

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年2月29日(29.02.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/043250 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 4/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/030223
- (22) 国際出願日: 2023年8月23日(23.08.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-132147 2022年8月23日(23.08.2022) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 金子 麻依 (KANEKO Mai); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 田村 崇 (TAMURA Takashi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 鈴木 晃生 (SUZUKI Koo); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 津村 享佑 (TSUMURA Kyosuke); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 大橋 紀之 (OHASHI Noriyuki); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 公地 将大 (KOCHI Masahiro); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 橋本 一彦 (HASHIMOTO Ichihiko); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 宮原 建太 (MIYAHARA Kenta); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 堀込 弘記 (HORIGOME Hiroki); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

- (74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(54) Title: CYCLIC PEPTIDE OR SALT THEREOF, AND MDMX INHIBITOR

(54) 発明の名称: 環状ペプチドまたはその塩、およびMDMX阻害剤

$$r = \frac{2\sqrt{b^2 + c^2}}{\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{c^2 + a^2}} \quad (2)$$

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a cyclic peptide having a high cell membrane permeability or a salt thereof, and an MDMX inhibitor. The present invention provides a cyclic peptide that is represented by formula (1) as defined in the description and has the following characteristics (a) to (c), or a salt thereof. (a) In the structure of the cyclic peptide, when the axial length of the longest axial direction of the main chain structure is referred to as a and the axial lengths of the other two directions orthogonal to a and mutually orthogonal to each other are referred to as b and c, the molecular shape factor r, which is calculated by formula (2) via the ellipsoid approximation for determining the axial lengths of a, b and c, is within the range of 0.4-0.6. (b) The main chain structure of the aforesaid peptide contains a sulfur atom. (c) The aforesaid peptide is nonionic in a physiological environment.

(57) 要約: 本発明は、優れた細胞膜透過性を有する環状ペプチドまたはその塩、並びにMDMX阻害剤を提供することを課題とする。本発明によれば、本明細書で定義する式(1)で表され、下記(a)~(c)の特徴を有する、環状ペプチドまたはその塩が提供される。(a)環状ペプチドの構造において、主鎖構造の最も長い軸方向の軸長をaとし、aと直交し、互いに直交する他の2方向の軸長をb、cとした時に、a、b、cの各軸長を求める楕円体近似を行う段階を経て、下記式(2)で計算される分子形状因子rが0.4~0.6の範囲に含まれる;(b)上記ペプチドの主鎖構造に硫黄原子を含む;(c)上記ペプチドが生理環境下において非イオン性である。

WO 2024/043250 A1

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：環状ペプチドまたはその塩、およびMDMX阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、細胞膜透過性を有する環状ペプチド、およびMDMX阻害剤に関する。

背景技術

[0002] ヒト転写因子タンパク質 p53 は、DNA 損傷および細胞ストレスに応答して、細胞増殖停止またはアポトーシスを誘導することにより、悪性転換からの細胞の保護に重要な役割を果たす。MDM2 および MDMX は、p53 と相互作用し、p53 の機能を負に制御し、その転写活性を阻害する腫瘍性タンパク質として知られている。MDM2 および MDMX は、多くのがんで増幅または過剰発現していることが認められ、ヒトのがんの発生と進行に関与している。p53-MDM2 相互作用および p53-MDMX 相互作用に対する阻害剤は、p53 活性を回復させることができるため、抗がん剤として期待される。近年、MDMX 阻害剤として、低分子化合物である Nutlin-3a 等が野生型 p53 遺伝子を有するがん細胞を効率よく死滅させることが報告されている。一方、MDMX 阻害剤に関しては、有効な化合物は報告されておらず、MDMX が過剰発現しているがん細胞に対する治療法が未だ確立されていない。

[0003] 近年、ペプチド化合物（分子量 500～2000）は、タンパク質-タンパク質相互作用（Protein-Protein interaction: PPI）と呼ばれる標的に対して相互作用可能であり、かつ、細胞膜透過性を付与できる可能性があり、注目されている。特に、環状ペプチドは、直鎖ペプチドに比べて、標的タンパク質との標的結合性、特異性、細胞膜透過性、および代謝に対する安定性の向上等のメリットがある。例えば、シクロスポリン等の天然物由来の環状ペプチドが医薬品として上市されている。PPI の広い相互作用面に対して、高い標的結合性を得るためには、10ア

ミノ酸残基以上の環状ペプチドが好ましいが、10アミノ酸残基以上の環状ペプチドは、一般的に細胞膜透過性は高くないことが分かっている。

[0004] p53は、トランスアクチベーション(TA)ドメインの α ヘリックス領域の結合残基(Phe¹⁹、Leu²²、Trp²³)を介して、MDMXの疎水性ポケットに結合している。特許文献1および2においては、p53の α ヘリックス領域を創薬シードとして、ステーブル架橋を利用した環状ペプチドであるMDM2/MDMX二重阻害剤が記載されている。特許文献3および非特許文献1においては、 β ターン配列を組み合わせることで、シクロスポリン様の分子設計により β シート構造を形成し、p53のTAドメインを模倣した環状ペプチドであるMDM2/MDMX二重阻害剤が記載されている。また、特許文献4には、チオエーテル環状ペプチド化合物において、長鎖アルキル側鎖導入により疎水性を向上させ、親疎水環境下での構造変化を利用し、細胞膜透過性を付与する設計が報告されている。

[0005] 非特許文献2においては、上記のような配座を制御した環状ペプチドの他に、p53のTAドメインの代わりにMDMXのポケットに結合できる低分子化合物を利用したMDMX阻害剤が記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開WO2015/153761号公報
特許文献2：国際公開WO2013/123266号公報
特許文献3：国際公開WO2021/102322号公報
特許文献4：国際公開WO2015/030014号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：R. Fasan, R. L. A. Dias, K. Moehle, O. Zerbe, D. Obrecht, P. R. E. Mittl, M. G. Grutter, J. A. Robinson. (2006). Structure-Activity Studies in a Family of β -Hairpin Protein Epitope Mimetic Inhibitors of the p53-HDM2 Protein-Protein Interaction. *ChemBioChem*, 7, 515-526.

非特許文献2 : D. H. Yu, Z. Y. Xu, S. Mo, L. Yuan, X. D. Cheng, J. J. Qin. (2020). Targeting MDMX for Cancer Therapy: Rationale, Strategies, and Challenges. Front. Oncol. 10, article 1389.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 環状ペプチドは標的との標的結合性は高いが、細胞膜透過性は低い。特許文献1～3および非特許文献1においては、環状ペプチドを、細胞膜透過に望ましい配座に制御する設計により、細胞膜透過性の向上を図っている。しかし、いずれの試みを用いてもなお課題は残っており、細胞膜透過性の付与には新しい設計が求められている。

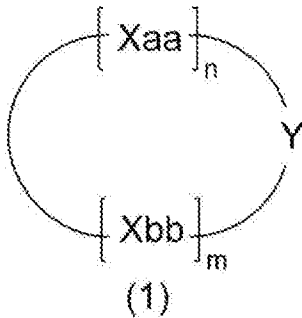
[0009] 上記の通り、MDMX阻害剤は様々ながん治療において有効な治療薬になり得ると考えられ、低分子化合物からペプチド化合物まで種々のMDMX阻害剤が開発されてきた。しかし、十分な細胞膜透過性を有する阻害剤は得られていない。本発明は、優れた細胞膜透過性を有する環状ペプチドまたはその塩を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記環状ペプチドまたはその塩を含む、MDMX阻害剤を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本明細書において規定する(a)から(c)の特徴を有する環状ペプチドまたはその塩が、優れた細胞膜透過性を有することを見出した。本発明は上記の知見に基づいて完成したものである。本発明によれば、以下の発明が提供される。

[0011] <1> 下記式(1)で表され、下記(a)～(c)の特徴を有する、環状ペプチドまたはその塩。

[化1]



式中、Yは、 $*-CR^1-S-CR^2-*$ で表される2価の基を示し、 R^1 および R^2 は水素原子または置換基を示し、*はX a aおよびX b bと結合する位置を示し、

n個のX a aはそれぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

m個のX b bはそれぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

n + mは、5 ~ 50の整数を示し；

(a) 環状ペプチドの構造において、主鎖構造の最も長い軸方向の軸長をaとし、aと直交し、互いに直交する他の2方向の軸長をb、cとした時に、a、b、cの各軸長を求める楕円体近似を行う段階を経て、下記式(2)で計算される分子形状因子rが0.4 ~ 0.6の範囲に含まれる；

[化2]

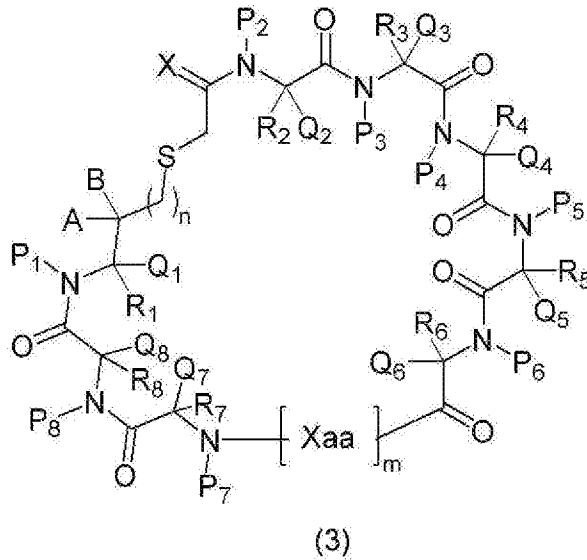
$$r = \frac{2\sqrt{b^2 + c^2}}{\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{c^2 + a^2}} \quad (2)$$

(b) 前記ペプチドの主鎖構造に硫黄原子を含む；

(c) 前記ペプチドが生理環境下において非イオン性である。

<2> 下記式(3)で表される、<1>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[化3]



式中、

Xは、酸素原子、または硫黄原子であり、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 Q_1 、 Q_2 、 Q_3 、 Q_4 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 、 Q_8 、AおよびBは、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有しているもよいアルキル基、置換基を有しているもよいアルケニル基、置換基を有しているもよいアルキニル基、置換基を有しているもよい芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい非芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい芳香族複素環式基、または置換基を有しているもよい非芳香族複素環式基であり、

P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 、および P_8 は、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有しているもよいアルキル基、置換基を有しているもよいアルケニル基、置換基を有しているもよいアルキニル基、置換基を有しているもよい芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい非芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい芳香族複素環式基、または置換基を有しているもよい非芳香族複素環式基であり、あるいは、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、AおよびBが結合している炭素原子は P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 および P_8 が結合している窒素原子と

一緒になって複素環を形成していてもよく、

m 個の $X a a$ は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

n は、0～5の整数であり、 m は、0～2の整数である。

<3> n が0または1である、<2>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

<4> m が1である、<2>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

<5> 前記 R_3 から R_8 もしくは Q_3 から Q_8 のうち少なくとも1つが、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、または置換基を有していてもよい芳香族複素環式基である、<2>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

<6> 前記 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 もしくは Q_3 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 、 Q_8 のうち少なくとも1つが、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、または置換基を有していてもよい芳香族複素環式基である、<2>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

<7> 前記 R_1 および Q_1 または A および B 、および P_1 は、 R_1 および Q_1 または A および B が結合している炭素原子および P_1 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していても良く、また、前記 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 Q_2 、 Q_3 、 Q_4 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 および Q_8 が結合している炭素原子は P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 および P_8 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していてもよく、前記 $X a a$ がプロリンであってもよく、これらから形成される構造によって少なくとも1つの複素環を含む、<2>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

<8> 前記 R_1 および Q_1 または A および B 、および P_1 は、 R_1 および Q_1 または A および B が結合している炭素原子および P_1 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していても良く、また、前記 R_2 および Q_2 が結合している炭素原子は P_2 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していてもよく、前記 $X a a$ がプロリンであってもよく、これらから形成される構造によって少なくとも1つの複素環を含む、<2>に記載の環状

ペプチドまたはその塩。

<9> 前記R₁およびQ₁またはAおよびB、およびP₁は、R₁およびQ₁またはAおよびBが結合している炭素原子およびP₁が結合している窒素原子と一緒になってピロリジン環を形成していても良く、また、前記R₂およびQ₂が結合している炭素原子はP₂が結合している窒素原子と一緒になってピロリジン環を形成していてもよく、前記X a aがプロリンであってもよく、これらから形成される構造によって少なくとも1つのピロリジン環を含む、<2>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

<10> 前記R₁およびQ₁またはAおよびBおよびX a aは、それぞれ任意のD-アミノ酸残基または任意のD-アミノ酸類縁体残基である、<2>に記載の環状ペプチドまたはその塩。

<11> <1>~<10>の何れかーに記載の環状ペプチドまたはその塩を含む、MDMX阻害剤。

[0012] <A> <1>から<10>の何れかーに記載の環状ペプチドまたはその塩を対象に投与することを含む、MDMXを阻害する方法。

 MDMXを阻害する処置において使用するための<1>から<10>の何れかーに記載の環状ペプチドまたはその塩。

<C> MDMX阻害剤の製造のための、<1>から<19>の何れかーに記載の環状ペプチドまたはその塩の使用。

発明の効果

[0013] 本発明の環状ペプチドまたはその塩およびMDMX阻害剤は、優れた細胞膜透過性を有する。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、環状ペプチドの二次元で描画した構造式を三次元構造化したものを示す。

[図2]図2は、環状ペプチドの構造の楕円体近似を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明について詳細に説明する。

本明細書において「～」は、その前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

[0016] <用語の説明>

アミノ酸は、アミノ基およびカルボキシル基の両方を含有する分子を意味する。アミノ酸としては、天然アミノ酸又は非天然アミノ酸のいずれでもよく、D-およびL-異性体のいずれでもよい。アミノ酸としては、 α -アミノ酸でもよい。 α -アミノ酸は、 α -炭素として指定される炭素に結合したアミノ基およびカルボキシル基を含有する分子を意味する。

[0017] 天然アミノ酸は、アラニン (A)、アルギニン (R)、アスパラギン (N)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン (Q)、グルタミン酸 (E)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロシン (I)、ロイシン (L)、リジン (K)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、プロリン (P)、セリン (S)、トレオニン (T)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) およびバリン (V) の何れかを示す。

非天然アミノ酸は、上記した20種類の天然アミノ酸以外のアミノ酸を意味する。

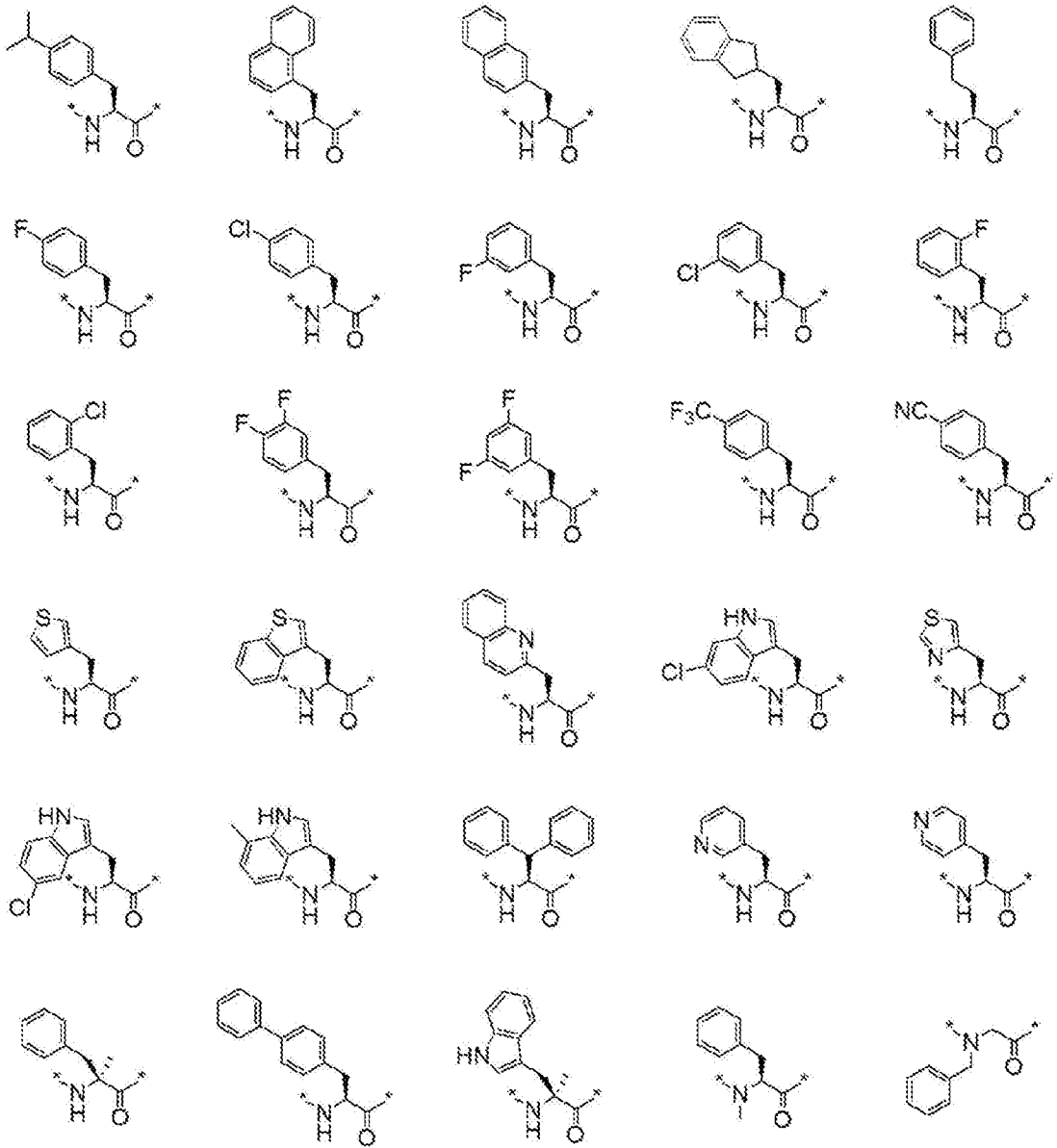
アミノ酸類縁体は、構造的にアミノ酸に類似し、環状ペプチドの製造においてアミノ酸の代わりに使用することができる分子を意味する。

[0018] アミノ酸類縁体としては、 β -アミノ酸、およびアミノ基またはカルボキシル基が同様に反応性の基により置換されたアミノ酸（例えば、第一級アミンの第二級もしくは第三級アミンによる置換、またはカルボキシ基のエステルによる置換）が挙げられるが、特に限定されない。 β -アミノ酸は、アミノ基およびカルボキシル基両方を β 配置で含有する分子を意味する。

[0019] 非天然アミノ酸残基およびアミノ酸類縁体残基としては、以下を挙げることができるが、特に限定されない。

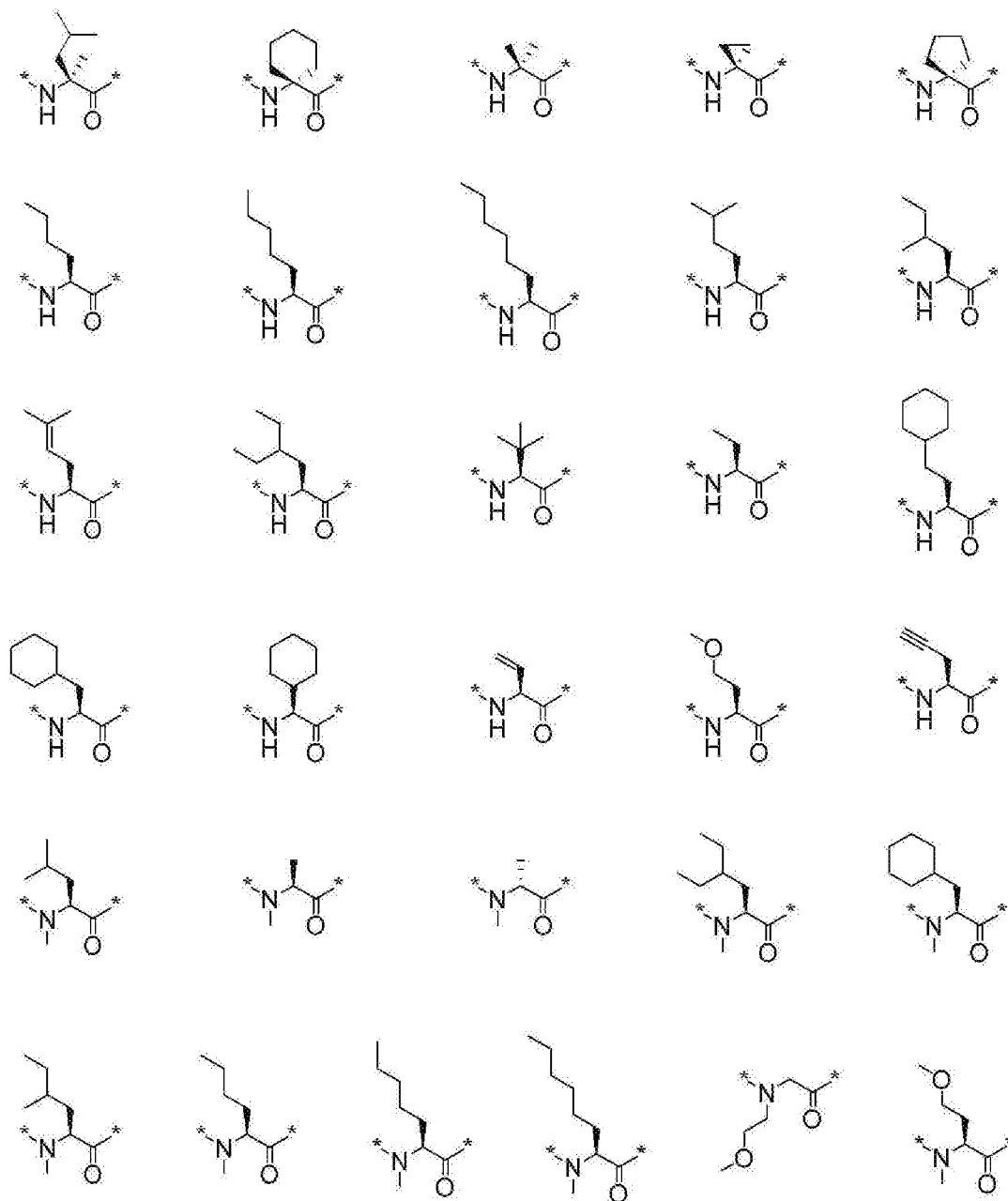
[0020]

[化4]



[0021]

[化5]



[0022] アミノ酸類縁体には β -アミノ酸類縁体が含まれる。 β -アミノ酸類縁体の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：環状 β -アミノ酸類縁体； β -アラニン；(R)- β -フェニルアラニン；(R)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-酢酸；(R)-3-アミノ-4-(1-ナフチル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2, 4-ジクロロフェニル)酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2-クロロフェニル)-酪酸

酸；(R)-3-アミノ-4-(2-シアノフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2-フリル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2-メチルフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2-ナフチル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2-チエニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(2-トリフルオロメチルフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3,4-ジクロロフェニル)酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3,4-ジフルオロフェニル)酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-ベンゾチエニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-クロロフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-シアノフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-フルオロフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-メチルフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-ピリジル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-チエニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(3-トリフルオロメチルフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-ブromoフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-クロロフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-シアノフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-フルオロフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-ヨードフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-メチルフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-ニトロフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-ピリジル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-(4-トリフルオロメチルフェニル)-酪酸；(R)-3-アミノ-4-ペンタフルオロフェニル酪酸；(R)-3-アミノ-5-ヘキセン酸；(R)-3-アミノ-5-ヘキシニン酸；(R)-3-アミノ-5-フェニルペンタン酸；(R)-3-アミノ-6-フェニル-5-ヘキセン酸；(S)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-酢酸；(S)-3-アミノ-4-(1-ナフチル)-酪酸；(S)-3-アミノ-4-(2,4-ジクロロフェニル)酪酸；(S)-3-アミノ-4-(2-クロロフェニル)-酪酸；(S)-3-アミノ-4-(2-シアノフェ

ニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (2 - フルオロフェニル) - 酪酸;
; (S) - 3 - アミノ - 4 - (2 - フリル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ -
4 - (2 - メチルフェニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (2 - ナフ
チル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (2 - チエニル) - 酪酸; (S)
- 3 - アミノ - 4 - (2 - トリフルオロメチルフェニル) - 酪酸; (S) -
3 - アミノ - 4 - (3, 4 - ジクロロフェニル) 酪酸; (S) - 3 - アミノ
- 4 - (3, 4 - ジフルオロフェニル) 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (
3 - ベンゾチエニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (3 - クロロフェ
ニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (3 - シアノフェニル) - 酪酸;
(S) - 3 - アミノ - 4 - (3 - フルオロフェニル) - 酪酸; (S) - 3 -
アミノ - 4 - (3 - メチルフェニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (
3 - ピリジル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (3 - チエニル) - 酪酸
; (S) - 3 - アミノ - 4 - (3 - トリフルオロメチルフェニル) - 酪酸;
(S) - 3 - アミノ - 4 - (4 - ブロモフェニル) - 酪酸; (S) - 3 - ア
ミノ - 4 - (4 - クロロフェニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (4
- シアノフェニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェ
ニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (4 - ヨードフェニル) - 酪酸;
(S) - 3 - アミノ - 4 - (4 - メチルフェニル) - 酪酸; (S) - 3 - ア
ミノ - 4 - (4 - ニトロフェニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (4
- ピリジル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - (4 - トリフルオロメチル
フェニル) - 酪酸; (S) - 3 - アミノ - 4 - ペンタフルオロフェニル酪
酸; (S) - 3 - アミノ - 5 - ヘキセン酸; (S) - 3 - アミノ - 5 - ヘキ
シン酸; (S) - 3 - アミノ - 5 - フェニルペンタン酸; (S) - 3 - アミ
ノ - 6 - フェニル - 5 - ヘキセン酸; 1, 2, 5, 6 - テトラヒドロピリジ
ン - 3 - カルボン酸; 1, 2, 5, 6 - テトラヒドロピリジン - 4 - カルボ
ン酸; 3 - アミノ - 3 - (2 - クロロフェニル) - プロピオン酸; 3 - アミ
ノ - 3 - (2 - チエニル) - プロピオン酸; 3 - アミノ - 3 - (3 - ブロモ
フェニル) - プロピオン酸; 3 - アミノ - 3 - (4 - クロロフェニル) - プ

ロピオン酸；3-アミノ-3-(4-メトキシフェニル)-プロピオン酸；3-アミノ-4,4,4-トリフルオロ-酪酸；3-アミノアジピン酸；D- β -フェニルアラニン； β -ロイシン；L- β -ホモアラニン；L- β -ホモアスパラギン酸 γ -ベンジルエステル；L- β -ホモグルタミン酸 δ -ベンジルエステル；L- β -ホモイソロイシン；L- β -ホモロイシン；L- β -ホモメチオニン；L- β -ホモフェニルアラニン；L- β -ホモプロリン；L- β -ホモトリプトファン；L- β -ホモバリン；L-N ω -ベンジルオキシカルボニル- β -ホモリジン；N ω -L- β -ホモアルギニン；O-ベンジル-L- β -ホモヒドロキシプロリン；O-ベンジル-L- β -ホモセリン；O-ベンジル-L- β -ホモトレオニン；O-ベンジル-L- β -ホモチロシン； γ -トリチル-L- β -ホモアスパラギン；(R)- β -フェニルアラニン；L- β -ホモアスパラギン酸 γ -t-ブチルエステル；L- β -ホモグルタミン酸 δ -t-ブチルエステル；L-N ω - β -ホモリジン；N δ -トリチル-L- β -ホモグルタミン；N ω -2,2,4,6,7-ペンタメチル-ジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル-L- β -ホモアルギニン；O-t-ブチル-L- β -ホモヒドロキシプロリン；O-t-ブチル-L- β -ホモセリン；O-t-ブチル-L- β -ホモトレオニン；O-t-ブチル-L- β -ホモチロシン；2-アミノシクロペンタンカルボン酸；および2-アミノシクロヘキサンカルボン酸。

[0023] アミノ酸類縁体には、アラニン、バリン、グリシンまたはロイシンの類縁体が含まれる。アラニン、バリン、グリシン、およびロイシンのアミノ酸類縁体の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない： α -メトキシグリシン； α -アリル-L-アラニン； α -アミノイソ酪酸； α -メチル-ロイシン； β -(1-ナフチル)-D-アラニン； β -(1-ナフチル)-L-アラニン； β -(2-ナフチル)-D-アラニン； β -(2-ナフチル)-L-アラニン； β -(2-ピリジル)-D-アラニン； β -(2-ピリジル)-L-アラニン； β -(2-チエニル)-D-アラニン； β -(2-チエニル)-L-アラニン； β -(3-ベンゾチエニル)-D-アラニン

; β - (3 - ベンゾチエニル) - L - アラニン; β - (3 - ピリジル) - D - アラニン; β - (3 - ピリジル) - L - アラニン; β - (4 - ピリジル) - D - アラニン; β - (4 - ピリジル) - L - アラニン; β - クロロ - L - アラニン; β - シアノ - L - アラニン; β - シクロヘキシル - D - アラニン; β - シクロヘキシル - L - アラニン; β - シクロペンテン - 1 - イル - アラニン; β - シクロペンチル - アラニン; β - シクロプロピル - L - Ala - OH · ジシクロヘキシルアンモニウム塩; β - t - ブチル - D - アラニン; β - t - ブチル - L - アラニン; γ - アミノ酪酸; L - α , β - ジアミノプロピオン酸; 2, 4 - ジニトロ - フェニルグリシン; 2, 5 - ジヒドロ - D - フェニルグリシン; 2 - アミノ - 4, 4, 4 - トリフルオロ酪酸; 2 - フルオロ - フェニルグリシン; 3 - アミノ - 4, 4, 4 - トリフルオロ酪酸; 3 - フルオロ - バリン; 4, 4, 4 - トリフルオロ - バリン; 4, 5 - デヒドロ - L - leu - OH · ジシクロヘキシルアンモニウム塩; 4 - フルオロ - D - フェニルグリシン; 4 - フルオロ - L - フェニルグリシン; 4 - ヒドロキシ - D - フェニルグリシン; 5, 5, 5 - トリフルオロ - ロイシン; 6 - アミノヘキサン酸; シクロペンチル - D - Gly - OH · ジシクロヘキシルアンモニウム塩; シクロペンチル - Gly - OH · ジシクロヘキシルアンモニウム塩; D - α , β - ジアミノプロピオン酸; D - α - アミノ酪酸; D - α - t - ブチルグリシン; D - (2 - チエニル) グリシン; D - (3 - チエニル) グリシン; D - 2 - アミノカプロン酸; D - 2 - インダニルグリシン; D - アリルグリシン · ジシクロヘキシルアンモニウム塩; D - シクロヘキシルグリシン; D - ノルバリン; D - フェニルグリシン; β - アミノ酪酸; β - アミノイソ酪酸; (2 - ブロモフェニル) グリシン; (2 - メトキシフェニル) グリシン; (2 - メチルフェニル) グリシン; (2 - チアゾイル) グリシン; (2 - チエニル) グリシン; 2 - アミノ - 3 - (ジメチルアミノ) - プロピオン酸; L - α , β - ジアミノプロピオン酸; L - α - アミノ酪酸; L - α - t - ブチルグリシン; L - (3 - チエニル) グリシン; L - 2 - アミノ - 3 - (ジメチルアミノ) - プロピオン酸; L - 2 - アミノ

カプロン酸ジシクロヘキシルアンモニウム塩；L-2-インダニルグリシン；L-アリルグリシン・ジシクロヘキシルアンモニウム塩；L-シクロヘキシルグリシン；L-フェニルグリシン；L-プロパルギルグリシン；L-ノルバリン；N- α -アミノメチル-L-アラニン；D- α , γ -ジアミノ酪酸；L- α , γ -ジアミノ酪酸； β -シクロプロピル-L-アラニン；(N- β -(2,4-ジニトロフェニル))-L- α , β -ジアミノプロピオン酸；(N- β -1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル)-D- α , β -ジアミノプロピオン酸；(N- β -1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル)-L- α , β -ジアミノプロピオン酸；(N- β -4-メチルトリチル)-L- α , β -ジアミノプロピオン酸；(N- β -アリルオキシカルボニル)-L- α , β -ジアミノプロピオン酸；(N- γ -1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル)-D- α , γ -ジアミノ酪酸；(N- γ -1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル)-L- α , γ -ジアミノ酪酸；(N- γ -4-メチルトリチル)-D- α , γ -ジアミノ酪酸；(N- γ -4-メチルトリチル)-L- α , γ -ジアミノ酪酸；(N- γ -アリルオキシカルボニル)-L- α , γ -ジアミノ酪酸；D- α , γ -ジアミノ酪酸；4,5-デヒドロ-L-ロイシン；シクロペンチル-D-Gly-OH；シクロペンチル-Gly-OH；D-アリルグリシン；D-ホモシクロヘキシルアラニン；L-1-ピレニルアラニン；L-2-アミノカプロン酸；L-アリルグリシン；L-ホモシクロヘキシルアラニン；およびN-(2-ヒドロキシ-4-メトキシ-Bzl)-Gly-OH。

[0024] アミノ酸類縁体には、フェニルアラニンおよびチロシンの類縁体が含まれる。フェニルアラニンおよびチロシンのアミノ酸類縁体の例には下記のものが含まれる： β -メチル-フェニルアラニン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、 α -メチル-3-メトキシ-DL-フェニルアラニン、 α -メチル-D-フェニルアラニン、 α -メチル-L-フェニルアラニン、1, 2, 3,

4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、2,4-ジクロロフェニルアラニン、2-(トリフルオロメチル)-D-フェニルアラニン、2-(トリフルオロメチル)-L-フェニルアラニン、2-ブロモ-D-フェニルアラニン、2-ブロモ-L-フェニルアラニン、2-クロロ-D-フェニルアラニン、2-クロロ-L-フェニルアラニン、2-シアノ-D-フェニルアラニン、2-シアノ-L-フェニルアラニン、2-フルオロ-D-フェニルアラニン、2-フルオロ-L-フェニルアラニン、2-メチル-D-フェニルアラニン、2-メチル-L-フェニルアラニン、2-ニトロ-D-フェニルアラニン、2-ニトロ-L-フェニルアラニン、2;4;5-トリヒドロキシフェニルアラニン、3,4,5-トリフルオロ-D-フェニルアラニン、3,4,5-トリフルオロ-L-フェニルアラニン、3,4-ジクロロ-D-フェニルアラニン、3,4-ジクロロ-L-フェニルアラニン、3,4-ジフルオロ-D-フェニルアラニン、3,4-ジフルオロ-L-フェニルアラニン、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン、3,4-ジメトキシ-L-フェニルアラニン、3,5,3'-トリヨード-L-チロニン、3,5-ジヨード-D-チロシン、3,5-ジヨード-L-チロシン、3,5-ジヨード-L-チロニン、3-(トリフルオロメチル)-D-フェニルアラニン、3-(トリフルオロメチル)-L-フェニルアラニン、3-アミノ-L-チロシン、3-ブロモ-D-フェニルアラニン、3-ブロモ-L-フェニルアラニン、3-クロロ-D-フェニルアラニン、3-クロロ-L-フェニルアラニン、3-クロロ-L-チロシン、3-シアノ-D-フェニルアラニン、3-シアノ-L-フェニルアラニン、3-フルオロ-D-フェニルアラニン、3-フルオロ-L-フェニルアラニン、3-フルオロ-L-チロシン、3-ヨード-D-フェニルアラニン、3-ヨード-L-フェニルアラニン、3-ヨード-L-チロシン、3-メトキシ-L-チロシン、3-メチル-D-フェニルアラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、3-ニトロ-D-フェニルアラニン、3-ニトロ-L-フェニルアラニン、3-ニトロ-L-チロシン、4-(トリフルオロメチル)-D-フェニルアラニ

ン、4-(トリフルオロメチル)-L-フェニルアラニン、4-アミノ-D-フェニルアラニン、4-アミノ-L-フェニルアラニン、4-ベンゾイル-D-フェニルアラニン、4-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、4-ビス(2-クロロエチル)アミノ-L-フェニルアラニン、4-ブロモ-D-フェニルアラニン、4-ブロモ-L-フェニルアラニン、4-クロロ-D-フェニルアラニン、4-クロロ-L-フェニルアラニン、4-シアノ-D-フェニルアラニン、4-シアノ-L-フェニルアラニン、4-フルオロ-D-フェニルアラニン、4-フルオロ-L-フェニルアラニン、4-ヨード-D-フェニルアラニン、4-ヨード-L-フェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、チロキシン、3,3-ジフェニルアラニン、チロニン、エチルチロシン、およびメチルチロシン。

[0025] アミノ酸類縁体には、プロリンの類縁体が含まれる。プロリンのアミノ酸類縁体の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：3,4-デヒドロプロリン、4-フルオロプロリン、cis-4-ヒドロキシプロリン、チアゾリジン-2-カルボン酸、およびtrans-4-フルオロプロリン。

[0026] アミノ酸類縁体には、セリンおよびトレオニンの類縁体が含まれる。セリンおよびトレオニンのアミノ酸類縁体の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：3-アミノ-2-ヒドロキシ-5-メチルヘキサン酸、2-アミノ-3-ヒドロキシ-4-メチルペンタン酸、2-アミノ-3-エトキシブタン酸、2-アミノ-3-メトキシブタン酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸、2-アミノ-3-ベンジルオキシプロピオン酸、2-アミノ-3-ベンジルオキシプロピオン酸、2-アミノ-3-エトキシプロピオン酸、4-アミノ-3-ヒドロキシブタン酸、および α -メチルセリン。

[0027] アミノ酸類縁体には、トリプトファンの類縁体が含まれる。トリプトファンのアミノ酸類縁体の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない： α -メチルトリプトファン； β -(3-ベンゾチエニル)-D-アラ

ニン； β -（3-ベンゾチエニル）-L-アラニン；1-メチルトリプトファン；4-メチルトリプトファン；5-ベンジルオキシトリプトファン；5-ブロモトリプトファン；5-クロロトリプトファン；5-フルオロトリプトファン；5-ヒドロキシトリプトファン；5-ヒドロキシー-L-トリプトファン；5-メトキシトリプトファン；5-メトキシー-L-トリプトファン；5-メチルトリプトファン；6-ブロモトリプトファン；6-クロロ-D-トリプトファン；6-クロロトリプトファン；6-フルオロトリプトファン；6-メチルトリプトファン；7-ベンジルオキシトリプトファン；7-ブロモトリプトファン；7-メチルトリプトファン；D-1, 2, 3, 4-テトラヒドロノルハルマン-3-カルボン酸；6-メトキシー-1, 2, 3, 4-テトラヒドロノルハルマン-1-カルボン酸；7-アザトリプトファン；L-1, 2, 3, 4-テトラヒドロノルハルマン-3-カルボン酸；5-メトキシー-2-メチルトリプトファン；および6-クロロ-L-トリプトファン。

[0028] 一例においては、アミノ酸類縁体はラセミ体である。アミノ酸類縁体のD異性体を用いても、アミノ酸類縁体のL異性体を用いてもよい。また、アミノ酸類縁体はRまたはS立体配置であるキラル中心を含んでいてもよい。さらに、 β -アミノ酸類縁体のアミノ基（単数または複数）を、保護基、例えばtert-ブチルオキシカルボニル（BOC基）、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（FMOC）、トシル等で置換してもよい。さらに、 β -アミノ酸類縁体のカルボン酸官能基を、例えばそのエステル誘導体として保護してもよい。また、アミノ酸類縁体の塩を用いてもよい。

[0029] アルキル基とは、炭素数1~15、好ましくは炭素数1~10、より好ましくは炭素数1~6の直鎖又は分枝状の炭化水素基を包含する。例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル、n-ヘプチル、イソヘプチル、n-オクチル、イソオクチル、n-ノニル、n-デシル等が挙げられるがこれらに

限定されない。また、これらのアルキル基は、少なくとも一つの炭素原子がヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、硫黄、リンまたはケイ素で置換されていてもよい。アルケニル基とは、任意の位置に1個以上の炭素-炭素二重結合を有する、炭素数2~15、好ましくは炭素数2~10、より好ましくは炭素数2~6の直鎖又は分枝状の炭化水素基を包含する。例えば、ビニル、アリル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、プレニル、ブタジエニル、ペンテニル、イソペンテニル、ペンタジエニル、ヘキセニル、イソヘキセニル、ヘキサジエニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル、ドデセニル、トリデセニル、テトラデセニル、ペンタデセニル等が挙げられるが、これらに限定されない。また、これらのアルケニル基は、少なくとも一つの炭素原子がヘテロ原子で置換されていてもよい。アルキニル基とは、任意の位置に1個以上の炭素-炭素三重結合を有する、炭素数2~10、好ましくは炭素数2~8、さらに好ましくは炭素数2~6の直鎖又は分枝状の炭化水素基を包含する。さらに任意の位置に二重結合を有していてもよい。例えば、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニル等が挙げられるが、これらに限定されない。また、これらのアルキニル基は、少なくとも一つの炭素原子がヘテロ原子で置換されていてもよい。

[0030] 芳香族炭素環式基とは、単一の芳香環または複数の芳香環を含有する炭素環式基である。芳香族炭素環式基の炭素数は、好ましくは5~24であり、より好ましくは5~18であり、さらに好ましくは5~14である。芳香族炭素環式基としては、フェニル、ナフチル等が挙げられる。

[0031] 非芳香族炭素環式基とは、単一の非芳香環または複数の非芳香環を含有する炭素環式基である。非芳香族炭素環式基の炭素数は、好ましくは3~24であり、より好ましくは3~18であり、さらに好ましくは3~14である。非芳香族炭素環式基としては、飽和および不飽和の環状炭化水素基が挙げられ、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、およびシ

クロオクチルが挙げられる。

[0032] 芳香族複素環式基とは、単環式の場合1～3個のヘテロ原子、二環式の場合1～6個のヘテロ原子、または三環式の場合1～9個のヘテロ原子を有する、芳香族の5～8員単環式、8～12員二環式、または11～14員三環式の環系を示す。ヘテロ原子はO、N またはSから選択することができる。芳香族複素環式基としては、ピリジル基、ピリミジニル基、ピロリル基、フリル基、フラニル基、チオフェニル基、チエニル基、インドリル基、イソインドリル基、インドリジニル基、イミダゾリル基、ピリドニル基、ピリミジニル基、ピラジニル基、オキサゾリル基、チアゾリル基、プリニル基、キノリニル基、イソキノリニル基、ベンズイミダゾリル基、ベンゾフラニル基およびベンゾオキサゾリル基などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0033] 非芳香族複素環式基とは、単環式の場合1～3個のヘテロ原子、二環式の場合1～6個のヘテロ原子、または三環式の場合1～9個のヘテロ原子を有する、非芳香族の5～8員単環式、8～12員二環式、または11～14員三環式の環系を示す。ヘテロ原子はO、NまたはSから選択することができる。非芳香族複素環式基としては、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル、モルホリニル、テトラヒドロフラニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0034] 複素環としては、上記した芳香族複素環式基および非芳香族複素環式基を包含する。

[0035] 置換基を有していてもよいとは、上記に挙げたいずれかの化学基（アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、芳香族炭素環式基、非芳香族炭素環式基、芳香族複素環式基、および非芳香族複素環式基）において、1つ以上の水素原子が水素原子以外の原子または化学基で置換されていることを示す。置換基としては、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素又はヨウ素など）、ヒドロキシ、メルカプト、オキソ、ニトロ、炭素数1～10のハロアルキル、炭素数1～10のアルキル、炭素数6～20のアリール、炭素数7～20のアラルキル、炭素数1～10のアルコキシ、炭素数1～10のチオアルコキシ、炭素数

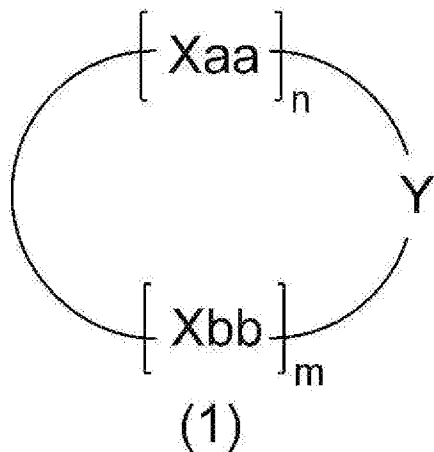
6～20のアリールオキシ、アミノ、炭素数2～10のアルコシカルボニル、アミド、カルボキシ、炭素数1～10のアルカンスルホニル、炭素数2～10のアルキルカルボニル、およびシアノ基などが挙げられるが、特に限定されない。

[0036] *—CR¹—S—CR²—*で表される2価の基におけるR¹およびR²はそれぞれ、置換基を示す場合があるが、置換基としては、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素又はヨウ素など）、ヒドロキシ、メルカプト、オキシ、ニトロ、炭素数1～10のハロアルキル、炭素数1～10のアルキル、炭素数6～20のアリール、炭素数7～20のアラルキル、炭素数1～10のアルコキシ、炭素数1～10のチオアルコキシ、炭素数6～20のアリールオキシ、アミノ、炭素数2～10のアルコシカルボニル、アミド、カルボキシ、炭素数1～10のアルカンスルホニル、炭素数2～10のアルキルカルボニル、およびシアノ基などが挙げられるが、特に限定されない。

[0037] <環状ペプチド>

本発明の環状ペプチドは、下記式(1)で表され、下記の(a)～(c)の特徴を有する。

[0038] [化6]



式中、Yは、*—CR¹—S—CR²—*で表される2価の基を示し、R¹およびR²は水素原子または置換基を示し、*はXaaおよびXbbと結合する位置を示し、

n個のX a aはそれぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

m個のX b bはそれぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

n + mは、5 ~ 50の整数を示す。

[0039] n + mは、好ましくは、5 ~ 50の整数を示し、より好ましくは、5 ~ 20の整数を示し、さらに好ましくは、9 ~ 11の整数を示す。

[0040] 本発明の環状ペプチドは、細胞内への高い透過性を有する。本発明の環状ペプチドは、MDMX-p53相互作用を阻害することができることから、MDMXが過剰発現した固形腫瘍などのがんの治療において有用である。

[0041] (a) 環状ペプチドの構造において、主鎖構造の最も長い軸方向の軸長をaとし、aと直交し、互いに直交する他の2方向の軸長をb、cとした時に、a、b、cの各軸長を求める楕円体近似（図2を参照）を行う段階を経て、下記式(2)で計算される分子形状因子rが0.4 ~ 0.6の範囲に含まれる；

[化7]

$$r = \frac{2\sqrt{b^2 + c^2}}{\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{c^2 + a^2}} \quad (2)$$

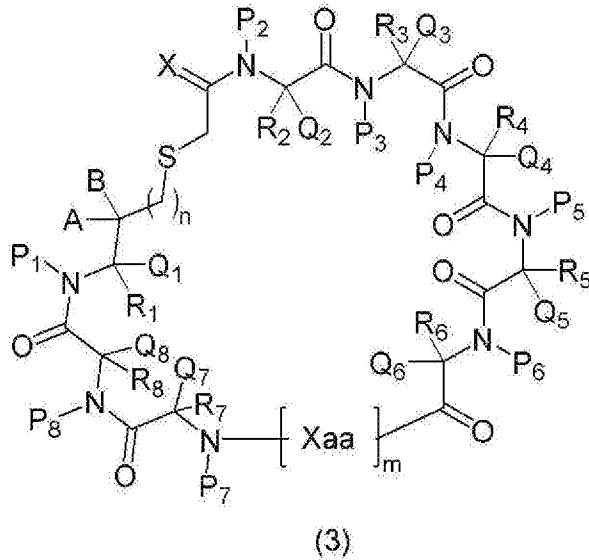
[0042] 式(2)で計算される分子形状因子rは、好ましくは、0.4 ~ 0.6であり、より好ましくは、0.4 ~ 0.55である。

[0043] (b) 上記ペプチドの主鎖構造に硫黄原子を含む。

[0044] (c) ペプチドが生理環境下において非イオン性である。生理環境下において非イオン性とは、ペプチドが、生理環境下において電荷を帯びた置換基を有さないことを意味する。

[0045] 本発明の環状ペプチドは、好ましくは、下記式(3)で表される。

[化8]



式中、

Xは、酸素原子、または硫黄原子であり、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 Q_1 、 Q_2 、 Q_3 、 Q_4 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 、 Q_8 、AおよびBは、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有しているもよいアルキル基、置換基を有しているもよいアルケニル基、置換基を有しているもよいアルキニル基、置換基を有しているもよい芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい非芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい芳香族複素環式基、または置換基を有しているもよい非芳香族複素環式基であり、

P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 、および P_8 は、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有しているもよいアルキル基、置換基を有しているもよいアルケニル基、置換基を有しているもよいアルキニル基、置換基を有しているもよい芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい非芳香族炭素環式基、置換基を有しているもよい芳香族複素環式基、または置換基を有しているもよい非芳香族複素環式基であり、あるいは、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、AおよびBが結合している炭素原子は P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 および P_8 が結合している窒素原子と

一緒になって複素環を形成していてもよく、

m 個の $X a a$ は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

n は、 $0 \sim 5$ の整数であり、 m は、 $0 \sim 2$ の整数である。

[0046] 好ましくは、 n は 0 または 1 である。

好ましくは、 m は 1 である。

[0047] 好ましくは、 R_3 から R_8 もしくは Q_3 から Q_8 のうち少なくとも 1 つが、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、または置換基を有していてもよい芳香族複素環式基である。

[0048] 好ましくは、 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 もしくは Q_3 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 、 Q_8 のうち少なくとも 1 つが、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、または置換基を有していてもよい芳香族複素環式基である、

[0049] 好ましくは、 R_1 および Q_1 または A および B 、および P_1 は、 R_1 および Q_1 または A および B が結合している炭素原子および P_1 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していても良く、また、上記 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 Q_2 、 Q_3 、 Q_4 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 および Q_8 が結合している炭素原子は P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 および P_8 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していてもよく、上記 $X a a$ がプロリンであってもよく、これらから形成される構造によって少なくとも 1 つの複素環を含む。

[0050] 好ましくは、 R_1 および Q_1 または A および B 、および P_1 は、 R_1 および Q_1 または A および B が結合している炭素原子および P_1 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していても良く、また、上記 R_2 および Q_2 が結合している炭素原子は P_2 が結合している窒素原子と一緒に複素環を形成していてもよく、上記 $X a a$ がプロリンであってもよく、これらから形成される構造によって少なくとも 1 つの複素環を含む。

[0051] 好ましくは、 R_1 および Q_1 または A および B 、および P_1 は、 R_1 および Q_1 または A および B が結合している炭素原子および P_1 が結合している窒素原子

と一緒にあってピロリジン環を形成していても良く、また、上記 R_2 および Q_2 が結合している炭素原子は P_2 が結合している窒素原子と一緒にあってピロリジン環を形成していてもよく、上記 X_{aa} がプロリンであってもよく、これらから形成される構造によって少なくとも1つのピロリジン環を含む。

[0052] 好ましくは、 R_1 および Q_1 または A および B および X_{aa} は、それぞれ任意のD-アミノ酸残基または任意のD-アミノ酸類縁体残基である。

[0053] 本発明の環状ペプチドは、用途に合わせてリン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、ADPリボシル化、糖鎖付加などの修飾を加えてもよい。また、本発明の環状ペプチドは、塩であってもよい。塩は、好ましくは、生理学的に許容される無機および有機の酸および塩基との塩である。適切な酸塩の例には下記のものが含まれる：酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンカルボン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パモ酸塩 (palmoate)、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、およびウンデカン酸塩。適切な塩基から誘導される塩類には、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩、アンモニウム塩、およびN-(アルキル) $4+$ 塩が含まれる。

[0054] <環状ペプチドの製造方法>

本発明の環状ペプチドの製造方法は特に限定されない。本発明の環状ペプチドは、無細胞翻訳系を使用する方法で製造してもよいし、ペプチドの化学合成法により製造してもよい。ペプチドの化学合成は、一般的には自動ペプチド合成装置により行うことができる。

[0055] ペプチドの合成は、固相合成法でも液相合成法でもよいが、好ましくは固

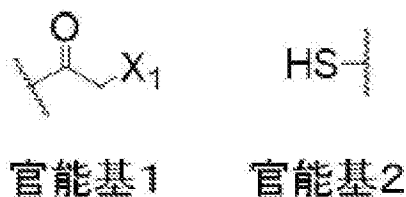
相合成法である。ペプチドの固相合成は、当業者には公知であり、例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、 α -アミノ基が保護基で保護された第一のアミノ酸（通常、目的とするペプチドのC末端アミノ酸）のカルボキシ基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては、1-メシチレンスルホン-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール (MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI) 等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。次に、第一アミノ酸の α -アミノ基の保護基を脱離させるとともに、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第二のアミノ酸を加え、上記カルボキシ基を活性化させて、第一および第二のアミノ酸を結合させる。さらに、第二のアミノ酸の α -アミノ基を脱保護し、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第三のアミノ酸を加え、上記カルボキシ基を活性化させて、第二および第三のアミノ酸を結合させる。これを繰り返して、目的とする長さのペプチドが合成されたら、すべての官能基を脱保護する。固相合成のレジンとしては、Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin (Merck)、HMPA-PEGA resin (Merck) 等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤（ジメチルホルムアミド (DMF)、2-プロパノール、塩化メチレン等）で洗浄してから用いてもよい。 α -アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル (Cbz又はZ) 基、tert-ブトキシカルボニル (Boc) 基、フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル (Alloc) 基等が挙げられる。Cbz基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、Boc基はトリフルオロ酢酸 (TFA) により脱保護でき、Fmoc基はピペリジンによる処理で脱保護できる。 α -カルボキシ基の保護は、メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル、tert-ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等を用いることができる。アミノ酸のその他の官能基として、セリンやトレオニンの水酸基はベンジル基や tert-ブチル基で保護することができ、チロシ

ンの水酸基は2-ブロモベンジルオキシカルボニル基やtert-ブチル基で保護する。リジン側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシ基は、 α -アミノ基、 α -カルボキシ基と同様に保護することができる。カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCあるいはWSC)、(1Hベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート(BOP)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート(HBTU)等が挙げられる。レジンからのペプチド鎖の切断は、TFA、フッ化水素(HF)等の酸で処理することによって行うことができる。

[0056] ペプチドのチオエーテル環化方法は、特に限定されないが、例えば、以下の官能基をペプチドの側鎖または主鎖に含めることにより、環化することができる。官能基1と2の位置としては、特に限定されないが、官能基1と2はどちらがペプチドのN末端およびC末端側にきてもよく、両方を末端に配置してもよく、一方を末端、他方を非末端としてもよく、両方を非末端としてもよい。

ペプチド化合物の合成工程と環化反応の工程は、分離していても、連続して進行してもよい。環化は、例えばWO2013/100132、WO2008/117833、WO2012/074129等に記載された当業者に公知の方法により行うことができる。

[0057] [化9]



[0058] 式中、X1は塩素、臭素又はヨウ素を示す。

[0059] <MDMX阻害剤>

本発明によれば、本発明の環状ペプチドまたはその塩を含むMDMX阻害剤が提供される。

実施例に示す通り、本発明の環状ペプチドまたはその塩は、MDMX阻害効果を有する。「MDMX阻害効果」とは、MDMXとp53の結合を阻害する効果のことを示す。

ヒトMDMXの遺伝子配列及びアミノ酸配列は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) にGene ID:4194として登録されている。

[0060] 本発明の環状ペプチドは、MDMX阻害剤が関与する疾患の治療のための医薬組成物において用いることが可能である。医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口的投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膈、経直腸）投与等が挙げられる。医薬組成物中の環状ペプチドは、代謝および排泄されやすい性質に鑑みて、各種の修飾を行うことができる。例えば、環状ポリペプチドにポリエチレングリコール（PEG）や糖鎖を付加して血中滞留時間を長くし、抗原性を低下させることができる。また、ポリ乳酸やポリグリコール酸、PLGAなどの生体内分解性の高分子化合物、多孔性ヒドロキシアパタイト、リポソーム、表面修飾リポソーム、不飽和脂肪酸で調整したエマルジョン、ナノパーティクル、ナノスフェア等を除放化基剤として用い、これに環状ペプチドを内包させてもよい。経皮投与する場合、弱い電流を皮膚表面に流して角質層を透過させることもできる。

[0061] 医薬組成物は、有効成分をそのまま用いてもよいし、薬学的に許容できる担体、賦形剤、添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。

製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤などを適宜使用し、常法により行うことができる。

[0062] 製剤化に用いられる成分の例としては、精製水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等の薬学的に許容される有機溶剤、動植物油、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ソルビトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、コーンスターチ、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、等が挙げられるがこれらに限定されない。環状ペプチドの吸収を改善する吸収促進剤として、ポリオキシエチレンラウリルエーテル類、ラウリル硫酸ナトリウム、サポニン等の界面活性剤；グリココール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸等の胆汁酸塩；EDTA、サリチル酸類等のキレート剤；カプロン酸、カプリン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、混合ミセル等の脂肪酸類；エナミン誘導体、N-アシルコラーゲンペプチド、N-アシルアミノ酸、シクロデキストリン類、キトサン類、一酸化窒素供与体等を用いてもよい。丸剤又は錠剤は、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆することもできる。注射剤は、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、アルコール類等を含むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えることができる。

[0063] <環状ペプチドおよびMDMX阻害剤の用途>

本発明の環状ペプチドおよびMDMX阻害剤は、医薬品、化粧品、DDS (Drug Delivery System) 材料等として用いることができるが、これらに限定されるものではない。

[0064] 本発明の環状ペプチドおよびMDMX阻害剤は、MDMXに結合する薬剤を同定するための競合結合アッセイにおいて有用である。例えば、p53 / MDMX系において、標識した本発明の環状ペプチドを、MDMXに競合結合する小分子と共にMDMX結合アッセイにおいて用いることができる。競合結合試験は、p53 / MDMX系に特異的な薬物候補の迅速なインビトロでの評価および決定を可能にする。そのような結合試験は、本発明の環状ペプチドを用いて実施することができる。

[0065] 本発明の環状ペプチドは、本発明の環状ペプチドに対する抗体の製造のために使用することもできる。

[0066] 本発明の環状ペプチドおよびMDMX阻害剤は、p53またはMDMXの異常な（例えば不十分または過剰な）発現または活性と関係する障害を有する対象を処置するために使用することができる。

[0067] 障害は、p53もしくはMDMXの異常なレベル（例えば過剰発現または過小発現）により、または異常な活性を示すp53もしくはMDMXの存在により引き起こされる。

[0068] 本発明の環状ペプチドおよびMDMX阻害剤は、過剰増殖性疾患および炎症性障害などの疾患を、p53およびMDMXの間の相互作用または結合を妨げることによって処置または予防するために使用することができる。

[0069] 上記においては、有効量の本発明の環状ペプチドまたはMDMX阻害剤を、ヒトを含む哺乳動物に投与することができる。

[0070] 一例としては、本発明の環状ペプチドおよびMDMX阻害剤は、がんおよび新生物性の病気を処置、予防、および／または診断するために用いることができる。本明細書において、がん、過剰増殖性および新生物性とは、自律的増殖に関する能力を有する細胞、すなわち急速に増殖する細胞増殖を特徴

とする異常な状態または病気を指す。

[0071] がんまたは新生物性の病気の例としては、下記のものに含まれるが、これらに限定されない：線維肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胃癌、食道癌、直腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、頭頸部の癌、皮膚癌、脳癌、扁平上皮癌、脂腺癌、乳癌（乳頭状癌、乳頭状腺癌など）、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌など）、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髓膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、またはカポジ肉腫。

[0072] 増殖性障害の例には、造血性新生物性障害が含まれる。造血性新生物性障害には、例えば骨髄、リンパもしくは赤血球系列、またはその前駆細胞に起因する、造血系由来の過形成性／新生物性細胞を含む疾患が含まれる。その疾患は、未分化型急性白血病、例えば赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病に起因し得る。

[0073] 以下の実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0074] 特に記載のない場合、カラムクロマトグラフィーによる精製は、自動精製装置 I S O L E R A (B i o t a g e 社) を使用した。特に記載のない場合、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおける担体は、S N A P K P - S i l C a r t r i d g e (B i o t a g e 社) を使用した。

溶離液における混合比は、容量比である。例えば、「クロロホルム／メタノール＝90／10→50／50」は、「クロロホルム／メタノール＝90／10」の溶離液を「クロロホルム／メタノール＝50／50」の溶離液へ変化させたことを意味する。

質量スペクトル (MS) は、ACQUITY SQD LC/MS System (Waters社、イオン化法:ESI (ElectroSpray Ionization、エレクトロスプレーイオン化) 法を用いて測定した。

保持時間 (RT) は、ACQUITY SQD LC/MS System (Waters社) を用いて測定し、分 (min) で示した。

カラム: Waters社製BEHC 18 1.7 μ m, 2.1 x 30 mm

溶媒: A液: 0.1%ギ酸-水

B液: 0.1%ギ酸-アセトニトリル

グラジエントサイクル: 0.00 min (A液/B液=95/5)、2.00 min (A液/B液=5/95)、3.00 min (A液/B液=95/5)

流速: 0.5 mL/min

カラム温度: 室温

検出波長: 254 nm

特に記載のない場合、MSは、MS (ESI m/z) : (M+H) を意味する。

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、内部基準としてテトラメチルシランを用い、Bruker AV300 (Bruker社) を用いて測定し、全 δ 値を ppm で示した。

[0075] <実施例 1 >

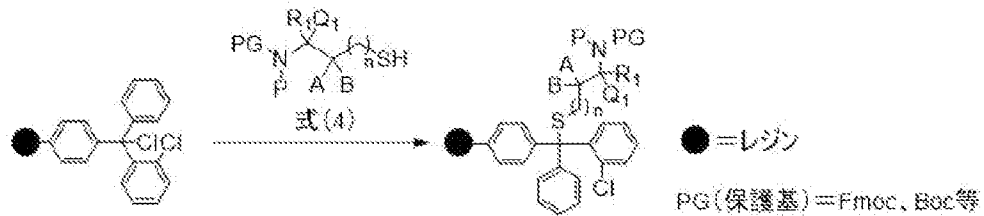
本発明の環状ペプチドの合成ルートを示す。本発明の環状ペプチドは、例えば下記に示す一般合成法によって製造することができる。一般式 (4) 中の R_1 、 Q_1 、A および B は、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、置換基を有していてもよい非芳香族炭素環式基、置換基を有していてもよい芳香族複素環式基、置換基を有していてもよい非芳香族複素環式基であ

り、 n は0～5の整数を示す。また、PGは保護基を示し、例えば、フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、tert-ブトキシカルボニル (Boc) 基等である。

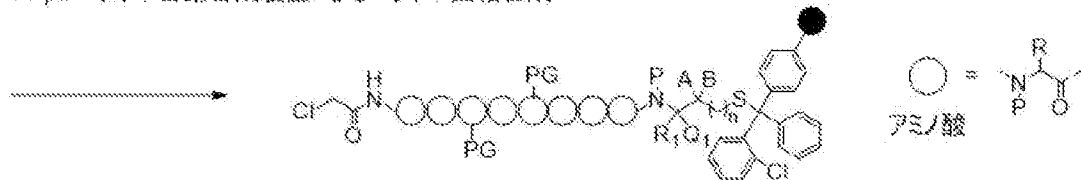
[0076] チオエーテル環状ペプチド合成の一般法

[化10]

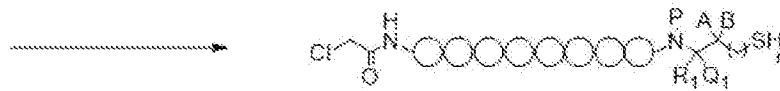
Step1 式(4)のチオール基含有化合物を2-クロロトリチルレジンに担持



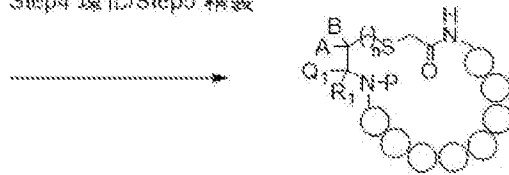
Step2 ペプチド自動合成装置によるペプチド固相合成



Step3 切り出し/脱保護



Step4 環化/Step5 精製



[0077] Step 1 : チオール基含有化合物の2-クロロトリチルクロライドレジンへの担持

フィルター付きの反応容器 (10 mL) に2-クロロトリチルクロライド (100～200 mesh、1%DVB、渡辺化学工業株式会社から購入、100 mg、0.137 mmol) と脱水ジクロロメタン (2 mL) を入れ、室温にて10 分間振盪した。ろ過によりジクロロメタンを除いた後、レジンに対し4モル当量の一般式 (3) で表されるチオール基含有化合物のジクロロメタン (0.5 M) 溶液、および5モル当量のジイソプロピルエチルアミンを加えた混合液を反応容器に添加し、2時

間振盪した。ろ過により反応液を除いた後、ジクロロメタン：メタノール：ジイソプロピルエチルアミン=17：2：1（2 mL）を加えた混合液を反応容器に添加し、15分間振盪した。ろ過により反応液を除いた後、同じ操作を2回繰り返した。ろ過により反応液を除いた後、ジメチルホルムアミド（2 mL）、ジクロロメタン（2 mL）を用いて、各3回以上レジンの洗浄を行う。減圧下にレジンを終夜乾燥させ、Fmoc-アミノ酸-2-クロロトリチルレジンを得た。得られたレジンのローディング率は、Fmoc脱保護後の吸光度より算出した。

[0078] Step2：ペプチド自動合成装置によるペプチド固相合成

ペプチド自動合成装置（Biotage社製 Syro I）を用いてペプチド固相合成を行った。操作の詳細な手順については、合成機付属のマニュアルに従った。合成装置に固相合成用レジン（0.05 mmol）、Fmocアミノ酸（0.5 M）のN-メチル-2-ピロリドン（NMP）溶液、クロロ酢酸（0.5 M）のNMP溶液、1-[ビス（ジメチルアミノ）メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート（0.5 M）のNMP溶液、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（0.5 M）のNMP溶液、およびジイソプロピルエチルアミン（0.1 M）のNMP溶液、ピペリジン（20 %v/v）のNMP溶液をセットし、合成を行った。Fmoc脱保護（20分）、NMPによる洗浄、Fmocアミノ酸の縮合（1時間）、NMPによる洗浄を1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことで、ペプチド鎖を伸長させた。N末端のアミノ酸を縮合後、同様の手順で、クロロ酢酸をN末端のアミノ基に縮合した。

[0079] Step3：レジンからの切り出しと側鎖官能基の保護基の脱保護

レジンからの直鎖ペプチドの切り出しと側鎖官能基の保護基の脱保護を同時に行うため、レジンに対し、5倍量に相当するトリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジクロロメタン=5:2.5:92.5溶液をレジンに添加し、室温にて2時間振盪した。反応液をろ過により回収した。さらに1回、同濃度のトリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジクロロメタン溶液を用いた反応を繰り返し、反応液をろ過により回収した。回収した反応液を全て合わせて溶媒を減圧留去し、十分乾燥を行い、直鎖ペプチドの粗精製物を得た。

[0080] Step4 : チオエーテル環化反応

直鎖ペプチドの粗精製物をアセトニトリル (10 mL) と0.1 M TEABバッファ
ー : 純水 = 1:9 (10 mL) 溶液に溶解させ、溶液をpH 8.5±0.1に調整する。1
モル当量のTCEP溶液 (0.5 M) を加え、室温にて30分~48時間攪拌した。原料
の直鎖ペプチドが消失したことをLC/MS質量分析 (Waters社製Acquity UPLC /
SQD) により確認した後、溶媒を減圧留去し、環状ペプチドの粗精製物を得
た。

[0081] Step5 : 環状ペプチド精製

得られた粗精製物の精製は液体クロマトグラフィーによって行った。最終
的に凍結乾燥粉末として目的の環状ペプチドを得た。

[0082] カラム : Waters社製 X Select CSH Prep C18 5 μm OBD (19 x 250 mm)

カラム温度 : 40度

流速 : 20 ml / min

検出波長 : 220 nm、254 nm

溶媒 : A液 : 0.1%ギ酸-水

B液 : 0.1%ギ酸-アセトニトリル

N-メチル-2-ピロリドン、ジイロプロピルエチルアミン、1-[ビス(ジメチルア
ミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサ
フルオロホスファート、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、ピペリジン、ク
ロロ酢酸は富士フィルム和光純薬株式会社から入手した。

[0083] 本明細書内に記載する環状ペプチドの合成には、下記のFmoc-アミノ酸を用
いた。また、本明細書中で示される配列において、下記の略語を用いて示す
。Fmoc-アミノ酸は、渡辺化学工業株式会社もしくはCHEM-IMPEX社もしくはAc
rotein社もしくはAmatek Chemical社から購入した。

Ala : アラニン

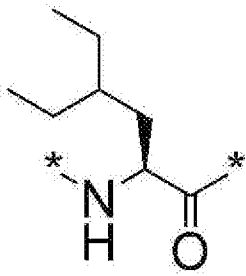
Met : メチオニン

Gly : グリシン

Tyr : チロシン

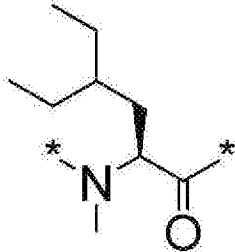
Trp : トリプトファン
Gln : グルタミン
Thr : スレオニン
Phe : フェニルアラニン
Nle : ノルロイシン
Phe(4-F) : 4-Fフェニルアラニン
Ala(4-Thz) : 4-チアゾリルアラニン
HSe (Me) : 0-メチル-ホモセリン
Tle : tert-ロイシン
Cha : シクロヘキシルアラニン
Ahp(2) : 2-アミノヘプタン酸
Aoc(2) : 2-アミノ酪酸
Phe(4-CF3) : 4-トリフルオロメチルフェニルアラニン
Phe(4-Cl) : 4-クロロフェニルアラニン
Phe(4-CN) : 4-シアノフェニルアラニン
Phe(3,4-F2) : 3,4-ジフルオロフェニルアラニン
Ala(4-Pyri) : 4-ピリジルアラニン
MeAla : N-メチルアラニン
MeNle : N-メチルノルロイシン
MeHSe (Me) : N-メチル-0-メチル-ホモセリン
MeCha : N-メチルシクロヘキシルアラニン
MeLeu : N-メチルロイシン
MePhe : N-メチルフェニルアラニン
D-Pro : D-プロリン
D-MeAla : D-N-メチルアラニン

[化11]



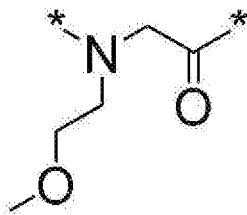
4-EtNle : 4-エチル-ノルロイシン

[化12]



Me4-EtNle : N-メチル-4-エチル-ノルロイシン

[化13]



N(2-MeOEt)Gly : N-(2-メトキシエチル)-グリシン

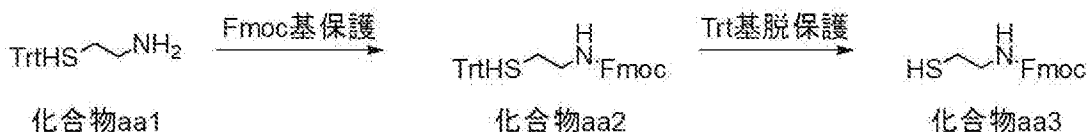
[0084] ペプチド合成に用いるチオール側鎖を有するFmocアミノ酸類縁体の合成

N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(2-メルカプトエチル))
カルバメート(化合物aa 3、Fmoc-C2SH)の合成

N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(2-メルカプトエチル))
カルバメート(化合物aa 3、Fmoc-C2SH)は、下記のルートにて合成した

。

[化14]



[0085] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(2-(トリチル-スルファネイル)エチル)カルバメート(化合物aa2)の合成

市販の2-(トリチルチオ)エタンアミン(化合物aa1、Combi-blocks社)(1 g、3.13 mmol)にジメチルホルムアミド(10 mL/g、10 mL)を加え、メカニカルスターラーを用い、攪拌した。次いで、ジイロプロピルエチルアミン(0.66 mL、3.76 mmol)、Fmoc N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(1.16 g、3.44 mmol)を室温にて加えた。室温にて、反応液を2時間攪拌した。反応液に純水(10 mL)を室温にて加え、25%酢酸エチル/ヘキサン溶液で2回洗浄した。得られた水層を、飽和クエン酸水を用いてpH7になるように調整した。その後、酢酸エチルで2回抽出し、得られた有機層をまとめて、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、濾過、減圧留去し、粗精製物を得た。カラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン=0/100→20/80)にて精製し、薄黄色油状の標題化合物aa2(1.02 g、収率60%)を得た。

MS (ESI m/z) : (M+H)542.7

RT (min) :2.24

N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(2-メルカプトエチル))カルバメート(化合物aa3、Fmoc-C2SH)の合成

化合物aa2(1g、1.85 mmol)にトリフルオロ酢酸:3,6-ジオキサ-1,8-オクタン-ジチオール:トリイソプロピルシラン:ジクロロメタン=88:5:2:5:溶液(10 mL)を室温下加え、メカニカルスターラーを用い、4時間攪拌した。反応液にトルエン(5 mL)を加え、溶媒を減圧留去した。残渣に純水(10 mL)を加え、1 MのNaOH水溶液を用いて、pH7になるように調整した。その後、酢酸エチルで2回抽出し、得られた有機層をまとめて、飽和食塩水で

洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、濾過、減圧留去し、粗精製物を得た。カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン=0/100→20/80）にて精製し、白色固体の標題化合物aa3（0.54 g、98%収率）を得た。

MS (ESI m/z) : (M+H)300.1

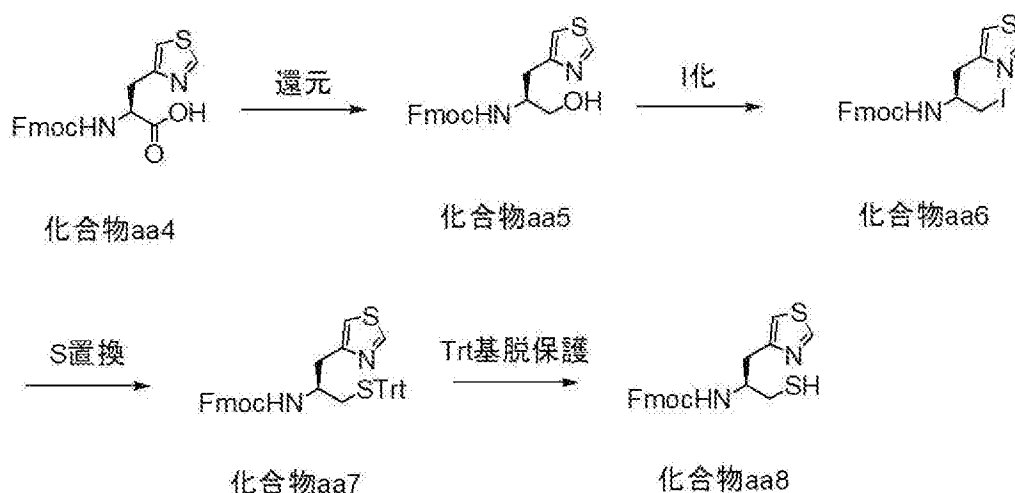
RT (min) :1.57

¹H-NMR(CDCl₃) δ :7.78-7.76(2H, m), 7.60-7.58(2H, m), 7.43-7.39(2H, m), 7.34-7.30(2H, m), 5.25(1H, bs), 4.44-4.42(2H, m), 4.24-4.20(1H, m), 3.40-3.35(2H, m), 2.69-2.63(2H, m), 1.36-1.32(1H, m).

[0086] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-メルカプト-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa8、Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)の合成

N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-メルカプト-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa8、Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)は下記のルートにて合成した。

[化15]



[0087] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-ヒドロキシ-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa5)の合成

窒素雰囲気下、市販のFmoc-Ala(4-Thz)-OH（渡辺化学工業株式会社、1g、

2.54 mmol) にテトラヒドロフラン (8 mL/g、8 mL)、4-メチルモルホリン (0.31 mL、2.79 mmol) を加え、メカニカルスターラーを用い、攪拌した。メタノールドライアイスバスを用いて、反応液が -30°C 以下になるように冷却し、クロロギ酸イソブチル (0.36 mL、2.79 mmol) を滴下した。反応液を -30°C で30分攪拌した後、油性水素化ナトリウム (60%) の水溶液 (3 M、3 mL、0.28 g) を5分以上かけて滴下した。そのまま反応液を -30°C で30分攪拌した。その後氷浴を用いて、反応液に飽和クエン酸水 (20 mL) をゆっくり滴下し、30分攪拌した。室温まで昇温した後、酢酸エチル (20 mL) で2回抽出し、得られた有機層をまとめて、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、濾過、減圧留去し、粗精製物を得た。カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、酢酸エチル/メタノール=100/0 \rightarrow 0/100) にて精製し、白色固体の標題化合物aa5 (0.68 g、70%収率) を得た。

MS(ESI m/z):(M+H)381.1

RT(min):1.33

[0088] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-ヨード-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート (化合物aa6) の合成

化合物aa5 (0.68 g、1.78 mmol)、トリフェニルホスフィン (0.93 g、3.56 mmol) およびヨウ素 (0.89 g、3.56 mmol) をテトラヒドロフラン (8 mL/g、5.4 mL) に溶解し、氷浴下で、イミダゾール (0.29 g、4.27 mmol) を5分以上かけてゆっくり添加した。添加終了後、溶液の温度を室温まで昇温し、22時間攪拌した。反応液に純水 (10 mL) を加え、酢酸エチル (10 mL) で2回抽出し、得られた有機層をまとめて、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、濾過、減圧留去し、粗精製物を得た。カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン=0/100 \rightarrow 30/70) にて精製し、無色液体の標題化合物aa6 (0.28 g、22%収率) を得た。

MS(ESI m/z):(M+H)491.2

RT(min):1.74

[0089] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-(チアゾール-4-イル)-3-(トリチルチオ)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa7)の合成

窒素雰囲気下、油性水素化ナトリウム(60%) (0.041 g、1.0 mmol)をジメチルホルムアミド(10 mL/g、2 mL)に溶解し、トリフェニルメタンチオール(0.29 g、1.06 mmol)を加え、室温下、1時間攪拌した。反応液に、化合物aa6(0.20 g、0.41 mmol)のジメチルホルムアミド溶液(1 mL/g、0.2 mL)を滴下し、室温下、1時間攪拌した。その後、純水(10 mL)をゆっくり滴下し、30分攪拌した。酢酸エチル(10 mL)で2回抽出し、得られた有機層をまとめて、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、濾過、減圧留去した。得られた残渣をジメチルホルムアミド(10 mL/g、2 mL)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(0.09 mL、0.49 mmol)とFmoc-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(0.15 g、0.45 mmol)を室温にて加えた。3時間攪拌した後、反応液に純水(10 mL)を室温にて加え、25%酢酸エチル/ヘキサン溶液で2回洗浄した。得られた水層を、飽和クエン酸水を用いてpH7になるように調整した。その後、酢酸エチルで2回抽出し、得られた有機層をまとめて、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、濾過、減圧留去し、粗精製物を得た。カラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/ヘキサン=0/100→10/90)にて精製し、白色油状の標題化合物aa7(0.20 g、収率79%)を得た。

MS(ESI m/z):(M+H)639.1

RT(min):2.21

[0090] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-メルカプト-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa8、Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)の合成

化合物aa7 (0.21 g, 0.32 mmol) にトリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：ジクロロメタン=25：5：70：溶液 (7 mL) を室温下に加え、メカニカルスターラーを用い、30分攪拌した。反応液にトルエン (5 mL) を加え、溶媒を減圧留去した。残渣に純水 (10 mL) を加え、1 MのNaOH水溶液を用いて、pH7になるように調整した。その後、酢酸エチルで2回抽出し、得られた有機層をまとめて、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、濾過、減圧留去し、粗精製物を得た。カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、酢酸エチル/メタノール=100/0→0/100) にて精製し、白色固体の標題化合物aa8 (0.13 g、>99%収率) を得た。

MS(ESI m/z):(M+H)397.1

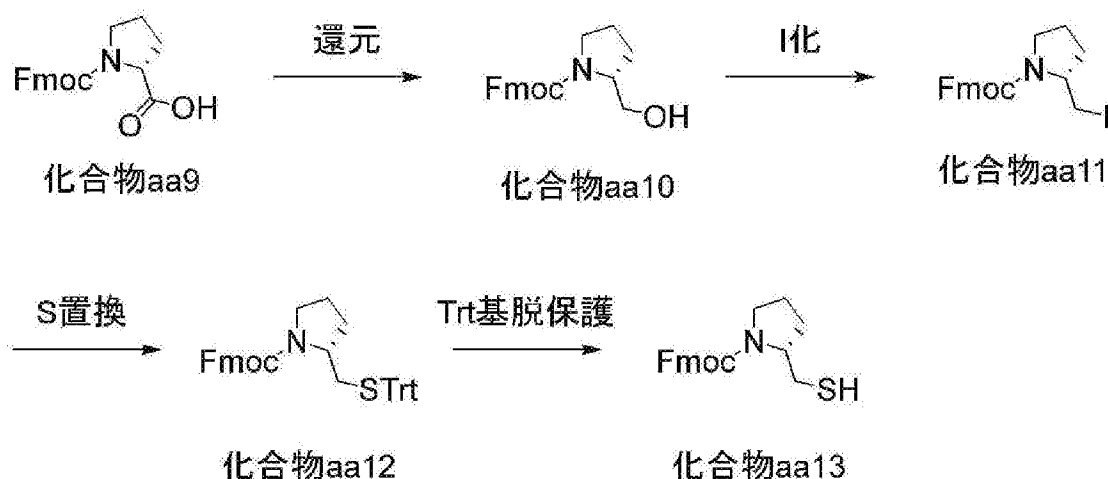
RT(min):1.61

¹H-NMR(CDCl₃) δ :8.82(1H, s), 7.77-7.50(2H, m), 7.61-7.53(2H, m), 7.44-7.36(2H, m), 7.34-7.27(2H, m), 7.10(1H, bs), 5.76-5.74(1H, m), 4.76(1H, bs), 4.39-4.37(2H, m), 4.21-4.14(1H, m), 3.29-3.08(2H, m), 2.81-2.67(1H, m), 2.65-2.47(1H, m), 1.52-1.39(1H, m).

[0091] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(R)-2-(メルカプトメチル)ピロリジン-1-カルボキシレート (化合物aa13、Fmoc-D-Pro-SH) の合成

N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(R)-2-(メルカプトメチル)ピロリジン-1-カルボキシレート (化合物aa13、Fmoc-D-Pro-SH) は下記のルートにて合成した。

[化16]



[0092] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(R)-2-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-1-カルボキシレート(化合物aa10)の合成

市販のFmoc-D-Pro-OH(化合物aa9、渡辺化学工業株式会社)より、N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-ヒドロキシ-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa5)の合成と同様に実施した。精製せずに、化合物aa11の合成に用いた。

[0093] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(R)-2-(ヨードメチル)ピロリジン-1-カルボキシレート(化合物aa11)の合成

N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-ヨード-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa6)の合成と同様に実施した。

MS(ESI m/z):(M+H)434.0

RT(min):1.96

[0094] N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(R)-2-(トリチルチオ)メチル)ピロリジン-1-カルボキシレート(化合物aa12)の合成

N-((9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-(チアゾール-4-イル)-3-(トリチルチオ)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa7)の合成と同様に実施した。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 7.81-7.72(2H, m), 7.61-7.54(2H, m), 7.48-7.10(19H, m), 4.39-

4.27(1H, m), 4.25-4.10(2H, m), 4.00-3.85(1H, m), 3.43-3.27(2H, m), 2.73-2.59(1H, m), 2.31-2.15(1H, m), 1.97-1.57(4H, m).

[0095] N-(9H-フルオレン-9-イル)メチル(R)-2-(メルカプトメチル)ピロリジン-1-カルボキシレート(化合物aa13、Fmoc-D-Pro-SH)の合成

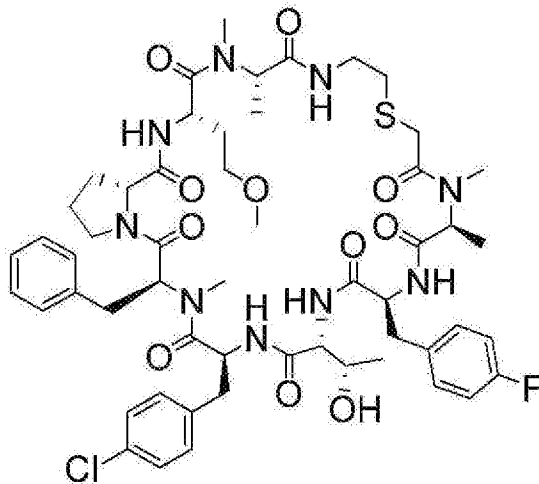
N-(9H-フルオレン-9-イル)メチル(S)-(1-メルカプト-3-(チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル)カルバメート(化合物aa 8、Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)の合成と同様に実施した。

MS(ESI m/z):(M+H)340.1

RT(min):1.82

[0096] 環状ペプチド1の合成

[化17]



[0097] 一般法のStep1に従い、化合物aa3のチオール基を2-クロロトリチルクロリドレジンに担持した。Fmoc-C2S-2-クロロトリチルレジン(1.01 mmol/g, 0.05 mmol, 50 mg)をNMPに懸濁し、1時間膨潤させ、濾過によりNMPを除去した。Fmoc-NMe-Ala、Fmoc-Hse(Me)-OH、Fmoc-D-Pro-OH、Fmoc-NMe-Phe-OH、Fmoc-Phe(4-Cl)-OH、Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Phe(4-F)-OH、Fmoc-NMe-Ala-OH、クロロ酢酸の順に縮合を行った。伸長終了後、レジンにNMP、ジクロロメタンで洗浄した後、減圧下溶媒を留去した。TFA: トリイソプロピルシラン: ジクロロメタン=5:2.5:92.5(2 mL)を加え、ペプチドの切り出しと脱

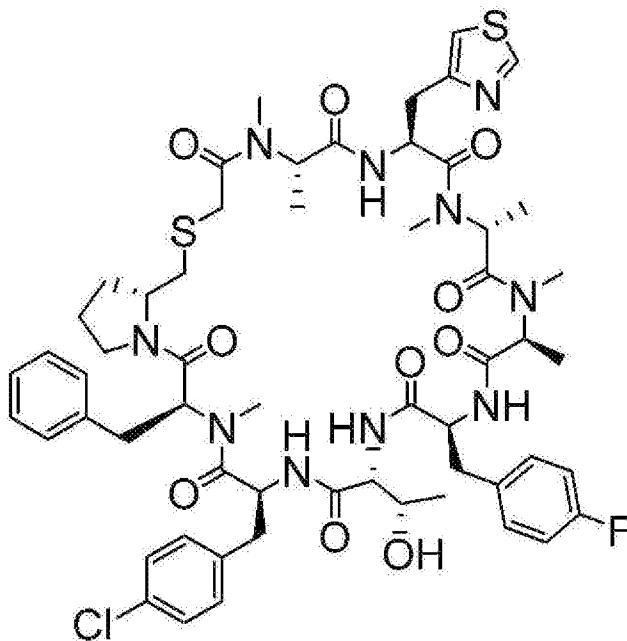
保護を行った。2時間後、レジンを濾別し、ろ液を回収した。さらに、2回TFA : トリイソプロピルシラン : ジクロロメタン=5 : 2.5 : 92.5 (1 mL) を加え、洗いこみ、ろ液を回収した。回収したろ液を全て合わせて溶媒を減圧留去し、十分乾燥を行い、直鎖ペプチドの粗精製物を得た。得られた粗精製物をアセトニトリル (10 mL) と0.1 M TEABバッファー : 純水=1:9 (10 mL) 溶液に溶解させ、溶液をpH 8.5±0.1に調整する。1モル当量のTCEP溶液 (0.5 M) を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、環状ペプチドの粗精製物を得た。得られた粗精製物を少量のアセトニトリルに溶解し、逆相HPLC(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、凍結乾燥粉末として、環状ペプチド1 (5.99 mg、収率10.8%)を得た。

MS (ESI m/z) : (M+H)1108.5

RT (min) :1.54

[0098] 環状ペプチド2の合成

[化18]



[0099] 一般法のStep1に従い、化合物aa13のチオール基を2-クロロトリチルクロリドレジンに担持した。Fmoc-D-Pro-S-2-クロロトリチルレジン (0.99 mmol/g, 0.05 mmol, 51 mg) をNMPに懸濁し、1時間膨潤させ、濾過によりNMP

を除去した。Fmoc-NMe-Phe-OH、Fmoc-Phe(4-Cl)-OH、Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Phe(4-F)-OH、Fmoc-NMe-Ala-OH、Fmoc-D-NMe-Ala、Fmoc-Ala(4-Thz)-OH、Fmoc-NMe-Ala、クロロ酢酸の順に縮合を行った。伸長終了後、レジンをNMP、ジクロロメタンで洗浄した後、減圧下溶媒を留去した。TFA：トリイソプロピルシラン：ジクロロメタン=5：2.5：92.5 (2 mL) を加え、ペプチドの切り出しと脱保護を行った。2時間後、レジンを濾別し、ろ液を回収した。さらに、2回TFA：トリイソプロピルシラン：ジクロロメタン=5：2.5：92.5 (1 mL) を加え、洗いこみ、ろ液を回収した。回収したろ液を全て合わせて溶媒を減圧留去し、十分乾燥を行い、直鎖ペプチドの粗精製物を得た。得られた粗精製物をアセトニトリル (10 mL) と0.1 M TEABバッファ：純水=1:9 (10 mL) 溶液に溶解させ、溶液をpH 8.5±0.1に調整する。1モル当量のTCEP溶液 (0.5 M) を加え、室温にて5時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、環状ペプチドの粗精製物を得た。得られた粗精製物を少量のアセトニトリルに溶解し、逆相HPLC(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、凍結乾燥粉末として、環状ペプチド1 (2.16 mg、収率3.7%) を得た。

MS (ESI m/z) : (M+H)1175.5

RT (min) :1.58

[0100] 環状ペプチド3～6、比較例1および2の合成

環状ペプチド3～6は、環状ペプチド1と同様の方法で合成した。比較例1は、W02021102322記載の方法により合成した。比較例2は、W02013123266記載の方法により合成した。

[0101] 表1に、環状ペプチドの配列を示す。なお、表中の環状ペプチドは左側がN末端クロロアセチル化されたアミノ酸残基、右側がチオール基含有化合物を示し、N末端クロロアセチル基とチオール基との反応により、チオエーテル結合することにより、環状ペプチドを形成している。比較例1は、左側がN末端アミノ酸残基、右側がC末端アミノ酸残基を示し、ペプチドの両端がアミド結合することにより環状ペプチドを形成している。比較例2は、表中の「Ac」

はアセチル基を表し、「\$r8」として表されるアミノ酸は、1個の二重結合を含む全炭素クロスリンカーにより連結された α -MeS8-オクテニル-アラニンオレフィンアミノ酸である。「\$」として表されるアミノ酸は、1個の二重結合を含む全炭素クロスリンカーにより連結された α MeS5-ペンテニル-アラニンオレフィンアミノ酸である。比較例2は、「\$r8」と「\$」で表されるアミノ酸残基の側鎖が、ステープル化されている。

[0102] [表1]

環状ペプチド	配列									
1	MeAla	Phe(4-F)	Thr	Phe(4-Cl)	MePhe	D-Pro	Hse(Me)	MeAla	C2S	
2	MeAla	Ala(4-Thz)	D-MeAla	MeAla	Phe(4-F)	Thr	Phe(4-Cl)	MePhe	ProS	
3	Pro	Phe(4-F)	Thr	Phe(4-Cl)	MePhe	D-MeAla	Hse(Me)	MeAla	C2S	
4	Pro	Phe(4-F)	Thr	Phe(4-Cl)	MePhe	MeAla	Hse(Me)	MeAla	C2S	
5	Pro	Phe(4-F)	Thr	Phe(4-Cl)	MePhe	MeAla	Hse(Me)	MeAla	Ala(4-Thz)S	
6	N(2-MeOEti)Gly	Phe(4-F)	Thr	Phe(4-Cl)	MePhe	MeAla	Hse(Me)	MeAla	Ala(4-Thz)S	
比較例1	Hse(Me)	MeAla	Ala(4-Thz)	D-MeAla	MeAla	Phe(4-F)	Tle	Phe(4-Cl)	MePhe	D-Pro
比較例2	Ac-Leu-Thr-Phe-\$r8-Ala-Tyr-Trp-Ala-Gln-Leu-\$-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-D-Ala-NH ₂									

なお、表1中、以下の略語は、それぞれ以下に記載するものを意味する。

C2S：化合物aa3に由来するチオール基含有アミノ酸類縁体残基

Ala(4-Thz)S：化合物8に由来するチオール基含有アミノ酸類縁体残基

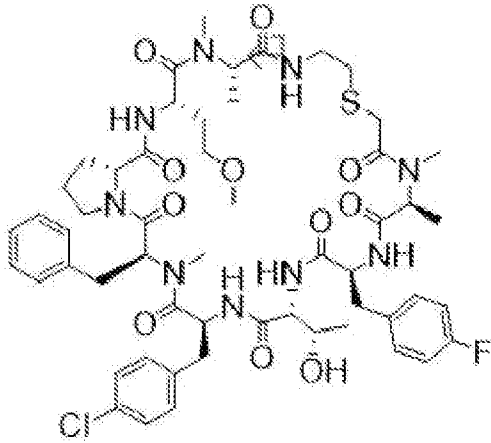
ProS：化合物aa13に由来するチオール基含有アミノ酸類縁体残基

[0103] 環状ペプチドの構造

環状ペプチドの構造を以下に示す。

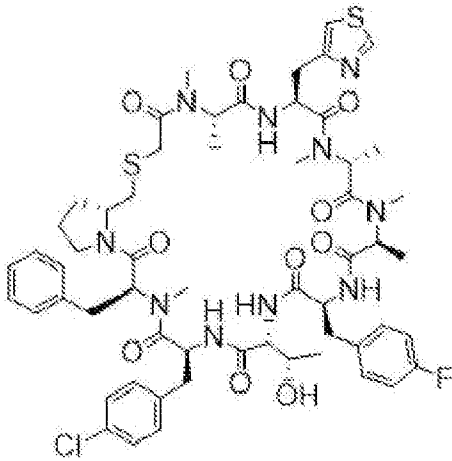
[0104] 環状ペプチド1

[化19]



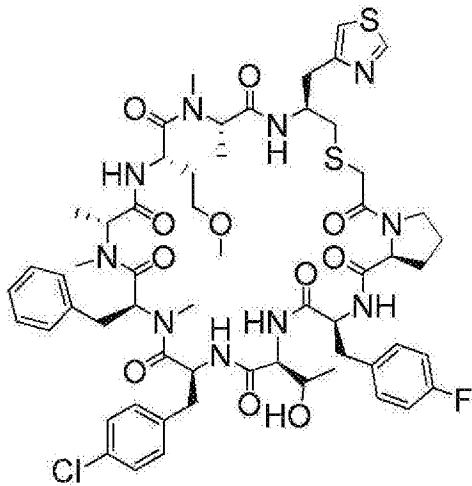
[0105] 環状ペプチド2

[化20]



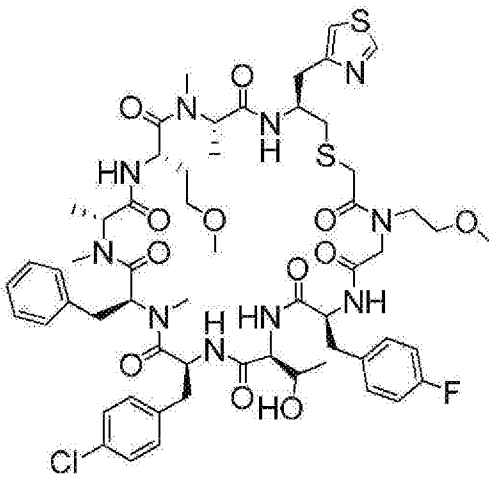
[0106] 環状ペプチド3

[化23]



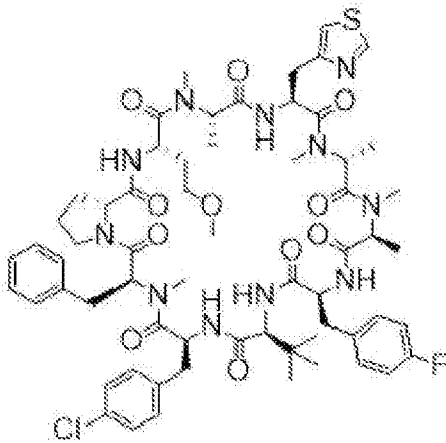
環状ペプチド6

[化24]



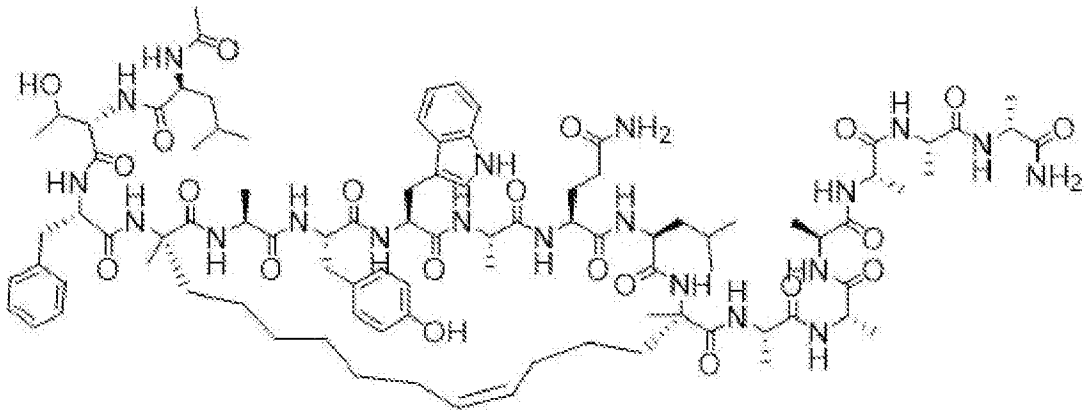
[0108] 比較例1

[化25]



[0109] 比較例 2

[化26]



[0110] LC-MS測定結果

[表2]

環状ペプチド	実測値 (M+H)	保持時間 (分)
1	1108.5	1.54
2	1175.5	1.58
3	1108.4	1.58
4	1108.5	1.54
5	1205.6	1.70
6	1223.6	1.65

[0111] <実施例 2>Alpha Screenアッセイ

本発明による環状ペプチドのMDMXに対するAlpha Screenアッセイを实

施した。

MDMXは、固相合成により合成したMDMX (24-108, N末端にHis-tag ; PDB ID : 2MWY, <https://www.rcsb.org/structure/2MWY>)を用いた。MDMXの結合相手には、p53のフラグメントペプチド[AnaSpec社製, p53(17-26) FITC-labeled]を用いた。ドナービーズは、Anti-FITC AlphaScreenを用いた。アクセプタービーズは、Anti-His tag AlphaLISAを用いた。反応に用いる緩衝液の組成は、PBS、0.1% BSA、0.01% Tween 20とした。

384ウェルプレート (PerkinElmer社 #6007290) の各ウェルに、濃度を調整した化合物5 μ L (DMSO終濃度1~5%)、MDMX 5 μ L (終濃度1 μ M)、p53ペプチド 5 μ L (終濃度10 nM) を順に加えた後、抗Hisタグ抗体修飾されたアクセプタービーズと抗FITC抗体修飾されたドナービーズをそれぞれ終濃度20 μ g/mLとなるように計10 μ L加え、室温で1時間インキュベートした。最後に蛍光シグナルをEnvisionを用いて測定した。尚、調液の際は光によるシグナルの減衰を防ぐため、緑色のフィルターを備えた光源下で実験を行った。

[0112] IC₅₀の計算式

陽性対照 (化合物を添加せず、代わりにDMSO濃度を揃えた緩衝液を添加したウェル) の蛍光強度を100 %、陰性対照 (MDMX、p53ペプチド、化合物を添加せず、代わりにDMSO濃度を揃えた緩衝液を添加したウェル) の蛍光強度を0 %として各ウェルの蛍光強度を規格化し、下式で表されるシグモイド曲線にフィッティングすることによりIC₅₀を算出した。

[化27]

$$(\text{規格化した蛍光強度}) = 1 - \frac{1}{1 + e^{-a[(\text{化合物濃度}) - \text{IC}_{50}]}}$$

[0113] <実施例3>細胞膜透過性評価

<準備>

本発明による環状ペプチドの細胞膜透過性評価を実施した。

インサート (24 well plate用, 孔径3.0 μ m, CORNING製) に1.0 \times 10⁶ cells/mLのMDCKII細胞 (ECACC標準細胞株) を300 μ L播種し、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂環境下

にて培養した。3日後に細胞層の電気抵抗値（測定器）を測定し、高バリア性（ $>100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ）であることを確認した。

[0114] <透過試験>

インサートをHBSS（フェノールレッド不含、以下同様）に浸して洗浄した後、 $10 \mu\text{M}$ /HBSSに調製した試料 $200 \mu\text{L}$ を加え、 $900 \mu\text{L}$ のHBSSが入った低吸着24 well plate内に静置した（ 37°C 5% CO_2 ）。2時間後、インサートの上層（apical）と下層（basal）の各液（apicalは $10 \mu\text{L}$ 、basalは $500 \mu\text{L}$ ）を回収した。試験後、非透過性の蛍光色素であるLucifer Yellowで漏洩がないことを確認した。

[0115] <定量>

装置はLC/MS/MS（トリプル四重極タイプ）を用いた。

溶離液：A) 5 mM ギ酸アンモニウム, 0.2% ギ酸/ H_2O , B) 0.1% ギ酸/ MeCN 、流速： 0.5 mL/min 、注入量： $2 \mu\text{L}$ 、カラム：ACQUITY UPLC BEH C18 Column, $1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ (Waters製)、温度： 70°C 、gradient (%B)： 2% ($0-0.5 \text{ min}$) $\rightarrow 98\%$ ($2-3 \text{ min}$) $\rightarrow 2\%$ ($3-5 \text{ min}$)、イオン化：ESI、検出モード：MRM (positive)

式 (1) に示した計算式に基づき、各定量値から膜透過性を表す透過係数 P_{app} を算出した。

$$P_{\text{app}} = V/C_0 \times 1/S \times dC/dt \quad \dots (1)$$

V: basalの体積 (0.9 mL)

C_0 : 初期濃度 ($10 \mu\text{M}$)

S: 単層膜の表面積 (0.33 cm^2)

dC/dt : basalでの濃度変化 [$\mu\text{M/s}$]

[0116] <実施例4>

MD計算を用いた分子形状因子r値の算出

まず、環状ペプチドの二次元で描画した構造式をChem3Dに入力して三次元で構造化する（図1）。本立体構造を初期構造として、量子化学計算手法(B3LYP/6-31G*、ソフトウェアはGaussian)で構造最適化し、局所安定構造を求め

る。上記局所安定構造で、量子化学計算手法(B3LYP/6-31G*、ソフトウェアはGaussian)で環状ペプチドが発生させる静電場を求め、上記の静電場を再現するように各原子上に点電荷(ESP電荷)をアサインする。次に、各原子間の共有結合の状態を解析し(Amber)、ファンデルワールスパラメータ(gaff2)を各原子にアサインする。本電荷と本ファンデルワールスパラメータを合わせて力場と呼ぶ。

[0117] 次に、本力場の下で、上記局所安定構造を初期構造に、クロロホルム中で分子動力学(MD)シミュレーションを実施する(ソフトウェアはGromacsとplumed)。MDシミュレーションには、効率的に広い配座空間を探索するための効率化の手法として、シミュレーション時の温度に室温に加え、より高温も利用するレプリカ交換MD法を使用する。用いた温度は6種で(レプリカ数が6種)、下表の通りである。なお、環状ペプチドのみに本温度は適用し、環状ペプチドの周りに存在するクロロホルムには常に298Kを適用する。

[0118] [表3]

	環状ペプチド/クロロホルムの温度[K]
系列1	298 / 298
系列2	348 / 298
系列3	398 / 298
系列4	448 / 298
系列5	498 / 298
系列6	548 / 298

[0119] 本レプリカ交換MD法で300nsの計算を実施すると、室温の最安定構造が算出された。

本最安定構造に対し、慣性テンソルを求め、主慣性モーメントを求め、各軸長(a、b、c)を求め、r値を計算する。具体的には、以下の手順でr値を計算する。

[0120] 上記の最安定構造の環状ペプチドの主鎖に属する原子の三次元座標を

$$(X_{a,1}, X_{a,2}, X_{a,3})$$

と表す。ここで、 a は主鎖に属する原子を識別するラベルで、1から N の整数をとる。 N は環状ペプチドの主鎖に属する原子の総数である。

[0121] この三次元座標に対して r 値を計算する。 r 値の計算は以下の手順で行うことができる。

[0122] (1)三次元座標をインプットに、慣性テンソル(3×3 の行列)を

[化28]

$$\begin{pmatrix} I_{11} & I_{12} & I_{31} \\ I_{21} & I_{22} & I_{32} \\ I_{31} & I_{32} & I_{33} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum_{a=1}^N \sum_{k=1}^3 (X_{a,k})^2 - \sum_{a=1}^N X_{a,1}X_{a,1} & -\sum_{a=1}^N X_{a,2}X_{a,1} & -\sum_{a=1}^N X_{a,3}X_{a,1} \\ -\sum_{a=1}^N X_{a,2}X_{a,1} & \sum_{a=1}^N \sum_{k=1}^3 (X_{a,k})^2 - \sum_{a=1}^N X_{a,2}X_{a,2} & -\sum_{a=1}^N X_{a,3}X_{a,2} \\ -\sum_{a=1}^N X_{a,3}X_{a,1} & -\sum_{a=1}^N X_{a,2}X_{a,3} & \sum_{a=1}^N \sum_{k=1}^3 (X_{a,k})^2 - \sum_{a=1}^N X_{a,3}X_{a,3} \end{pmatrix}$$

に従って計算する。

[0123] (2)慣性テンソルの固有値を計算する。得られた3つの固有値は主慣性モーメントと呼ばれ、

$$(I_1, I_2, I_3)$$

と表す。

[0124] (3)図2に示すように、一様分布の楕円体の各軸長を a, b, c ($a > b > c$) とする。

主慣性モーメントをインプットに、一様分布の楕円体の各軸長 a, b, c ($a > b > c$) を以下の式に従って計算する。

[化29]

$$a = \sqrt{\frac{5}{N} \left[\frac{\sum_{i=1}^3 I_i}{2} - I_1 \right]}$$

$$b = \sqrt{\frac{5}{N} \left[\frac{\sum_{i=1}^3 I_i}{2} - I_2 \right]}$$

$$c = \sqrt{\frac{5}{N} \left[\frac{\sum_{i=1}^3 I_i}{2} - I_3 \right]}$$

[0125] (4)楕円体の各軸長をインプットに、分子形状因子 (r) を以下の式に従って計算する。

[化30]

$$r = \frac{2\sqrt{b^2 + c^2}}{\sqrt{c^2 + a^2} + \sqrt{a^2 + b^2}}$$

[0126] 上記に従って、r値を求めた。

表4に、環状ペプチドのr値、 P_{app} についてまとめた。

[0127] < P_{app} の評価基準>

$D < 0.1 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}; 0.1 \times 10^{-6} \text{ cm/sec} \leq C < 0.25 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}; 0.25 \times 10^{-6} \text{ cm/sec} \leq B < 0.50 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}; 0.5 \times 10^{-6} \text{ cm/sec} \leq A$

評価A、BおよびCは、細胞膜透過性が十分であることを表し、評価Dは十分な細胞膜透過性が得られないことを表す。

[0128] [表4]

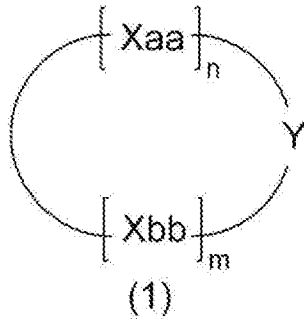
環状ペプチド	下記 (b)	下記 (c)	r	P_{app}
1	満たす	満たす	0.46	C
2	満たす	満たす	0.46	C
3	満たす	満たす	0.47	B
4	満たす	満たす	0.43	C
5	満たす	満たす	0.47	C
6	満たす	満たす	0.48	C
比較例1	満たさない	満たす	0.51	D
比較例2	満たさない	満たす	0.64	D

- [0129] (b) ペプチドの主鎖構造に硫黄原子を含む。
- (c) ペプチドが生理環境下において非イオン性である。

請求の範囲

[請求項1] 下記式(1)で表され、下記(a)～(c)の特徴を有する、環状ペプチドまたはその塩。

[化1]



式中、Yは、 $*-CR^1-S-CR^2-*$ で表される2価の基を示し、 R^1 および R^2 は水素原子または置換基を示し、*はXaaおよびXbbと結合する位置を示し、

n個のXaaはそれぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

m個のXbbはそれぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

n+mは、5～50の整数を示し；

(a) 環状ペプチドの構造において、主鎖構造の最も長い軸方向の軸長をaとし、aと直交し、互いに直交する他の2方向の軸長をb、cとした時に、a、b、cの各軸長を求める楕円体近似を行う段階を経て、下記式(2)で計算される分子形状因子rが0.4～0.6の範囲に含まれる；

[化2]

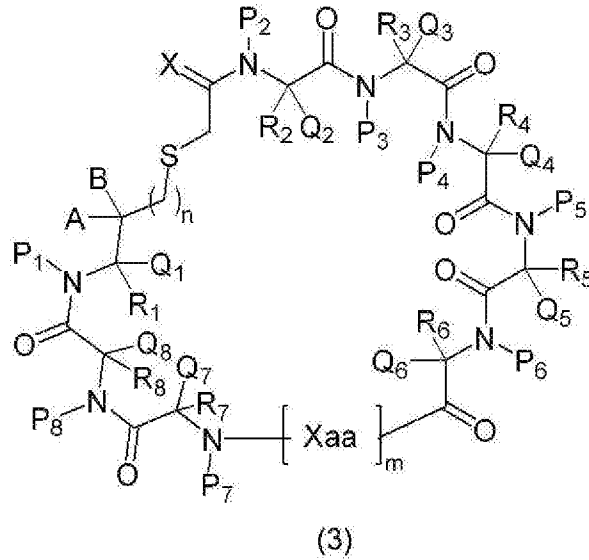
$$r = \frac{2\sqrt{b^2 + c^2}}{\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{c^2 + a^2}} \quad (2)$$

(b) 前記ペプチドの主鎖構造に硫黄原子を含む；

(c) 前記ペプチドが生理環境下において非イオン性である。

[請求項2] 下記式(3)で表される、請求項1に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[化3]



式中、

Xは、酸素原子、または硫黄原子であり、

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、Q₁、Q₂、Q₃、Q₄、Q₅、Q₆、Q₇、Q₈、AおよびBは、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、置換基を有していてもよい非芳香族炭素環式基、置換基を有していてもよい芳香族複素環式基、または置換基を有していてもよい非芳香族複素環式基であり、

P₁、P₂、P₃、P₄、P₅、P₆、P₇、およびP₈は、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいアルキニル基、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、置換基を有していてもよい非芳香族炭素環式基、置換基を有していてもよい芳香族複素環式基、または置換基を有していてもよい非芳香族複素環式基であり

、あるいは、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、AおよびBが結合している炭素原子は P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 および P_8 が結合している窒素原子と一緒にあって複素環を形成していてもよく、

m 個のX a aは、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基または任意のアミノ酸類縁体残基を示し、

n は、0～5の整数であり、 m は、0～2の整数である。

[請求項3] n が0または1である、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[請求項4] m が1である、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[請求項5] 前記 R_3 から R_8 もしくは Q_3 から Q_8 のうち少なくとも1つが、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、または置換基を有していてもよい芳香族複素環式基である、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[請求項6] 前記 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 もしくは Q_3 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 、 Q_8 のうち少なくとも1つが、置換基を有していてもよい芳香族炭素環式基、または置換基を有していてもよい芳香族複素環式基である、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[請求項7] 前記 R_1 および Q_1 またはAおよびB、および P_1 は、 R_1 および Q_1 またはAおよびBが結合している炭素原子および P_1 が結合している窒素原子と一緒にあって複素環を形成していても良く、また、前記 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 Q_2 、 Q_3 、 Q_4 、 Q_5 、 Q_6 、 Q_7 および Q_8 が結合している炭素原子は P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 および P_8 が結合している窒素原子と一緒にあって複素環を形成していてもよく、前記X a aがプロリンであってもよく、これらから形成される構造によって少なくとも1つの複素環を含む、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[請求項8] 前記 R_1 および Q_1 またはAおよびB、および P_1 は、 R_1 および Q_1

またはAおよびBが結合している炭素原子およびP₁が結合している窒素原子と一緒にって複素環を形成していても良く、また、前記R₂およびQ₂が結合している炭素原子はP₂が結合している窒素原子と一緒にって複素環を形成していてもよく、前記X a aがプロリンであっていてもよく、これらから形成される構造によって少なくとも1つの複素環を含む、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

[請求項9]

前記R₁およびQ₁またはAおよびB、およびP₁は、R₁およびQ₁またはAおよびBが結合している炭素原子およびP₁が結合している窒素原子と一緒にってピロリジン環を形成していても良く、また、前記R₂およびQ₂が結合している炭素原子はP₂が結合している窒素原子と一緒にってピロリジン環を形成していてもよく、前記X a aがプロリンであっていてもよく、これらから形成される構造によって少なくとも1つのピロリジン環を含む、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

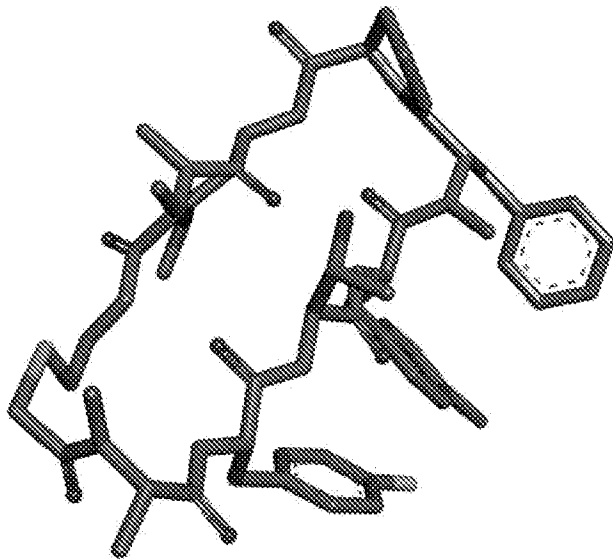
[請求項10]

前記R₁およびQ₁またはAおよびBおよびX a aは、それぞれ任意のD-アミノ酸残基または任意のD-アミノ酸類縁体残基である、請求項2に記載の環状ペプチドまたはその塩。

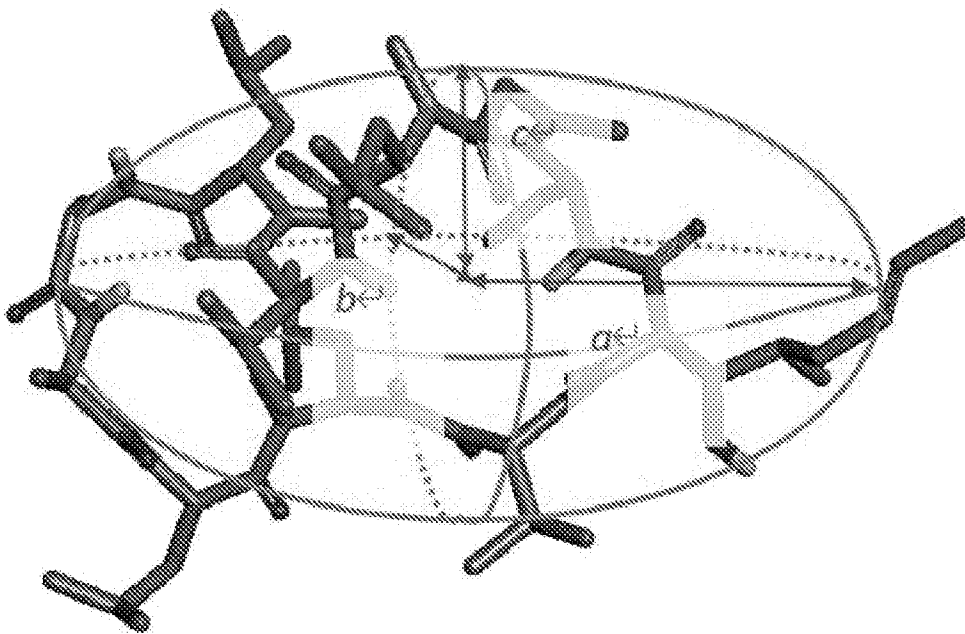
[請求項11]

請求項1～10の何れか一項に記載の環状ペプチドまたはその塩を含む、MDMX阻害剤。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/030223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C07K 4/00</i>(2006.01)i; <i>C07K 7/64</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/11</i>(2006.01)i FI: C07K7/64; C07K4/00; C12N15/11 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K4/00; C07K7/64; C12N15/11		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2022/0002346 A1 (LOKEY, R. S.) 06 January 2022 (2022-01-06) claims, examples	1-11
A	WO 2021/102322 A1 (UNNATURAL PRODUCTS INC.) 27 May 2021 (2021-05-27) claims, examples	1-11
A	FURUKAWA, A. et al. Drug-Like Properties in Macrocycles above MW 1000: Backbone Rigidity versus Side-Chain Lipophilicity. <i>Angewandte Chemie, International Edition</i> . 2020, vol. 59, no. 48, pp. 21571-21577, DOI 10.1002/anie.202004550 abstract, fig. 1, 3	1-11
A	PYE, C. R. et al. Nonclassical Size Dependence of Permeation Defines Bounds for Passive Adsorption of Large Drug Molecules. <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> . 2017, vol. 60, no. 5, pp. 1665-1672, DOI 10.1021/acs.jmedchem.6b01483 abstract, fig. 2	1-11
A	FOUCHE, M. et al. Pharmacokinetic Studies around the Mono- and Difunctionalization of a Bioavailable Cyclic Decapeptide Scaffold. <i>ChemMedChem</i> . 2016, vol. 11, no. 10, pp. 1060-1068, DOI 10.1002/cmdc.201600083 abstract, tables 1-9	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2023		Date of mailing of the international search report 17 October 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/030223

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAWRENCE, N. et al. Cyclic peptide scaffold with ability to stabilize and deliver a helical cell-impermeable cargo across membranes of cultured cancer cells. RSC Chemical Biology. 2020, vol. 1, pp. 405-420, DOI 10.1039/d0cb00099j abstract, fig. 1, table 1, fig. 3, 4	1-11
A	PARTRIDGE, A. W. et al. Incorporation of Putative Helix-Breaking Amino Acids in the Design of Novel Stapled Peptides: Exploring Biophysical and Cellular Permeability Properties. Molecules. 2019, vol. 24, no. 12, p. 2292, DOI 10.3390/molecules24122292 abstract, fig. 1, tables 1, 2	1-11
A	JP 2015-508777 A (AILERON THERAPEUTICS, INC.) 23 March 2015 (2015-03-23) claims, examples	1-11

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“In the form of an Annex C/ST.25 text file” above should be understood as “in ST. 26 format”.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/030223

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2022/0002346	A1	06 January 2022	(Family: none)	
WO	2021/102322	A1	27 May 2021	JP 2023-502745	A
				claims, examples	
				US 2022/0411471	A1
				EP 4061397	A1
				CN 115297883	A
JP	2015-508777	A	23 March 2015	US 2013/0210745	A1
				claims, examples	
				WO 2013/123267	A1
				EP 2819688	A1
				CN 104144695	A

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 4/00(2006.01)i; C07K 7/64(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i FI: C07K7/64; C07K4/00; C12N15/11 Z		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K4/00; C07K7/64; C12N15/11 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2023年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2023年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 2022/0002346 A1 (LOKEY R. S.) 06.01.2022 (2022 - 01 - 06) CLAIMS, EXAMPLES	1 - 1 1
A	WO 2021/102322 A1 (UNNATURAL PRODUCTS INC.) 27.05.2021 (2021 - 05 - 27) CLAIMS, EXAMPLES	1 - 1 1
A	FURUKAWA A. et al., Drug-Like Properties in Macrocycles above MW 1000: Backbone Rigidity versus Side-Chain Lipophilicity, Angewandte Chemie, International Edition, 2020, Vol.59, No.48, p.21571-21577, DOI 10.1002/anie.202004550 Abstract, Fig.1, Fig.3	1 - 1 1
A	PYE C. R. et al., Nonclassical Size Dependence of Permeation Defines Bounds for Passive Adsorption of Large Drug Molecules, Journal of Medicinal Chemistry, 2017, Vol.60, No.5, p.1665-1672, DOI 10.1021/acs.jmedchem.6b01483 Abstract, Fig.2	1 - 1 1
A	FOUCHE M. et al., Pharmacokinetic Studies around the Mono- and Difunctionalization of a Bioavailable Cyclic Decapeptide Scaffold, ChemMedChem, 2016, Vol.11, No.10, p.1060-1068, DOI 10.1002/cmde.201600083 Abstract, Table 1-9	1 - 1 1
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	25.09.2023	国際調査報告の発送日 17.10.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 上條 のぶよ 4B 9454 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	LAWRENCE N. et al., Cyclic peptide scaffold with ability to stabilize and deliver a helical cell-impermeable cargo across membranes of cultured cancer cells, RSC Chemical Biology, 2020, Vol.1, p.405-420, DOI 10.1039/d0cb00099j Abstract, Fig.1, Table 1, Fig.3, Fig.4	1 - 1 1
A	PARTRIDGE A. W. et al, Incorporation of Putative Helix-Breaking Amino Acids in the Design of Novel Stapled Peptides: Exploring Biophysical and Cellular Permeability Properties, Molecules, 2019, Vol.24, No.12, p.2292, DOI 10.3390/molecules24122292 Abstract, Fig. 1, Table 1, Table 2	1 - 1 1
A	JP 2015-508777 A (エイルロン セラピューティクス, インコーポレイテッド) 23.03.2015 (2015 - 03 - 23) 特許請求の範囲、実施例	1 - 1 1

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:
- 上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/030223

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2022/0002346 A1	06.01.2022	(ファミリーなし)	
WO 2021/102322 A1	27.05.2021	JP 2023-502745 A 特許請求の範囲、実施例	
		US 2022/0411471 A1	
		EP 4061397 A1	
		CN 115297883 A	
JP 2015-508777 A	23.03.2015	US 2013/0210745 A1 CLAIMS, EXAMPLES	
		WO 2013/123267 A1	
		EP 2819688 A1	
		CN 104144695 A	