



(21)申請案號：112131447

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 08 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07K7/64 (2006.01)

A61K38/12 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/08/23 日本

2022-132147

(71)申請人：日商富士軟片股份有限公司(日本) FUJIFILM CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：金子麻依 KANEKO, MAI (JP)；田村崇 TAMURA, TAKASHI (JP)；鈴木晃生 SUZUKI, KOO (JP)；津村享佑 TSUMURA, KYOSUKE (JP)；大橋紀之 OHASHI, NORIYUKI (JP)；公地將大 KOCHI, MASAHIRO (JP)；橋本一彥 HASHIMOTO, ICHIIHIKO (JP)；宮原建太 MIYAHARA, KENTA (JP)；堀込弘記 HORIGOME, HIROKI (JP)

(74)代理人：王彥評；賴碧宏

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：2 共 75 頁

(54)名稱

環肽或其鹽及MDMX抑制劑

(57)摘要

本發明的課題為提供一種具有優異的細胞膜穿透性之環肽或其鹽以及MDMX抑制劑。依據本發明，提供由在本說明書中定義之式(1)表示且具有下述(a)~(c)的特徵之、環肽或其鹽。

(a)在環肽的結構中，將主鏈結構的最長的軸方向的軸長設為a、將與a正交且相互正交的其他2個方向的軸長設為b、c時，經過進行求出a、b、c的各軸長之橢圓體近似之階段，由下述式(2)計算之分子形狀因數r包含在0.4~0.6的範圍；

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

(b)在上述肽的主鏈結構中包含硫原子；

(c)上述肽在生理環境下為非離子性。

## 〔發明摘要〕

〔中文發明名稱〕

環狀或其鹽及 MDMX 抑制劑

〔中文〕

本發明的課題為提供一種具有優異的細胞膜穿透性之環狀或其鹽以及 MDMX 抑制劑。依據本發明，提供出在本說明書中定義之式(1)表示且具有下述(a)~(c)的特徵之、環狀或其鹽。

(a)在環狀的結構中，將主鏈結構的最長的軸方向的軸長設為  $a$ 、將與  $a$  正交且相互正交的其他 2 個方向的軸長設為  $b$ 、 $c$  時，經過進行求出  $a$ 、 $b$ 、 $c$  的各軸長之橢圓體近似之階段，由下述式(2)計算之分子形狀因數  $r$  包含在  $0.4 \sim 0.6$  的範圍；



(b)在上述狀的主鏈結構中包含硫原子；

(c)上述狀在生理環境下為非離子性。

〔指定代表圖〕

無。

〔代表圖之符號簡單說明〕

無。

〔特徵化學式〕

無。

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

環肽或其鹽及 MDMX 抑制劑

### 【技術領域】

【0001】本發明係關於一種具有細胞膜穿透性之環肽及 MDMX 抑制劑。

### 【先前技術】

【0002】人類轉錄因數蛋白 p53 響應於 DNA 損傷及細胞壓力而誘導細胞增殖停止或細胞凋亡，藉此對從惡性轉化保護細胞發揮重要的作用。MDM2 及 MDMX 被已知為與 p53 交互作用、負調控 p53 的功能、抑制其轉錄活性之腫瘤性蛋白。發現 MDM2 及 MDMX 在很多癌症中擴增或過度表達，並且參與人類癌症的發生和進展。針對 p53-MDM2 交互作用及 p53-MDMX 交互作用的抑制劑能夠使 p53 活性恢復，因此作為抗癌劑備受期待。近年來，作為 MDMX 抑制劑，報道有作為低分子化合物的 Nutlin-3a 等能夠高效率地殺滅具有野生型 p53 基因之癌細胞。另一方面，關於 MDMX 抑制劑，尚未報道有有效的化合物，MDMX 針對過度表達之癌細胞的治療法尚未確立。

【0003】近年來，肽化合物(分子量 500~2000)能夠與被稱為蛋白質-蛋白質交互作用(Protein-Protein interaction: PPI)之標靶交互作用，且有可能能夠賦予

細胞膜穿透性，備受關注。尤其，與直鏈肽相比，環肽具有提高針對與標靶蛋白質的標靶結合性、特異性、細胞膜穿透性及代謝的穩定性等優點。例如，環孢素等來自於天然物之環肽作為藥劑已被上市。為了對 PPI 的寬的交互作用面得到高標靶結合性，較佳為 10 胺基酸殘基以上的環肽，但已知 10 胺基酸殘基以上的環肽的細胞膜穿透性一般不高。

【0004】p53 介由反式激活(TA)結構域  $\alpha$  螺旋區域的結合殘基(Phe<sup>19</sup>、Leu<sup>22</sup>、Trp<sup>23</sup>)與 MDMX 的疏水性口袋(Pocket)結合。在專利文獻 1 及 2 中，記載有作為環肽的 MDM2/MDMX 雙重抑制劑，其將 p53 的  $\alpha$  螺旋區域作為藥物發現種子(Drug Discovery Seed)並利用了裝訂(Stapled)交聯。在專利文獻 3 及非專利文獻 1 中，記載有作為環肽的 MDM2/MDMX 雙重抑制劑，其藉由組合  $\beta$  轉折(Turn)序列，利用類似環孢素的分子設計來形成  $\beta$  褶板(Sheet)結構，並且模仿了 p53 的 TA 結構域。又，在專利文獻 4 中報道有如下設計：在硫醚環肽化合物中，藉由長鏈烷基側鏈的導入來提高疏水性，並利用親疏水環境下的結構變化來賦予細胞膜穿透性。

【0005】在非專利文獻 2 中記載有 MDMX 抑制劑，其除了如上所述的控制了構形之環肽以外，還利用了能夠代替 p53 的 TA 結構域而與 MDMX 的口袋結合之低分子化合物。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

**【 0006 】**

[專利文獻 1]國際公開 WO2015/153761 號公報

[專利文獻 2]國際公開 WO2013/123266 號公報

[專利文獻 3]國際公開 WO2021/102322 號公報

[專利文獻 4]國際公開 WO2015/030014 號公報

**【 0007 】**

[非專利文獻]

[非專利文獻 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  $\beta$ -Hairpin Protein Epitope Mimetic Inhibitors of the p53-HDM2 Protein-Protein Interaction. *ChemBioChem*, 7, 515-526.

[非專利文獻 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.

**【 0008 】** 環肽雖然與標靶的標靶結合性高，但細胞膜穿透性低。在專利文獻 1~3 及非專利文獻 1 中，藉由將環肽控制為細胞膜穿透中所期望的構形之設計來謀求細胞膜穿透性的提高。但是，無論使用哪種嘗試，仍

留有課題，對細胞膜穿透性的賦予要求新的設計。

〔0009〕如上所述，認為 MDMX 抑制劑在各種樣癌症治療中可能成為有效的治療藥，從低分子化合物到肽化合物，開發出了各種 MDMX 抑制劑。但是，尚未得到具有充分的細胞膜穿透性之抑制劑。本發明的要解決之課題為提供一種具有優異的細胞膜穿透性之環狀或其鹽。本發明的要解決之課題還在於提供一種包含上述環狀或其鹽之 MDMX 抑制劑。

〔發明內容〕

〔發明欲解決之課題〕

〔0010〕本發明人等為了解決上述課題而苦心探討之結果，發現了具有在本說明書中規定之(a)至(c)的特徵之環狀或其鹽具有優異的細胞膜穿透性。本發明為依據上述的見解而完成者。依據本發明，提供以下的發明。

〔0011〕〈1〉一種環狀或其鹽，前述環狀由下述式(1)表示，且具有下述(a)~(c)的特徵。

〔化學式 1〕



式中，Y 表示  $-\text{CR}^1-\text{S}-\text{CR}^2-$  所表示之 2 價的基， $\text{R}^1$

及  $R^2$  表示氫原子或取代基，\*表示與 Xaa 及 Xbb 鍵結之位置，

n 個 Xaa 分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

m 個 Xbb 分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

$n+m$  表示 5~50 的整數；

(a) 在環肽的結構中，將主鏈結構的最長的軸方向的軸長設為 a、將與 a 正交且相互正交的其他 2 個方向的軸長設為 b、c 時，經過進行求出 a、b、c 的各軸長之橢圓體近似之階段，由下述式(2)計算之分子形狀因數 r 包含在 0.4~0.6 的範圍；

[化學式 2]

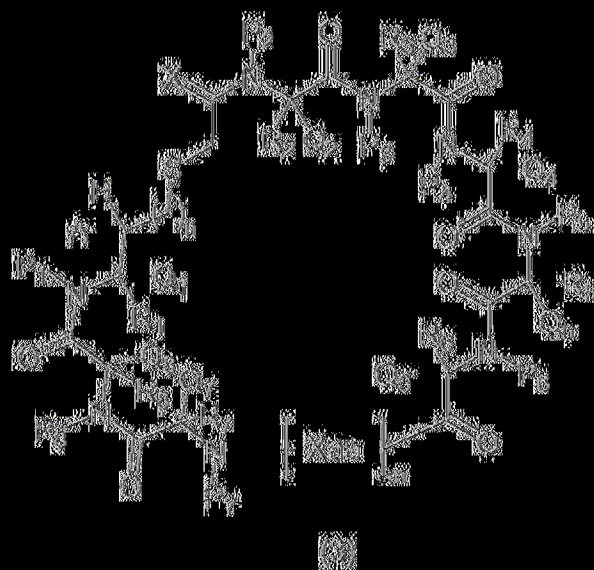
$$r = \frac{2\sqrt{b^2 + c^2}}{\sqrt{a^2 + b^2} + \sqrt{c^2 + a^2}} \quad (2)$$

(b) 在前述肽的主鏈結構中包含硫原子；

(c) 前述肽在生理環境下為非離子性。

< 2 > 如 < 1 > 所述之環肽或其鹽，前述環肽由下述式(3)表示。

## [化學式 3]



式中，

X 為氧原子或硫原子，

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、 $Q_4$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$ 、 $Q_8$ 、A 及 B 分別獨立地為氮原子、可以具有取代基之烷基、可以具有取代基之烯基、可以具有取代基之炔基、可以具有取代基之芳香族碳環基、可以具有取代基之非芳香族碳環基、可以具有取代基之芳香族雜環基或可以具有取代基之非芳香族雜環基，

$P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  分別獨立地為氮原子、可以具有取代基之烷基、可以具有取代基之烯基、可以具有取代基之炔基、可以具有取代基之芳香族碳環基、可以具有取代基之非芳香族碳環基、可以具有取代基之芳香族雜環基或可以具有取代基之非芳香族雜環基，或者，

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、A 及 B 所鍵結

之碳原子可以與  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，

$m$  個 Xaa 分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

$n$  為 0~5 的整數， $m$  為 0~2 的整數。

< 3 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

$n$  為 0 或 1。

< 4 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

$m$  為 1。

< 5 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

前述  $R_3$  至  $R_8$  或  $Q_3$  至  $Q_8$  中的至少一個為可以具有取代基之芳香族碳環基或可以具有取代基之芳香族雜環基。

< 6 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

前述  $R_3$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$  或  $Q_3$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$ 、 $Q_8$  中的至少一個為可以具有取代基之芳香族碳環基或可以具有取代基之芳香族雜環基。

< 7 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

前述  $R_1$  及  $Q_1$  以及  $P_1$  或 A 及 B 以及  $P_1$  可以與  $R_1$  及  $Q_1$  或 A 及 B 所鍵結之碳原子及  $P_1$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，並且，前述  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、 $Q_4$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$  及  $Q_8$  所鍵結之碳原子可以與  $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  所鍵結之氮原子一同形成

雜環，前述 Xaa 可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個雜環。

< 8 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

前述 R<sub>1</sub> 及 Q<sub>1</sub> 以及 P<sub>1</sub> 或 A 及 B 以及 P<sub>1</sub> 可以與 R<sub>1</sub> 及 Q<sub>1</sub> 或 A 及 B 所鍵結之碳原子以及 P<sub>1</sub> 所鍵結之氮原子一同形成雜環，並且，前述 R<sub>2</sub> 及 Q<sub>2</sub> 所鍵結之碳原子可以與 P<sub>2</sub> 所鍵結之氮原子一同形成雜環，前述 Xaa 可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個雜環。

< 9 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

前述 R<sub>1</sub> 及 Q<sub>1</sub> 以及 P<sub>1</sub> 或 A 及 B 以及 P<sub>1</sub> 可以與 R<sub>1</sub> 及 Q<sub>1</sub> 或 A 及 B 所鍵結之碳原子以及 P<sub>1</sub> 所鍵結之氮原子一同形成吡咯啉環，並且，前述 R<sub>2</sub> 及 Q<sub>2</sub> 所鍵結之碳原子可以與 P<sub>2</sub> 所鍵結之氮原子一同形成吡咯啉環，前述 Xaa 可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個吡咯啉環。

< 10 > 如 < 2 > 所述之環肽或其鹽，其中

前述 R<sub>1</sub> 及 Q<sub>1</sub> 或 A 及 B 以及 Xaa 分別為任意的 D-胺基酸殘基或任意的 D-胺基酸類似物殘基。

< 11 > 一種 MDMX 抑制劑，其包含 < 1 > 至 < 10 > 之任一項所述之環肽或其鹽。

**【0012】** < A > 一種抑制 MDMX 之方法，其包括將 < 1 > 至 < 10 > 之任一項所述之環肽或其鹽投予到對象。

< B > 如 < 1 > 至 < 10 > 之任一項所述之環肽或其鹽，其用於抑制 MDMX 之處置。

< C > 如 < 1 > 至 < 19 > 之任一項所述之環肽或其鹽的使用，其用於製造 MDMX 抑制劑。

[發明之效果]

**【0013】** 本發明的環肽或其鹽及 MDMX 抑制劑具有優異的細胞膜穿透性。

**【圖式簡單說明】**

**【0014】**

圖 1 表示將環肽的二維描繪之結構式進行三維結構化者。

圖 2 表示環肽的結構的橢圓體近似。

**【實施方式】**

[用以實施發明的形態]

**【0015】** 以下，對本發明進行詳細說明。

在本說明書中，“~”表示將記載於其前後之數值分別作為最小值及最大值而包含之範圍。

**【0016】**

< 術語的說明 >

胺基酸係指含有胺基及羧基這兩者之分子。作為胺基酸，可以為天然胺基酸或非天然胺基酸中的任一者，且可以為 D-及 L-異構物中的任一者。作為胺基酸，可以為  $\alpha$ -胺基酸。 $\alpha$ -胺基酸係指含有與被指定為  $\alpha$ -碳之碳

鍵結之胺基及羧基之分子。

【0017】天然胺基酸表示丙胺酸(A)、精胺酸(R)、天冬醯胺(N)、半胱胺酸(C)、天冬醯胺酸(D)、穀醯胺(Q)、穀醯胺酸(E)、甘胺酸(G)、組胺酸(H)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、苯基丙胺酸(F)、脯胺酸(P)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、色胺酸(W)、酪胺酸(Y)及纈胺酸(V)中的任一者。

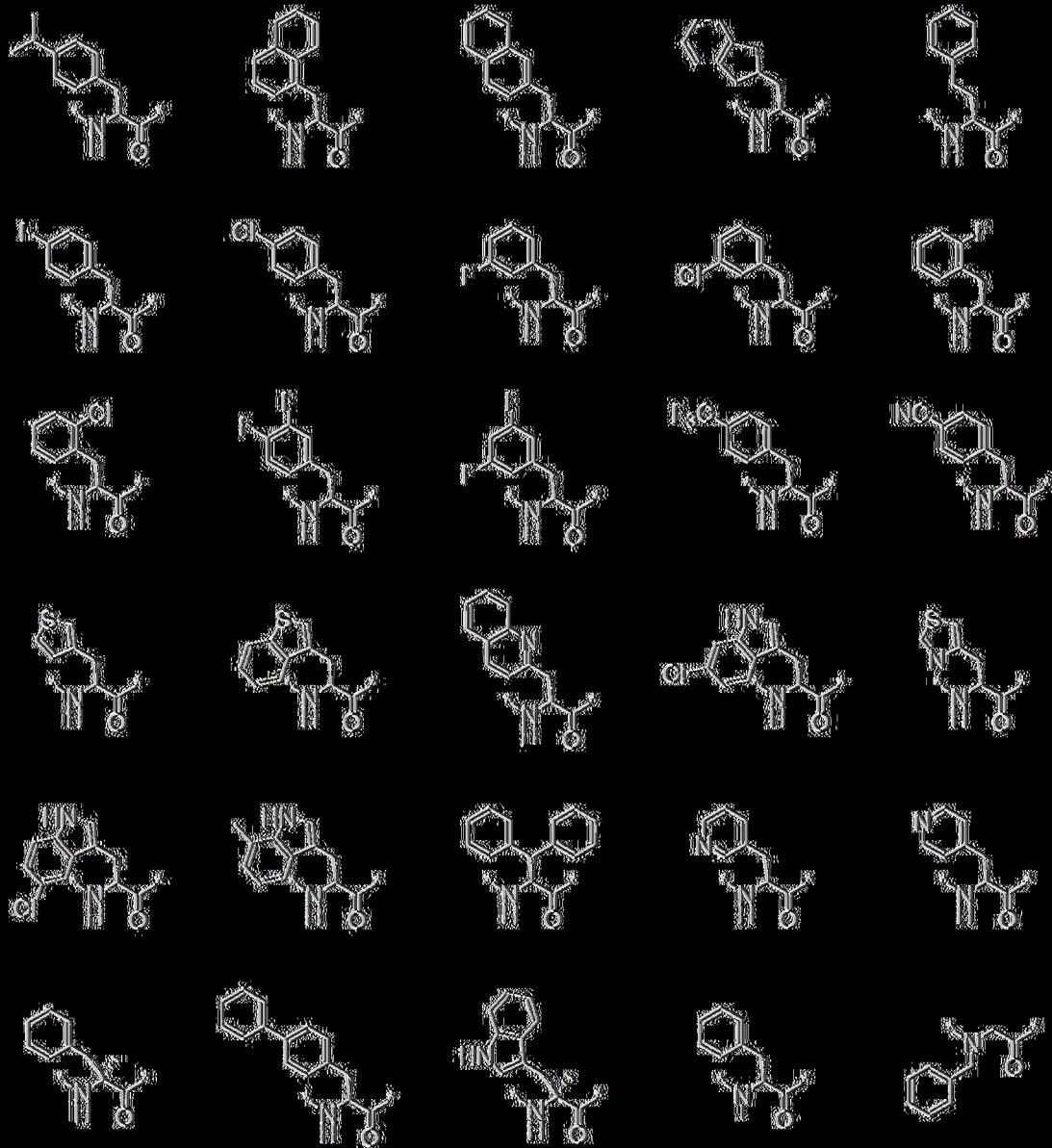
非天然胺基酸係指除上述之 20 個種類的天然胺基酸以外的胺基酸。

胺基酸類似物係指在結構上與胺基酸類似且在環肽的製造中能夠代替胺基酸使用之分子。

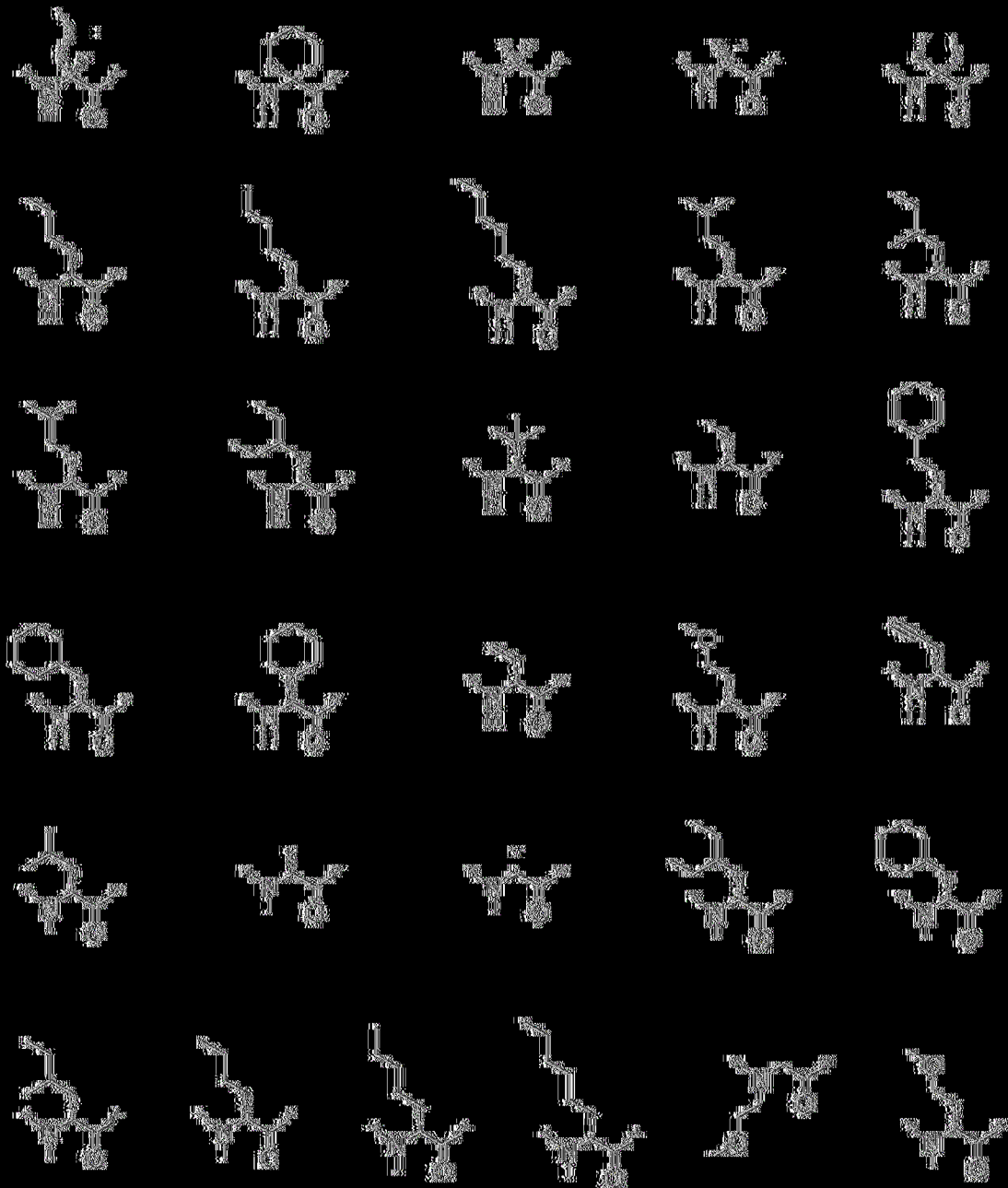
【0018】作為胺基酸類似物，可以舉出  $\beta$ -胺基酸及胺基或羧基同樣被反應性的基取代之胺基酸(例如，一級胺基於二級或三級胺的取代或羧基基於酯的取代)，但並不受特別限定。 $\beta$ -胺基酸係指在  $\beta$  配置中含有胺基及羧基這兩者之分子。

【0019】作為非天然胺基酸殘基及胺基酸類似物殘基，能夠舉出以下，但並不受特別限定。

## [ (0020) ] [ 化學式 4 ]



[(0021)] [化學式 5]



[(0022)] 胺基酸類似物中包括  $\beta$ -胺基酸類似物。 $\beta$ -胺基酸類似物的例子中包括下述者，但並不限定於該等：環狀  $\beta$ -胺基酸類似物； $\beta$ -丙胺酸；(R)- $\beta$ -苯基丙胺酸；(R)-1,2,3,4-四氟-異喹啉-3-乙酸；(R)-3-胺基-4-(1-萘基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2,4-二氯苯基)-丁酸；(R)-3-

胺基-4-(2-氯苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2-氰基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2-氟苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2-呋喃基(Furyl))-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2-甲基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2-萘基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2-噻吩基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(2-三氟甲基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3,4-二氯苯基)丁酸；(R)-3-胺基-4-(3,4-二氟苯基)丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-氯苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-氰基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-氟苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-甲基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-吡啶基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-噻吩基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-溴苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-氯苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-氰基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-氟苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-碘苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-甲基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-硝基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-吡啶基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸；(R)-3-胺基-4-五氟苯基丁酸；(R)-3-胺基-5-己烯酸；(R)-3-胺基-5-己炔酸；(R)-3-胺基-5-苯基戊酸；(R)-3-胺基-6-苯基-5-己烯酸；(S)-1,2,3,4-四氟-異喹啉-3-乙酸；(S)-3-胺基-4-(1-萘基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2,4-二氯苯基)丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-氯苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-氰基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-氟苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-呋

喃基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-甲基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-萘基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-噻吩基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(2-三氟甲基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3,4-二氯苯基)丁酸；(S)-3-胺基-4-(3,4-二氟苯基)丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-氯苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-氰基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-氟苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-甲基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-吡啶基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-噻吩基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-溴苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-氯苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-氰基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-氟苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-碘苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-甲基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-硝基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-吡啶基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸；(S)-3-胺基-4-五氟-苯基丁酸；(S)-3-胺基-5-己烯酸；(S)-3-胺基-5-己炔酸；(S)-3-胺基-5-苯基戊酸；(S)-3-胺基-6-苯基-5-己烯酸；1,2,5,6-四氟吡啶-3-羧酸；1,2,5,6-四氟吡啶-4-羧酸；3-胺基-3-(2-氯苯基)-丙酸；3-胺基-3-(2-噻吩基)-丙酸；3-胺基-3-(3-溴苯基)-丙酸；3-胺基-3-(4-氯苯基)-丙酸；3-胺基-3-(4-甲氧基苯基)-丙酸；3-胺基-4,4,4-三氟-丁酸；3-胺基己二酸；D-β-苯基丙胺酸；β-白胺酸；L-β-高丙胺酸；L-β-高天冬醯胺酸 γ-苄基酯；L-β-高穀醯

胺酸  $\delta$ -苄基酯；L- $\beta$ -高異白胺酸；L- $\beta$ -高白胺酸；L- $\beta$ -高甲硫胺酸；L- $\beta$ -高苯基丙胺酸；L- $\beta$ -高脯胺酸；L- $\beta$ -高色胺酸；L- $\beta$ -高纈胺酸；L-N $\omega$ -苄氧基羰基- $\beta$ -高離胺酸；N $\omega$ -L- $\beta$ -高精胺酸；O-苄基-L- $\beta$ -高羥基脯胺酸；O-苄基-L- $\beta$ -高絲胺酸；O-苄基-L- $\beta$ -高蘇胺酸；O-苄基-L- $\beta$ -高酪胺酸； $\gamma$ -三苯甲基(Trityl)-L- $\beta$ -高天冬醯胺；(R)- $\beta$ -苯基丙胺酸；L- $\beta$ -高天冬醯胺  $\gamma$ -三級丁基酯；L- $\beta$ -高穀醯胺  $\delta$ -三級丁基酯；L-N $\omega$ - $\beta$ -高離胺酸；N $\delta$ -三苯甲基-L- $\beta$ -高穀醯胺；N $\omega$ -2,2,4,6,7-五甲基-二氫苯并吡喃-5-磺醯基-L- $\beta$ -高精胺酸；O-三級丁基-L- $\beta$ -高羥基-脯胺酸；O-三級丁基-L- $\beta$ -高絲胺酸；O-三級丁基-L- $\beta$ -高蘇胺酸；O-三級丁基-L- $\beta$ -高酪胺酸；2-胺基環戊烷羧酸；及 2-胺基環己烷羧酸。

【0023】胺基酸類似物中包括丙胺酸、纈胺酸、甘胺酸或白胺酸的類似物。丙胺酸、纈胺酸、甘胺酸及白胺酸的胺基酸類似物的例子中包括下述者，但並不限定於該等： $\alpha$ -甲氧基甘胺酸； $\alpha$ -烯丙基-L-丙胺酸； $\alpha$ -胺基異丁酸； $\alpha$ -甲基-白胺酸； $\beta$ -(1-萘基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(1-萘基)-L-丙胺酸； $\beta$ -(2-萘基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(2-萘基)-L-丙胺酸； $\beta$ -(2-吡啶基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(2-吡啶基)-L-丙胺酸； $\beta$ -(2-噻吩基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(2-噻吩基)-L-丙胺酸； $\beta$ -(3-苯并噻吩基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(3-苯并噻吩基)-L-丙胺酸； $\beta$ -(3-吡啶基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(3-吡啶基)-L-丙胺酸；

$\beta$ -(4-吡啶基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(4-吡啶基)-L-丙胺酸； $\beta$ -氯-L-丙胺酸； $\beta$ -氰基-L-丙胺酸； $\beta$ -環己基-D-丙胺酸； $\beta$ -環己基-L-丙胺酸； $\beta$ -環戊烯-1-基-丙胺酸； $\beta$ -環戊基-丙胺酸； $\beta$ -環丙基-L-Ala-OH·二環己基銨鹽； $\beta$ -三級丁基-D-丙胺酸； $\beta$ -三級丁基-L-丙胺酸； $\gamma$ -胺基丁酸；L- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；2,4-二硝基-苯基甘胺酸；2,5-二氫-D-苯基甘胺酸；2-胺基-4,4,4-三氟丁酸；2-氟-苯基甘胺酸；3-胺基-4,4,4-三氟-丁酸；3-氟-纈胺酸；4,4,4-三氟-纈胺酸；4,5-脫氫-L-leu-OH·二環己基銨鹽；4-氟-D-苯基甘胺酸；4-氟-L-苯基甘胺酸；4-羥基-D-苯基甘胺酸；5,5,5-三氟-白胺酸；6-胺基己酸；環戊基-D-Gly-OH·二環己基銨鹽；環戊基-Gly-OH·二環己基銨鹽；D- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；D- $\alpha$ -胺基丁酸；D- $\alpha$ -三級丁基甘胺酸；D-(2-噻吩基)甘胺酸；D-(3-噻吩基)甘胺酸；D-2-胺基己酸；D-2-茛滿基甘胺酸；D-烯丙基甘胺酸·二環己基銨鹽；D-環己基甘胺酸；D-正纈胺酸；D-苯基甘胺酸； $\beta$ -胺基丁酸； $\beta$ -胺基異丁酸；(2-溴苯基)甘胺酸；(2-甲氧基苯基)甘胺酸；(2-甲基苯基)甘胺酸；(2-噻唑基)甘胺酸；(2-噻吩基)甘胺酸；2-胺基-3-(二甲基胺基)-丙酸；L- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；L- $\alpha$ -胺基丁酸；L- $\alpha$ -三級丁基甘胺酸；L-(3-噻吩基)甘胺酸；L-2-胺基-3-(二甲基胺基)-丙酸；L-2-胺基己酸二環己基-銨鹽；L-2-茛滿基甘胺酸；L-烯丙基甘胺酸·二環己基銨鹽；L-環己基甘胺酸；L-

苯基甘胺酸；L-炔丙基甘胺酸；L-正纈胺酸；N- $\alpha$ -胺基  
 甲基-L-丙胺酸；D- $\alpha,\gamma$ -二胺基丁酸；L- $\alpha,\gamma$ -二胺基丁  
 酸； $\beta$ -環丙基-L-丙胺酸；(N- $\beta$ -(2,4-二硝基苯基))-L-  
 $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；(N- $\beta$ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代環己-  
 1-亞基)乙基)-D- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；(N- $\beta$ -1-(4,4-二甲基-  
 2,6-二氧代環己-1-亞基)乙基)-L- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；(N- $\beta$ -  
 4-甲基三苯甲基)-L- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；(N- $\beta$ -烯丙氧基羰  
 基)-L- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸；(N- $\gamma$ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代  
 環己-1-亞基)乙基)-D- $\alpha,\gamma$ -二胺基丁酸；(N- $\gamma$ -1-(4,4-二  
 甲基-2,6-二氧代環己-1-亞基)乙基)-L- $\alpha,\gamma$ -二胺基丁酸；  
 (N- $\gamma$ -4-甲基三苯甲基)-D- $\alpha,\gamma$ -二胺基丁酸；(N- $\gamma$ -4-甲基  
 三苯甲基)-L- $\alpha,\gamma$ -二胺基丁酸；(N- $\gamma$ -烯丙氧基羰基)-L-  
 $\alpha,\gamma$ -二胺基丁酸；D- $\alpha,\gamma$ -二胺基丁酸；4,5-脫氫-L-白胺  
 酸；環戊基-D-Gly-OH；環戊基-Gly-OH；D-烯丙基甘  
 胺酸；D-高環己基丙胺酸；L-1-芑基丙胺酸；L-2-胺基  
 己酸；L-烯丙基甘胺酸；L-高環己基丙胺酸；及 N-(2-  
 羥基-4-甲氧基-Bzl)-Gly-OH。

**【0024】** 胺基酸類似物中包括苯基丙胺酸及酪胺酸  
 的類似物。苯基丙胺酸及酪胺酸的胺基酸類似物的例子  
 中包括下述者： $\beta$ -甲基-苯基丙胺酸、 $\beta$ -羥基苯基丙胺  
 酸、 $\alpha$ -甲基-3-甲氧基-DL-苯基丙胺酸、 $\alpha$ -甲基-D-苯基  
 丙胺酸、 $\alpha$ -甲基-L-苯基丙胺酸、1,2,3,4-四氟異喹啉-3-  
 羧酸、2,4-二氯-苯基丙胺酸、2-(三氟甲基)-D-苯基丙胺

酸、2-(三氟甲基)-L-苯基丙胺酸、2-溴-D-苯基丙胺酸、2-溴-L-苯基丙胺酸、2-氯-D-苯基丙胺酸、2-氯-L-苯基丙胺酸、2-氰基-D-苯基丙胺酸、2-氰基-L-苯基丙胺酸、2-氟-D-苯基丙胺酸、2-氟-L-苯基丙胺酸、2-甲基-D-苯基丙胺酸、2-甲基-L-苯基丙胺酸、2-硝基-D-苯基丙胺酸、2-硝基-L-苯基丙胺酸、2,4,5-三羥基-苯基丙胺酸、3,4,5-三氟-D-苯基丙胺酸、3,4,5-三氟-L-苯基丙胺酸、3,4-二氯-D-苯基丙胺酸、3,4-二氯-L-苯基丙胺酸、3,4-二氟-D-苯基丙胺酸、3,4-二氟-L-苯基丙胺酸、3,4-二羥基-L-苯基丙胺酸、3,4-二甲氧基-L-苯基丙胺酸、3,5,3'-三碘-L-甲狀腺胺酸、3,5-二碘-D-酪胺酸、3,5-二碘-L-酪胺酸、3,5-二碘-L-甲狀腺胺酸、3-(三氟甲基)-D-苯基丙胺酸、3-(三氟甲基)-L-苯基丙胺酸、3-胺基-L-酪胺酸、3-溴-D-苯基丙胺酸、3-溴-L-苯基丙胺酸、3-氯-D-苯基丙胺酸、3-氯-L-苯基丙胺酸、3-氯-L-酪胺酸、3-氰基-D-苯基丙胺酸、3-氰基-L-苯基丙胺酸、3-氟-D-苯基丙胺酸、3-氟-L-苯基丙胺酸、3-氟-酪胺酸、3-碘-D-苯基丙胺酸、3-碘-L-苯基丙胺酸、3-碘-L-酪胺酸、3-甲氧基-L-酪胺酸、3-甲基-D-苯基丙胺酸、3-甲基-L-苯基丙胺酸、3-硝基-D-苯基丙胺酸、3-硝基-L-苯基丙胺酸、3-硝基-L-酪胺酸、4-(三氟甲基)-D-苯基丙胺酸、4-(三氟甲基)-L-苯基丙胺酸、4-胺基-D-苯基丙胺酸、4-胺基-L-苯基丙胺酸、4-苯甲醯基-D-

苯基丙胺酸、4-苯甲醯基-L-苯基丙胺酸、4-雙(2-氯乙基)胺基-L-苯基丙胺酸、4-溴-D-苯基丙胺酸、4-溴-L-苯基丙胺酸、4-氯-D-苯基丙胺酸、4-氯-L-苯基丙胺酸、4-氰基-D-苯基丙胺酸、4-氰基-L-苯基丙胺酸、4-氟-D-苯基丙胺酸、4-氟-L-苯基丙胺酸、4-碘-D-苯基丙胺酸、4-碘-L-苯基丙胺酸、高苯基丙胺酸、甲狀腺素、3,3-二苯基丙胺酸、甲狀腺胺酸、乙基-酪胺酸及甲基-酪胺酸。

【0025】胺基酸類似物中包括脯胺酸的類似物。脯胺酸的胺基酸類似物的例子中包括下述者，但並不限定於該等：3,4-脫氫-脯胺酸、4-氟-脯胺酸、順式(cis)-4-羥基-脯胺酸、噻唑烷(Thiazolidine)-2-羧酸及反式(trans)-4-氟-脯胺酸。

【0026】胺基酸類似物中包括絲胺酸及蘇胺酸的類似物。絲胺酸及蘇胺酸的胺基酸類似物的例子中包括下述者，但並不限定於該等：3-胺基-2-羥基-5-甲基己酸、2-胺基-3-羥基-4-甲基戊酸、2-胺基-3-乙氧基丁酸、2-胺基-3-甲氧基丁酸、4-胺基-3-羥基-6-甲基庚酸、2-胺基-3-苄氧基丙酸、2-胺基-3-苄氧基丙酸、2-胺基-3-乙氧基丙酸、4-胺基-3-羥基丁酸及 $\alpha$ -甲基絲胺酸。

【0027】胺基酸類似物中包括色胺酸的類似物。色胺酸的胺基酸類似物的例子中包括下述者，但並不限定

於該等： $\alpha$ -甲基-色胺酸； $\beta$ -(3-苯并噻吩基)-D-丙胺酸； $\beta$ -(3-苯并噻吩基)-L-丙胺酸；1-甲基-色胺酸；4-甲基-色胺酸；5-苄氧基-色胺酸；5-溴-色胺酸；5-氯-色胺酸；5-氟-色胺酸；5-羥基-色胺酸；5-羥基-L-色胺酸；5-甲氧基-色胺酸；5-甲氧基-L-色胺酸；5-甲基-色胺酸；6-溴-色胺酸；6-氯-D-色胺酸；6-氯-色胺酸；6-氟-色胺酸；6-甲基-色胺酸；7-苄氧基-色胺酸；7-溴-色胺酸；7-甲基-色胺酸；D-1,2,3,4-四氟-去甲哈爾滿(Norharman)-3-羧酸；6-甲氧基-1,2,3,4-四氟去甲哈爾滿-1-羧酸；7-氮雜色胺酸；L-1,2,3,4-四氟-去甲哈爾滿-3-羧酸；5-甲氧基-2-甲基-色胺酸；及6-氯-L-色胺酸。

【0028】在一例中，胺基酸類似物為消旋物。可以使用胺基酸類似物的D異構物，亦可以使用胺基酸類似物的L異構物。又，胺基酸類似物可以包含R或S組態的立構中心(stereocenter)。此外，可以將 $\beta$ -胺基酸類似物的胺基(單數或複數)用保護基例如三級丁氧基羰基(BOC基)、9-芴基甲氧基羰基(FMOC)、甲苯磺醯基等取代。此外，亦可以將 $\beta$ -胺基酸類似物的羧酸官能基例如作為其酯衍生物進行保護。又，亦可以使用胺基酸類似物的鹽。

【0029】烷基包含碳數1~15、較佳為碳數1~10、更佳為碳數1~6的直鏈或分支狀的烴基。例如，可以舉出甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁

基、二級丁基、三級丁基、正戊基、異戊基、新戊基、正己基、異己基、正庚基、異庚基、正辛基、異辛基、正壬基、正癸基等，但並不限定於該等。又，該等烷基的至少一個碳原子可以被雜原子，例如氧、氮、硫、磷或矽取代。烯基包含在任意的位置具有 1 個以上的碳-碳雙鍵之、碳數 2~15、較佳為碳數 2~10、更佳為碳數 2~6 的直鏈或分支狀的烴基。例如，可以舉出乙烯基、烯丙基、丙烯基、異丙烯基、丁烯基、異丁烯基、異戊二烯基、丁二烯基、戊烯基、異戊烯基、戊二烯基、己烯基、異己烯基、己二烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基、十一烯基、十二烯基、十三烯基、十四烯基、十五烯基等，但並不限定於該等。又，該等烯基的至少一個碳原子可以被雜原子取代。炔基包含在任意的位置具有 1 個以上的碳-碳三鍵之、碳數 2~10、較佳為碳數 2~8、進一步較佳為碳數 2~6 的直鏈或分支狀的烴基。可以進一步在任意的位置具有雙鍵。例如，可以舉出乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、辛炔基、壬炔基、癸炔基等，但並不限定於該等。又，該等炔基的至少一個碳原子可以被雜原子取代。

**【0030】** 芳香族碳環基為具有單個芳香環或複數個芳香環之碳環基。芳香族碳環基的碳數較佳為 5~24，更佳為 5~18，進一步較佳為 5~14。作為芳香族碳環基，可以舉出苯基、萘基等。

【0031】非芳香族碳環基為含有單個非芳香環或複數個非芳香環之碳環基。非芳香族碳環基的碳數較佳為3~24，更佳為3~18，進一步較佳為3~14。作為非芳香族碳環基，可以舉出飽和及不飽和的環狀烴基，例如可以舉出環丙基、環丁基、環戊基、環戊烯基、環己基、環己烯基、環庚基及環辛基。

【0032】芳香族雜環基表示在單環式的情況下具有1~3個雜原子、在二環式的情況下具有1~6個雜原子或在三環式的情況下具有1~9個雜原子之、芳香族的5~8員單環式、8~12員二環式或11~14員三環式的環系。雜原子能夠選自O、N或S。作為芳香族雜環基，可以舉出吡啶基、嘧啶基(Pyrimidinyl/Pyrimidyl)、吡咯基、呋喃基、吡喃基(Furanyl)、苯硫基(Thiophenyl)、噻吩基、吡啶基、異吡啶基、吡啶嗪基、咪唑基、吡啶酮基(Pyridonyl)、吡嗪基、嘔唑基、噻唑基、噁吟基、喹啉基、異喹啉基、苯并咪唑基、苯并吡喃基及苯并嘔唑基等，但並不限定於該等。

【0033】非芳香族雜環基表示在單環式的情況下具有1~3個雜原子、在二環式的情況下具有1~6個雜原子或在三環式的情況下具有1~9個雜原子之、非芳香族的5~8員單環式、8~12員二環式或11~14員三環式的環系。雜原子能夠選自O、N或S。作為非芳香族雜環基，可以舉出哌嗪基、吡咯啶基、二噁烷基

(Dioxanyl)、嗎啉基、四氟呋喃基等，但並不限定於該等。

【0034】作為雜環，包含上述之芳香族雜環基及非芳香族雜環基。

【0035】可以具有取代基表示在上述中舉出之任一化學基(烷基、烯基、炔基、芳香族碳環基、非芳香族碳環基、芳香族雜環基及非芳香族雜環基)中1個以上的氫原子被除氫原子以外的原子或化學基取代。作為取代基，可以舉出鹵素(氟、氯、溴或碘等)、羥基、巰基、氧代基、硝基、碳數1~10的鹵烷基、碳數1~10的烷基、碳數6~20的芳基、碳數7~20的芳烷基、碳數1~10的烷氧基、碳數1~10的硫代烷氧基、碳數6~20的芳氧基、胺基、碳數2~10的烷氧基羰基、醯胺基、羧基、碳數1~10的烷磺醯基(Alkanesulfonyl)、碳數2~10的烷基羰基及氰基等，但並不受特別限定。

【0036】 $^*-CR^1-S-CR^2-^*$ 所表示之2價的基中的 $R^1$ 及 $R^2$ 有時分別表示取代基，作為取代基，可以舉出鹵素(氟、氯、溴或碘等)、羥基、巰基、氧代基、硝基、碳數1~10的鹵烷基、碳數1~10的烷基、碳數6~20的芳基、碳數7~20的芳烷基、碳數1~10的烷氧基、碳數1~10的硫代烷氧基、碳數6~20的芳氧基、胺基、碳數2~10的烷氧基羰基、醯胺基、羧基、碳數1~10的烷磺醯基(Alkanesulfonyl)、碳數2~10的烷基羰

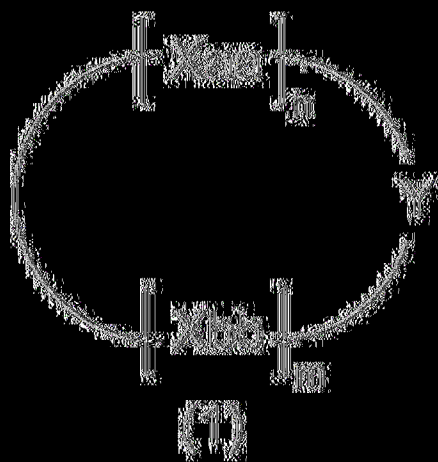
基及氫基等，但並不受特別限定。

〔0037〕

< 環狀 >

本發明的環狀由下述式(1)表示，且具有下述的(a)~(c)的特徵。

〔0038〕 [化學式 6]



式中，Y表示 $*-CR^1-S-CR^2-*$ 所表示之2價的基， $R^1$ 及 $R^2$ 表示氫原子或取代基，\*表示與Xaa及Xbb鍵結之位置，

n個Xaa分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

m個Xbb分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

$n+m$ 表示5~50的整數。

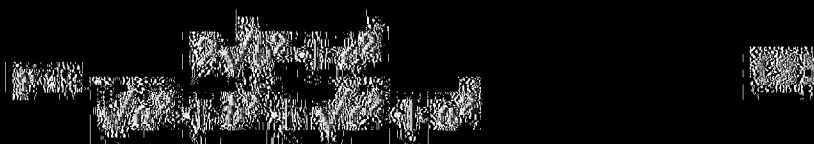
〔0039〕  $n+m$ 較佳為表示5~50的整數，更佳為表示5~20的整數，進一步較佳為表示9~11的整數。

〔0040〕 本發明的環狀具有向細胞內的高穿透性。

本發明的環狀能夠抑制 MDMX-p53 交互作用，因此在 MDMX 過度表達之固體腫瘤等癌症的治療中 useful。

〔0041〕 (a) 在環狀的結構中，將主鏈結構的最長的軸方向的軸長設為  $a$ 、將與  $a$  正交且相互正交的其他 2 個方向的軸長設為  $b$ 、 $c$  時，經過進行求出  $a$ 、 $b$ 、 $c$  的各軸長之橢圓體近似(參照圖 2)之階段，由下述式(2)計算之分子形狀因數  $r$  包含在  $0.4 \sim 0.6$  的範圍；

〔化學式 7〕



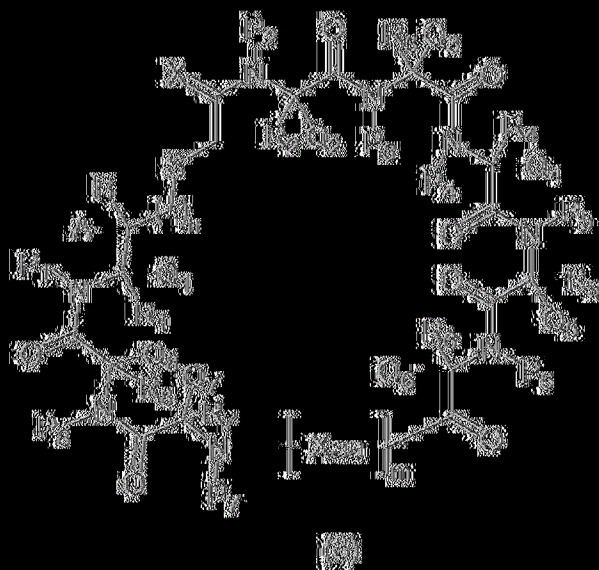
〔0042〕 由式(2)計算之分子形狀因數  $r$  較佳為  $0.4 \sim 0.6$ ，更佳為  $0.4 \sim 0.55$ 。

〔0043〕 (b) 在上述狀的主鏈結構中包含硫原子。

〔0044〕 (c) 狀在生理環境下為非離子性。在生理環境下為非離子性係指狀不具有在生理環境下帶電荷之取代基。

〔0045〕 本發明的環狀較佳為由下述式(3)表示。

[化學式 8]



式中，

X 為氧原子或硫原子，

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、 $Q_4$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$ 、 $Q_8$ 、A 及 B 分別獨立地為氫原子、可以具有取代基之烷基、可以具有取代基之烯基、可以具有取代基之炔基、可以具有取代基之芳香族碳環基、可以具有取代基之非芳香族碳環基、可以具有取代基之芳香族雜環基或可以具有取代基之非芳香族雜環基，

$P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  分別獨立地為氫原子、可以具有取代基之烷基、可以具有取代基之烯基、可以具有取代基之炔基、可以具有取代基之芳香族碳環基、可以具有取代基之非芳香族碳環基、可以具有取代基之芳香族雜環基或可以具有取代基之非芳香族雜環基，或者，

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、A 及 B 所鍵結

之碳原子可以與  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，

$m$  個 Xaa 分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

$n$  為 0~5 的整數， $m$  為 0~2 的整數。

【0046】較佳地， $n$  為 0 或 1。

較佳地， $m$  為 1。

【0047】較佳地， $R_3$  至  $R_8$  或  $Q_3$  至  $Q_8$  中的至少一個為可以具有取代基之芳香族碳環基或可以具有取代基之芳香族雜環基。

【0048】較佳地， $R_3$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$  或  $Q_3$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$ 、 $Q_8$  中的至少一個為可以具有取代基之芳香族碳環基或可以具有取代基之芳香族雜環基。

【0049】較佳地， $R_1$  及  $Q_1$  以及  $P_1$  或 A 及 B 以及  $P_1$  可以與  $R_1$  及  $Q_1$  或 A 及 B 所鍵結之碳原子以及  $P_1$  所鍵結之氮原子一起形成雜環，並且，上述  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、 $Q_4$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$  及  $Q_8$  所鍵結之碳原子可以與  $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  所鍵結之氮原子一起形成雜環，上述 Xaa 可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個雜環。

【0050】較佳地， $R_1$  及  $Q_1$  以及  $P_1$  或 A 及 B 以及  $P_1$  可以與  $R_1$  及  $Q_1$  或 A 及 B 所鍵結之碳原子以及  $P_1$  所鍵結之氮原子一起形成雜環，並且，上述  $R_2$  及  $Q_2$  所鍵結

之碳原子可以與  $P_2$  所鍵結之氮原子一起形成雜環，上述  $X_{aa}$  可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個雜環。

【0051】較佳地， $R_1$  及  $Q_1$  以及  $P_1$  或  $A$  及  $B$  以及  $P_1$  可以與  $R_1$  及  $Q_1$  或  $A$  及  $B$  所鍵結之碳原子以及  $P_1$  所鍵結之氮原子一同形成吡咯啉環，並且，上述  $R_2$  及  $Q_2$  所鍵結之碳原子可以與  $P_2$  所鍵結之氮原子一同形成吡咯啉環，上述  $X_{aa}$  可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個吡咯啉環。

【0052】較佳地， $R_1$  及  $Q_1$  或  $A$  及  $B$  以及  $X_{aa}$  分別為任意的  $D$ -胺基酸殘基或任意的  $D$ -胺基酸類似物殘基。

【0053】本發明的環肽根據用途可以施加磷酸化、甲基化、乙醯化、腺苷酸化 (Adenylation)、ADP 核糖基化、糖鏈加成等修飾。又，本發明的環肽可以為鹽。鹽較佳為與生理學上允許之無機及有機的酸及鹼的鹽。適當的酸鹽的例子中包括下述者：乙酸鹽、己二酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、丁酸鹽、檸檬酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、甲酸鹽、反丁烯二酸鹽、乙醇酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、乳酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、撲酸鹽 (pamoate)、磷酸鹽、苦味酸鹽、三甲基乙酸 (pivalic

acid)鹽、丙酸鹽、水楊酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、甲苯磺醯基酸鹽及十一酸鹽。從適當的鹼衍生之鹽類中包括鹼金屬(例如，鈉)鹽、鹼土金屬(例如，鎂)鹽、銨鹽及 N-(烷基) $4+$ 鹽。

#### 【0054】

##### < 環肽之製造方法 >

本發明的環肽之製造方法並不受特別限定。本發明的環肽可以利用使用無細胞翻譯系統之方法來製造，亦可以藉由肽的化學合成法來製造。肽的化學合成一般能夠利用自動肽合成裝置來進行。

【0055】肽的合成可以為固相合成法，亦可以為液相合成法，但較佳為固相合成法。肽的固相合成對本領域技術人員是公知的，例如使具有羥基之樹脂的羥基與 $\alpha$ -胺基被保護基保護之第一胺基酸(通常為作為目標之肽的 C 末端胺基酸)的羧基進行酯化反應。作為酯化觸媒，能夠使用 1-均三甲苯磺醯基-3-硝基-1,2,4-三唑(MSNT)、二環己基碳二亞胺(DCC)、二異丙基碳二亞胺(DIPCDI)等公知的脫水縮合劑。接著，使第一胺基酸的 $\alpha$ -胺基的保護基脫離，並且加上主鏈的除羧基以外的所有官能基被保護之第二胺基酸而使上述羧基活化，從而使第一及第二胺基酸鍵結。此外，使第二胺基酸的 $\alpha$ -胺基脫保護，並加上主鏈的除羧基以外的所有官能基被保護之第三胺基酸而使上述羧基活化，從而使第二及第三

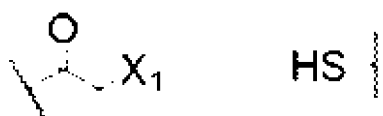
胺基酸鍵結。重複該過程而合成出作為目標的長度的肽，則使所有官能基脫保護。作為固相合成的樹脂，可以舉出 Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin(Merck)、HMPA-PEGA resin(Merck)等。該等樹脂可以用溶劑(二甲基甲醯胺(DMF)、2-丙醇、二氯甲烷等)洗滌之後使用。作為 $\alpha$ -胺基的保護基，可以舉出苄氧基羰基(Cbz或Z基)、三級丁氧基羰基(Boc基)、苄基甲氧基羰基(Fmoc基)、苯甲基、烯丙基、烯丙氧基羰基(Alloc基)等。Cbz基能夠藉由氫氟酸、氫化等而脫保護，Boc基能夠藉由三氟乙酸(TFA)而脫保護，Fmoc基能夠藉由基於吡啶之處理而脫保護。 $\alpha$ -羧基的保護能夠使用甲酯、乙酯、苄酯、三級丁基酯、環己酯等。作為胺基酸的其他官能基，絲胺酸或蘇胺酸的羥基能夠被苄基或三級丁基保護，酪胺酸的羥基能夠被2-溴苄氧基羰基或三級丁基保護。離胺酸側鏈的胺基、穀醯胺酸或天冬醯胺酸的羧基能夠與 $\alpha$ -胺基、 $\alpha$ -羧基同樣地進行保護。羧基的活化能夠使用縮合劑來進行。作為縮合劑，例如可以舉出二環己基碳二亞胺(DCC)、二異丙基碳二亞胺(DIPCDI)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺(EDC或WSC)、(1H-苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基胺基)磷六氟磷酸酯(BOP)、1-[雙(二甲基胺基)甲基]-1H-苯并三唑鎗-3-氧化物六氟磷酸

酯 (HBTU) 等。從樹脂的肽鏈的斷裂能夠藉由用 TFA、氟化氫 (HF) 等酸處理來進行。

【0056】肽的硫醚環化方法並不受特別限定，例如能夠藉由使以下的官能基包含於肽的側鏈或主鏈中而進行環化。作為官能基 1 和 2 的位置，並不受特別限定，可以使官能基 1 和 2 中的任一者位於肽的 N 末端及 C 末端側，亦可以將兩者配置於末端，亦可以將一者設為末端並將另一者設為非末端，亦可以將兩者設為非末端。

肽化合物的合成製程和環化反應的製程可以分離，亦可以連續進行。環化例如能夠藉由 WO2013/100132、WO2008/117833、WO2012/074129 等中所記載之對本領域技術人員公知的方法來進行。

【0057】[化學式 9]



官能基 1

官能基 2

【0058】式中，X1 表示氯、溴或碘。

【0059】

< MDMX 抑制劑 >

依據本發明，可提供包含本發明的環肽或其鹽之 MDMX 抑制劑。

如實施例所示，本發明的環肽或其鹽具有 MDMX 抑制效果。“MDMX 抑制效果”表示抑制 MDMX 與 p53 的結

合之效果。

人類 MDMX 的基因序列及胺基酸序列作為 Gene ID:4194 登記在 NCBI(National Center for Biotechnology Information：國家生物技術信息中心)。

【0060】本發明的環肽能夠在用於治療 MDMX 抑制劑參與之疾病之醫藥組成物中使用。醫藥組成物的投予形態並不受特別限定，可以為口服投予，亦可以為非口服投予。作為非口服投予，例如可以舉出肌肉內注射、靜脈內注射、皮下注射等注射投予、經皮投予、經黏膜投予(經鼻、經口腔、經眼、經肺、經陰道、經直腸)投予等。醫藥組成物中的環肽能夠鑑於容易被代謝及排泄之性質而進行各種修飾。例如，在環狀多肽上加成聚乙二醇(PEG)或糖鏈來延長血中滯留時間，從而能夠降低抗原性。又，亦可以將聚乳酸或聚乙醇酸、PLGA 等活體內分解性的高分子化合物、多孔性羥基磷灰石、脂質體、表面修飾脂質體、用不飽和脂肪酸調整之乳液、奈米粒子、奈米球等用作緩釋化基劑，並在其中內含環肽。當進行經皮投予時，亦能夠使弱電流流過皮膚表面而使其穿透角質層。

【0061】醫藥組成物可以直接使用有效成分，亦可以加入藥學上可允許之載體、賦形劑、添加劑等而進行製劑化。作為劑型，例如可以舉出液劑(例如，注射劑)、分散劑、懸浮劑、片劑、丸劑、粉末劑、坐劑、

散劑、細粒劑、顆粒劑、膠囊劑、糖漿劑、錠 (troche) 劑、吸入劑、軟膏劑、點眼劑、點鼻劑、點耳劑、泥罨劑等。

製劑化例如能夠適當使用賦形劑、結合劑、崩解劑、潤滑劑、溶解劑、溶解輔助劑、著色劑、矯味矯臭劑、穩定化劑、乳化劑、吸收促進劑、界面活性劑、pH 調整劑、防腐劑、抗氧化劑等並藉由常規方法來進行。

【0062】作為用於製劑化之成分的例子，可以舉出純化水、食鹽水、磷酸緩衝液、葡萄糖、甘油、乙醇等藥學上允許之有機溶劑、動植物油、乳糖、甘露醇、葡萄糖、山梨醇、結晶纖維素、羥丙基纖維素、澱粉、玉米澱粉、矽酸酐、矽酸鋁鎂、膠原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纖維素鈉、聚丙烯酸鈉、海藻酸鈉、水溶性葡聚糖、羧甲基澱粉鈉、果膠、甲基纖維素、乙基纖維素、黃原膠、阿拉伯膠、黃蓍膠、酪蛋白、瓊脂、聚乙二醇、雙甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蠟 (Paraffin)、肉豆蔻酸辛基十二烷基酯、肉豆蔻酸異丙酯、高級醇、硬脂醇、硬脂酸、人類血清白蛋白等，但並不限定於該等。作為改善環肽的吸收之吸收促進劑，可以使用聚氧乙烯月桂醚類、月桂基硫酸鈉、石鹼素等界面活性劑；甘膽酸、去氧膽酸、牛膽酸等膽酸鹽；EDTA、水楊酸類等螯合劑；己酸、癸酸、月桂酸、油酸、亞油酸、混合微胞等

脂肪酸類；烯胺衍生物、N-醯基膠原蛋白肽、N-醯基胺基酸、環糊精類、幾丁聚醣類、一氧化氮供體等。丸劑或片劑亦可以由糖衣、胃溶性、腸溶性物質被覆。注射劑可以包含注射用蒸餾水、生理食鹽水、丙二醇、聚乙二醇、植物油、醇類等。此外，能夠加入濕潤劑、乳化劑、分散劑、穩定化劑、溶解劑、溶解輔助劑、防腐劑等。

### 【0063】

< 環肽及 MDMX 抑制劑的用途 >

本發明的環肽及 MDMX 抑制劑能夠用作藥劑、化妝品、DDS(Drug Delivery System：藥物傳遞系統)材料等，但並不限定於該等。

【0064】本發明的環肽及 MDMX 抑制劑在用於鑑定與 MDMX 結合之藥劑之競爭結合檢定中 useful。例如，在 p53/MDMX 系統中，能夠將所標識之本發明的環肽和與 MDMX 競爭結合之小分子一同在 MDMX 結合檢定中進行使用。競爭結合試驗能夠在體外迅速地評價及決定對 p53/MDMX 系統具有特異性之藥物候選。這樣的結合試驗能夠使用本發明的環肽來實施。

【0065】本發明的環肽還能夠用於製造針對本發明的環肽的抗體。

【0066】本發明的環肽及 MDMX 抑制劑能夠用於對具有與 p53 或 MDMX 的異常(例如，不充分或過度的)表

達或活性有關的障礙之對象進行處置。

【0067】障礙因 p53 或 MDMX 的異常水準(例如，過度表達或表達不足)或因顯示出異常活性之 p53 或 MDMX 的存在而引起。

【0068】本發明的環肽及 MDMX 抑制劑能夠用於藉由妨礙 p53 與 MDMX 之間的交互作用或結合來處置或預防過度增殖性疾病及炎症性障礙等疾病。

【0069】在上述中，能夠將有效量的本發明的環肽或 MDMX 抑制劑投予到包括人類之哺乳動物。

【0070】作為一例，本發明的環肽及 MDMX 抑制劑能夠用於處置、預防及/或診斷癌症及新生物性的疾病。在本說明書中，癌症、過度增殖性及新生物性係指以具有與自律增殖有關的之能力細胞亦即快速增殖之細胞增殖為特徵之異常的狀態或疾病。

【0071】作為癌症或新生物性的疾病的例子，包括下述者，但並不限定於該等：纖維肉瘤、肌肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、Ewing 氏腫瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、胃癌、食道癌、直腸癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宮癌、頭頸癌、皮膚癌、腦癌、鱗狀細胞癌、皮脂腺癌、乳癌(乳頭狀癌、乳頭狀腺癌等)、囊腺癌、髓樣癌、支氣管癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膽管癌、絨毛膜癌、精

原細胞瘤、胚胎性癌、威爾姆氏腫瘤(Wilms' tumor)、子宮頸癌、睪丸癌、肺癌(小細胞肺癌、非小細胞肺癌等)、膀胱癌、上皮癌、神經膠質瘤、星狀細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果腺瘤、血管母細胞瘤、聽覺神經瘤、寡樹突膠質細胞瘤、腦脊髓膜瘤、黑瘤、神經胚細胞瘤、視網膜母細胞瘤、白血病、淋巴瘤或 Kaposi 氏肉瘤。

【0072】增殖性障礙的例子中包括造血性新生物性障礙。造血性新生物性障礙中包括例如起因於骨髓、淋巴或紅血球譜系或其前驅細胞之、包含來自於造血系統之增生性/新生物性細胞之疾病。該疾病有可能起因於未分化型急性白血病，例如紅血球母細胞性白血病及急性巨核母細胞性白血病。

【0073】利用以下的實施例對本發明進行說明，但本發明並不限定於該等。

[實施例]

【0074】當沒有特別的記載時，基於管柱層析法之純化中使用了自動純化裝置 ISOLERA(Biotage 公司)。當沒有特別的記載時，矽膠管柱層析法中的載體使用了 SNAP KP-Sil Cartridge(Biotage 公司)。

在洗提液中的混合比為容量比。例如，“氯仿/甲醇=90/10→50/50”係指將“氯仿/甲醇=90/10”的洗提液改變為“氯仿/甲醇=50/50”的洗提液。

使用 ACQUITY SQD LC/MS System(Waters 公司，離子化法：ESI(ElectroSpray Ionization、電灑離子化)法測定了質譜(MS)。

使用 ACQUITY SQD LC/MS System(Waters 公司)測定保持時間(RT)，以分鐘(min)表示。

管柱：Waters 公司製造之 BEHC 18 1.7 $\mu$ m，  
2.1 $\times$ 30mm

溶劑：A 液：0.1%甲酸-水

B 液：0.1%甲酸-乙腈

梯度循環：0.00min(A 液/B 液=95/5)、2.00min(A 液/B 液=5/95)、3.00min(A 液/B 液=95/5)

流速：0.5mL/min

管柱溫度：室溫

檢測波長：254nm

當沒有特別的記載時，MS 係指 MS(ESI m/z)：  
(M+H)。

使用四甲基矽烷作為內部基準，並使用 Bruker AV300(Bruker 公司)來測定核磁共振(NMR)譜，並且以 ppm 表示總  $\delta$  值。

### 【0075】

#### < 實施例 1 >

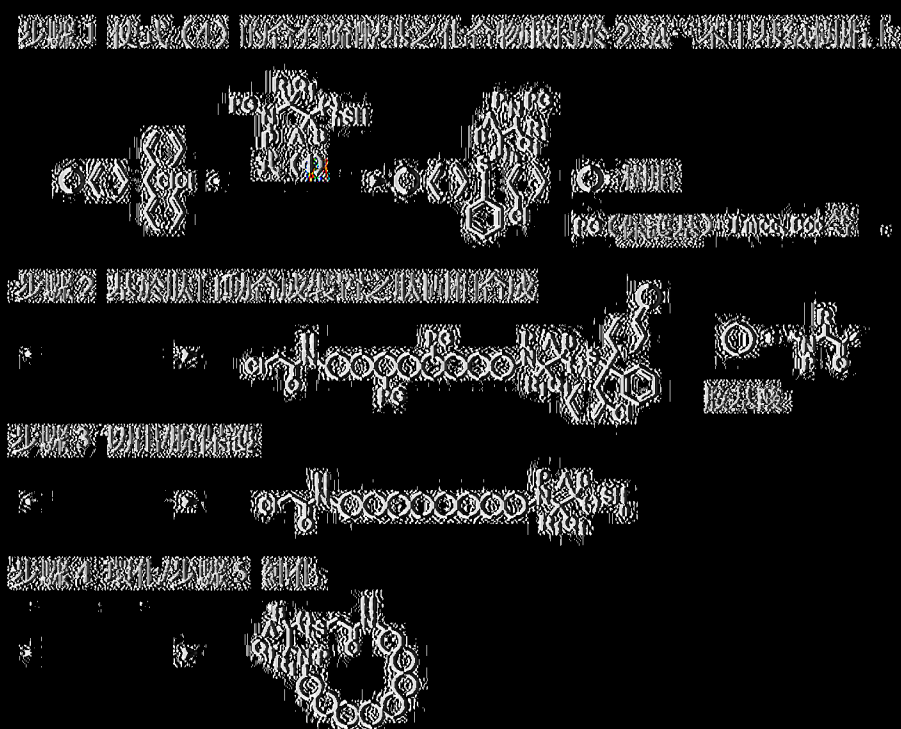
示出本發明的環肽的合成路徑。本發明的環肽例如能夠藉由下述所示之一般合成法進行製造。通式(4)中

的  $R_1$ 、 $Q_1$ 、 $A$  及  $B$  分別獨立地為氫原子、可以具有取代基之烷基、可以具有取代基之烯基、可以具有取代基之炔基、可以具有取代基之芳香族碳環基、可以具有取代基之非芳香族碳環基、可以具有取代基之芳香族雜環基、可以具有取代基之非芳香族雜環基， $m$  表示 0~5 的整數。又，PG 表示保護基，例如為苄基甲氧基羰基 (Fmoc 基)、 $t$ -叔丁氧基羰基 (Boc 基) 等。

〔0076〕

硫醯環肽合成的一般法

〔化學式 10〕



〔0077〕

步驟 1：含有硫醇基之化合物在 2-氯三苯甲基氯樹脂上的載持

向附有過濾器之反應容器(10mL)中放入 2-氯三苯甲

基 氣 (100 ~ 200mesh , 1%DVB , 從 Watanabe Kasei Co.,Ltd. 購 入 , 100mg , 0.137mmol) 和 脫 水 二 氯 甲 烷 (2mL) , 並 在 室 溫 振 盪 了 10 分 鐘 。 藉 由 過 濾 去 除 二 氯 甲 烷 之 後 , 將 相 對 於 樹 脂 加 入 了 4 莫 耳 當 量 的 通 式 (3) 所 表 示 之 含 有 硫 醇 基 之 化 合 物 的 二 氯 甲 烷 (0.5M) 溶 液 及 5 莫 耳 當 量 的 二 異 丙 基 乙 胺 之 混 合 液 添 加 到 反 應 容 器 中 , 並 振 盪 了 2 小 時 。 藉 由 過 濾 去 除 反 應 液 之 後 , 將 加 入 了 二 氯 甲 烷 : 甲 醇 : 二 異 丙 基 乙 胺 = 17:2:1 (2mL) 之 混 合 液 添 加 到 反 應 容 器 中 , 並 振 盪 了 15 分 鐘 。 藉 由 過 濾 去 除 反 應 液 之 後 , 重 複 了 2 次 相 同 的 操 作 。 藉 由 過 濾 去 除 反 應 液 之 後 , 使 用 二 甲 基 甲 醯 胺 (2mL) 、 二 氯 甲 烷 (2mL) 進 行 各 3 次 以 上 樹 脂 的 洗 滌 。 在 減 壓 下 徹 夜 乾 燥 樹 脂 , 得 到 了 Fmoc-胺 基 酸 -2-氯 三 苯 甲 基 樹 脂 。 所 得 到 之 樹 脂 的 擔 載 率 根 據 Fmoc 脫 保 護 後 的 吸 光 度 來 計 算 出 。

### 【 0078 】

步 驟 2 : 基 於 肽 自 動 合 成 裝 置 之 肽 固 相 合 成

使 用 肽 自 動 合 成 裝 置 (Biotage 公 司 製 造 之 Syro I) 進 行 了 肽 固 相 合 成 。 關 於 操 作 的 詳 細 順 序 , 按 照 合 成 機 附 帶 的 手 冊 。 在 合 成 裝 置 中 設 置 固 相 合 成 用 樹 脂 (0.05mmol) 、 Fmoc 胺 基 酸 (0.5M) 的 N-甲 基 -2-吡 咯 啉 酮 (NMP) 溶 液 、 氯 乙 酸 (0.5M) 的 NMP 溶 液 、 1-[雙 (二 甲 基 胺 基 ) 亞 甲 基 ]-1H-1,2,3-三 唑 并 [4,5-b] 吡 啶 鎊 3-氧 化 物 六 氟 磷 酸 酯 (0.5M) 的 NMP 溶 液 、 1-羥 基 苯 并 三 唑 (0.5M) 的

NMP 溶液及二異丙基乙胺 (0.1M) 的 NMP 溶液、哌啶 (20% v/v) 的 NMP 溶液，並進行了合成。將 Fmoc 脫保護 (20 分鐘)、基於 NMP 之洗滌、Fmoc 胺基酸的縮合 (1 小時)、基於 NMP 之洗滌作為 1 循環，藉由重複該循環而使肽鏈伸長。使 N 末端的胺基酸縮合之後，以相同的順序使氯乙酸在 N 末端的胺基上縮合。

### 【0079】

步驟 3：從樹脂的切出和側鏈官能基的保護基的脫保護

為了同時進行從樹脂的直鏈肽的切出和側鏈官能基的保護基的脫保護，將相對於樹脂為相當於 5 倍量之三氟乙酸:三異丙基矽烷:二氯甲烷=5:2.5:92.5 溶液添加到樹脂中，並在室溫振盪了 2 小時。藉由過濾回收了反應液。進一步重複一次使用相同濃度的三氟乙酸:三異丙基矽烷:二氯甲烷溶液之反應，藉由過濾回收了反應液。將所回收之反應液全部都匯總在一起，減壓蒸餾去除溶劑，並且充分進行乾燥，從而得到了直鏈肽的粗製純化物。

### 【0080】

步驟 4：硫醚環化反應

將直鏈肽的粗製純化物溶解於乙腈 (10mL) 和 0.1M TEAB 緩衝液:純水=1:9(10mL) 溶液中，將溶液調整為 pH8.5±0.1。加入 1 莫耳當量的 TCEP 溶液 (0.5M)，並在室溫攪拌了 30 分鐘～48 小時。藉由 LC/MS 質譜分析

(Waters 公司製造之 Acquity UPLC/SQD) 確認到原料的直鏈肽的消失之後，減壓蒸餾去除溶劑，從而得到了環肽的粗製純化物。

### 【0081】

#### 步驟 5：環肽純化

所得到之粗製純化物的純化藉由液相層析法來進行。最終以冷凍乾燥粉末形式得到了目標的環肽。

【0082】管柱：Waters 公司製造之 X Select CSH Prep C18 5 $\mu$ m OBD(19 $\times$ 250mm)

管柱溫度：40 $^{\circ}$ C

流速：20ml/min

檢測波長：220nm、254nm

溶劑：A 液：0.1%甲酸-水

B 液：0.1%甲酸-乙腈

N-甲基-2-吡咯啉酮、二異丙基乙胺、1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎘 3-氧化物六氟磷酸酯、1-羥基苯并三唑、哌啶、氯乙酸從 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation 獲得。

【0083】本說明書內所記載之環肽的合成中使用了下述的 Fmoc-胺基酸。又，在本說明書中所示之序列中，使用下述的縮寫來表示。Fmoc-胺基酸從 Watanabe Kasei Co.,Ltd.或 CHEM-IMPEX 公司或 Acrotein 公司或 Amatek Chemical 公司購入。

Ala : 丙胺酸

Met : 甲硫胺酸

Gly : 甘胺酸

Tyr : 酪胺酸

Trp : 色胺酸

Gln : 穀醯胺

Thr : 蘇胺酸

Phe : 苯基丙胺酸

Nle : 正白胺酸

Phe(4-F) : 4-F 苯基丙胺酸

Ala(4-Thz) : 4-噻唑丙胺酸

HSe(Me) : O-甲基-高絲胺酸

Tle : 三級白胺酸

Cha : 環己基丙胺酸

Ahp(2) : 2-胺基庚酸

Aoc(2) : 2-胺基丁酸

Phe(4-CF3) : 4-三氟甲基苯基丙胺酸

Phe(4-Cl) : 4-氯苯基丙胺酸

Phe(4-CN) : 4-氰基苯基丙胺酸

Phe(3,4-F2) : 3,4-二氟苯基丙胺酸

Ala(4-Pyri) : 4-吡啶基丙胺酸

MeAla : N-甲基丙胺酸

MeNle : N-甲基正白胺酸

McHSc(Me) : N-甲基-O-甲基-高絲胺酸

McCha : N-甲基環己基丙胺酸

McLeu : N-甲基白胺酸

McPhe : N-甲基苯基丙胺酸

D-Pro : D-脯胺酸

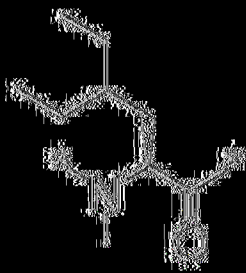
D-McAla : D-N-甲基丙胺酸

[化學式 11]



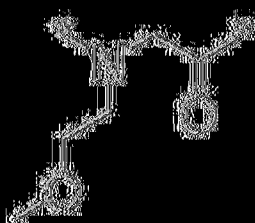
4-B1Nlc : 4-乙基-正白胺酸

[化學式 12]



Mc4-B1Nlc : N-甲基-4-乙基-正白胺酸

[化學式 13]



N(2-MeOEt)Gly : N-(2-甲氧基乙基)-甘胺酸

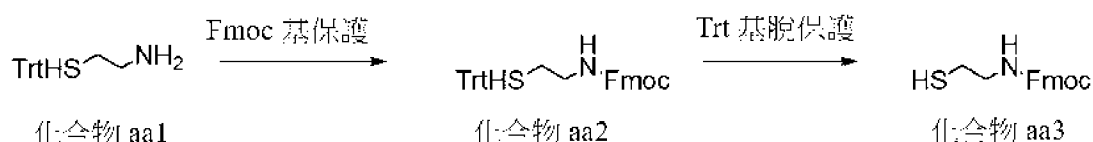
【 0084 】

在肽合成中使用之具有硫醇側鏈之 Fmoc 胺基酸類似物的合成

N-((9H-芴-9-基)甲基(2-巰基乙基))胺甲酸酯(化合物 aa3, Fmoc-C2SH)的合成

藉由下述的路徑合成了 N-((9H-芴-9-基)甲基(2-巰基乙基))胺甲酸酯(化合物 aa3, Fmoc-C2SH)。

[化學式 14]



【 0085 】

N-((9H-芴-9-基)甲基(2-(三苯甲基-磺醯基)乙基))胺甲酸酯(化合物 aa2)的合成

向市售的 2-(三苯甲基硫基)乙胺(化合物 aa1, Combi-blocks 公司)(1g, 3.13mmol)中加入二甲基甲醯胺(10mL/g, 10mL), 並使用機械攪拌器進行了攪拌。接著, 在室溫加入了二異丙基乙胺(0.66mL, 3.76mmol)、Fmoc N-羥基琥珀醯亞胺酯(1.16g, 3.44mmol)。在室溫將反應液攪拌了 2 小時。在室溫向反應液中加入純水(10mL), 並用 25%乙酸乙酯/己烷溶液洗滌了 2 次。使用飽和檸檬酸水, 將所得到之水層調整為 pH7。之後, 用乙酸乙酯提取 2 次, 將所得到之有機層匯總在一起, 用

飽和食鹽水進行了洗滌。藉由無水硫酸鈉乾燥所得到之有機層，並進行過濾、減壓蒸餾去除，從而得到了粗製純化物。藉由管柱層析法(矽膠、乙酸乙酯/己烷=0/100→20/80)進行純化，得到了淺黃色油狀的標題化合物 aa2(1.02g，產率 60%)。

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

RT(min) : 2.24

N-((9H-芴-9-基)甲基(2-巰基乙基))胺甲酸酯(化合物 aa3，Fmoc-C2SH)的合成

在室溫向化合物 aa2(1g，1.85mmol)中加入三氟乙酸:3,6-二氧雜-1,8-辛烷-二硫醇:三異丙基矽烷:二氯甲烷=88:5:2:5:溶液(10mL)，並使用機械攪拌器攪拌了4小時。向反應液中加入甲苯(5mL)，並減壓蒸餾去除了溶劑。向殘渣中加入純水(10mL)，並使用1M的NaOH水溶液調整為pH7。之後，用乙酸乙酯提取2次，將所得到之有機層匯總在一起，用飽和食鹽水進行了洗滌。藉由無水硫酸鈉乾燥所得到之有機層，並進行過濾、減壓蒸餾去除，從而得到了粗製純化物。藉由管柱層析法(矽膠、乙酸乙酯/己烷=0/100→20/80)進行純化，得到了白色固體的標題化合物 aa3(0.54g，98%產率)。

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

RT(min) : 1.57

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ:7.78-7.76(2H, m), 7.60-7.58(2H,

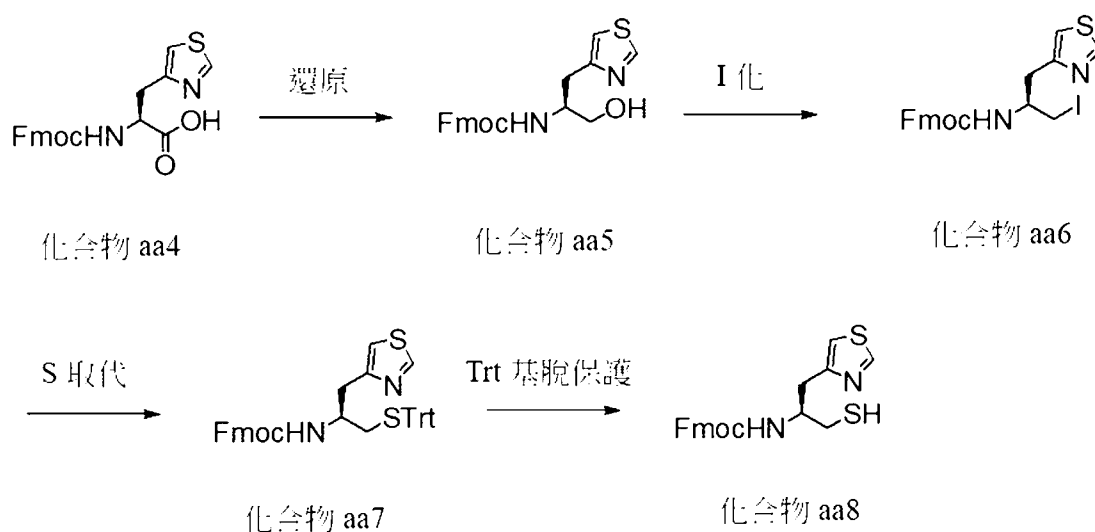
m), 7.43-7.39(2H, m), 7.34-7.30(2H, m), 5.25(1H, bs), 4.44-4.42(2H, m), 4.24-4.20(1H, m), 3.40-3.35(2H, m), 2.69-2.63(2H, m), 1.36-1.32(1H, m).

【0086】

N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-巯基-3-(噻唑-4-基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa8, Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)的合成

藉由下述的路徑合成了 N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-巯基-3-(噻唑-4-基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa8, Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)。

[化學式 15]



【0087】

N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-羥基-3-(噻唑-4-基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa5)的合成

在氮氣氛下，向市售的 Fmoc-Ala(4-Thz)-OH(Watanabe Kasei Co.,Ltd., 1g, 2.54mmol)中加入四氟呋喃(8mL/g, 8mL)、4-甲基嗎啉(0.31mL,

2.79mmol)，並使用機械攪拌器進行了攪拌。使用甲醇-乾冰浴冷卻為反應液成為 $-30^{\circ}\text{C}$ 以下，並滴加了氯甲酸異丁酯(0.36mL，2.79mmol)。將反應液在 $-30^{\circ}\text{C}$ 攪拌30分鐘之後，耗時5分鐘以上滴加了油性氫化鈉(60%)的水溶液(3M，3mL，0.28g)。將反應液直接在 $-30^{\circ}\text{C}$ 攪拌了30分鐘。之後，使用冰浴向反應液中緩慢地滴加飽和檸檬酸水(20mL)，並攪拌了30分鐘。升溫至室溫之後，用乙酸乙酯(20mL)提取2次，將所得到之有機層匯總在一起，用飽和食鹽水進行了洗滌。藉由無水硫酸鈉乾燥所得到之有機層，並進行過濾、減壓蒸餾去除，從而得到了粗製純化物。藉由管柱層析法(矽膠、乙酸乙酯/甲醇=100/0 $\rightarrow$ 0/100)進行純化，得到了白色固體的標題化合物 aa5(0.68g，70%產率)。

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

RT(min)：1.33

### 【0088】

N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-碘-3-(噻唑-4-基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa6)的合成

將化合物 aa5(0.68g，1.78mmol)、三苯基膦(0.93g，3.56mmol)及碘(0.89g，3.56mmol)溶解於四氫呋喃(8mL/g，5.4mL)中，並在冰浴下耗時5分鐘以上緩慢地添加了咪唑(0.29g，4.27mmol)。添加結束後，將溶液的溫度升溫至室溫，並攪拌了22小時。向反應液中

加入純水(10mL)，並用乙酸乙酯(10mL)提取 2 次，將所得到之有機層匯總在一起，用飽和食鹽水進行了洗滌。藉由無水硫酸鎂乾燥所得到之有機層，並進行過濾、減壓蒸餾去除，從而得到了粗製純化物。藉由管柱層析法(矽膠、乙酸乙酯/己烷=0/100→30/70)進行純化，得到了無色液體的標題化合物 aa6(0.28g，22%產率)。

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

RT(min)：1.74

### 【0089】

N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-(噻唑-4-基)-3-(三苯甲基硫基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa7)的合成

在氮氣氛下，將油性氫化鈉(60%)(0.041g，1.0mmol)溶解於二甲基甲醯胺(10mL/g，2mL)中，並加入三苯基甲硫醇(0.29g，1.06mmol)，並且在室溫攪拌了1小時。向反應液中滴加化合物 aa6(0.20g，0.41mmol)的二甲基甲醯胺溶液(1mL/g，0.2mL)，並在室溫攪拌了1小時。之後，緩慢地滴加純水(10mL)，並攪拌了30分鐘。用乙酸乙酯(10mL)提取 2 次，將所得到之有機層匯總在一起，用飽和食鹽水進行了洗滌。藉由無水硫酸鈉乾燥所得到之有機層，並進行了過濾、減壓蒸餾去除。將所得到之殘渣溶解於二甲基甲醯胺(10mL/g，2mL)中，並在室溫加入了二異丙基乙胺(0.09mL，0.49mmol)和 Fmoc N-羥基琥珀醯亞胺酯(0.15g，0.45mmol)。攪拌

3 小時之後，在室溫向反應液中加入純水(10mL)，並用 25%乙酸乙酯/己烷溶液洗滌了 2 次。使用飽和檸檬酸水，將所得到之水層調整為 pH7。之後，用乙酸乙酯提取 2 次，將所得到之有機層匯總在一起，用飽和食鹽水進行了洗滌。藉由無水硫酸鈉乾燥所得到之有機層，並進行過濾、減壓蒸餾去除，從而得到了粗製純化物。藉由管柱層析法(矽膠、乙酸乙酯/己烷=0/100→10/90)進行純化，得到了白色油狀的標題化合物 aa7(0.20g，產率 79%)。

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

RT(min) : 2.21

**【0090】**

N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-巰基-3-(噻唑-4-基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa8，Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)的合成

在室溫向化合物 aa7(0.21g，0.32mmol)中加入三氟乙酸:三異丙基矽烷:二氯甲烷=25:5:70:溶液(7mL)，並使用機械攪拌器攪拌了 30 分鐘。向反應液中加入甲苯(5mL)，並減壓蒸餾去除了溶劑。向殘渣中加入純水(10mL)，並使用 1M 的 NaOH 水溶液調整為 pH7。之後，用乙酸乙酯提取 2 次，將所得到之有機層匯總在一起，用飽和食鹽水進行了洗滌。藉由無水硫酸鈉乾燥所得到之有機層，並進行過濾、減壓蒸餾去除，從而得到了粗製純化物。藉由管柱層析法(矽膠、乙酸乙酯/甲醇

=100/0→0/100)進行純化，得到了白色固體的標題化合物 aa8(0.13g，>99%產率)。

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

RT(min): 1.61

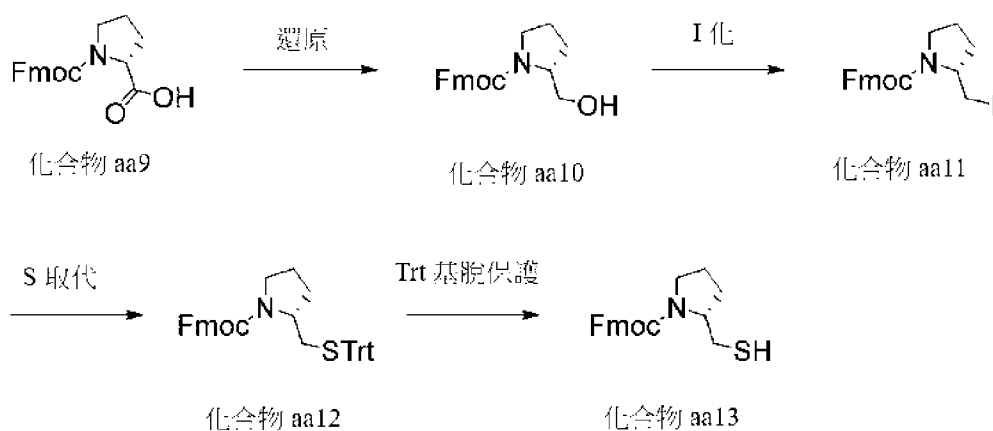
<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)δ:8.82(1H,s), 7.77-7.50(2H,m), 7.61-7.53(2H,m), 7.44-7.36(2H,m), 7.34-7.27(2H,m), 7.10(1H,bs), 5.76-5.74(1H,m), 4.76(1H,bs), 4.39-4.37(2H,m), 4.21-4.14(1H,m), 3.29-3.08(2H,m), 2.81-2.67(1H,m), 2.65-2.47(1H,m),1.52-1.39(1H,m).

### 【0091】

N-((9H-芴-9-基)甲基(R)-2-(巰基甲基)吡咯啉-1-羧酸酯(化合物 aa13，Fmoc-D-Pro-SH)的合成

藉由下述的路徑合成了 N-((9H-芴-9-基)甲基(R)-2-(巰基甲基)吡咯啉-1-羧酸酯(化合物 aa13，Fmoc-D-Pro-SH)。

### [化學式 16]



### 【0092】

N-((9H-芴-9-基)甲基(R)-2-(羥基甲基)吡咯啉-1-羧酸酯(化合物 aa10)的合成

利用市售的 Fmoc-D-Pro-OH(化合物 aa9, Watanabe Kasei Co.,Ltd.), 與 N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-羥基-3-(噻唑-4-基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa5)的合成同樣地實施。不進行純化而用於化合物 aa11 的合成。

**【 0093 】**

N-((9H-芴-9-基)甲基(R)-2-(碘甲基)吡咯啉-1-羧酸酯(化合物 aa11)的合成

與 N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-碘-3-(噻唑-4-基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa6)的合成同樣地實施。

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

RT(min) : 1.96

**【 0094 】**

N-((9H-芴-9-基)甲基(R)-2-((三苯甲基硫基)甲基)吡咯啉-1-羧酸酯(化合物 aa12)的合成

與 N-((9H-芴-9-基)甲基(S)-(1-(噻唑-4-基)-3-(三苯甲基硫基)丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa7)的合成同樣地實施。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$ : 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-芴-9-基)甲基(R))-2-(巰基甲基)吡咯啉-1-羧酸酯  
(化合物 aa13, Fmoc-D-Pro-SH)的合成

與 N-((9H-芴-9-基)甲基(S))-1-巰基-3-(噻唑-4-基)  
丙-2-基)胺甲酸酯(化合物 aa8, Fmoc-Ala(4-Thz)-SH)的  
合成同樣地實施。

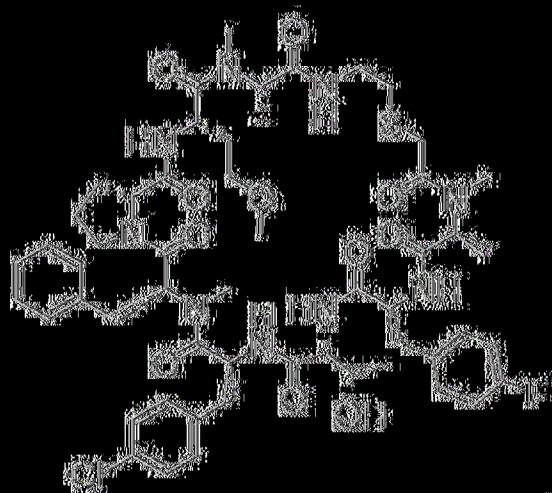
MS(ESI m/z):(M+H)340.1

RT(min): 1.82

[ 0096 ]

環狀 1 的合成

[化學式 17]



[ 0097 ] 按照一般法的步驟 1, 將化合物 aa3 的硫  
醇基載持於 2-氨基苯甲基氨樹脂上。將 Fmoc-C2S-2-氨  
基苯甲基樹脂(1.01mmol/g, 0.05mmol, 50mg)懸浮於  
NMP 中, 使其膨潤 1 小時, 並藉由過濾去除了 NMP。  
以 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、氯乙酸的順序進行了縮合。伸長結束後，用NMP、二氯甲烷洗滌樹脂之後，在減壓下蒸餾去除了溶劑。加入 TFA:三異丙基矽烷:二氯甲烷=5:2.5:92.5(2mL)，進行了肽的切出和脫保護。2小時後，濾出樹脂，回收了濾液。此外，加入 2 次 TFA:三異丙基矽烷:二氯甲烷=5:2.5:92.5(1mL)，並進行清洗，並且回收了濾液。將所回收之濾液全部都匯總在一起，並減壓蒸餾去除溶劑，並且充分進行乾燥，從而得到了直鏈肽的粗製純化物。將所得到之粗製純化物溶解於乙腈(10mL)和 0.1M TEAB 緩衝液:純水=1:9(10mL)溶液中，將溶液調整為 pH8.5±0.1。加入 1 莫耳當量的 TCEP 溶液(0.5M)，並在室溫攪拌了 2 小時。之後，減壓蒸餾去除溶劑，得到了環肽的粗製純化物。將所得到之粗製純化物溶解於少量的乙腈中，藉由反相 HPLC(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)進行純化，以冷凍乾燥粉末形式得到了環肽 1(5.99mg，產率 10.8%)。

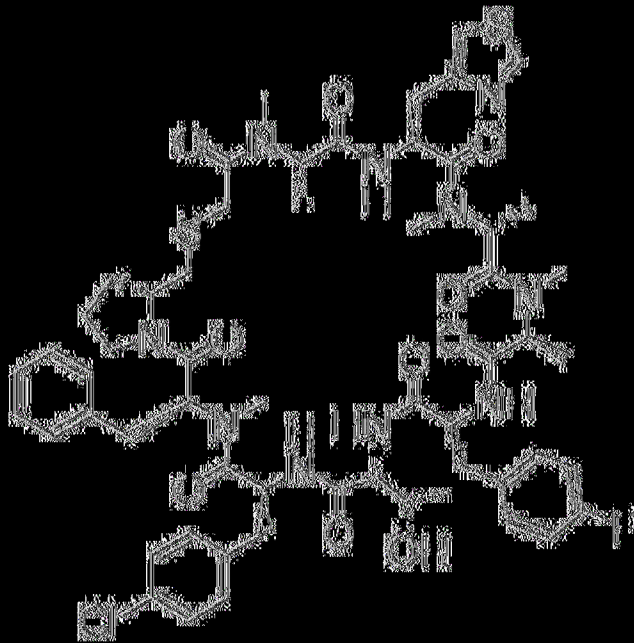
MS(ESI m/z) : (M+H)1108.5

RT(min) : 1.54

【0098】

環肽 2 的合成

## [化學式 18]



[0099] 按照一般法的步驟 1，將化合物 aa13 的硫醇基載持於 2-氨基三苯甲基樹脂上。將 Fmoc-D-Pro-S-2-氨基三苯甲基樹脂(0.99mmol/g，0.05mmol，51mg)懸浮於 NMP 中，使其膨潤 1 小時，並藉由過濾去除了 NMP。以 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、氯乙酸的順序進行了縮合。伸長結束後，用 NMP、二氯甲烷洗滌樹脂之後，在減壓下蒸餾去除了溶劑。加入 TBA: 三異丙基碇烷: 二氯甲烷::5:2.5:92.5(2mL)，進行了肽的切出和脫保護。2 小時後，濾出樹脂，回收了濾液。此外，加入 2 次 TBA: 三異丙基碇烷: 二氯甲烷::5:2.5:92.5(1mL)，並進行清洗，並且回收了濾液。將所回收之濾液全部都匯總在一起，並

減壓蒸餾去除溶劑，並且充分進行乾燥，從而得到了直鏈肽的粗製純化物。將所得到之粗製純化物溶解於乙腈(10mL)和 0.1M TEAB 緩衝液:純水=1:9(10mL)溶液中，將溶液調整為 pH8.5±0.1。加入 1 莫耳當量的 TCEP 溶液(0.5M)，並在室溫攪拌了 5 小時。之後，減壓蒸餾去除溶劑，得到了環肽的粗製純化物。將所得到之粗製純化物溶解於少量的乙腈中，藉由反相 HPLC(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)進行純化，以冷凍乾燥粉末形式得到了環肽 1(2.16mg，產率 3.7%)。

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

RT(min) : 1.58

### 【0100】

環肽 3~6、比較例 1 及 2 的合成

利用與環肽 1 相同的方法合成了環肽 3~6。藉由 WO2021102322 中所記載之方法合成了比較例 1。藉由 WO2013123266 中所記載之方法合成了比較例 2。

【0101】在表 1 中示出環肽的序列。另外，在表中的環肽中，左側表示被 N 末端氯乙醯化之胺基酸殘基，右側表示含有硫醇基之化合物，藉由 N 末端氯乙醯基與硫醇基的反應進行硫醚鍵結來形成環肽。在比較例 1 中，左側表示 N 末端胺基酸殘基，右側表示 C 末端胺基酸殘基，藉由肽的兩端進行醯胺鍵結來形成環肽。在比較例 2 中，表中的“Ac”表示乙醯基，以“\$ r8”表示之胺

基酸為藉由包含 1 個雙鍵之全碳交聯而連結之  $\alpha$ -MeS8-辛烯基-丙胺酸烯烴胺基酸 (Olefin amino acid)。以“\$”表示之胺基酸為藉由包含 1 個雙鍵之全碳交聯而連結之  $\alpha$ MeS5-戊烯基-丙胺酸烯烴胺基酸。在比較例 2 中，由“\$ r8”和“\$”表示之胺基酸殘基的側鏈被裝訂化。

【0102】 [表 1]

環肽	序列									
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-MeOEt)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 <sub>2</sub>									

另外，表 1 中，以下的縮寫分別表示以下所記載者。

C2S：來自於化合物 aa3 之含有硫醇基之胺基酸類似物殘基

Ala(4-Thz)S：來自於化合物 8 之含有硫醇基之胺基酸類似物殘基

ProS：來自於化合物 aa13 之含有硫醇基之胺基酸類似物殘基

## 【0103】

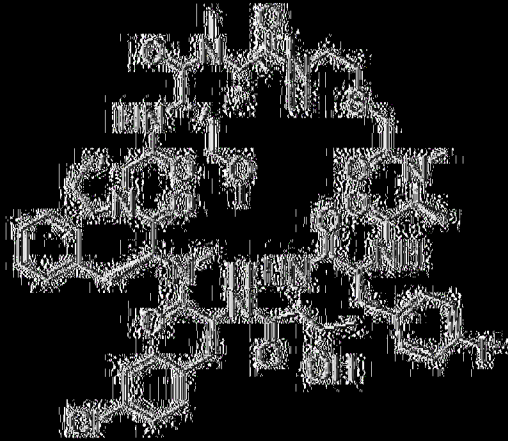
環肽的結構

以下示出環肽的結構。

$(0104)$ 

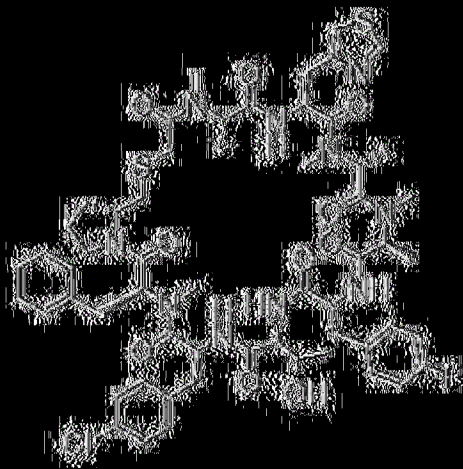
環狀 1

[化學式 19]

 $(0105)$ 

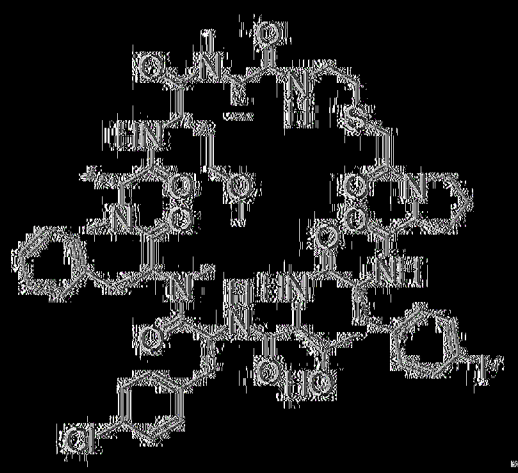
環狀 2

[化學式 20]

 $(0106)$ 

環狀 3

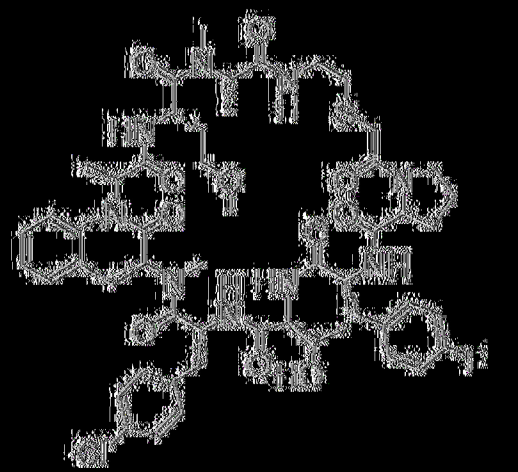
[化學式 2.1]



[ (010') ]

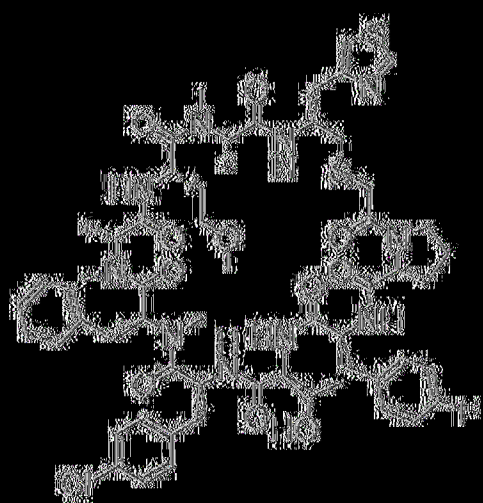
環狀 4

[化學式 2.2]



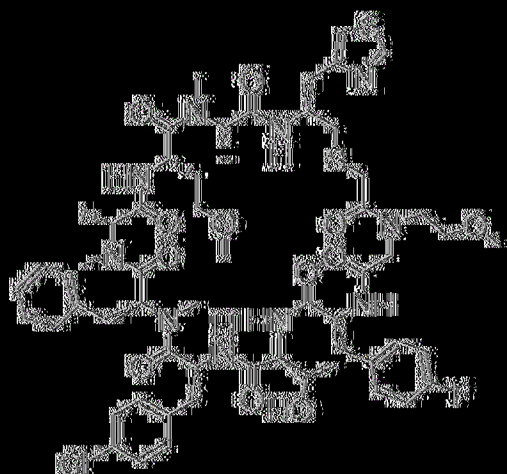
環狀 5

[化學式 23]



環狀 6

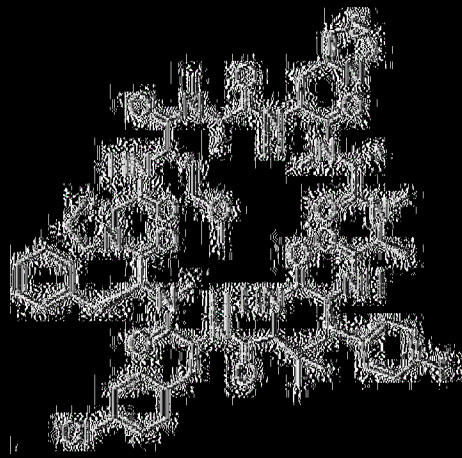
[化學式 24]



[ ( 0108 ) ]

## 比較例 1

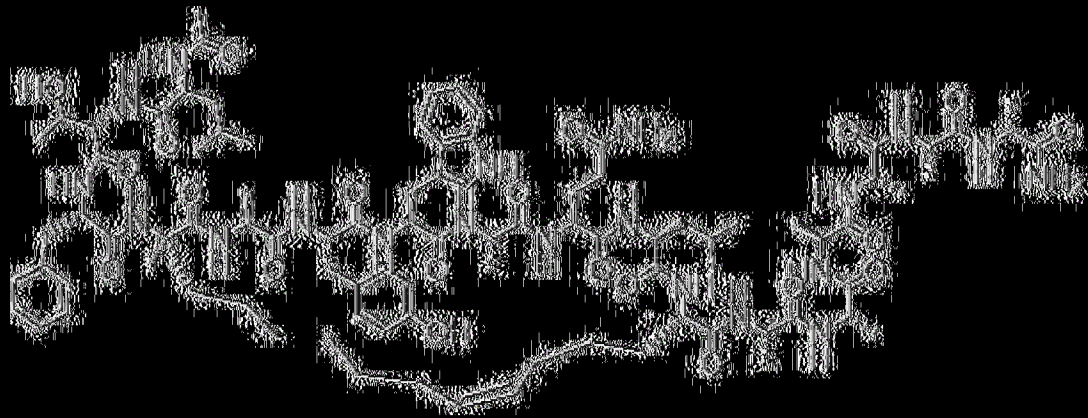
[化學式 2.5]



[(0109)]

## 比較例 2

[化學式 2.6]



[(0110)]

## LC-MS 測定結果

[表 2]

環状	實測値(M:HD)	保持時間(分鐘)
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】****< 實施例 2 > Alpha Screen 檢定**

實施了依本發明之環肽對 MDMX 的 Alpha Screen 檢定。

MDMX 使用了藉由固相合成而合成之 MDMX(24-108，在 N 末端有 His-tag；PDB ID：2MWY，<https://www.rcsb.org/structure/2MWY>)。MDMX 的鍵結鍵使用了 p53 的片段肽 [AnaSpec 公司製造，p53(17-26) FITC-labeled]。供體微球 (Donor beads) 使用了 Anti-FITC AlphaScreen。受體微球 (Acceptor beads) 使用了 Anti-His tag AlphaLISA。在反應中使用之緩衝液的組成設為 PBS、0.1% BSA、0.01% Tween 20。

在 384 孔板 (PerkinElmer 公司 #6007290) 的各孔中依序加入調整了濃度之化合物 5 $\mu$ L (DMSO 終濃度 1~5%)、MDMX 5 $\mu$ L (終濃度 1 $\mu$ M)、p53 肽 5 $\mu$ L (終濃度 10nM) 之後，將經抗 His 標籤抗體修飾之受體微球和經抗 FITC 抗體修飾之供體微球分別以終濃度成為 20 $\mu$ g/mL 之方式加入共計 10 $\mu$ L，並在室溫培養了 1 小時。最後，使用 Envision 測定了螢光訊號。另外，在進行調液時，為了防止由光引起之訊號的衰減，在具備綠色濾光片之光源下進行了實驗。

**【 0112】****IC<sub>50</sub> 的計算式**

將陽性對照 (未添加化合物，取而代之添加調整了 DMSO 濃度之緩衝液之孔) 的螢光強度設為 100%，將陰

性對照(未添加 MDMX、p53 肽、化合物，取而代之添加調整了 DMSO 濃度之緩衝液之孔)的螢光強度設為 0%而將各孔的螢光強度標準化，藉由與下式所表示之 S 形(Sigmoid)曲線擬合來計算出了 IC<sub>50</sub>。

[化學式 27]

$$\frac{\text{(標準化之螢光強度)}}{\text{(化合物濃度)}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{\text{化合物濃度}}{\text{IC}_{50}}\right)^n}$$

〔0113〕

### <實施例 3> 細胞膜穿透性評價

#### <準備>

實施了依本發明之環肽的細胞膜穿透性評價。

在插入物(Insert)(24 孔板(well plate)用，孔徑 3.0 μm，CORNING 製造)中接種 300 μL 的 1.0×10<sup>6</sup> 個細胞/mL 的 MDCKII 細胞(BCACC 標準細胞株)，並在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的環境下進行了培養。3 天後測定細胞層的電阻值(測定器)，確認到高阻隔性(>100 Ω·cm<sup>2</sup>)。

〔0114〕

#### <穿透試驗>

將插入物浸泡於 HBSS(不含酚紅，以下相同)中進行洗滌之後，加入調整為 10 μM/HBSS 之試樣 200 μL，將其於放入有 900 μL 的 HBSS 之低吸附 24 孔板內靜置(37℃、5%CO<sub>2</sub>)。2 小時後，回收了插入物的上層(apical)與下層(basal)的各液(apical 為 10 μL，basal 為 500 μL)。試驗後，用非穿透性的螢光色素 Lucifer Yellow 確認到無洩漏。

## 【 0115】

< 定量 >

裝置使用了 LC/MS/MS(三重四極型)。

洗提液：A)5mM 甲酸銨，0.2%甲酸/H<sub>2</sub>O，B)0.1%甲酸/MeCN、流速：0.5mL/min、注入量：2μL、管柱：ACQUITY UPLC BEH C18 Column，1.7μm，2.1mm×50mm(Waters 製造)、溫度：70℃、梯度(gradient)(%B)：2%(0-0.5min)→98%(2-3min)→2%(3-5min)、離子化：ESI、檢測模式：MRM(正(positive))

依據式(1)所示之計算式，由各定量值計算出了表示膜穿透性之穿透係數  $P_{app}$ 。

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

V：basal 的體積(0.9mL)

C<sub>0</sub>：初始濃度(10μM)

S：單層膜的表面積(0.33cm<sup>2</sup>)

dC/dt：在 basal 中的濃度變化[μM/s]

## 【 0116】

< 實施例 4 >

使用 MD 計算之分子形狀因數 r 值的計算

首先，將環肽的二維描繪之結構式輸入到 Chem3D 中，將其三維結構化(圖 1)。將本立體結構作為初始結構，藉由量子化學計算方法(B3LYP/6-31G\*，軟體為 Gaussian)進行結構最優化，求出局部穩定結構。在上述局部穩定結構中，藉由量子化學計算方法(B3LYP/6-31G\*，軟體為 Gaussian)求出環肽所產生之靜電場，為

各原子分配點電荷 (RESP 電荷) 以再現上述的靜電場。接著，分析各原子間的共價鍵狀態 (Amber)，將範德華參數 (gaff2) 分配給各原子。將本電荷和本範德華參數統稱為力場。

【0117】接著，在本力場下，將上述局部穩定結構作為初始結構，在氯仿中實施分子動力學 (MD) 模擬 (軟體為 Gromacs 和 plumed)。在 MD 模擬中，作為用於高效率地探索寬的構形空間之效率化方法，使用模擬時的溫度加上室溫，除此以外，還利用更高溫度之副本交換 (Replica-exchange) MD 法。所使用之溫度為 6 種 (副本數為 6 種)，如下表所示。另外，僅對環肽適用本溫度，而對存在於環肽周圍之氯仿始終適用 298K。

【0118】 [表 3]

	環肽/氯仿的溫度[K]
譜系 1	298/298
譜系 2	348/298
譜系 3	398/298
譜系 4	448/298
譜系 5	498/298
譜系 6	548/298

【0119】若藉由本副本交換 MD 法實施 300ns 的計算，則可計算出室溫的最穩定結構。

對本最穩定結構求出慣性張量，求出主慣性矩，並求出各軸長 (a、b、c)，並且計算 r 值。具體而言，按以下的順序計算 r 值。

【0120】將屬於上述的最穩定結構的環肽的主鏈中之原子的三維座標表示為

$(X_{a,1}, X_{a,2}, X_{a,3})$ 。

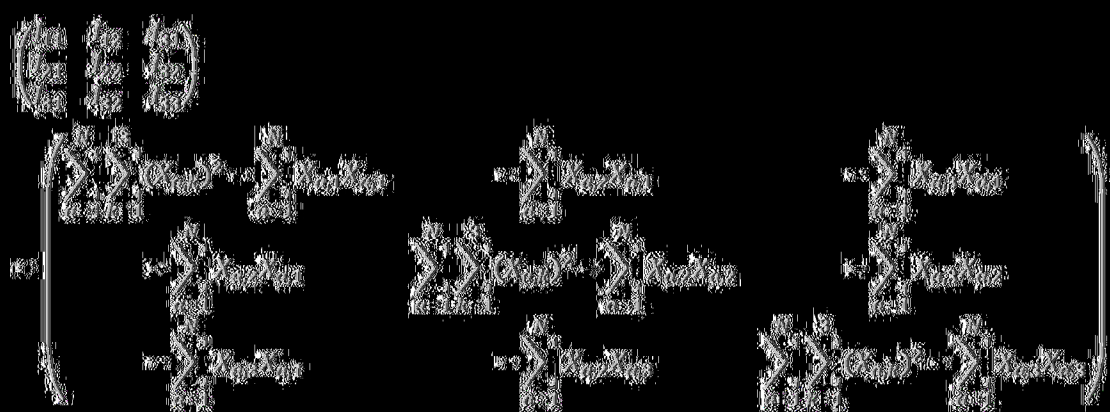
在此， $a$  為識別屬於主鏈中之原子之標籤，取 1 至  $N$  的整數。 $N$  為屬於環狀的主鏈中之原子的總數。

〔0121〕對該三維座標計算  $\pi$  值。 $\pi$  值的計算能夠按以下的順序進行。

〔0122〕

(1) 將三維座標作為輸入，按照

〔化學式 28〕



計算慣性張量 ( $3 \times 3$  的矩陣)。

〔0123〕

(2) 計算慣性張量的固有值。所得之 3 個固有值稱為主慣性矩，表示為

$(I_1, I_2, I_3)$ 。

〔0124〕(3) 如同 2 所示，將均勻分布的橢圓體的各軸長設為  $a$ 、 $b$ 、 $c$  ( $a > b > c$ )。

將主慣性矩作為輸入，按照以下的式計算均勻分布的橢圓體的各軸長  $a$ 、 $b$ 、 $c$  ( $a > b > c$ )。

[化學式 29]



(0125) (4) 將橢圓體的各軸長作為輸入，按照以下的式計算分子形狀因數( $\tau$ )。

[化學式 30]



(0126) 按照上述求出了  $\tau$  值。

在表 4 中對環狀的  $\tau$  值、 $P_{app}$  進行了匯總。

(0127)

< $P_{app}$  的評價標準>

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

評價 A、B 及 C 表示細胞膜穿透性充分，評價 D 表示無法得到充分的細胞膜穿透性。

【 0128】 [表 4]

環肽	下述(b)	下述(c)	r	P <sub>app</sub>
1	滿足	滿足	0.46	C
2	滿足	滿足	0.46	C
3	滿足	滿足	0.47	B
4	滿足	滿足	0.43	C
5	滿足	滿足	0.47	C
6	滿足	滿足	0.48	C
比較例 1	不滿足	滿足	0.51	D
比較例 2	不滿足	滿足	0.64	D

【 0129】 (b)在肽的主鏈結構中包含硫原子。

(c)肽在生理環境下為非離子性。

【符號說明】

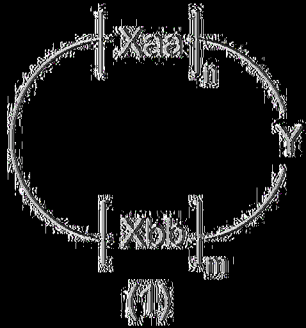
無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="PD1238124(9)_Sequence.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-11-23">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112131447</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-08-22</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>22F00771W1</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>JP</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2022-132147</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-08-23</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">富士軟片股份有限公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>FUJIFILM Corporation</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">環肽或其鹽及MDMX抑制劑</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="en">Cyclic peptide or salt thereof, and MDMX
inhibitor</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>1</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Description of Artificial Sequence: syntesized
peptide</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LTFAYWAQLAAAAAA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

## 〔發明申請專利範圍〕

〔請求項 1〕一種環狀或其鹽，前述環狀由下述式(1)表示，且具有下述(a)~(c)的特徵，



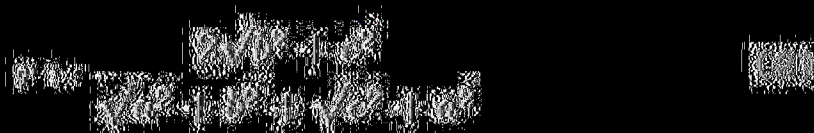
式中，Y 表示  $^{*}..CR^1..S..CR^2..^{*}$  所表示之 2 價的基， $R^1$  及  $R^2$  表示氮原子或取代基，\* 表示與 Xaa 及 Xbb 鍵結之位置，

m 個 Xaa 分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

m 個 Xbb 分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

$m+n$  表示 5~50 的整數；

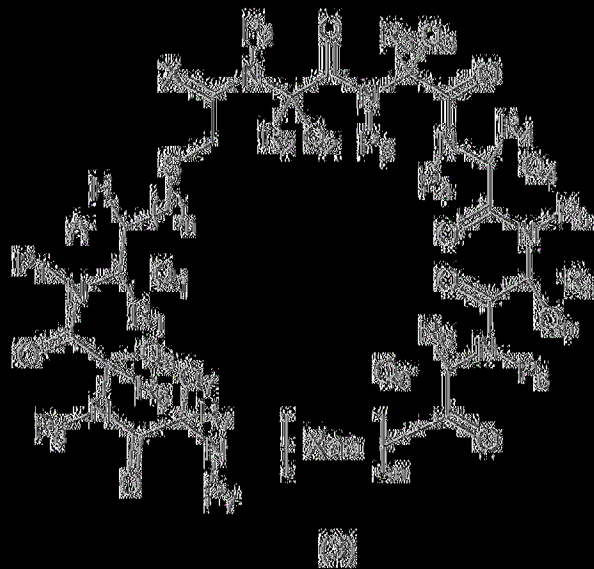
(a)在環狀的結構中，將主鏈結構的最長的軸方向的軸長設為 a、將與 a 正交且相互正交的其他 2 個方向的軸長設為 b、c 時，經過進行求出 a、b、c 的各軸長之橢圓體近似之階段，由下述式(2)計算之分子形狀因數  $\tau$  包含在 0.4~0.6 的範圍；



(b)在前述肽的主鏈結構中包含硫原子；

(c)前述肽在生理環境下為非離子性。

(請求項 2) 如請求項 1 之環狀或其鹽，前述環狀由下述式(3)表示，



式中，

X 為氧原子或硫原子，

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、 $Q_4$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$ 、 $Q_8$ 、A 及 B 分別獨立地為氫原子、可以具有取代基之烷基、可以具有取代基之烯基、可以具有取代基之炔基、可以具有取代基之芳香族碳環基、可以具有取代基之非芳香族碳環基、可以具有取代基之芳香族雜環基或可以具有取代基之非芳香族雜環基，

$P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  分別獨立地為氫原子、可以具有取代基之烷基、可以具有取代基之烯基、可以具有取代基之炔基、可以具有取代基之芳香族碳環基、可以具有取代基之非芳香族碳環基、可以具有取代基之芳香族雜環基或可以具有取代基之非芳香族雜環基，或者，

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、A 及 B 所鍵結

之碳原子可以與  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，

$m$  個 Xaa 分別獨立地表示任意的胺基酸殘基或任意的胺基酸類似物殘基，

$n$  為 0~5 的整數， $m$  為 0~2 的整數。

【請求項 3】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中  
 $n$  為 0 或 1。

【請求項 4】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中  
 $m$  為 1。

【請求項 5】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中  
前述  $R_3$  至  $R_8$  或  $Q_3$  至  $Q_8$  中的至少一個為可以具有取代基之芳香族碳環基或可以具有取代基之芳香族雜環基。

【請求項 6】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中  
前述  $R_3$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$  或  $Q_3$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$ 、 $Q_8$  中的至少一個為可以具有取代基之芳香族碳環基或可以具有取代基之芳香族雜環基。

【請求項 7】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中  
前述  $R_1$  及  $Q_1$  以及  $P_1$  或 A 及 B 以及  $P_1$  可以與  $R_1$  及  $Q_1$  或 A 及 B 所鍵結之碳原子以及  $P_1$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，並且，前述  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、 $Q_4$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 、 $Q_7$  及  $Q_8$  所鍵結之碳原子可以與  $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$ 、 $P_6$ 、 $P_7$  及  $P_8$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，前述 Xaa 可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個雜環。

【請求項 8】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中

前述  $R_1$  及  $Q_1$  以及  $P_1$  或 A 及 B 以及  $P_1$  可以與  $R_1$  及  $Q_1$  或 A 及 B 所鍵結之碳原子以及  $P_1$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，並且，前述  $R_2$  及  $Q_2$  所鍵結之碳原子可以與  $P_2$  所鍵結之氮原子一同形成雜環，前述 Xaa 可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個雜環。

【請求項 9】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中

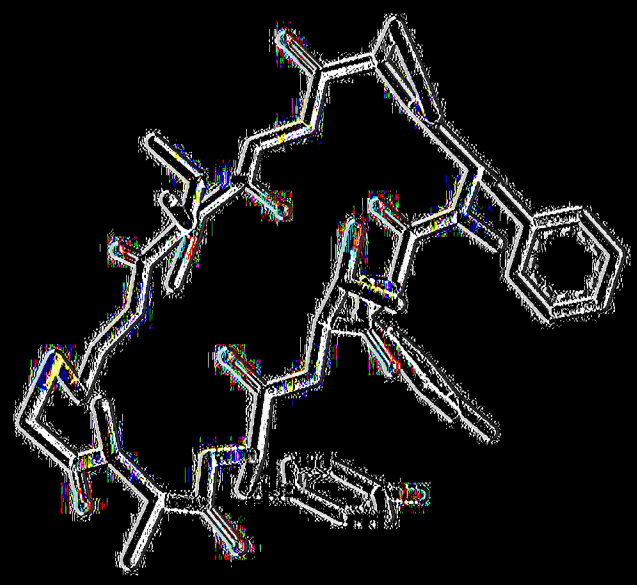
前述  $R_1$  及  $Q_1$  以及  $P_1$  或 A 及 B 以及  $P_1$  可以與  $R_1$  及  $Q_1$  或 A 及 B 所鍵結之碳原子以及  $P_1$  所鍵結之氮原子一同形成吡咯啉環，並且，前述  $R_2$  及  $Q_2$  所鍵結之碳原子可以與  $P_2$  所鍵結之氮原子一同形成吡咯啉環，前述 Xaa 可以為脯胺酸，藉由由該等形成之結構而包含至少一個吡咯啉環。

【請求項 10】如請求項 2 之環肽或其鹽，其中

前述  $R_1$  及  $Q_1$  或 A 及 B 以及 Xaa 分別為任意的 D-胺基酸殘基或任意的 D-胺基酸類似物殘基。

【請求項 11】一種 MDMX 抑制劑，其包含如請求項 1 至 10 中任一項之環肽或其鹽。

〔發明圖式〕



〔圖 1〕



〔圖 2〕