, 2H); 7.37 (m, 4H); 7.58 (d, 2H); 7.76 (d, 2H)。



6-碘代庚-2-炔的合成。向加入反应烧瓶的 THF 溶液 (250 毫升) 中加入 5-氯-1-戊炔 (48.7mmol, 5.0g)。然后将反应混合物在干冰浴中冷却至 -78℃。逐滴加入 nBuLi (51.1mmol, 20.44mL), 并使其在 -78℃ 下反应 0.5 小时, 并升温至室温。然后将碘甲烷 (54.5mmol, 3.39mL) 加入到反应混合物中。将反应混合物搅拌 5 小时。加入水 (1.5mL) 并蒸出 THF。用戊烷 (100mL) 和水 (100mL) 萃取粗产物。蒸出戊烷, 并将得到的粗混合物溶解于丙酮 (300mL) 中。将碘化钠 (172.9mmol, 25.92g) 加入到溶液中。将连接有回流冷凝器的反应混合物加热至 70℃ 保持两天。用短程蒸馏装置蒸出丙酮。加入乙醚 (100mL) 和水 (100mL) 并进行萃取。然后将乙醚经硫酸镁干燥并蒸馏除去, 得到 8.35g 产物 (收率 83%)。无需进行进一步纯化。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.762 (t, 3H, CH_3); 1.941 (m, 2H, CH_2); 2.245 (m, 2H, CH_2); 3.286 (m, 2H, CH_2)。



MeS5-甲基炔-Ni-S-BPB 的合成。在氩气下向 S-Ala-Ni-S-BPB (19.53mmol, 10g) 和 KO-tBu (29.29mmol, 3.28g) 中加入 200mL 的 DMF。通过注射器加入在 DMF 溶液 (50mL) 中的 6-碘代庚-2-炔 (29.29mmol, 6.09g)。将反应混合物在环境温度下搅拌 1 小时。然后将溶液用乙酸 (29.29mmol, 1.69mL) 进行猝灭, 并用水 (100mL) 稀释。将产物用二氯甲烷 (300mL) 萃取, 分离并经硫酸镁干燥。通过正相急骤层析使用丙酮和二氯甲烷作为洗脱剂对粗产物进行纯化, 得到呈红色固体的所需产物 (8.10g, 70%)。M+H 计算 592.2, M+H 实测 592.4; ^1H NMR (500Mz, CDCl_3) δ 1.17 (s, 3H, CH_3 (α Me-Phe)); 1.57 (m, 1H, CH_2); 1.67 (m, 1H, CH_2); 1.89 (m, 1H, CH_2); 2.06 (m, 1H, CH_2); 2.24 (m, 2H, CH_2); 3.05 (m, 1H); 3.18 (s, 2H); 3.26 (m, 1H); 3.56 和 4.31 (AB 系统, 2H, CH_2 (苯基), $J = 12.8\text{Hz}$); 6.64 (m, 2H); 6.94 (d, 1H); 7.12 (m, 1H); 7.20 (m, 1H); 7.20-7.40 (m, 10H); 7.43 (m, 2H); 8.01 (d, 2H); 8.13 (m, 1H)。

(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基氨基)-2-甲基辛-6-炔酸的合成。向 70℃ 下的 3N 的 HCl/MeOH 溶液 (1/1, 23mL) 中逐滴加入 MeS5-甲基炔-Ni-S-BPB (13.70mmol, 8.10g) 的甲醇 (70mL) 溶液。原料在 10-20min 内消失。然后真空浓缩绿色的反应混合物。加入水 (150mL), 并将所得的沉淀物 (S-BPB HCl 盐) 滤出。将碳酸钠 (116mmol, 12.29g) 和 EDTA (29mmol, 10.79g) 加入到母液中。将混合物在室温下搅拌 3 小时, 以清除游离的镍。加入 75mL 的丙酮后, 将反应液用冰浴冷却至 0℃。加入溶解于丙酮 (75mL) 中的 Fmoc-OSu (15.76mmol, 5.31g), 并在过夜搅拌下使反应液升温至环境温度。之后, 用乙酸乙酯 (200mL) 稀释反应物。然后分离有机层。用浓盐酸酸化水层。将所需产物用二氯甲烷 (200mL) 萃取, 经硫酸镁干燥并进行真空浓缩。通过正相急骤层析使用 10% 的 MBTE/DCM 作为洗脱剂对粗产物进行纯化, 得到呈白色固体的所需产物 (2.40g, 45%)。M+H 计算 392.18, M+H 实测 392.3; ¹H NMR (500Mz, CDCl₃) δ 1.38 (bs, 1H, CH₂); 1.50 (bs, 1H, CH₂); 1.60 (bs, 2H, CH₂); 1.75 (s, 3H, CH₃); 1.95 (bs, 2H, CH₂); 2.10 (bs, 3H, CH₃); 4.20 (m, 1H, CH); 4.40 (bs, 2H, CH₂); 5.58 (s, 1H, NH); 7.32 (m, 2H); 7.42 (m, 2H); 7.59 (d, 2H); 7.78 (d, 2H)。

实施例 2: 式 I 的拟肽大环化合物

拟肽大环化合物如本文和 2008 年 2 月 25 日提交的未决的美国专利申请号 12/037,041 所述制备, 该申请特此通过引用整体并入。通过用相对应的合成氨基酸替代两个或多个天然存在的氨基酸来设计拟肽大环化合物。替代在 i 和 i+4 以及 i 和 i+7 位进行。使用固相条件、Rink Amide AM 树脂 (Novabiochem) 和 Fmoc 主链保护基团化学法人工地或在自动化肽合成仪 (Applied Biosystems, 433A 型) 上进行肽合成。对于天然 Fmoc 保护的氨基酸 (Novabiochem) 的偶联, 使用 10 当量的氨基酸和 1 : 1 : 2 摩尔比的偶联试剂 HBTU/HOBt (Novabiochem)/DIEA。非天然氨基酸 (4 当量) 与 1 : 1 : 2 摩尔比的 HATU (Applied Biosystems)/HOBt/DIEA 偶联。合成肽的 N 末端被乙酰化, 而 C 末端被酰胺化。

通常, 以 0.5mmol 规模在 PEG-PS 树脂 (加载 0.45mmol/g) 上合成完全保护的结合树脂的肽。通过采用在 DMF 中的 20% (v/v) 的哌啶对结合树脂的肽进行 3×10min 的处理来实现临时 Fmoc 基团的脱保护。用 NMP (3×)、二氯甲烷 (3×) 和 NMP (3x) 洗涤后, 通过与适当的预活化的 Fmoc-氨基酸衍生物进行 1×60min 的温育来实现每个连续氨基酸的偶联。在将偶联溶液转移至脱保护的结合树脂的肽之前, 将所有被保护的氨基酸 (1.0mmol) 溶解在 NMP 中, 并用 HCTU (1.0mmol)、Cl-HOBt (1.0mmol) 和 DIEA (2.0mmol) 进行活化。偶联反应完成后, 洗涤树脂, 准备下一个脱保护/偶联循环。在存在于 NMP 中的乙酸酐/DIEA 的存在下进行氨基末端的乙酰化。对从完全组装的结合树脂的肽的等分试样所获得的已切割和脱保护的样品进行 LC-MS 分析以验证每个偶联的完成。

在用于制备包含 1,4-三唑基的拟肽大环化合物 (例如 SP153) 的一个典型实例中, 将 DMF 中的 20% (v/v) 的 2,6-二甲基吡啶加入到在 40mL 玻璃小瓶中的肽树脂 (0.5mmol) 中并摇动 10 分钟。然后加入抗坏血酸钠 (0.25g, 1.25mmol) 和二异丙基乙胺 (0.22mL, 1.25mmol), 接着加入碘化亚铜 (I) (0.24g, 1.25mmol), 并将所得反应混合物在环境温度下机械摇动 16 小时。

在用于制备包含 1,5-三唑基的拟肽大环化合物 (SP932, SP933) 的一个典型实例中, 用无水 DCM 洗涤肽树脂 (0.25mmol)。将树脂装入微波小瓶中。对容器进行抽真空并用氮气进行吹扫。加入氯 (五甲基环戊二烯基) 双 (三苯基膦) 钨 (II), 10% 装载量,

(Strem44-0117)。将无水甲苯加入到反应容器中。然后将反应物装入微波,并在 90℃保持 10 分钟。可能需要在随后的时间推动反应以完成反应。在其它情况下,可使用氯(1,5-环辛二烯)(五甲基环戊二烯基)钌(“CP*RuCl(cod)”),例如,在室温下在包含甲苯的溶剂中。

在用于制备包含碘取代的三唑基的拟肽大环化合物(如 SP457)的一个典型实例中,将 THF(2ml)加入到在 40ml 玻璃小瓶中的肽树脂(0.05mmol)中,并摇动 10 分钟。然后加入 N-溴代琥珀酰亚胺(0.04g,0.25mmol)、碘化亚铜(I)(0.05g,0.25mmol)和二异丙基乙胺(0.04ml,0.25mmol),并将所得反应混合物在环境温度下机械摇动 16 小时。碘代-三唑交联体可通过偶联反应进一步被取代,例如采用硼酸,以产生拟肽大环化合物如 SP465。在一个典型的实例中,将 DMF(3ml)加入到在 40ml 玻璃小瓶中的碘代-三唑肽树脂(0.1mmol)中,并摇动 10 分钟。然后加入苯基硼酸(0.04g,0.3mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(0.006g,0.005mmol)和碳酸钾(0.083g,0.6mmol),并将所得反应混合物在 70℃下机械摇动 16 小时。碘代-三唑交联体也可通过偶联反应进一步被取代,例如用末端炔(例如 Sonogashira 偶联),以产生拟肽大环化合物如 SP468。在一个典型的实例中,将 2:1 的 THF:三乙胺(3ml)加入到在 40ml 玻璃小瓶中的碘代-三唑肽树脂(0.1mmol)中,并摇动 10 分钟。加入 N-BOC-4-戊炔-1-胺(0.04g,0.2mmol)和双(三苯基膦)氯化钯(0.014g,0.02mmol)并摇动 5 分钟。然后加入碘化亚铜(I)(0.004g,0.02mmol),并将所得反应混合物在 70℃下机械摇动 16 小时。

在室温下通过用 TFA/H₂O/TIS(95/5/5v/v)处理 2.5h 来将三唑环化的结合树脂的肽进行脱保护并从固体载体上切下。将树脂过滤后,使 TFA 溶液在冷乙醚中沉淀并进行离心,以生产呈固体的所需产物。通过制备型 HPLC 对粗产物进行纯化。例如,通过在反相 C18 柱(Varian)上的高效液相色谱法(HPLC)(Varian ProStar)来实现交联化合物的纯化,以产生纯的化合物。通过 LC/MS 质谱法(与 Agilent 1100 HPLC 系统接口连接的 Micromass LCT)和氨基酸分析(Applied Biosystems,型号 420A)确认该纯产物的化学组成。

表 4 显示了式 I 的拟肽大环化合物的列表。

表 4

SP-	序列
1	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAA-NH2
2	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAibA-NH2
3	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAN1e-NH2
4	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAL-NH2
5	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAM-NH2
6	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAhL-NH2
7	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAF-NH2

8	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAI-NH2
9	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SACg-NH2
10	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAAib-NH2
11	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAA-NH2
12	Ac-LTF\$4rn6AYWA\$4a5L\$S\$N1e-NH2
13	Ac-LTF\$4rn6AYWA\$4a5L\$S\$A-NH2
14	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAN1e-NH2
15	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAL-NH2
16	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAM-NH2
17	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAhL-NH2
18	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAF-NH2
19	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAI-NH2
SP-	序列
20	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AACHg-NH2
21	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AACHa-NH2
22	Ac-F\$4rn6AYWEAc3cL\$4a5AAAib-NH2
23	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAibV-NH2
24	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAibV-NH2
25	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAibAA-NH2
26	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAibAA-NH2
27	Ac-HLTF\$4rn6HHWHQL\$4a5AAN1eN1e-NH2
28	Ac-DLTF\$4rn6HHWHQL\$4a5RRLV-NH2
29	Ac-HHTF\$4rn6HHWHQL\$4a5AAML-NH2
30	Ac-F\$4rn6HHWHQL\$4a5RRDCha-NH2

31	Ac-F\$4rn6HHWHQL\$4a5HRFV-NH2
32	Ac-HLTF\$4rn6HHWHQL\$4a5AAhLA-NH2
33	Ac-DLTF\$4rn6HHWHQL\$4a5RRChg1-NH2
34	Ac-DLTF\$4rn6HHWHQL\$4a5RRChg1-NH2
35	Ac-HHTF\$4rn6HHWHQL\$4a5AACHav-NH2
36	Ac-F\$4rn6HHWHQL\$4a5RRDa-NH2
37	Ac-F\$4rn6HHWHQL\$4a5HRAibG-NH2
38	Ac-F\$4rn6AYWAQL\$4a5HHN1eL-NH2
39	Ac-F\$4rn6AYWSAL\$4a5HQAN1e-NH2
40	Ac-F\$4rn6AYWVQL\$4a5QHChg1-NH2
41	Ac-F\$4rn6AYWTAL\$4a5QQN1ev-NH2
42	Ac-F\$4rn6AYWYQL\$4a5HAibAa-NH2
43	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5HHLA-NH2
44	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5HHLA-NH2
45	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5HQN1ev-NH2
46	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5HQN1ev-NH2
47	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5QQM1-NH2
48	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5QQM1-NH2
49	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5HAibhLV-NH2
50	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AHFA-NH2
51	Ac-HLTF\$4rn6HHWHQL\$4a5AAN1e1-NH2
52	Ac-DLTF\$4rn6HHWHQL\$4a5RRLa-NH2
53	Ac-HHTF\$4rn6HHWHQL\$4a5AAMv-NH2
54	Ac-F\$4rn6HHWHQL\$4a5RRDA-NH2

55	Ac-F\$4rn6HHWHQL\$4a5HRFCha-NH2
56	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHAm
57	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHiAm
58	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHnPr3Ph
59	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHnBu33Me
60	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHnPr
61	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHnEt2Ch
62	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHnEt2Cp
63	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AA-NHHex
64	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAIA-NH2
65	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AALA-NH2
66	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAMA-NH2
67	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAMA-NH2
68	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
69	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
70	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAIa-NH2
71	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAIa-NH2
72	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAMa-NH2
73	AcLTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAMa-NH2
74	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1ea-NH2
SP-	序列
75	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1ea-NH2
76	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAIv-NH2
77	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAIv-NH2

78	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAMv-NH2
79	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAN1ev-NH2
80	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAN1ev-NH2
81	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAI1-NH2
82	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAI1-NH2
83	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAM1-NH2
84	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1e1-NH2
85	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1e1-NH2
86	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAMA-NH2
87	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAN1eA-NH2
88	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAIa-NH2
89	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAMa-NH2
90	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAN1ea-NH2
91	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAIv-NH2
92	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAMv-NH2
93	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAN1ev-NH2
94	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAI1-NH2
95	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAM1-NH2
96	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAN1e1-NH2
97	Ac-F\$4rn6AYWEAL\$4a5AAN1e1-NH2
98	Ac-LTF\$4rn6AY6c1WAQL\$4a5SAA-NH2
99	Ac-LTF\$4rn6AY6c1WAQL\$4a5SAA-NH2
100	Ac-WTF\$4rn6FYWSQL\$4a5AVAa-NH2
101	Ac-WTF\$4rn6FYWSQL\$4a5AVAa-NH2

102	Ac-WTF\$4rn6VYWSQL\$4a5AVA-NH2
103	Ac-WTF\$4rn6VYWSQL\$4a5AVA-NH2
104	Ac-WTF\$4rn6FYWSQL\$4a5SAAa-NH2
105	Ac-WTF\$4rn6FYWSQL\$4a5SAAa-NH2
106	Ac-WTF\$4rn6VYWSQL\$4a5AVAaa-NH2
107	Ac-WTF\$4rn6VYWSQL\$4a5AVAaa-NH2
108	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AVG-NH2
109	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AVG-NH2
110	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AVQ-NH2
111	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AVQ-NH2
112	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAa-NH2
113	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAa-NH2
114	Ac-LTF\$4rn6AYWAQhL\$4a5SAA-NH2
115	Ac-LTF\$4rn6AYWAQhL\$4a5SAA-NH2
116	Ac-LTF\$4rn6AYWEQLStSA\$4a5-NH2
117	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SLA-NH2
118	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SLA-NH2
119	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SWA-NH2
120	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SWA-NH2
121	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SVS-NH2
122	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SAS-NH2
123	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5SVG-NH2
124	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SAa-NH2
125	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SAA-NH2

126	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVA-NH2
127	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SLA-NH2
128	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SWA-NH2
129	Ac-ETF\$4rn6KYWAQL\$4a5SWA-NH2
SP-	序列
130	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVS-NH2
131	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SAS-NH2
132	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVG-NH2
133	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SSa-NH2
134	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SSa-NH2
135	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SNa-NH2
136	Ac-ETF\$4rn6VYWAQL\$4a5SNa-NH2
137	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SAa-NH2
138	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVA-NH2
139	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVA-NH2
140	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SWA-NH2
141	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVS-NH2
142	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVS-NH2
143	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SAS-NH2
144	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SAS-NH2
145	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVG-NH2
146	Ac-LTF\$4rn6VYWAQL\$4a5SVG-NH2
147	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCha\$4a5SAA-NH2
148	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCha\$4a5SAA-NH2

149	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCpg\$4a5SAA-NH2
150	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCpg\$4a5SAA-NH2
151	Ac-LTF\$4rn6EYWAQF\$4a5SAA-NH2
152	Ac-LTF\$4rn6EYWAQF\$4a5SAA-NH2
153	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
154	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
155	Ac-LTF3C1\$4rn6EYWAQL\$4a5SAA-NH2
156	Ac-LTF3C1\$4rn6EYWAQL\$4a5SAA-NH2
157	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWAQL\$4a5SAA-NH2
158	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWAQL\$4a5SAA-NH2
159	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWAQhL\$4a5SAA-NH2
160	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWAQhL\$4a5SAA-NH2
161	Ac-ETF\$4rn6EYWAQL\$4a5SAA-NH2
162	Ac-LTF\$4rn6AYWVQL\$4a5SAA-NH2
163	Ac-LTF\$4rn6AHWAQL\$4a5SAA-NH2
164	Ac-LTF\$4rn6AEWAQL\$4a5SAA-NH2
165	Ac-LTF\$4rn6ASWAQL\$4a5SAA-NH2
166	Ac-LTF\$4rn6AEWAQL\$4a5SAA-NH2
167	Ac-LTF\$4rn6ASWAQL\$4a5SAA-NH2
168	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQL\$4a5SAA-NH2
169	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQL\$4a5SAA-NH2
170	Ac-LTF\$4rn6AHWAQL\$4a5AAIa-NH2
171	Ac-ITF\$4rn6FYWAQL\$4a5AAIa-NH2
172	Ac-ITF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAIa-NH2

173	Ac-ITF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAIa-NH2
174	Ac-ETF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAIa-NH2
175	Ac-ETF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAIa-NH2
176	Ac-LTF\$4rn6AHWVQL\$4a5AAIa-NH2
177	Ac-ITF\$4rn6FYWVQL\$4a5AAIa-NH2
178	Ac-ITF\$4rn6EYWVQL\$4a5AAIa-NH2
179	Ac-ITF\$4rn6EHWVQL\$4a5AAIa-NH2
180	Ac-LTF\$4rn6AEWAQL\$4a5AAIa-NH2
181	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQL\$4a5AAIa-NH2
182	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQL\$4a5AAIa-NH2
183	Ac-LTF\$4rn6AHWAQL\$4a5AHFA-NH2
184	Ac-ITF\$4rn6FYWAQL\$4a5AHFA-NH2
SP-	序列
185	Ac-ITF\$4rn6FYWAQL\$4a5AHFA-NH2
186	Ac-ITF\$4rn6FHWAQL\$4a5AEFA-NH2
187	Ac-ITF\$4rn6FHWAQL\$4a5AEFA-NH2
188	Ac-ITF\$4rn6EHWAQL\$4a5AHFA-NH2
189	Ac-ITF\$4rn6EHWAQL\$4a5AHFA-NH2
190	Ac-LTF\$4rn6AHWVQL\$4a5AHFA-NH2
191	Ac-ITF\$4rn6FYWVQL\$4a5AHFA-NH2
192	Ac-ITF\$4rn6EYWVQL\$4a5AHFA-NH2
193	Ac-ITF\$4rn6EHWVQL\$4a5AHFA-NH2
194	Ac-ITF\$4rn6EHWVQL\$4a5AHFA-NH2
195	Ac-ETF\$4rn6EYWAAL\$4a5SAA-NH2

196	Ac-LTF\$4rn6AYWVAL\$4a5SAA-NH2
197	Ac-LTF\$4rn6AHWAAL\$4a5SAA-NH2
198	Ac-LTF\$4rn6AEWAAL\$4a5SAA-NH2
199	Ac-LTF\$4rn6AEWAAL\$4a5SAA-NH2
200	Ac-LTF\$4rn6ASWAAL\$4a5SAA-NH2
201	Ac-LTF\$4rn6ASWAAL\$4a5SAA-NH2
202	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAIa-NH2
203	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AAIa-NH2
204	Ac-LTF\$4rn6AYWAAL\$4a5AHFa-NH2
205	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AHIa-NH2
206	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AHIa-NH2
207	Ac-LTF\$4rn6AHWAQL\$4a5AHIa-NH2
208	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AHIa-NH2
209	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAFa-NH2
210	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAFa-NH2
211	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAWa-NH2
212	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAVa-NH2
213	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAVa-NH2
214	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AALa-NH2
215	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AALa-NH2
216	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAIa-NH2
217	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAIa-NH2
218	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAFa-NH2
219	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAFa-NH2

220	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAVa-NH2
221	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAVa-NH2
222	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAIa-NH2
223	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAIa-NH2
224	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAWa-NH2
225	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AAWa-NH2
226	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AALa-NH2
227	Ac-LTF\$4rn6EHWAQL\$4a5AALa-NH2
228	Ac-ETF\$4rn6EHVQL\$4a5AALa-NH2
229	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAa-NH2
230	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAa-NH2
231	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAibA-NH2
232	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAibA-NH2
233	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAAa-NH2
234	Ac-LTF\$r5AYWAQL\$4a5s8AAIa-NH2
235	Ac-LTF\$r5AYWAQL\$4a5s8SAA-NH2
236	Ac-LTF\$4rn6AYWAQCba\$4a5AANleA-NH2
237	Ac-ETF\$4rn6AYWAQCba\$4a5AANleA-NH2
238	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5AANleA-NH2
239	Ac-LTF\$4rn6AYWAQCba\$4a5AWNleA-NH2
SP-	序列
240	Ac-ETF\$4rn6AYWAQCba\$4a5AWNleA-NH2
241	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5AWNleA-NH2
242	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAFA-NH2

243	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAN1eA-NH2
244	Ac-LTF\$4rn6EF4coohWAQCba\$4a5SAN1eA-NH2
245	Ac-LTF\$4rn6EYWSQCba\$4a5SAN1eA-NH2
246	Ac-LTF\$4rn6EYWWQCba\$4a5SAN1eA-NH2
247	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5AA1a-NH2
248	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWAQCba\$4a5AA1a-NH2
249	Ac-LTF\$4rn6EF4coohWAQCba\$4a5AA1a-NH2
250	Pam-ETF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
251	Ac-LThF\$4rn6EFWAQCba\$4a5SAA-NH2
252	Ac-LTA\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
253	Ac-LTF\$4rn6EYAAQCba\$4a5SAA-NH2
254	Ac-LTF\$4rn6EY2Na1AQCb\$4a5SAA-NH2
255	Ac-LTF\$4rn6AYWAQCba\$4a5SAA-NH2
256	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAF-NH2
257	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAFa-NH2
258	Ac-LTF\$4rn6AYWAQCba\$4a5SAF-NH2
259	Ac-LTF34F2\$4rn6AYWAQCba\$4a5SAF-NH2
260	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQCba\$4a5SAF-NH2
261	Ac-LTF\$4rn6EY6c1WAQCba\$4a5SAF-NH2
262	Ac-LTF\$4rn6AYWSQCba\$4a5SAF-NH2
263	Ac-LTF\$4rn6AYWWQCba\$4a5SAF-NH2
264	Ac-LTF\$4rn6AYWAQCba\$4a5AA1a-NH2
265	Ac-LTF34F2\$4rn6AYWAQCba\$4a5AA1a-NH2
266	Ac-LTF\$4rn6AY6c1WAQCba\$4a5AA1a-NH2

267	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWQCba\$4a5AAIa-NH2
268	Ac-LTF\$4rn6EYWQCba\$4a5AAFa-NH2
269	Ac-LTF\$4rn6EYWQCba\$4a5AAFa-NH2
270	Ac-ETF\$4rn6AYWQCba\$4a5AWN1ea-NH2
271	Ac-LTF\$4rn6EYWQCba\$4a5AWN1ea-NH2
272	Ac-ETF\$4rn6EYWQCba\$4a5AWN1ea-NH2
273	Ac-ETF\$4rn6EYWQCba\$4a5AWN1ea-NH2
274	Ac-LTF\$4rn6AYWQCba\$4a5SAFa-NH2
275	Ac-LTF\$4rn6AYWQCba\$4a5SAFa-NH2
276	Ac-ETF\$4rn6AYWQL\$4a5AWN1ea-NH2
277	Ac-LTF\$4rn6EYWQL\$4a5AWN1ea-NH2
278	Ac-ETF\$4rn6EYWQL\$4a5AWN1ea-NH2
279	Dmaac-LTF\$4rn6EYWQhL\$4a5SAA-NH2
280	Hexac-LTF\$4rn6EYWQhL\$4a5SAA-NH2
281	Napac-LTF\$4rn6EYWQhL\$4a5SAA-NH2
282	Decac-LTF\$4rn6EYWQhL\$4a5SAA-NH2
283	Admac-LTF\$4rn6EYWQhL\$4a5SAA-NH2
284	Tmac-LTF\$4rn6EYWQhL\$4a5SAA-NH2
285	Pam-LTF\$4rn6EYWQhL\$4a5SAA-NH2
286	Ac-LTF\$4rn6AYWQCba\$4a5AAN1eA-NH2
287	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWQCba\$4a5AAIa-NH2
288	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWQCba\$4a5SAA-NH2
289	Ac-LTF34F2\$4rn6EYWQCba\$4a5SAA-NH2
290	Ac-LTF\$4rn6EF4coohWQCba\$4a5SAA-NH2

291	Ac-LTF\$4rn6EF4coohWAQCba\$4a5SAA-NH2
292	Ac-LTF\$4rn6EYWSQCba\$4a5SAA-NH2
293	Ac-LTF\$4rn6EYWSQCba\$4a5SAA-NH2
294	Ac-LTF\$4rn6EYWAQhL\$4a5SAA-NH2
SP-	序列
295	Ac-LTF\$4rn6AYWAQhL\$4a5SAF-NH2
296	Ac-LTF\$4rn6AYWAQhL\$4a5SAF-NH2
297	Ac-LTF34F2\$4rn6AYWAQhL\$4a5SAA-NH2
298	Ac-LTF34F2\$4rn6AYWAQhL\$4a5SAA-NH2
299	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQhL\$4a5SAA-NH2
300	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQhL\$4a5SAA-NH2
301	Ac-LTF\$4rn6AYWSQhL\$4a5SAA-NH2
302	Ac-LTF\$4rn6AYWSQhL\$4a5SAA-NH2
303	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
304	Ac-LTF34F2\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
305	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
306	Ac-LTF\$4rn6AYWSQL\$4a5AAN1eA-NH2
307	Ac-LTF34F2\$4rn6AYWAQhL\$4a5AAN1eA-NH2
308	Ac-LTF34F2\$4rn6AYWAQhL\$4a5AAN1eA-NH2
309	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQhL\$4a5AAN1eA-NH2
310	Ac-LTF\$4rn6AF4coohWAQhL\$4a5AAN1eA-NH2
311	Ac-LTF\$4rn6AYWSQhL\$4a5AAN1eA-NH2
312	Ac-LTF\$4rn6AYWSQhL\$4a5AAN1eA-NH2
313	Ac-LTF\$4rn6AYWAQhL\$4a5AAAAa-NH2

314	Ac-LTF\$4rn6AYWAQhL\$4a5AAAAa-NH2
315	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAAa-NH2
316	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAAa-NH2
317	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAAa-NH2
318	Ac-LTF\$4rn6EYWAQhL\$4a5AAN1eA-NH2
319	Ac-AATF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
320	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAA-NH2
321	Ac-ALTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAA-NH2
322	Ac-LTF\$4rn6AYWAQCba\$4a5AAN1eAA-NH2
323	Ac-LTF\$4rn6AYWAQhL\$4a5AAN1eAA-NH2
324	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAA-NH2
325	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAA-NH2
326	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAA-NH2
327	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAA-NH2
328	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
329	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAA-NH2
330	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
331	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAa-NH2
332	Ac-LTF\$4rn6EY6c1WAQCba\$4a5SAA-NH2
333	Ac-LTF\$4rn6EF4cooh6c1WAQCba\$4a5SAN1eA-NH2
334	Ac-LTF\$4rn6EF4cooh6c1WAQCba\$4a5SAN1eA-NH2
335	Ac-LTF\$4rn6EF4cooh6c1WAQCba\$4a5AAIa-NH2
336	Ac-LTF\$4rn6EF4cooh6c1WAQCba\$4a5AAIa-NH2
337	Ac-LTF\$4rn6AY6c1WAQL\$4a5AAAAa-NH2

338	Ac-LTF\$4rn6AY6c1WAQL\$4a5AAAAAa-NH2
339	Ac-F\$4rn6AY6c1WEAL\$4a5AAAAAa-NH2
340	Ac-ETF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
341	Ac-ETF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
342	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
343	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
344	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAAa-NH2
345	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAAa-NH2
346	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5AAAAAa-NH2
347	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5AAAAAa-NH2
348	Ac-LTF\$4rn6EF4coohWAQCba\$4a5AAAAAa-NH2
349	Ac-LTF\$4rn6EF4coohWAQCba\$4a5AAAAAa-NH2
SP-	序列
350	Ac-LTF\$4rn6EYWSQCba\$4a5AAAAAa-NH2
351	Ac-LTF\$4rn6EYWSQCba\$4a5AAAAAa-NH2
352	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAa-NH2
353	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAa-NH2
354	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAa-NH2
355	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAa-NH2
356	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAAa-NH2
357	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAAa-NH2
358	Ac-AALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAAa-NH2
359	Ac-AALTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAAAa-NH2
360	Ac-RTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2

361	Ac-LRF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
362	Ac-LTF\$4rn6EYWRQCba\$4a5SAA-NH2
363	Ac-LTF\$4rn6EYWARCba\$4a5SAA-NH2
364	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5RAA-NH2
365	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SRA-NH2
366	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAR-NH2
367	5-FAM-BaLTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
368	5-FAM-BaLTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
369	Ac-LAF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
370	Ac-ATF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
371	Ac-AAF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
372	Ac-AAAF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
373	Ac-AAAAF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
374	Ac-AATF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
375	Ac-AALTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
376	Ac-AAALTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
377	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eAA-NH2
378	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eAA-NH2
379	Ac-AALTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAN1eAA-NH2
380	Ac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5AAN1eAA-NH2
381	Ac-LTF\$4rn6EYWAQhL\$4a5AAN1eAA-NH2
382	Ac-ALTF\$4rn6EYWAQhL\$4a5AAN1eAA-NH2
383	Ac-LTF\$4rn6ANmYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
384	Ac-LTF\$4rn6ANmYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2

385	Ac-LTF\$4rn6AYNmWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
386	Ac-LTF\$4rn6AYNmWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
387	Ac-LTF\$4rn6AYAmwAQL\$4a5AAN1eA-NH2
388	Ac-LTF\$4rn6AYAmwAQL\$4a5AAN1eA-NH2
389	Ac-LTF\$4rn6AYWAibQL\$4a5AAN1eA-NH2
390	Ac-LTF\$4rn6AYWAibQL\$4a5AAN1eA-NH2
391	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAibN1eA-NH2
392	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAibN1eA-NH2
393	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AaN1eA-NH2
394	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AaN1eA-NH2
395	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5ASarN1eA-NH2
396	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5ASarN1eA-NH2
397	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAib-NH2
398	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAib-NH2
399	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eNmA-NH2
400	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eNmA-NH2
401	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eSar-NH2
402	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eSar-NH2
403	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAAib-NH2
404	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAAib-NH2
SP-	序列
405	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eANmA-NH2
406	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eANmA-NH2
407	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAa-NH2

408	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eAa-NH2
409	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eASar-NH2
410	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eASar-NH2
413	Ac-LTF\$4rn6Cou4YWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
414	Ac-LTF\$4rn6Cou4YWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
415	Ac-LTF\$4rn6AYWCou4QL\$4a5AAN1eA-NH2
416	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5Cou4AN1eA-NH2
417	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5Cou4AN1eA-NH2
418	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5ACou4N1eA-NH2
419	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5ACou4N1eA-NH2
420	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-OH
421	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-OH
422	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NHnPr
423	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NHnPr
424	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NHnBu33Me
425	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NHnBu33Me
426	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NHHex
427	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NHHex
428	Ac-LTA\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
429	Ac-LThL\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
430	Ac-LTF\$4rn6AYAAQL\$4a5AAN1eA-NH2
431	Ac-LTF\$4rn6AY2Na1AQL\$4a5AAN1eA-NH2
432	Ac-LTF\$4rn6EYWCou4QCba\$4a5SAA-NH2
433	Ac-LTF\$4rn6EYWCou7QCba\$4a5SAA-NH2

435	Dmaac-LTF\$4rn6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2
436	Dmaac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
437	Dmaac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
438	Dmaac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
439	Dmaac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
440	Dmaac-LTF\$4rn6EF4coohWAQCba\$4a5AAIa-NH2
441	Dmaac-LTF\$4rn6EF4coohWAQCba\$4a5AAIa-NH2
442	Dmaac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
443	Dmaac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
444	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2
445	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2
446	Cou6BaLTF\$4rn6EYWAQhL\$4a5SAA-NH2
447	Cou8BaLTF\$4rn6EYWAQhL\$4a5SAA-NH2
448	Ac-LTF4I\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2

表 4a

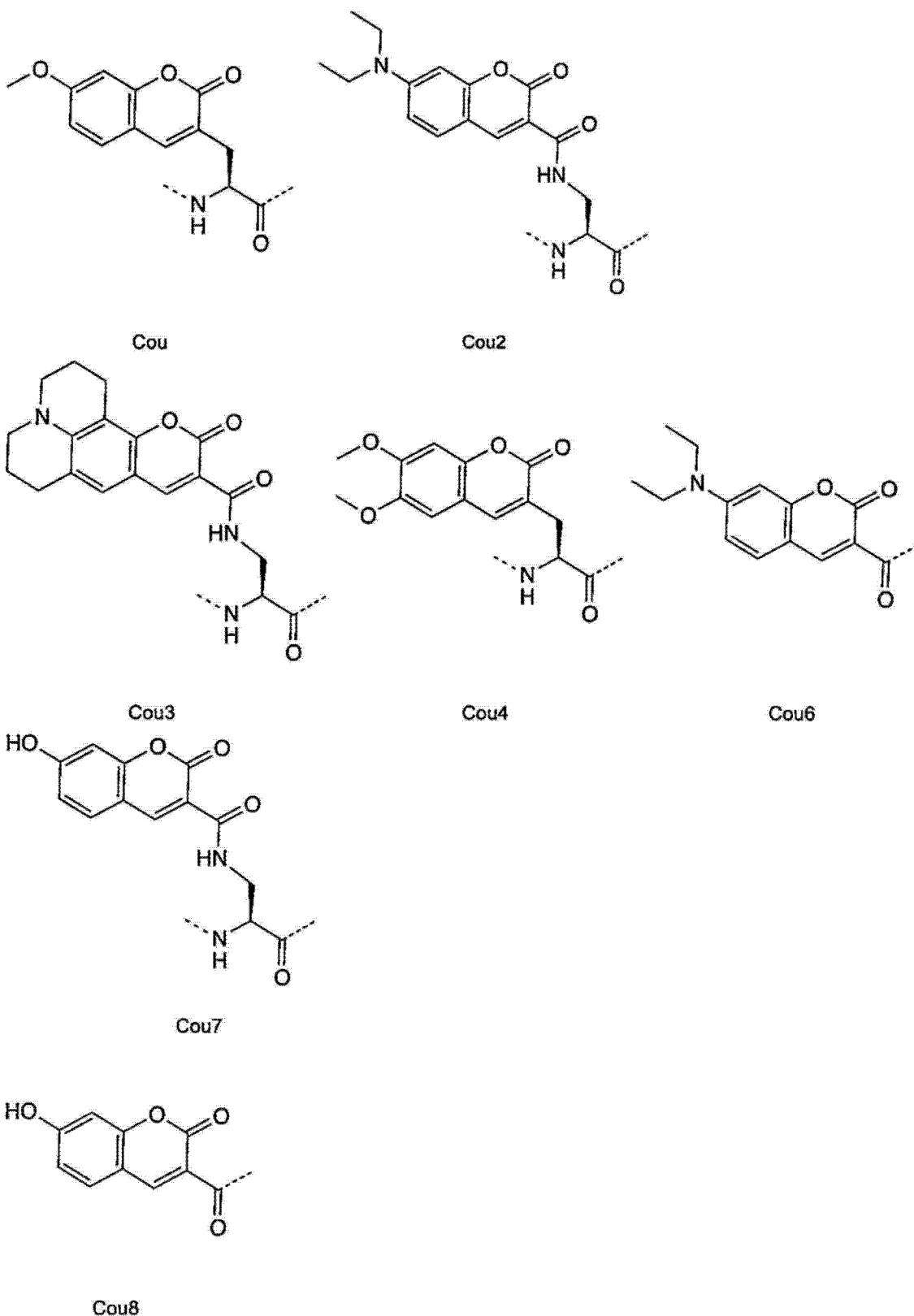
SP	序列	准确质量	实测质量	计 算 (M+1)/1	计 算 (M+2)/2	计 算 (M+3)/3
449	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAN1eA-NH2	1812.01	907.89	1813.02	907.01	605.01
450	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2	1912.04	957.75	1913.05	957.03	638.35
451	Ac-LTF\$4rn6EYWAQL\$4a5AAAAAa-NH2	1970.04	986.43	1971.05	986.03	657.69
452	Ac-LTF\$5rn6AYWAQL\$5a5AAAAAa-NH2	1912.04	957.38	1913.05	957.03	638.35

SP	序列	准确质量	实测质量	计算 (M+1)/1	计算 (M+2)/2	计算 (M+3)/3
153	Ac-LTF\$4m6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2	1784.93	894.38	1785.94	893.47	595.98
454	Ac-LTF\$4m4EYWAQCba\$4a5SAA-NH2	1756.89	880.05	1757.9	879.45	586.64
455	Ac-LTF\$4m5EYWAQCba\$4a5SAA-NH2	1770.91	887.08	1771.92	886.46	591.31
456	Ac-LTF\$5m6EYWAQCba\$5a5SAA-NH2	1784.92	894.11	1785.93	893.47	595.98
457	Ac-LTF\$4m6EYWAQCba5I-\$4a5SAA-NH2	1910.82	957.01	1911.83	956.42	637.95
459	Ac-LTA\$5m6EYWAQCba\$5a5SAA-NH2	1708.89	856	1709.9	855.45	570.64
460	Ac-LTA\$4m6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2	1708.89	856	1709.9	855.45	570.64
461	5-FAM-BaLTF\$4m6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2	2172	1087.81	2173.01	1087.01	725.01
462	5-FAM-BaLTA\$4m6EYWAQCba\$4a5SAA-NH2	2095.97	1049.79	2096.98	1048.99	699.66
463	5-FAM-BaLTF\$5m6EYWAQCba\$5a5SAA-NH2	2172	1087.53	2173.01	1087.01	725.01
464	5-FAM-BaLTA\$5m6EYWAQCba\$5a5SAA-NH2	2095.97	1049.98	2096.98	1048.99	699.66
465	Ac-LTF\$4m6EYWAQCba5Ph-\$4a5SAA-NH2	1675.87	932.31	1676.88	931.48	559.63
466	Ac-LTF\$4m6EYWAQCba5Prp-\$4a5SAA-NH2	1675.87	914.46	1676.88	913.48	559.63
467	Ac-LTF\$4m6AYWAAL\$4a5AAAAAa-NH2	1855.01		1856.02	928.51	619.34
468	Ac-LTF\$4m6EYWAQCba5penNH2-\$4a5SAA-NH2	1675.87		1676.88	838.94	559.63
469	Ac-LTF\$4m6EYWAQCba5BnzNH2-\$4a5SAA-NH2	1675.87		1676.88	838.94	559.63
470	Ac-LTF\$4m6EYWAQCba5prpOMe-\$4a5SAA-NH2		929.17		928.48	
932	Ac-LTF\$5m6EYWAQL4Me\$5a5AAAAAa-NH2	1926.05		1927.06	964.03	643.02
933	Ac-LTF\$5m6EYWAQL4Ph\$5a5AAAAAa-NH2	1988.07		1989.07	995.04	663.70
934	Ac-LTF\$5m6EYWAQCba4Me\$5a5SAANH2	1740.93		1741.94	871.48	581.32
935	Ac-LTF\$5m6EYWAQCba4Ph\$5a5SAANH2	1802.95		1803.96	902.48	601.99

在上文和别处显示的序列中,使用了以下缩写:“Nle”表示正亮氨酸,“Aib”表示 2-氨基异丁酸,“Ac”表示乙酰基,并且“Pr”表示丙酰基。由“\$”表示的氨基酸是由全碳交联体连接的 α -Me S5-戊烯基-丙氨酸烯炔氨基酸,其包含一个双键。由“\$r5”表示的氨基酸是由全碳交联体连接的 α -Me R5-戊烯基-丙氨酸烯炔氨基酸,其包含一个双键。由“\$s8”表示的氨基酸是由全碳交联体连接的 α -Me S8-辛烯基-丙氨酸烯炔氨基酸,其包含一个双键。由“\$r8”表示的氨基酸是由全碳交联体连接的 α -Me R8-辛烯基-丙氨酸烯炔氨基酸,其包含一个双键。“Ahx”表示氨基环己基连接体。该交联体是直链全碳交联体,其在每个氨基酸的 α 碳之间包含 8 个或 11 个碳原子。由“\$/”表示的氨基酸是并非由任何交联体连接的 α -Me S5-戊烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。由“\$/r5”表示的氨基酸是未由任何交联体连接的 α -Me R5-戊烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。由“\$/s8”表示的氨基酸是未由任何交联体连接的 α -Me S8-辛烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。由“\$/r8”表示的氨基酸是未由任何交联体连接的 α -Me R8-辛烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。由“Amw”表示的氨基酸是氨基酸

α -Me 色氨酸。由“Aml”表示的氨基酸是氨基酸 α -Me 亮氨酸。由“Amf”表示的氨基酸是氨基酸 α -Me 苯丙氨酸。由“2ff”表示的氨基酸是氨基酸 2- 氟 - 苯丙氨酸。由“3ff”表示的氨基酸是氨基酸 3- 氟 - 苯丙氨酸。由“St”表示的氨基酸是包含两条戊烯基丙氨酸烯烴侧链且如所示每条侧链与另一氨基酸交联的氨基酸。由“St//”表示的氨基酸是包含两条不交联的戊烯基丙氨酸烯烴侧链的氨基酸。由“% St”表示的氨基酸是包含两条戊烯基丙氨酸烯烴侧链且如所示每条侧链通过完全饱和的烴交联与另一氨基酸交联的氨基酸。由“Ba”表示的氨基酸是 β - 丙氨酸。交联氨基酸的名称内的小写字母“e”或“z”（例如“\$er8”或“\$zr8”）表示双键构型（分别为 E 或 Z）。在其它情况下, 诸如“a”或“f”的小写字母表示 D 氨基酸（例如, 分别为 D- 丙氨酸或 D- 苯丙氨酸）。指定为“NmW”的氨基酸表示 N- 甲基色氨酸。指定为“NmY”的氨基酸表示 N- 甲基酪氨酸。指定为“NmA”的氨基酸表示 N- 甲基丙氨酸。指定为“Sar”的氨基酸表示肌氨酸。指定为“Cha”的氨基酸表示环己基丙氨酸。指定为“Cpg”的氨基酸表示环戊基甘氨酸。指定为“Cba”的氨基酸表示环丁基丙氨酸。指定为“F4I”的氨基酸表示 4- 碘代苯丙氨酸。指定为“F3Cl”的氨基酸表示 3- 氯苯丙氨酸。指定为“F4cooh”的氨基酸表示 4- 羧基苯丙氨酸。指定为“F34F2”的氨基酸表示 3,4- 二氟苯丙氨酸。指定为“6clW”的氨基酸表示 6- 氯色氨酸。指定“iso1”或“iso2”指示该拟肽大环化合物是单一异构体。“Ac3c”表示氨基环丙烷羧酸残基。

分别指定为“Cou4”、“Cou6”、“Cou7”和“Cou8”的氨基酸表示下列结构：



在一些实施方案中,拟肽大环化合物以超过一种异构体获得,例如这是由于交联体结构中双键的构型(E与Z)。此类异构体能够或不能通过常规的色谱法分离。在一些实施方案中,一种异构体相对于其它异构体具有改善的生物学性质。在一个实施方案中,拟肽大环化合物的E交联体烯烃异构体相对于其Z对应物具有更好的溶解度、更好的靶标亲和性、更好的体内或体外效力、更高的螺旋度或提高的细胞透性。在一个实施方案中,拟肽大环化合

物的 Z 交联体烯烃异构体相对于其 E 对应物具有更好的溶解度、更好的靶标亲和性、更好的体内或体外效力、更高的螺旋度或提高的细胞透性。

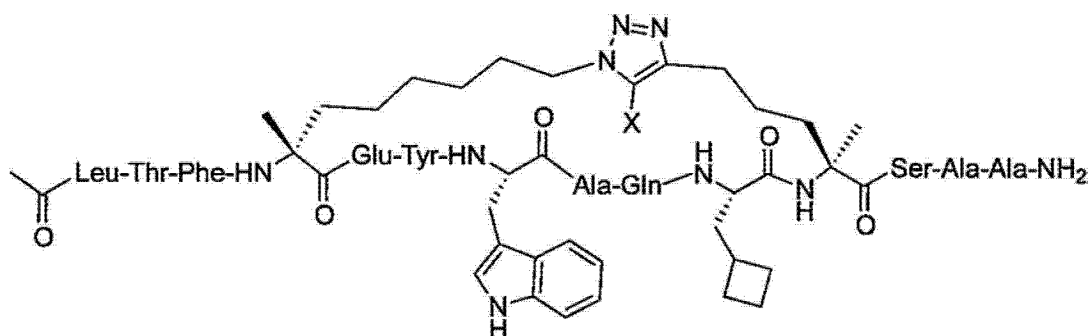
氨基酸形成交联体按照如下所示的图例表示。

除非另有指明,各个氨基酸在 α 位点上的立体化学为 S。标记为“4Me”的氨基酸用包含甲基取代的炔烃(内炔)的氨基酸来制备,从而产生在 4- 位包含甲基的三唑基。标记为“4Ph”的氨基酸用包含苯基取代的炔烃(内炔)的氨基酸来制备,从而产生在 4- 位包含苯基的三唑基。对于叠氮氨基酸,所示碳原子的数目是指 α 碳与末端叠氮之间的亚甲基单位的数目。对于炔烃氨基酸,所示碳原子的数目是 α 位点与三唑部分之间的亚甲基单位的数目加上来源于炔烃的三唑基团内的两个碳原子。

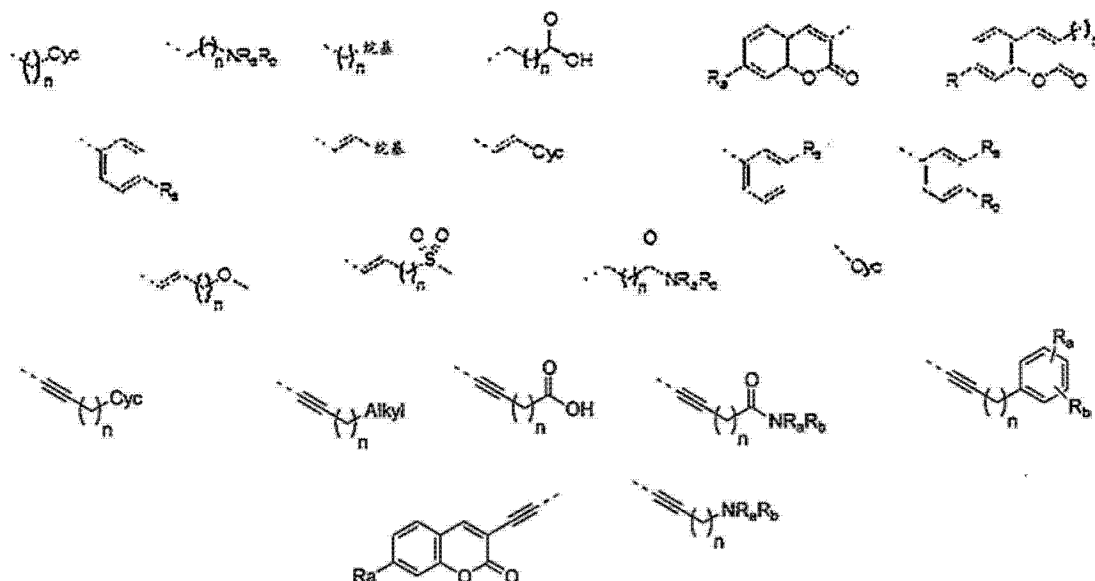
\$5n3	α -Me 叠氮 1,5 三唑(3 碳)
#5n3	α -H 叠氮 1,5 三唑(3 碳)
\$4a5	α -Me 炔烃 1,4 三唑(5 碳)
\$4a6	α -Me 炔烃 1,4 三唑(6 碳)
\$5a5	α -Me 炔烃 1,5 三唑(5 碳)
\$5a6	α -Me 炔烃 1,5 三唑(6 碳)
#4a5	α -H 炔烃 1,4 三唑(5 碳)
#5a5	α -H 炔烃 1,5 三唑(5 碳)
\$5n5	α -Me 叠氮 1,5 三唑(5 碳)
\$5n6	α -Me 叠氮 1,5 三唑(6 碳)
\$4n5	α -Me 叠氮 1,4 三唑(5 碳)
\$4n6	α -Me 叠氮 1,4 三唑(6 碳)
\$4ra5	α -Me R-炔烃 1,4 三唑(5 碳)
\$4ra6	α -Me R-炔烃 1,4 三唑(6 碳)
\$4rn4	α -Me R-叠氮 1,4 三唑(4 碳)

- \$4rn5 α -Me R-叠氮 1,4 三唑(5 碳)
 \$4rn6 α -Me R-叠氮 1,4 三唑(6 碳)
 \$5rn5 α -Me R-叠氮 1,5 三唑(5 碳)
 \$5ra5 α -Me R-炔烃 1,5 三唑(5 碳)
 \$5ra6 α -Me R-炔烃 1,5 三唑(6 碳)
 \$5rn6 α -Me R-叠氮 1,5 三唑(6 碳)
 #5rn6 α -H R-叠氮 1,5 三唑(6 碳)
 \$4rn5 α -Me R-叠氮 1,4 三唑(5 碳)
 #4rn5 α -H R-叠氮 1,4 三唑(5 碳)
 4Me\$5rn6 α -Me R-叠氮 1,5 三唑(6 碳); 4-Me 取代的三唑
 4Me\$5a5 α -Me 炔烃 1,5 三唑(5 碳); 4-Me 取代的三唑
 4Ph\$5a5 α -Me 炔烃 1,5 三唑(5 碳); 4-苯基取代的三唑

指定为“5I”、“5penNH2”、“5BnzNH2”、“5prpOMe”、“5Ph”和“5prp”的氨基酸是指以下式 I 拟肽大环化合物中所示类型的交联氨基酸：



在上述结构中，x 例如为下列取代基之一：



其中“Cyc”为合适的芳基、环烷基、环烯基、杂芳基或杂环基，它们是未取代的或任选地

被如上所述的 R_a 或 R_b 基团取代。

在一些实施方案中,三唑取代基选自:

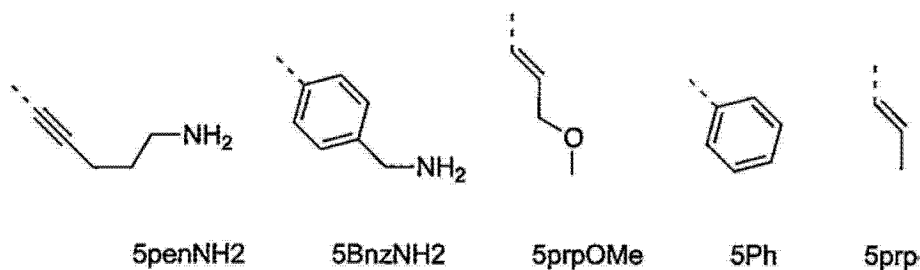
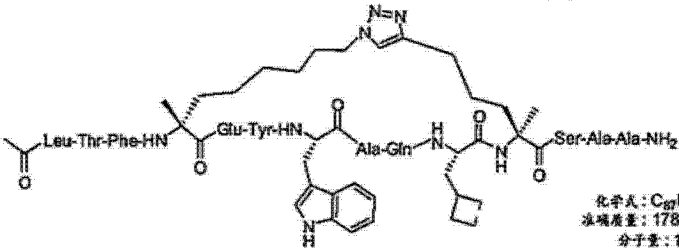
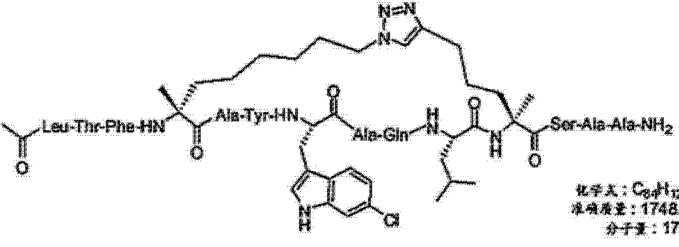
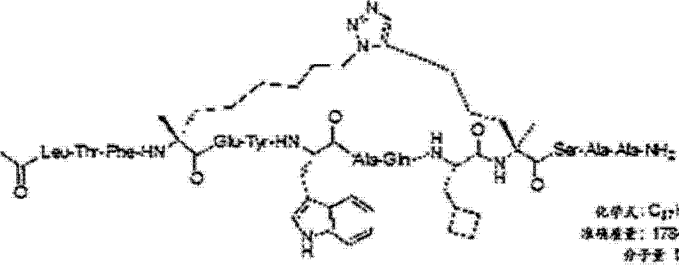
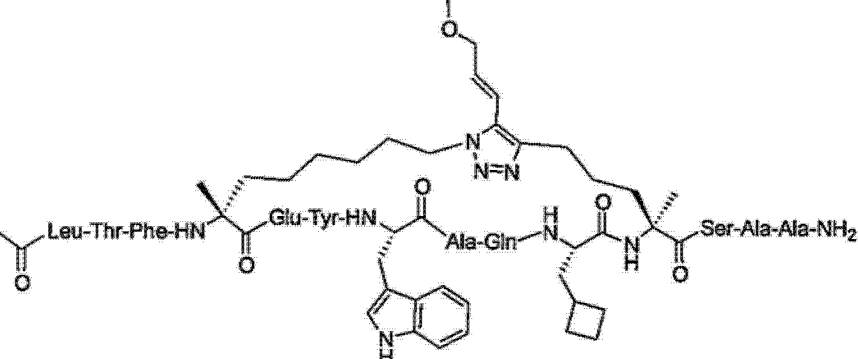


表 4 显示了示例性的式 I 拟肽大环化合物:

表 4b

	结构
SP-449	Ac-LTF\$4m6\$AYWAQL\$4a5\$AA-NH₂ 化学式: C₉₀H₁₃₃N₂₁O₁₉ 准确质量: 1812.01 分子量: 1813.15
SP-64	Ac-LTF\$4m6\$AYWAQL\$4a5\$AAIa-NH₂ 化学式: C₉₀H₁₃₃N₂₁O₁₉ 准确质量: 1812.01 分子量: 1813.15

SP-153	 化学式: $C_{82}H_{124}N_{20}O_{21}$ 准确质量: 1784.92 分子量: 1786.04 Ac- L T F \$4rn6\$ E Y W A Q Cba \$4a5\$ S A A -NH2
SP-98	 化学式: $C_{80}H_{121}ClN_{20}O_{19}$ 准确质量: 1748.68 分子量: 1750.44 Ac- L T F \$4rn6\$ A Y 6clW A Q L \$4a5\$ S A A -NH2
SP-456	 化学式: $C_{81}H_{124}N_{20}O_{21}$ 准确质量: 1784.92 分子量: 1786.04 Ac-LTF\$5rn6\$EYW A Q Cba \$5a5\$S A A -NH2
SP-470	

在一些实施方案中,拟肽大环化合物不包括表 5 所示的拟肽大环化合物:

表 5

#	序列
1	Ac-QSQQTF\$5rn6\$NLWRLL\$5a5QN-NH2
2	Ac-QSQQTF\$4rn5\$NLWRLL\$4a5QN-NH2
3	Ac-QSQQTF\$5rn6\$NLWRLL\$5a5QN-NH2
4	Ac-QSQQTF\$4rn5\$NLWRLL\$4a5QN-NH2
5	Ac-QSQQTF\$5rn5\$NLWRLL\$5a5QN-NH2

6	Ac-QSQQTF\$5ra5NLWRLL\$5n5QN-NH2
7	Ac-QSQQTF\$5ra5NLWRLL\$5n6QN-NH2
8	Ac-QSQQTF\$4ra5NLWRLL\$4n5QN-NH2
9	Ac-QSQQTF\$4ra5NLWRLL\$4n6QN-NH2
10	Ac-QSQQTF\$4rn6NLWRLL\$4a5QN-NH2
11	Ac-QSQQTF\$5rn6NLWRLL\$5a6QN-NH2
12	Ac-QSQQTF\$5ra6NLWRLL\$5n6QN-NH2
13	Ac-QSQQTF\$4rn6NLWRLL\$4a6QN-NH2
14	Ac-QSQQTF\$4ra6NLWRLL\$4n6QN-NH2
15	Ac-QSQQTF\$4rn5NLWRLL\$4a6QN-NH2
16	Ac-QSQQTF4Me\$5rn6NLWRLL4Me\$5a5QN-NH2
17	Ac-LTF\$4ra5HYWAQL\$4n6S-NH2
18	H-F\$4rn6HYWAQL\$4a5S-NH2
19	Ac-LTF\$4rn6HYWAQL\$4a5S-NH2
20	Ac-F\$4rn6HYWAQL\$4a5S-NH2
21	Ac-LTF\$4rn6HYWAQL\$4a6S-NH2
22	Ac-LTF\$5ra5HYWAQL\$5n6S-NH2
23	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5A-NH2
24	Ac-LTF\$5ra5HYWAQL\$5n6S-NH2
25	Ac-LTF\$4rn6AYWAQL\$4a5A-NH2
26	Ac-LTFEHYWAQLTS-NH2

所示的肽可包含 N-末端封端基团如乙酰基或另外的连接体,如在封端基团与肽序列的起点之间的 β -丙氨酸。

在一些实施方案中,拟肽大环化合物不包含如表 5 所示的拟肽大环化合物结构。

实施例 3: 式 II 的拟肽大环化合物

[0252] 拟肽大环化合物通过将两个或更多个天然存在的氨基酸替代为相应的合成氨基

酸而设计。替代在 i 和 i+4 以及 i 和 i+7 位进行。通过固相肽合成然后经由肽的含有巯基的侧链对肽进行交联来产生大环化合物。使用固相条件、Rink Amide AM 树脂 (Novabiochem) 和 Fmoc 主链保护基团化学法人工地或在自动化肽合成仪 (Applied Biosystems, 433A 型) 上进行肽合成

[0253] 以 0.1mmol 规模在 Rink amide MBHA 树脂 (加载 0.62mmol/g) 上合成完全保护的结合树脂的肽。通过采用在 NMP 中的 25% (v/v) 的哌啶对结合树脂的肽进行 2×20min 的处理来实现临时 Fmoc 基团的脱保护。采用 NMP 和二氯甲烷进行充分的流动洗涤后,通过与适当的预活化的 Fmoc-氨基酸衍生物进行 1×60min 的温育来实现每个连续氨基酸的偶联。在将偶联溶液转移至脱保护的结合树脂的肽之前,将所有被保护的氨基酸 (1mmol) 溶解在 NMP 中,并用 HCTU (1mmol) 和 DIEA (1mmol) 进行活化。偶联反应完成后,对树脂进行充分的流动洗涤,准备下一个脱保护 / 偶联循环。在存在于 NMP/MM 中的乙酸酐 /DIEA 的存在下进行氨基末端的乙酰化。对从完全组装的结合树脂的肽的等分试样所获得的已切割和脱保护的样品进行 LC-MS 分析以验证每个偶联反应的完成。

[0254] 通过在反相 C18 柱 (Varian) 上的高效液相色谱法 (HPLC) (Varian ProStar) 来实现交联化合物的纯化,以产生纯的化合物。通过 LC/MS 质谱法 (与 Agilent1100HPLC 系统接口连接的 Micromass LCT) 和氨基酸分析 (Applied Biosystems, 型号 420A) 确认该纯产物的化学组成。

[0255] 在一个典型的实例中,用 DCM 洗涤肽树脂 (0.1mmol)。通过用 2% TFA/DCM5% TIPS 对结合树脂的肽进行 3×3min 的处理来实现临时 Mmt 基团的脱保护,然后进行 30min 的处理直到在滤液中观察不到橙色。在各次处理之间用 DCM 对树脂进行充分的流动洗涤。在完成 Mmt 的去除之后,将树脂用 5% 的 DIEA/NMP 溶液洗涤 3 次,为双硫醚 (bisthioether) 偶联作准备。将树脂装入反应小瓶中。向反应容器中加入 1/1 的 DCM/DMF,随后加入 DIEA (2.4 当量)。充分混合 5 分钟后,加入 4,4' - 双 (溴甲基) 联苯 (1.05 当量) (TCI America B1921)。然后在室温下机械搅拌反应混合物过夜。需要时,使反应进行另外的时间以达到反应完全。类似的程序可用于制备五亚甲基、六亚甲基或七亚甲基交联剂 (“% c7”、“% c6”或 “% c5”)。

[0256] 在室温下通过用 TFA/H₂O/TIS (94/3/3v/v) 处理 3h 来对双硫醚树脂结合肽进行脱保护并将其从固体载体上切下。将树脂过滤后,使 TFA 溶液在冷乙醚中沉淀并进行离心,以得到呈固体的所需产物。通过制备型 HPLC 对粗产物进行纯化。

[0257] 表 6 示出了拟肽大环化合物的列表。

表 6

SP	序列
471	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAA-NH2
SP	序列
472	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAibA-NH2
473	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAN1e-NH2

474	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAL-NH2
475	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAM-NH2
476	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAhL-NH2
477	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAF-NH2
478	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAI-NH2
479	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SACHg-NH2
480	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAAib-NH2
481	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAA-NH2
482	Ac-LTF% cs7AYWA% c7L% c7S% c7N1e-NH2
483	Ac-LTF% cs7AYWA% c7L% c7S% c7A-NH2
484	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAN1e-NH2
485	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAL-NH2
486	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAM-NH2
487	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAhL-NH2
488	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAF-NH2
489	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAI-NH2
490	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AACHg-NH2
491	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AACCha-NH2
492	Ac-F% cs7AYWEAc3cL% c7AAAib-NH2
493	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAibV-NH2
494	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAibV-NH2
495	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAibAA-NH2
496	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAibAA-NH2
497	Ac-HLTF% cs7HHWHQL% c7AAN1eN1e-NH2

498	Ac-DLTF% cs7HHWHQL% c7RRLV-NH2
499	Ac-HHTF% cs7HHWHQL% c7AAML-NH2
500	Ac-F% cs7HHWHQL% c7RRDCha-NH2
501	Ac-F% cs7HHWHQL% c7HRFV-NH2
502	Ac-HLTF% cs7HHWHQL% c7AAhLA-NH2
503	Ac-DLTF% cs7HHWHQL% c7RRChg1-NH2
504	Ac-DLTF% cs7HHWHQL% c7RRChg1-NH2
505	Ac-HHTF% cs7HHWHQL% c7AACHav-NH2
506	Ac-F% cs7HHWHQL% c7RRDa-NH2
507	Ac-F% cs7HHWHQL% c7HRAibG-NH2
508	Ac-F% cs7AYWAQL% c7HHN1eL-NH2
509	Ac-F% cs7AYWSAL% c7HQAN1e-NH2
510	Ac-F% cs7AYWVQL% c7QHChg1-NH2
511	Ac-F% cs7AYWTAL% c7QQN1ev-NH2
512	Ac-F% cs7AYWYQL% c7HAibAa-NH2
513	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7HHLA-NH2
514	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7HHLA-NH2
515	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7HQN1ev-NH2
516	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7HQN1ev-NH2
517	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7QQM1-NH2
518	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7QQM1-NH2
519	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7HAibhLV-NH2
520	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AHFA-NH2
521	Ac-HLTF% cs7HHWHQL% c7AAN1e1-NH2

522	Ac-DLTF% cs7HHWHQL% c7RRLa-NH2
523	Ac-HHTF% cs7HHWHQL% c7AAMv-NH2
524	Ac-F% cs7HHWHQL% c7RRDA-NH2
525	Ac-F% cs7HHWHQL% c7HRFCha-NH2
526	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHAm
SP	序列
527	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHiAm
528	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHnPr3Ph
529	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHnBu33Me
530	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHnPr
531	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHEt2Ch
532	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHEt2Cp
533	Ac-F% cs7AYWEAL% c7AA-NHHex
534	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAIA-NH2
535	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAIA-NH2
536	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AAMA-NH2
537	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AAMA-NH2
538	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NH2
539	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NH2
540	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAIa-NH2
541	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAIa-NH2
542	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AAMa-NH2
543	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AAMa-NH2
544	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1ea-NH2
545	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1ea-NH2
546	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AAIv-NH2

547	Ac-LTF % cs7AYWAAL % c7AAIv-NH2
548	Ac-LTF % cs7AYWAQL % c7AAMv-NH2
549	Ac-LTF % cs7AYWAAL % c7AANlev-NH2
550	Ac-LTF % cs7AYWAAL % c7AANlev-NH2
551	Ac-LTF % cs7AYWAQL % c7AAI1-NH2
552	Ac-LTF % cs7AYWAQL % c7AAI1-NH2
553	Ac-LTF % cs7AYWAAL % c7AAM1-NH2
554	Ac-LTF % cs7AYWAQL % c7AANle1-NH2
555	Ac-LTF % cs7AYWAQL % c7AANle1-NH2
556	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AAMA-NH2
557	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AANleANH2
558	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AAIa-NH2
559	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AAMa-NH2
560	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AANlea-NH2
561	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AAIv-NH2
562	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AAMv-NH2
563	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AANlev-NH2
564	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AAI1-NH2
565	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AAM1-NH2
566	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AANle1-NH2
567	Ac-F % cs7AYWEAL % c7AANle1-NH2
568	Ac-LTF % cs7AY6c1WAQL % c7SAA-NH2
569	Ac-LTF % cs7AY6c1WAQL % c7SAA-NH2
570	Ac-WTF % cs7FYWSQL % c7AVAA-NH2
571	Ac-WTF % cs7FYWSQL % c7AVAA-NH2
572	Ac-WTF % cs7VYWSQL % c7AVA-NH2

573	Ac-WTF% cs7VYWSQL% c7AVA-NH2
574	Ac-WTF% cs7FYWSQL% c7SAAa-NH2
575	Ac-WTF% cs7FYWSQL% c7SAAa-NH2
576	Ac-WTF% cs7VYWSQL% c7AVAAa-NH2
577	Ac-WTF% cs7VYWSQL% c7AVAAa-NH2
578	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AVG-NH2
579	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AVG-NH2
580	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AVQ-NH2
581	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AVQ-NH2
SP	序列
582	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAa-NH2
583	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAa-NH2
584	Ac-LTF% cs7AYWAQhL% c7SAA-NH2
585	Ac-LTF% cs7AYWAQhL% c7SAA-NH2
586	Ac-LTF% cs7AYWEQLStSA% c7-NH2
587	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SLA-NH2
588	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SLA-NH2
589	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SWA-NH2
590	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SWA-NH2
591	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SVS-NH2
592	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SAS-NH2
593	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7SVG-NH2
594	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SAa-NH2
595	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SAA-NH2

596	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SVA-NH2
597	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SLA-NH2
598	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SWA-NH2
599	Ac-ETF% cs7KYWAQL% c7SWA-NH2
600	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SVS-NH2
601	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SAS-NH2
602	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SVG-NH2
603	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SSa-NH2
604	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SSa-NH2
605	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SNa-NH2
606	Ac-ETF% cs7VYWAQL% c7SNa-NH2
607	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SAa-NH2
608	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SVA-NH2
609	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SVA-NH2
610	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SWA-NH2
611	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SVS-NH2
612	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SVS-NH2
613	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SAS-NH2
614	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SAS-NH2
615	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SVG-NH2
616	Ac-LTF% cs7VYWAQL% c7SVG-NH2
617	Ac-LTF% cs7EYWAQCha% c7SAA-NH2
618	Ac-LTF% cs7EYWAQCha% c7SAA-NH2
619	Ac-LTF% cs7EYWAQCpg% c7SAA-NH2

620	Ac-LTF% cs7EYWAQCpg% c7SAA-NH2
621	Ac-LTF% cs7EYWAQF% c7SAA-NH2
622	Ac-LTF% cs7EYWAQF% c7SAA-NH2
623	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
624	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
625	Ac-LTF3C1% cs7EYWAQL% c7SAA-NH2
626	Ac-LTF3C1% cs7EYWAQL% c7SAA-NH2
627	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQL% c7SAA-NH2
628	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQL% c7SAA-NH2
629	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
630	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
631	Ac-ETF% cs7EYWAQL% c7SAA-NH2
632	Ac-LTF% cs7AYWVQL% c7SAA-NH2
633	Ac-LTF% cs7AHWAQL% c7SAA-NH2
634	Ac-LTF% cs7AEWAQL% c7SAA-NH2
635	Ac-LTF% cs7ASWAQL% c7SAA-NH2
636	Ac-LTF% cs7AEWAQL% c7SAA-NH2
SP	序列
637	Ac-LTF% cs7ASWAQL% c7SAA-NH2
638	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQL% c7SAA-NH2
639	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQL% c7SAA-NH2
640	Ac-LTF% cs7AHWAQL% c7AAIa-NH2
641	Ac-ITF% cs7FYWAQL% c7AAIa-NH2
642	Ac-ITF% cs7EHWAQL% c7AAIa-NH2

643	Ac-ITF% cs7EHWAQL% c7AAIa-NH2
644	Ac-ETF% cs7EHWAQL% c7AAIa-NH2
645	Ac-ETF% cs7EHWAQL% c7AAIa-NH2
646	Ac-LTF% cs7AHWVQL% c7AAIa-NH2
647	Ac-ITF% cs7FYWVQL% c7AAIa-NH2
648	Ac-ITF% cs7EYWVQL% c7AAIa-NH2
649	Ac-ITF% cs7EHWVQL% c7AAIa-NH2
650	Ac-LTF% cs7AEWAQL% c7AAIa-NH2
651	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQL% c7AAIa-NH2
652	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQL% c7AAIa-NH2
653	Ac-LTF% cs7AHWAQL% c7AHFA-NH2
654	Ac-ITF% cs7FYWAQL% c7AHFA-NH2
655	Ac-ITF% cs7FYWAQL% c7AHFA-NH2
656	Ac-ITF% cs7FHWAQL% c7AEFA-NH2
657	Ac-ITF% cs7FHWAQL% c7AEFA-NH2
658	Ac-ITF% cs7EHWAQL% c7AHFA-NH2
659	Ac-ITF% cs7EHWAQL% c7AHFA-NH2
660	Ac-LTF% cs7AHWVQL% c7AHFA-NH2
661	Ac-ITF% cs7FYWVQL% c7AHFA-NH2
662	Ac-ITF% cs7EYWVQL% c7AHFA-NH2
663	Ac-ITF% cs7EHWVQL% c7AHFA-NH2
664	Ac-ITF% cs7EHWVQL% c7AHFA-NH2
665	Ac-ETF% cs7EYWAAL% c7SAA-NH2
666	Ac-LTF% cs7AYWVAL% c7SAA-NH2

667	Ac-LTF% cs7AHWAAL% c7SAA-NH2
668	Ac-LTF% cs7AEWAAL% c7SAA-NH2
669	Ac-LTF% cs7AEWAAL% c7SAA-NH2
670	Ac-LTF% cs7ASWAAL% c7SAA-NH2
671	Ac-LTF% cs7ASWAAL% c7SAA-NH2
672	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AAIa-NH2
673	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AAIa-NH2
674	Ac-LTF% cs7AYWAAL% c7AHFA-NH2
675	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AHIa-NH2
676	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AHIa-NH2
677	Ac-LTF% cs7AHWAQL% c7AHIa-NH2
678	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AHIa-NH2
679	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAFa-NH2
680	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAFa-NH2
681	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAWa-NH2
682	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAVa-NH2
683	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAVa-NH2
684	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AALa-NH2
685	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AALa-NH2
686	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAIa-NH2
687	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAIa-NH2
688	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAFa-NH2
689	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAFa-NH2
690	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAVa-NH2

691	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAVa-NH2
SP	序列
692	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AAIa-NH2
693	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AAIa-NH2
694	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AAWa-NH2
695	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AAWa-NH2
696	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AALa-NH2
697	Ac-LTF% cs7EHWAQL% c7AALa-NH2
698	Ac-ETF% cs7EHVQL% c7AALa-NH2
699	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAa-NH2
700	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAa-NH2
701	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAibA-NH2
702	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAibA-NH2
703	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAAa-NH2
704	Ac-LTF% c7r5AYWAQL% c7s8AAIa-NH2
705	Ac-LTF% c7r5AYWAQL% c7s8SAA-NH2
706	Ac-LTF% cs7AYWAQCba% c7AAN1eA-NH2
707	Ac-ETF% cs7AYWAQCba% c7AAN1eA-NH2
708	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AAN1eA-NH2
709	Ac-LTF% cs7AYWAQCba% c7AWN1eA-NH2
710	Ac-ETF% cs7AYWAQCba% c7AWN1eA-NH2
711	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AWN1eA-NH2
712	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAFA-NH2
713	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQCba% c7SAN1eA-NH2

714	Ac-LTF% cs7EF4coohWQCba% c7SAN1eA-NH2
715	Ac-LTF% cs7EYWSQCba% c7SAN1eA-NH2
716	Ac-LTF% cs7EYWWQCba% c7SAN1eA-NH2
717	Ac-LTF% cs7EYWQCba% c7AAIa-NH2
718	Ac-LTF34F2% cs7EYWQCba% c7AAIa-NH2
719	Ac-LTF% cs7EF4coohWQCba% c7AAIa-NH2
720	Pam-ETF% cs7EYWQCba% c7SAA-NH2
721	Ac-LThF% cs7EFWQCba% c7SAA-NH2
722	Ac-LTA% cs7EYWQCba% c7SAA-NH2
723	Ac-LTF% cs7EYAAQCba% c7SAA-NH2
724	Ac-LTF% cs7EY2Na1AQCb% c7SAA-NH2
725	Ac-LTF% cs7AYWQCba% c7SAA-NH2
726	Ac-LTF% cs7EYWQCba% c7SAF-NH2
727	Ac-LTF% cs7EYWQCba% c7SAFa-NH2
728	Ac-LTF% cs7AYWQCba% c7SAF-NH2
729	Ac-LTF34F2% cs7AYWQCba% c7SAF-NH2
730	Ac-LTF% cs7AF4coohWQCba% c7SAF-NH2
731	Ac-LTF% cs7EY6c1WQCba% c7SAF-NH2
732	Ac-LTF% cs7AYWSQCba% c7SAF-NH2
733	Ac-LTF% cs7AYWWQCba% c7SAF-NH2
734	Ac-LTF% cs7AYWQCba% c7AAIa-NH2
735	Ac-LTF34F2% cs7AYWQCba% c7AAIa-NH2
736	Ac-LTF% cs7AY6c1WQCba% c7AAIa-NH2
737	Ac-LTF% cs7AF4coohWQCba% c7AAIa-NH2

738	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AAFa-NH2
739	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AAFa-NH2
740	Ac-ETF% cs7AYWAQCba% c7AWN1ea-NH2
741	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AWN1ea-NH2
742	Ac-ETF% cs7EYWAQCba% c7AWN1ea-NH2
743	Ac-ETF% cs7EYWAQCba% c7AWN1ea-NH2
744	Ac-LTF% cs7AYWAQCba% c7SAFa-NH2
745	Ac-LTF% cs7AYWAQCba% c7SAFa-NH2
746	Ac-ETF% cs7AYWAQL% c7AWN1ea-NH2
SP	序列
747	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AWN1ea-NH2
748	Ac-ETF% cs7EYWAQL% c7AWN1ea-NH2
749	Dmaac-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
750	Hexac-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
751	Napac-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
752	Decac-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
753	Admac-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
754	Tmac-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
755	Pam-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
756	Ac-LTF% cs7AYWAQCba% c7AAN1eA-NH2
757	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQCba% c7AAIa-NH2
758	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
759	Ac-LTF34F2% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
760	Ac-LTF% cs7EF4coohWAQCba% c7SAA-NH2

761	Ac-LTF% cs7EF4coohWAQCba% c7SAA-NH2
762	Ac-LTF% cs7EYWSQCba% c7SAA-NH2
763	Ac-LTF% cs7EYWSQCba% c7SAA-NH2
764	Ac-LTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
765	Ac-LTF% cs7AYWAQhL% c7SAF-NH2
766	Ac-LTF% cs7AYWAQhL% c7SAF-NH2
767	Ac-LTF34F2% cs7AYWAQhL% c7SAA-NH2
768	Ac-LTF34F2% cs7AYWAQhL% c7SAA-NH2
769	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQhL% c7SAA-NH2
770	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQhL% c7SAA-NH2
771	Ac-LTF% cs7AYWSQhL% c7SAA-NH2
772	Ac-LTF% cs7AYWSQhL% c7SAA-NH2
773	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
774	Ac-LTF34F2% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NH2
775	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQL% c7AAN1eA-NH2
776	Ac-LTF% cs7AYWSQL% c7AAN1eA-NH2
777	Ac-LTF34F2% cs7AYWAQhL% c7AAN1eA-NH2
778	Ac-LTF34F2% cs7AYWAQhL% c7AAN1eA-NH2
779	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQhL% c7AAN1eA-NH2
780	Ac-LTF% cs7AF4coohWAQhL% c7AAN1eA-NH2
781	Ac-LTF% cs7AYWSQhL% c7AAN1eA-NH2
782	Ac-LTF% cs7AYWSQhL% c7AAN1eA-NH2
783	Ac-LTF% cs7AYWAQhL% c7AAAAa-NH2
784	Ac-LTF% cs7AYWAQhL% c7AAAAa-NH2

785	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAAAa-NH2
786	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAAAAa-NH2
787	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAAAAa-NH2
788	Ac-LTF% cs7EYWAQhL% c7AAN1eA-NH2
789	Ac-AATF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NH2
790	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eAA-NH2
791	Ac-ALTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eAA-NH2
792	Ac-LTF% cs7AYWAQCba% c7AAN1eAA-NH2
793	Ac-LTF% cs7AYWAQhL% c7AAN1eAA-NH2
794	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAAA-NH2
795	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAAA-NH2
796	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAAAA-NH2
797	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAAAA-NH2
798	Ac-ALTF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
799	Ac-ALTF% cs7EYWAQCba% c7SAAA-NH2
800	Ac-ALTF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
801	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAAAAa-NH2
SP	序列
802	Ac-LTF% cs7EY6c1WAQCba% c7SAA-NH2
803	Ac-LTF% cs7EF4cooh6c1WAQCba% c7SAN1eA-NH2
804	Ac-LTF% cs7EF4cooh6c1WAQCba% c7SAN1eA-NH2
805	Ac-LTF% cs7EF4cooh6c1WAQCba% c7AA1a-NH2
806	Ac-LTF% cs7EF4cooh6c1WAQCba% c7AA1a-NH2
807	Ac-LTF% cs7AY6c1WAQL% c7AAAAAa-NH2

808	Ac-LTF% cs7AY6c1WAQL% c7AAAAAa-NH2
809	Ac-F% cs7AY6c1WEAL% c7AAAAAAa-NH2
810	Ac-ETF% cs7EYWAQL% c7AAAAAa-NH2
811	Ac-ETF% cs7EYWAQL% c7AAAAAa-NH2
812	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAAAAAa-NH2
813	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAAAAAa-NH2
814	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eAAa-NH2
815	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eAAa-NH2
816	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AAAAAa-NH2
817	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AAAAAa-NH2
818	Ac-LTF% cs7EF4coohWAQCba% c7AAAAAa-NH2
819	Ac-LTF% cs7EF4coohWAQCba% c7AAAAAa-NH2
820	Ac-LTF% cs7EYWSQCba% c7AAAAAa-NH2
821	Ac-LTF% cs7EYWSQCba% c7AAAAAa-NH2
822	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAAa-NH2
823	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAAa-NH2
824	Ac-ALTF% cs7EYWAQCba% c7SAAa-NH2
825	Ac-ALTF% cs7EYWAQCba% c7SAAa-NH2
826	Ac-ALTF% cs7EYWAQCba% c7SAAAa-NH2
827	Ac-ALTF% cs7EYWAQCba% c7SAAAa-NH2
828	Ac-AALTF% cs7EYWAQCba% c7SAAAa-NH2
829	Ac-AALTF% cs7EYWAQCba% c7SAAAa-NH2
830	Ac-RTF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
831	Ac-LRF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2

832	Ac-LTF% cs7EYWRQCba% c7SAA-NH2
833	Ac-LTF% cs7EYWARCba% c7SAA-NH2
834	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7RAA-NH2
835	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SRA-NH2
836	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAR-NH2
837	5-FAM-BaLTF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
838	5-FAM-BaLTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NH2
839	Ac-LAF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
840	Ac-ATF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
841	Ac-AAF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
842	Ac-AAAF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
843	Ac-AAAAF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
844	Ac-AATF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
845	Ac-AALTF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
846	Ac-AAALTF% cs7EYWAQL% c7AAN1eA-NH2
847	Ac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAN1eAA-NH2
848	Ac-ALTF% cs7EYWAQL% c7AAN1eAA-NH2
849	Ac-AALTF% cs7EYWAQL% c7AAN1eAA-NH2
850	Ac-LTF% cs7EYWAQCba% c7AAN1eAA-NH2
851	Ac-LTF% cs7EYWAQhL% c7AAN1eAA-NH2
852	Ac-ALTF% cs7EYWAQhL% c7AAN1eAA-NH2
853	Ac-LTF% cs7ANmYWAQL% c7AAN1eA-NH2
854	Ac-LTF% cs7ANmYWAQL% c7AAN1eA-NH2
855	Ac-LTF% cs7AYNmWAQL% c7AAN1eA-NH2

856	Ac-LTF% cs7AYNmWAQL% c7AANleA-NH2
SP	序列
857	Ac-LTF% cs7AYAmwAQL% c7AANleA-NH2
858	Ac-LTF% cs7AYAmwAQL% c7AANleA-NH2
859	Ac-LTF% cs7AYWAibQL% c7AANleA-NH2
860	Ac-LTF% cs7AYWAibQL% c7AANleA-NH2
861	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAibNleA-NH2
862	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAibNleA-NH2
863	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AaNleA-NH2
864	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AaNleA-NH2
865	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7ASarNleA-NH2
866	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7ASarNleA-NH2
867	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleAib-NH2
868	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleAib-NH2
869	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleNmA-NH2
870	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleNmA-NH2
871	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleSar-NH2
872	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleSar-NH2
873	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleAAib-NH2
874	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleAAib-NH2
875	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleANmA-NH2
876	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleANmA-NH2
877	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleAa-NH2
878	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleAa-NH2

879	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eASar-NH2
880	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eASar-NH2
881	Ac-LTF% c7/r8AYWAQL% c7/AAN1eA-NH2
882	Ac-LTFAibAYWAQLAibAAN1eA-NH2
883	Ac-LTF% cs7Cou4YWAQL% c7AAN1eA-NH2
884	Ac-LTF% cs7Cou4YWAQL% c7AAN1eA-NH2
885	Ac-LTF% cs7AYWCou4QL% c7AAN1eA-NH2
886	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7Cou4AN1eA-NH2
887	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7Cou4AN1eA-NH2
888	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7ACou4N1eA-NH2
889	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7ACou4N1eA-NH2
890	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-OH
891	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-OH
892	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NHnPr
893	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NHnPr
894	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NHnBu33Me
895	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NHnBu33Me
896	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NHHex
897	Ac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NHHex
898	Ac-LTA% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NH2
899	Ac-LThL% cs7AYWAQL% c7AAN1eA-NH2
900	Ac-LTF% cs7AYAAQL% c7AAN1eA-NH2
901	Ac-LTF% cs7AY2Na1AQL% c7AAN1eA-NH2
902	Ac-LTF% cs7EYWCou4QCba% c7SAA-NH2

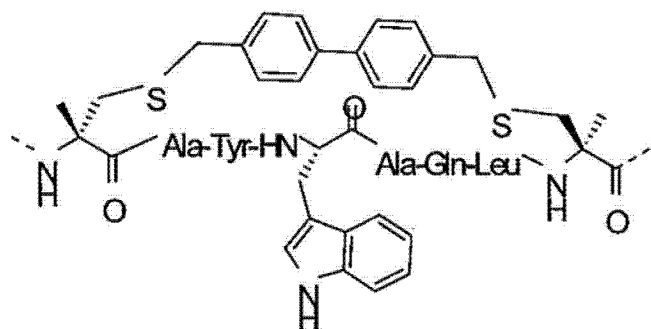
903	Ac-LTF% cs7EYWCou7QCba% c7SAA-NH2
904	Dmaac-LTF% cs7EYWAQCba% c7SAA-NH2
905	Dmaac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAAAa-NH2
906	Dmaac-LTF% cs7AYWAQL% c7AAAAAa-NH2
907	Dmaac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAAAAa-NH2
908	Dmaac-LTF% cs7EYWAQL% c7AAAAAa-NH2
909	Dmaac-LTF% cs7EF4coohWAQCba% c7AAIa-NH2
910	Dmaac-LTF% cs7EF4coohWAQCba% c7AAIa-NH2
911	Dmaac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleA-NH2
SP	序列
912	Dmaac-LTF% cs7AYWAQL% c7AANleA-NH2
913	Cou6BaLTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
914	Cou8BaLTF% cs7EYWAQhL% c7SAA-NH2
915	Ac-LTF4I% cs7EYWAQL% c7AAAAAa-NH2

表 6a 示出了示例性的拟肽大环化合物：

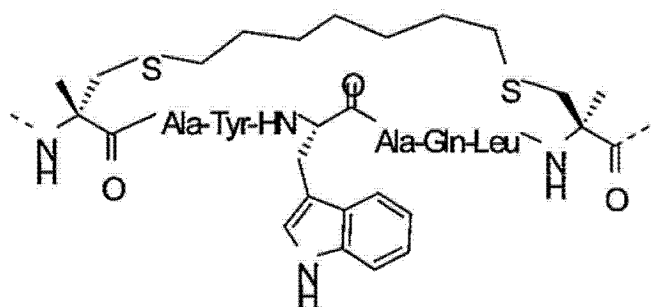
表 6a

SP	序列	准确质量	实测质量	Calc (M+1)/1	Calc (M+2)/2	Calc (M+3)/3
916	Ac-LTF%cs7AYWAQL%c7AANleA-NH2	1808.94		1809.95	905.48	603.99
917	Ac-LTF%cs7AYWAQL%c7AAAAAa-NH2	1908.96		1909.97	955.49	637.33
918	Ac-LTF%csBphAYWAQL%cBphAANleA-NH2	1890.92		1909.97	955.49	637.33
919	Ac-LTF%csBphAYWAQL%cBphAAAAAa-NH2	1990.92	996.88			
920	Ac-LTF%csBphEYWAQCba%cBphSAA-NH2	1865.16	933.45		933.58	
921	Ac-LTF#cs7EYWAQCba#c7SAA-NH2	1753.82		1754.83	877.92	585.61
922	Ac-LTF#csBphEYWAQCba#cBphSAA-NH2	1835.81		1836.82	918.91	612.94
923	Ac-LTF%csBphEYWAQL%cBphAAAAAa-NH2					
924	Ac-LTF%cs5AYWAQL%c5AANleA-NH2					
925	Ac-LTF%cs5AYWAQL%c5AAAAAa-NH2					
926	Ac-LTF%cs6AYWAQL%c6AANleA-NH2					
927	Ac-LTF%cs6AYWAQL%c6AAAAAa-NH2					
928	Ac-LTF%cs6EYWAQL%c6AAAAAa-NH2	1894.94		1895.96	948.48	632.66
929	Ac-LTF%cs5EYWAQL%c5AAAAAa-NH2	1880.93		1881.94	941.47	627.98
930	Ac-LTF%cs6EYWAQCba%c6SAANH2	1709.83		1710.84	855.92	570.95
931	Ac-LTF%cs5EYWAQCba%c5SAANH2	1695.81		1696.82	848.92	566.28

[0258] 选定的示例性拟肽大环化合物的部分结构如下所示：

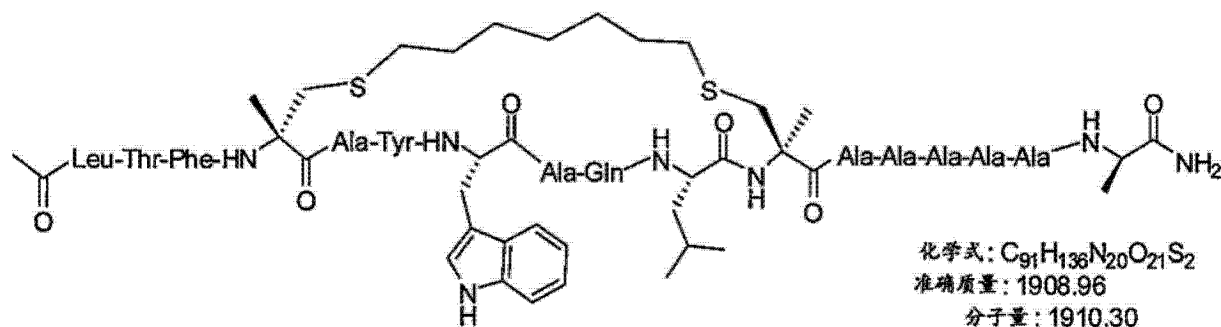


SP-918



SP-916/917

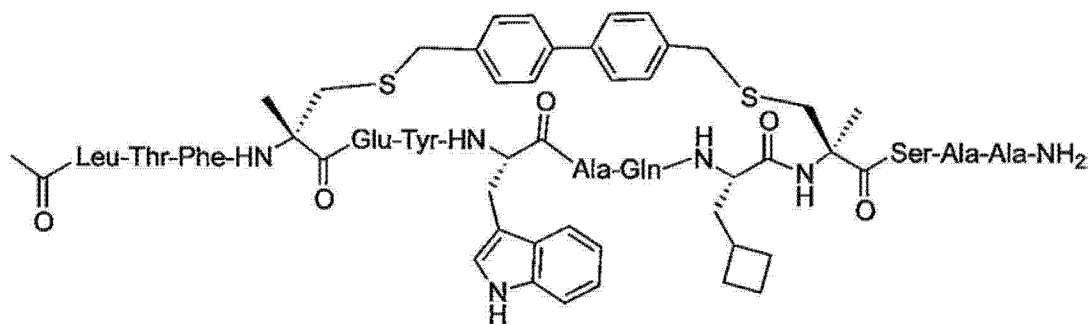
[0259] 示例性的拟肽大环化合物的结构如下所示：



Ac- L T F %cs7 A Y W A Q L %c7 A A A A A a -NH₂

SP-917

[0260] 示例性的拟肽大环化合物的另一结构如下所示：



SP-920

[0261] 表示为“#cs5”的氨基酸为通过 i 至 i+7、五亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 D- 半胱氨酸。表示为“#c5”的氨基酸为通过 i 至 i+7、五亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 L- 半胱氨酸。表示为“#cs6”的氨基酸为通过 i 至 i+7、六亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 D- 半胱氨酸。表示为“#c6”的氨基酸为通过 i 至

i+7、六亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 L- 半胱氨酸。表示为“#cs7”的氨基酸为通过 i 至 i+7、七亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 D- 半胱氨酸。表示为“#c7”的氨基酸为通过 i 至 i+7、七亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 L- 半胱氨酸。表示为“#cs8”的氨基酸为通过 i 至 i+7、八亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 D- 半胱氨酸。表示为“#c8”的氨基酸为通过 i 至 i+7、八亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 L- 半胱氨酸。表示为“% cs7”的氨基酸为通过 i 至 i+7、七亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-D- 半胱氨酸。表示为“% c7”的氨基酸为通过 i 至 i+7、七亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-L- 半胱氨酸。表示为“% cs8”的氨基酸为通过 i 至 i+7、八亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-D- 半胱氨酸。表示为“% c8”的氨基酸为通过 i 至 i+7、八亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-L- 半胱氨酸。表示为“% cs9”的氨基酸为通过 i 至 i+7、九亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-D- 半胱氨酸。表示为“% c9”的氨基酸为通过 i 至 i+7、九亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-L- 半胱氨酸。表示为“% cs10”的氨基酸为通过 i 至 i+7、十亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-D- 半胱氨酸。表示为“% c10”的氨基酸为通过 i 至 i+7、十亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-L- 半胱氨酸。表示为“pen8”氨基酸为通过 i 至 i+7、八亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 D- 青霉胺。表示为“Pen8”的氨基酸为通过 i 至 i+7、八亚甲基交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 L- 青霉胺。表示为“#csBph”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bph(4,4'- 双甲基- 二苯基) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 D- 半胱氨酸。表示为“#cBph”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bph(4,4'- 双甲基- 二苯基) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 L- 半胱氨酸。表示为“% csBph”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bph(4,4'- 双甲基- 二苯基) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-D- 半胱氨酸。表示为“% cBph”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bph(4,4'- 双甲基- 二苯基) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-L- 半胱氨酸。表示为“#csBpy”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bpy(6,6'- 双甲基-[3,3'] 联吡啶) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 D- 半胱氨酸。表示为“#cBpy”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bpy(6,6'- 双甲基-[3,3'] 联吡啶) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 L- 半胱氨酸。表示为“% csBpy”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bpy(6,6'- 双甲基-[3,3'] 联吡啶) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-D- 半胱氨酸。表示为“% cBpy”的氨基酸为通过 i 至 i+7、Bpy(6,6'- 双甲基-[3,3'] 联吡啶) 交联体连接到另一个含巯基的氨基酸的 α - 甲基-L- 半胱氨酸。以上指出的亚甲基单元的数目是指在交联体的两个巯基之间的亚甲基单元的数目。

[0262] 在一些实施方案中,例如,由于交联体的结构内的双键的构型(E 与 Z),拟肽大环化合物以多于一种异构体的形式获得。此类异构体可以或不可以通过常规的色谱方法分离。在一些实施方案中,一种异构体相对于另一种异构体具有改善的生物学性质。在一个实施方案中,拟肽大环化合物的 E 交联体烯烃异构体相对于它的 Z 对应异构体具有更好的溶解性、更好的靶标亲和性、更好的体内或体外效力、更高的螺旋度或改善的细胞透性。在另一个实施方案中,拟肽大环化合物的 Z 交联体烯烃异构体相对于它的 E 对应异构体具有更好的溶解性、更好的靶标亲和性、更好的体内或体外效力、更高的螺旋度或改善的细胞透性。

性。

[0263] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物不包括表 7 所示的拟肽大环化合物:

表 7

	序列
1	QSQQTF% csNLWLL% cs6QN
2	QSQQTF% csNLWLL% cs7QN
3	QSQQTF% csNLWLL% cs8QN
4	QSQQTF% csNLWLL% cs9QN

[0264] 所示的肽可包含 N- 末端封端基团如乙酰基或另外的连接体,如在封端基团和肽序列的起点之间的 β -丙氨酸。

[0265] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物不包含如表 7 所示的拟肽大环化合物结构。

[0266] 在其它实施方案中,拟肽大环化合物不包括表 7a 所示的拟肽大环化合物:

表 7a

编号	序列
1	Ac-QSQQTF#cs5NLWRLL#c5QN-NH ₂
2	Ac-QSQQTF#cs6NLWRLL#c6QN-NH ₂
3	Ac-QSQQTF#cs7NLWRLL#c7QN-NH ₂
4	Ac-QSQQTF#cs8NLWRLL#c8QN-NH ₂
5	Ac-QSQQTF#cs9NLWRLL#c9QN-NH ₂
6	Ac-QSQQTF% cs8NLWRLL% c8QN-NH ₂
7	Ac-QSQQTF#cs8NLWRLLPen8QN-NH ₂
8	Ac-QSQQTF#c8NLWRLL#c8QN-NH ₂
9	Ac-QSQQTF#c8NLWRLL#cs8QN-NH ₂
10	Ac-QSQQTF#cs8NLWALL#c8AN-NH ₂
11	Ac-QAibQQTF#cs8NLWALL#c8AN-NH ₂
12	Ac-QAibQQTF#cs8ALWALL#c8AN-NH ₂
13	Ac-QSQQTFpen8NLWRLLPen8QN-NH ₂

14	Ac-QSQQTFpen8NLWRLL#c8QN-NH2
15	Ac-QSQQTF% cs9NLWRLL% c9QN-NH2
16	Ac-LTF#cs8HYWAQL#c8S-NH2
17	Ac-LTF#cs8HYWAQI#c8S-NH2
18	Ac-LTF#cs8HYWAQN1e#c8S-NH2
19	Ac-LTF#cs8HYWAQL#c8A-NH2
20	Ac-LTF#cs8HYWAbuQL#c8S-NH2
21	Ac-LTF#cs8AYWAQL#c8S-NH2
22	Ac-LTF#cs8AYWAQL#c8A-NH2
23	Ac-LTF#cs8HYWAQLPen8S-NH2
24	Ac-LTFpen8HYWAQLPen8S-NH2
25	Ac-LTFpen8HYWAQL#c8S-NH2
26	Ac-LTF#cs7HYWAQL#hc7S-NH2
27	Ac-LTF% cs8HYWAQL% c8S-NH2
28	Ac-LTF% cs9HYWAQL% c9S-NH2
29	Ac-LTF% cs10HYWAQL% c10S-NH2
30	Ac-LTF% cs7HYWAQL% c7S-NH2
31	Ac-LTF% cs4BEBHYWAQL% c4BEBS-NH2
32	Ac-Fpen8AYWEAc3cL#c8A-NH2
33	Ac-F#cs8AYWEAc3cL#c8A-NH2
34	Ac-F% cs8AYWEAc3cL% c8A-NH2
35	Ac-LTFEHYWAQLTS-NH2

[0267] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物不包含如表 7a 所示的拟肽大环化合物结构。

[0268] 在其它实施方案中,拟肽大环化合物不包括表 7b 所示的和在 Muppidi 等人,Chem. Commun. (2011)DOI :10. 1039/c1cc13320a 中公开的拟肽大环化合物 :

表 7b

编号	序列
1	LTFEHYWAQLTS
2	LTFCHYWAQLCS
3	LTF#cBphHYWAQL#cBphS
4	LTF#cBpyHYWAQL#cBpyS
5	LTFCRYWARLCS
6	LTF#cBphRYWARL#cBphS
7	LTF#cBpyRYWARL#cBpyS
8	LTFcHYWAQLCS
9	LTF#csBphHYWAQL#cBphS
10	LTF#csBpyHYWAQL#csBpyS
11	LTF#csBphRYWARL#cBphS
12	LTF#csBpyRYWARL#cBpyS

其中在表 7b 中 C 表示 L- 半胱氨酸而 c 表示 D- 半胱氨酸 ;#cBph、#cBpy、#csBph 和 #csBpy 如本文中所定义。

[0269] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物不包含如表 7b 所示的拟肽大环化合物结构。

实施例 4 : α - 螺旋度的圆二色性 (CD) 分析

[0270] 使用带有第 2 版 Jasco Spectra Manager 系统软件的 Jasco J-815 分光偏振计 (Jasco Inc., Easton, MD) 通过 CD 光谱法分析肽溶液。使用珀尔帖 (Peltier) 温度控制器保持对光单元的温度控制。结果表示为从公式 $[\theta] = \theta_{\text{obs}} \cdot \text{MRW} / 10 \cdot l \cdot c$ 计算得到的平均摩尔椭圆度 $[\theta]$ (deg cm²dmol⁻¹), 在该公式中, θ_{obs} 为观察到的以毫度为单位的椭圆度, MRW 为肽的平均残基重量 (肽的分子量 / 残基数), l 为以厘米为单位的单元的光程长度, c 为以 mg/ml 为单位的肽浓度。通过氨基酸分析确定肽浓度。在温和 CD 缓冲液 (20mM 磷酸, pH2) 中制备肽的储备溶液。使用该储备溶液在温和 CD 缓冲液或含有 50% 三氟乙醇 (TFE) 的 CD 缓冲液中制备 0.05mg/ml 的肽溶液, 以用于在 10mm 光程单元中的分析。在 4℃ 下, 从 195 至 250nm, 以 0.2nm 的增量以及每分钟 50nm 的扫描速度扫描肽溶液的可变波长测量值。报告了六次扫描的平均值。

实施例 5 : 利用荧光偏振 (FP) 对 MDM2 的直接结合测定

[0271] 该测定按照以下一般方案进行 :

1. 将 MDM2 (内部, 41kD) 稀释到 FP 缓冲液 (高盐缓冲液 -200mM NaCl, 5mM CHAPS,

pH7.5) 中,从而制备 10 μ M 工作储备溶液。

2. 将 30 μ l 10 μ M 蛋白质储备溶液添加到 96 孔黑色 HE 微孔板 (Molecular Devices) 的 A1 和 B1 孔中。

3. 将 30 μ l FP 缓冲液填充到第 A2 至 A12、B2 至 B12、C1 至 C12 和 D1 至 D12 列中。

4. 蛋白质储备液从 A1、B1 经 2 或 3 倍系列稀释至 A2、B2 ;A2、B2 稀释至 A3、B3 ;... 在最后一个稀释点达到个位数的 nM 浓度。

5. 用 DMSO 将 1mM(在 100 % DMSO 中)FAM 标记的线性肽稀释到 100 μ M(1 : 10 稀释)。然后,用水从 100 μ M 稀释到 10 μ M(1 : 10 稀释),然后用 FP 缓冲液从 10 μ M 稀释到 40nM(1 : 250 稀释)。这就是工作溶液,其在孔中将是 10nM 浓度(1 : 4 稀释)。将稀释的 FAM 标记的肽保持在暗处,直至使用。

6. 将 10 μ l 10nM FAM 标记的肽添加到各孔中并温育,在不同时间点读数。
5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH₂ 的 K_d 为约 13.38nM。

实施例 6 :对 MDM2 的竞争性荧光偏振测定

[0272] 该测定按照以下一般方案进行 :

1. 将 MDM2(内部,41kD) 稀释到 FP 缓冲液(高盐缓冲液 -200mM NaCl,5mM CHAPS, pH7.5.) 中,从而制备 84nM(2X) 工作储备溶液。

2. 将 20 μ l 84nM(2X) 蛋白质储备溶液添加到 96 孔黑色 HE 微孔板 (Molecular Devices) 的各孔中。

3. 用 DMSO 将 1mM(在 100 % DMSO 中)FAM 标记的线性肽稀释到 100 μ M(1 : 10 稀释)。然后,用水从 100 μ M 稀释到 10 μ M(1 : 10 稀释),然后用 FP 缓冲液从 10 μ M 稀释到 40nM(1 : 250 稀释)。这就是工作溶液,其在孔中将是 10nM 浓度(1 : 4 稀释)。将稀释的 FAM 标记的肽保持在暗处,直至使用。

4. 用 FP 缓冲液制备未标记的肽剂量板,从 1 μ M(终浓度)肽开始,并使用以下稀释方案为 6 个点制备 5 倍系列稀释。

用 DMSO 将 10mM(在 100 % DMSO 中)稀释到 5mM(1 : 2 稀释)。然后,用 H₂O 从 5mM 稀释到 500 μ M(1 : 10 稀释),然后用 FP 缓冲液从 500 μ M 稀释到 20 μ M(1 : 25 稀释)。从 20 μ M(4X) 为 6 个点制备 5 倍系列稀释。

5. 将 10 μ l 系列稀释的未标记的肽转移到充填有 20 μ l 84nM 蛋白质的各孔中。

6. 将 10 μ l 10nM(4X)FAM 标记的肽添加到各孔中并温育 3 小时以读数。

实施例 7 :利用荧光偏振 (FP) 对 MDMX 的直接结合测定

[0273] 该测定按照以下一般方案进行 :

1. 将 MDMX(内部,40kD) 稀释到 FP 缓冲液(高盐缓冲液 -200mM NaCl,5mM CHAPS, pH7.5) 中,从而制备 10 μ M 工作储备溶液。

2. 将 30 μ l 10 μ M 蛋白质储备溶液添加到 96 孔黑色 HE 微孔板 (Molecular Devices) 的 A1 和 B1 孔中。

3. 将 30 μ l FP 缓冲液填充到第 A2 至 A12、B2 至 B12、C1 至 C12 和 D1 至 D12 列中。

4. 蛋白质储备液从 A1、B1 经 2 或 3 倍系列稀释到 A2、B2 ;A2、B2 稀释到 A3、B3 ;... 在最后一个稀释点达到个位数的 nM 浓度。

5. 用 DMSO 将 1mM(在 100 % DMSO 中)FAM 标记的线性肽稀释到 100 μ M(1 : 10 稀

释)。然后,用水从 100 μ M 稀释到 10 μ M(1 : 10 稀释),然后用 FP 缓冲液从 10 μ M 稀释到 40nM(1 : 250 稀释)。这就是工作溶液,其在孔中将是 10nM 浓度(1 : 4 稀释)。将稀释的 FAM 标记的肽保持在暗处,直至使用。

6. 将 10 μ l 10nM FAM 标记的肽添加到各孔中并温育,在不同时间点读数。

5-FAM-BaLTFEHYWAQLTS-NH₂ 的 K_d 为约 51nM。

实施例 8:对 MDMX 的竞争性荧光偏振测定

[0274] 该测定按照以下一般方案进行:

1. 将 MDMX(内部,40kD)稀释到 FP 缓冲液(高盐缓冲液-200mM NaCl,5mM CHAPS, pH7.5)中,从而制备 300nM(2X)工作储备溶液。

2. 将 20 μ l 300nM(2X)蛋白质储备溶液添加到 96 孔黑色 HE 微孔板(Molecular Devices)的各孔中。

3. 用 DMSO 将 1mM(在 100% DMSO 中)FAM 标记的线性肽稀释到 100 μ M(1 : 10 稀释)。然后,用水从 100 μ M 稀释到 10 μ M(1 : 10 稀释),然后用 FP 缓冲液从 10 μ M 稀释到 40nM(1 : 250 稀释)。这就是工作溶液,其在孔中将是 10nM 浓度(1 : 4 稀释)。将稀释的 FAM 标记的肽保持在暗处,直至使用。

4. 用 FP 缓冲液准备未标记的肽剂量板,从 5 μ M(终浓度)肽开始,并使用以下稀释方案为 6 个点制备 5 倍系列稀释。

5. 用 DMSO 将 10mM(在 100% DMSO 中)稀释到 5mM(1 : 2 稀释)。然后,用 H₂O 从 5mM 稀释到 500 μ M(1 : 10 稀释),然后用 FP 缓冲液从 500 μ M 稀释到 20 μ M(1 : 25 稀释)。从 4 μ M(4X)为 6 个点制备 5 倍系列稀释。

6. 将 10 μ l 1 系列稀释的未标记的肽转移到填充有 20 μ l 300nM 蛋白质的各孔中。

7. 将 10 μ l 10nM(4X)FAM 标记的肽添加到各孔中并温育 3 小时以读数。

[0275] 实施例 4-7 的结果在表 8 中示出。下列标度用于 IC₅₀ 和 K_i 值:“+”表示大于 1000nM 的值,“++”表示大于 100nM 且小于或等于 1000nM 的值,“+++”表示大于 10nM 且小于或等于 100nM 的值,而“++++”表示小于或等于 10nM 的值。细胞活力分析结果(如实施例 9 所述进行)也包括在表 8 中,使用下列标度:“+”表示大于 30 μ M 的值,“++”表示大于 15 μ M 且小于或等于 30 μ M 的值,“+++”表示大于 5 μ M 且小于或等于 15 μ M 的值,而“++++”表示小于或等于 5 μ M 的值。“IC₅₀ 比”表示 p53+/+ 细胞中的平均 IC₅₀ 相对于 p53-/- 细胞中的平均 IC₅₀ 的比值。

表 8

SP	IC50 (MDM2)	IC50 (MDMX)	Ki (MDM2)	Ki (MDMX)	SJSA-1 EC50 (72h)	IC50 比
449	++++	++++	++++	++++	++++	
450			++		+++	
451			+++		+++	
452					+	
456			++++	+++	+++	
457			++++	++++	++++	
461					+++	
459			+	+	+	
460			+	+	+	
463					++	
464					+	
153			++++	+++	++++	1-29
465			++++	++++		
466			++++	++++		
470			++++	++++		
916	+++	+++	++++	++++	++	
917	+++	+++	++++	+++	+	
919					+++	

实施例 9 : 竞争性结合 ELISA (MDM2 和 MDMX)

[0276] 在室温下将 p53-His6 蛋白质 (30nM/ 孔) 在 96 孔 Immulon 板的孔中包被过夜。在实验当天, 使用自动 ELISA 洗板器用 1X PBS- 吐温 20 (0.05%) 洗板, 在室温下采用 ELISA 微孔封闭将板封闭 30 分钟; 通过用 1X PBS- 吐温 20 (0.05%) 洗板以洗掉过量的封闭剂。在无菌水中将肽从 10mM DMSO 储备液稀释至 500 μ M 工作储备液, 在 0.5% DMSO 中进行进一步稀释, 以在样品中保持 DMSO 浓度恒定。向孔中加入 50 μ l 体积的 2X 期望浓度的肽, 随后添加稀释的 GST-MDM2 或 GST-HMDX 蛋白质 (最终浓度: 10nM)。在室温下温育样品 2h, 用 PBS- 吐温 20 (0.05%) 洗板, 之后添加 100 μ l 的在 HRP 稳定缓冲液中稀释至 0.5 μ g/ml 的 HRP 偶联抗 GST 抗体 [Hypromatrix, INC]。在与检测抗体温育 30min 后, 洗板, 并与 100 μ l/ 孔的 TMB-E 底物溶液温育高达 30 分钟; 用 1M HCL 停止反应, 并在微孔板阅读器上在 450nm 下测量吸光度。使用 Graph Pad PRISM 软件分析数据。

实施例 10 : 细胞活力分析

[0277] 该分析按照以下一般方案进行:

细胞接种: 在测定前一天对细胞进行胰蛋白酶化, 计数, 并以预定密度接种在 96 孔板中。对使用中的各个细胞系, 使用以下细胞密度:

- SJSA-1 : 7500 个细胞 / 孔
- RKO : 5000 个细胞 / 孔
- RKO-E6 : 5000 个细胞 / 孔
- HCT-116 : 5000 个细胞 / 孔
- SW-480 : 2000 个细胞 / 孔
- MCF-7 : 5000 个细胞 / 孔

[0278] 在研究当天, 在室温下将培养基替换为含有 11% FBS 的新鲜培养基 (测定培养基)。每孔添加 180 μ l 测定培养基。不含细胞的对照孔接收 200 μ l 培养基。

[0279] 肽稀释 :所有稀释均在室温下进行并在室温下添加至细胞。

- 在 DMSO 中制备肽的 10mM 储备液。使用 DMSO 作为稀释剂,利用 1 : 3 稀释方案连续稀释储备液,以得到 10、3.3、1.1、0.33、0.11、0.03、0.01mM 的溶液。使用无菌水将连续 DMSO 稀释的肽稀释 33.3 倍。这产生了 10X 工作储备液的范围。也为对照孔准备了 DMSO/ 无菌水 (3% DMSO) 混合物。

- 因此工作储备浓度范围 μM 将是 300、100、30、10、3、1、0.3 和 0 μM 。使用多通道在各稀释步骤充分混合。

- H 行含有对照。H1-H3 将接收 20 μl 测定培养基。H4-H9 将接收 20 μl 3% DMSO- 水载体。H10-H12 将含有不含细胞的单独培养基对照。

- 阳性对照 :MDM2 小分子抑制剂 Nutlin-3a(10mM) 用作阳性对照。使用与肽相同的稀释方案稀释 Nutlin。

[0280] 向细胞添加工作储备液 :

- 向适当的孔中添加 20 μl 10X 期望浓度,以在孔中在 200 μl 总体积中达到终浓度。(20 μl 1300 μM 肽 +180 μl 培养基中的细胞 = 在孔中在 200 μl 体积中的 30 μM 终浓度)。使用移液管轻柔混合数次。因此,使用的终浓度范围将是 30、10、3、1、0.3、0.1、0.03 和 0 μM (对于强的肽,包括进一步的稀释)。

- 对照包括未获得肽但与包含肽的孔包含相同浓度的 DMSO 的孔,和不含细胞的孔。

- 在 37°C 在潮湿的 5% CO_2 气氛下温育 72 小时。

- 使用来自 Promega 的 MTT 试剂测定细胞的活力。SJSA-1、RK0、RK0-E6、HCT-116 细胞的活力在第 3 天测定, MCF-7 细胞在第 5 天测定,而 SW-480 细胞在第 6 天测定。在指定的温育时间结束时,使板回到室温。从各孔中移除 80 μl 测定培养基。向各孔添加 15 μl 解冻的 MTT 试剂。

- 将板在 37°C 在潮湿的 5% CO_2 气氛下温育 2h,并按照生产商的方案添加 100 μl 增溶试剂。于室温在搅拌下温育 1h,并在 Synergy Biotek 多板阅读器上读取 570nm 处的吸光度。

- 使用 GraphPad PRISM 分析工具分析相对于 DMSO 对照的细胞活力。

[0281] 试剂 :

- Invitrogen 细胞培养基

- i. Falcon96 孔透明细胞培养处理板 (Nunc353072)

- DMSO (Sigma D2650)

- RPMI1640 (Invitrogen72400)

- MTT (Promega G4000)

[0282] 仪器 :用于吸光度读出的多板阅读器 (Synergy2)。

[0283] 结果在表 8 中示出。

实施例 11 :P21ELISA 测定

[0284] 该测定按照以下一般方案进行 :

细胞接种 :

- 在测定前一天对 SJSA1 细胞进行胰蛋白酶化,计数,并以 7500 个细胞 /100 μl / 孔的密度接种在 96 孔板中。

•在研究当天,将培养基替换为新鲜的 RPMI-11% FBS(测定培养基)。每孔添加 90 μ l 测定培养基。不含细胞的对照孔接收 100 μ l 培养基。

[0285] 肽稀释:

•在 DMSO 中制备肽的 10mM 储备液。使用 DMSO 作为稀释剂,利用 1 : 3 稀释方案连续稀释储备液,以得到 10、3.3、1.1、0.33、0.11、0.03、0.01mM 的溶液。使用无菌水将连续 DMSO 稀释的肽稀释 33.3 倍。这产生了 10X 工作储备液范围。也为对照孔准备了 DMSO/ 无菌水 (3% DMSO) 混合物。

•因此工作储备液浓度范围 μ M 将是 300、100、30、10、3、1、0.3 和 0 μ M。使用多通道在各稀释步骤充分混合。

•H 行含有对照。H1-H3 将接收 10 μ l 测定培养基。H4-H9 将接收 10 μ l 3% DMSO- 水载体。H10-H12 将含有不含细胞的单独培养基对照。

•阳性对照:HDM2 小分子抑制剂 Nutlin-3a(10mM) 用作阳性对照。使用与肽相同的稀释方案稀释 Nutlin。

[0286] 向细胞添加工作储备液:

•向适当的孔中添加 10 μ l 10X 期望浓度,以在孔中在 100 μ l 总体积中达到终浓度。(10 μ l 300 μ M 肽 +90 μ l 培养基中的细胞=在孔中在 100 μ l 体积中的 30 μ M 终浓度)。因此,使用的终浓度范围将是 30、10、3、1、0.3 和 0 μ M。

•对照将包括未获得肽但与包含肽的孔包含相同浓度的 DMSO 的孔,和不含细胞的孔。

•温育后 20h,吸出培养基;用 1X PBS(不含 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$) 洗涤细胞,并在冰上在 60 μ l 1X 细胞裂解缓冲液(稀释到 1X 并补充有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 Cell Signaling technologies 10X 缓冲液)中裂解 30min。

•将板在 4 $^{\circ}$ C 下以 5000rpm 的速度离心 8min;收集澄清的上清液并于 -80 $^{\circ}$ C 冷冻直至进一步使用。

[0287] 蛋白质估计:

•使用来自 Thermofisher 的 BCA 蛋白质检测试剂盒和 BSA 标准来测定裂解物的总蛋白质含量。通常预期每孔约 6-7 μ g 蛋白质。

•每孔使用 50 μ l 裂解物来建立 p21ELISA。

[0288] 人类总 p21ELISA:ELISA 测定方案按照生产商的说明书进行。各孔使用 50 μ l 裂解物,并且各孔一式三份建立。

[0289] 试剂:

•-Cell-Based Assay(-)-Nutlin-3(10mM):Cayman Chemicals,目录号 600034

•-OptiMEM, Invitrogen 目录号 51985

•-Cell Signaling 裂解缓冲液 (10X), Cell signaling technology, 目录号 9803

•-蛋白酶抑制剂混合片(迷你), Roche Chemicals, 目录号 04693124001

•-磷酸酶抑制剂混合片, Roche Chemicals, 目录号 04906837001

•-人类总 p21ELISA 试剂盒, R&D Systems, DYC1047-5

•-终止溶液 (1M HCL), Cell Signaling Technologies, 目录号 7002

[0290] 仪器:微型离心机-Eppendorf 5415D 和用于吸光度读出的多板阅读器 (Synergy2)。

实施例 12 : 胰蛋白酶 3 检测试验 :

[0291] 该试验按照以下一般方案进行 :

细胞接种 : 在测定前一天对 SJSA1 细胞进行胰蛋白酶化, 计数, 并以 7500 个细胞 /100 μ l/ 孔的密度接种在 96 孔板中。在研究当天, 将培养基替换为新鲜的 RPMI-11 % FBS (测定培养基)。每孔添加 180 μ l 测定培养基。不含细胞的对照孔接收 200 μ l 培养基。

[0292] 肽稀释 :

- 在 DMSO 中制备肽的 10mM 储备液。使用 DMSO 作为稀释剂, 利用 1 : 3 稀释方案连续稀释储备液, 以得到 10、3.3、1.1、0.33、0.11、0.03、0.01mM 的溶液。使用无菌水将连续 DMSO 稀释的肽稀释 33.3 倍。这产生了 10X 工作储备液范围。也为对照孔准备了 DMSO/ 无菌水 (3% DMSO) 混合物。

- 因此工作储备液浓度范围 μ M 将是 300、100、30、10、3、1、0.3 和 0 μ M。使用多通道在各稀释步骤充分混合。向适当的孔中添加 20 μ l 10X 工作储备液。

- H 行含有对照。H1-H3 将接收 20 μ l 测定培养基。H4-H9 将接收 20 μ l 3% DMSO- 水载体。H10-H12 将含有不含细胞的单独培养基对照。

- 阳性对照 : MDM2 小分子抑制剂 Nutlin-3a (10mM) 用作阳性对照。使用与肽相同的稀释方案稀释 Nutlin。

[0293] 向细胞添加工作储备液 :

- 向适当的孔中添加 10 μ l 10X 期望浓度, 以在孔中在 100 μ l 总体积中达到终浓度。(10 μ l 300 μ M 肽 + 90 μ l 培养基中的细胞 = 在孔中在 100 μ l 体积中的 30 μ M 终浓度)。因此, 使用的终浓度范围将是 30、10、3、1、0.3 和 0 μ M。

- 对照将包括未获得肽但与包含肽的孔包含相同浓度的 DMSO 的孔, 和不含细胞的孔。

- 温育后 48h, 从各孔中吸出 80 μ l 培养基; 每孔添加 100 μ l 胰蛋白酶 3/7Glo 测定试剂 (Promega 胰蛋白酶 3/7glo 测定系统, G8092), 于室温在轻柔振荡下温育 1h。

- 在 Synergy Biotek 多板阅读器上对读取发光。

- 数据作为胰蛋白酶 3 对经 DMSO 处理的细胞的激活而进行分析。

实施例 13 : 由拟肽大环化合物引起的细胞裂解

[0294] 提前一天以 7500 个细胞 / 孔并使用 100 μ l/ 孔的生长培养基将 SJSA-1 细胞铺设在透明平底板 (Costar, 目录号 353072) 中, 保留 H 行 10-12 列为空用于单独放置培养基。在试验当天, 将培养基更换为 RPMI 1% FBS 培养基, 每孔 90 μ l 培养基。

[0295] 在 100% 的 DMSO 中制备拟肽大环化合物的 10mM 储备溶液。然后将拟肽大环化合物在 100% 的 DMSO 中进行连续稀释, 然后进一步在无菌水中稀释 20 倍, 以制备各拟肽大环化合物在 5% DMSO/ 水中浓度为 500 μ M 至 62.5 μ M 的工作储备溶液。

[0296] 将 10 μ l 的各化合物加入到 90 μ l 的 SJSA-1 细胞中, 以在含 0.5% DMSO 的培养基中得到 50 μ M 至 6.25 μ M 的终浓度。阴性对照 (非裂解) 样品为单独的 0.5% DMSO, 而阳性对照 (裂解) 样品包括 10 μ M 蜂毒肽和 1% Triton X-100。

[0297] 将细胞板在 37°C 下温育 1 小时。在温育 1 小时后, 通过显微镜检查细胞的形态, 然后在室温下将该板在 1200rpm 下离心 5 分钟。对于每个拟肽大环化合物和对照样品, 将 40 μ l 上清液转移到透明的分析板上。使用来自 Cayman 的目录号 #1000882 的 LDH 细胞毒性分析试剂盒测定 LDH 的释放。

实施例 14 :p53GRIP 试验

[0298] Thermo Scientific*BioImage p53-Hdm2Redistribute Assay 监测响应于药物化合物或其它刺激物,蛋白质与MDM2的相互作用以及GFP-标记的p53的细胞转位。重组CHO-hIR细胞稳定地表达与增强绿色荧光蛋白(EGFP)的C末端融合的人p53(1-312)和PDE4A4-Hdm2(1-124),后者是PDE4A4和Hdm2(1-124)之间的融合蛋白。它们提供了用于检测实验条件对p53和MDM2的相互作用的影响的即用型测定系统。使用HCS平台进行成像和分析。

[0299] 将CHO-hIR细胞常规维持在补充有1%青霉素-链霉素、0.5mg/ml遗传霉素、1mg/ml Zeocin和10%FBS的Ham F12培养基中。在进行测定之前18-24h,使用培养基以7000个细胞/100 μ l/孔的密度将细胞接种至96孔板中。第二天,更新培养基,并向细胞添加PD177至3 μ M的最终浓度以激活灶形成。对照孔保持为不含PD-177溶液。用PD177刺激后24h,用Opti-MEM培养基洗涤细胞一次,并向细胞添加50 μ L补充有PD-177(6 μ M)的Opti-MEM培养基。在无菌水中将肽从10mM DMSO储备液稀释至500 μ M工作储备液,在0.5% DMSO中进行进一步稀释,以保持样品中的DMSO浓度恒定。最终的最高DMSO浓度是0.5%,并将其用作阴性对照。使用Cayman Chemicals Cell-Based Assay(-)-Nutlin-3(10mM)作为阳性对照。使用与将50 μ l 2X期望浓度的肽添加至适当的孔中相同的稀释方案稀释Nutlin以达到最终期望浓度。然后在湿润的5% CO₂气氛和37°C下,细胞与肽温育6h。在温育期之后,在室温下通过轻轻地吸出培养基并每孔添加150 μ l固定溶液来固定细胞20分钟。每次用200 μ l PBS/孔洗涤固定的细胞4次。在最后一次洗涤结束时,添加100 μ l 1 μ M Hoechst染色液。将密封的板在黑暗中温育至少30分钟,用PBS洗涤,以除去过量的染色剂,并向每孔中添加PBS。培养板可在4°C下于黑暗中储存长达3天。利用位于使用针对Hoechst和GFP的10x物镜、XF-100滤光器组的Cellomics Arrayscan仪器上的分子转位模块对p53/MDM2的转位进行成像。输出参数是Mean-CircRINGAveIntenRatio(核和细胞质的平均荧光强度的比例(孔平均值))。将用于图像分析的每孔最小可接受细胞数设置成500个细胞。

实施例 15 :拟肽大环化合物的溶解度测定

[0300] 首先将拟肽大环化合物溶解于纯的N,N-二甲基乙酰胺(DMA, Sigma-Aldrich, 38840-1L-F)中以制备在20-140mg/mL的浓度范围的20X储备溶液。将DMA储备溶液在含有2% Solutol-HS-15、25mM组氨酸、45mg/mL甘露醇的水性载体中稀释20倍,以获得拟肽大环化合物在5% DMA、2% Solutol-HS-15、25mM组氨酸、45mg/mL甘露醇中的1-7mg/ml的终浓度。通过反复移液或轻轻涡旋将终溶液轻轻地混合,然后在室温下将终溶液在超声波水浴中超声处理10分钟。然后,使用7x目视放大器在通风橱中进行仔细的目视观察,以确定沉淀物是否在底部上或作为悬浮物存在。根据需要检测另外的浓度范围,以确定每种拟肽大环化合物的最大溶解度极限。