



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104474529 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 01

(21) 申请号 201410541607. 0

(22) 申请日 2009. 02. 09

(30) 优先权数据

61/027, 326 2008. 02. 08 US

61/120, 380 2008. 12. 05 US

(62) 分案原申请数据

200980108027. X 2009. 02. 09

(71) 申请人 爱勒让治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 H·M·纳什 D·A·安妮斯

R·卡佩勒-利伯曼 T·K·索耶

N·卡瓦哈塔 韩佳文

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

A61K 38/12(2006. 01)

A61K 38/16(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书79页 附图55页

(54) 发明名称

治疗性的拟肽大环化合物

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗细胞增殖疾病如癌症和免疫增殖疾病的生物活性拟肽大环化合物。

1. 一种治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,所述癌症选自卵巢癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰癌和 Ph+ 急性淋巴细胞性白血病。
2. 根据权利要求 1 的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。
3. 根据权利要求 1 的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。
4. 根据权利要求 1 的方法,其中,所述拟肽大环化合物是 BIM 多肽。
5. 根据权利要求 4 的方法,其中,所述 BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 60%,且其中,* 为栓系氨基酸。
6. 根据权利要求 4 的方法,其中,所述 BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 80%,且其中,* 为栓系氨基酸。
7. 根据权利要求 4 的方法,其中,所述 BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 95%,且其中,* 为栓系氨基酸。
8. 根据权利要求 1 的方法,其中,所述癌症为乳腺癌。
9. 根据权利要求 8 的方法,其中,所述乳腺癌是浸润性乳腺癌。
10. 根据权利要求 9 的方法,其中,所述浸润性乳腺癌是浸润性导管癌。

治疗性的拟肽大环化合物

[0001] 本申请是申请日为 2009 年 02 月 09 日和发明名称为“治疗性的拟肽大环化合物”的 200980108027.X 号发明专利申请的分案申请。

[0002] 交叉参考

[0003] 本申请要求 2008 年 2 月 8 日提交的美国临时申请 61/027,326 和 2008 年 12 月 5 日提交的美国临时申请 61/120,380 的优先权,本文通过引用引入各该申请。

[0004] 发明背景

[0005] 不受控制的细胞增殖涉及从癌症到免疫增殖疾病的许多种疾病。例如,仅在美国,癌症已超过心脏病成为大部分人口中死亡的首要原因(Journal of the National Cancer Institute, 第 97 卷,第 5 期,2005 年 3 月 2 日,第 330 页),并且每年造成死亡超过 50 万。尽管几十年来这一领域进行了深入的研究,但细胞增殖疾病的治疗仍是一个挑战。

[0006] 癌症的治疗方法(如手术或化学治疗)在效力、副作用特征(profile)和成本方面仍然受到限制。特别是,现有治疗选择的效力和适用性对于特定类型的肿瘤和疾病差异很大。因此,仍然需要治疗细胞增殖疾病和其他疾病的组合物和方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明满足了这个方面和其他方面的需要。本发明基于以下令人吃惊的发现提供了组合物和治疗方法:当用于治疗细胞增殖疾病时,某些拟肽大环化合物(peptidomimetic macrocycle)表现出令人意外的特异性、效力和效能。

[0009] 在一个方面,本发明提供了治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,所述癌症选自小细胞肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰癌和 Ph⁺ 急性淋巴细胞性白血病(Ph+ALL)。在一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 α -螺旋。在另一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。拟肽大环化合物可以是,例如,BIM 多肽。在某些情况下,BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 60%,其中,*为栓系氨基酸(tethered amino acid)。或者,BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 80%,其中,*为栓系氨基酸。此外,所述 BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性可以高于大约 95%,其中,*为栓系氨基酸。在某些实施方式中,如在体外细胞活性分析中所测量的,癌症对于使用对应的交联 BID 多肽的治疗的敏感性至少低 2 倍。在其他的实施方式中,如在体外细胞活性分析中所测量的,癌症对于使用对应的交联 BID 多肽的治疗的敏感性至少低 5 倍。在更其他的实施方式中,如在体外细胞活性分析中所测量的,癌症对于使用对应的交联 BID 多肽的治疗的敏感性至少低 8 倍。

[0010] 在所选定的实施方式中,癌症为乳腺癌,例如,浸润性乳腺癌,如浸润性导管癌。或者,癌症为前列腺癌。在其他的实施方式中,癌症为卵巢癌。在更其他的实施方式中,癌症为胰癌。在进一步的实施方式中,癌症为肾癌。或者,癌症为 Ph⁺ 急性淋巴细胞性白血病(Ph+ALL)。

[0011] 本发明还提供了治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,癌症为结肠癌。在一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 α -螺旋。在另

一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。拟肽大环化合物可以是,例如,BID 多肽。在某些情况下,BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 60%,而且其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。或者,BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 80%,其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。此外,所述 BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性可以高于大约 95%,其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。在某些实施方式中,如在体外细胞活性分析中所测量的,癌症对于使用对应的交联 BIM 多肽的治疗的敏感性至少低 2 倍。在其他的实施方式中,如在体外细胞活性分析中所测量的,癌症对于使用对应的交联 BIM 多肽的治疗的敏感性至少低 5 倍。在更其他的实施方式中,如在体外细胞活性分析中所测量的,癌症对于使用对应的交联 BIM 多肽的治疗的敏感性至少低 8 倍。

[0012] 本发明还提供了治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,当在针对源自所述癌症的细胞系的体外细胞活性分析中进行测试时,所述拟肽大环化合物显示出低于大约 5 μ M 的 EC_{50} 。在某些实施方式中, EC_{50} 可能低于大约 4 μ M。在其他的实施方式中, EC_{50} 可能低于大约 3 μ M。在更另外的实施方式中, EC_{50} 可能低于大约 2 μ M。在更另外的实施方式中, EC_{50} 可能低于大约 1 μ M。在某些实施方式中,体外分析在血清的存在下进行。例如,所述分析可以在 10%人血清中进行。在某些方面,癌症选自卵巢癌、皮肤癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、小细胞肺癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、T 细胞谱系或 B 细胞谱系或混合谱系的急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓性白血病和滤泡性淋巴瘤。

[0013] 在一个方面,本发明提供了治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,癌症选自卵巢癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌和 Ph+ 急性淋巴细胞性白血病。在一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 α -螺旋。在另一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。拟肽大环化合物可以是,例如,BIM 多肽。在某些情况下,BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 60%,其中,*为栓系氨基酸。或者,BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 80%,其中,*为栓系氨基酸。此外,所述 BIM 多肽的氨基酸序列可以与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 95%,其中,*为栓系氨基酸。

[0014] 在某些实施方式中,癌症选自结肠癌、小细胞肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、神经胶质瘤、伯基特淋巴瘤、T 细胞谱系或 B 细胞谱系或混合谱系的急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓性白血病和滤泡性淋巴瘤。在一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 α -螺旋。在另一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。拟肽大环化合物可以是,例如,BID 多肽。在某些情况下,BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 60%,而且其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。或者,BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 80%,其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。此外,所述 BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性可以高于大约 95%,其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。

[0015] 本发明另外提供了治疗需要治疗的人类患者的病症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,该方法包括:a) 通过多肽的两个氨基酸残基之间引入交联制备拟肽大环化合物;b) 测试拟肽大环化合物是否存在免疫原性反应;和 c) 如果所述免疫原性反应不会引起实质性的副作用,那么向患者施用拟肽大环化合物。非免疫原性可以在啮齿类动物(如小鼠)、非人类灵长类动物或人类的体内分析中以最小抗体反应(minimal antibody response)加以证明。当向人类患者施用拟肽大环化合物时,非免疫原性的化合物可能不会在患者中诱导与其免疫原性有关的实质性的或最小的副作用。所述病症可能是,例如,癌症、代谢障碍、心血管疾病、炎症疾病或变性疾病(degenerative disease)。在一个实施方式中,拟肽大环化合物包含 α -螺旋。在另一个实施方式中,拟肽大环化合物包含BH3结构域。拟肽大环化合物可以是,例如,BID多肽。在某些情况下,BID多肽的氨基酸序列与序列DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI的同一性高于大约60%,而且其中,*为栓系氨基酸和N1e为正亮氨酸。或者,BID多肽的氨基酸序列与序列DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI的同一性高于大约80%,其中,*为栓系氨基酸和N1e为正亮氨酸。此外,所述BID多肽的氨基酸序列与序列DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI的同一性可以高于大约95%,其中,*为栓系氨基酸和N1e为正亮氨酸。拟肽大环化合物也可以是,例如,BIM多肽。在某些情况下,BIM多肽的氨基酸序列与氨基酸序列IWIAQELR*IGD*FNAYYARR的同一性高于大约60%,其中,*为栓系氨基酸。或者,BIM多肽的氨基酸序列与氨基酸序列IWIAQELR*IGD*FNAYYARR的同一性高于大约80%,其中,*为栓系氨基酸。此外,所述BIM多肽的氨基酸序列与氨基酸序列IWIAQELR*IGD*FNAYYARR的同一性可以高于大约95%,其中,*为栓系氨基酸。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了治疗需要治疗的人类患者的免疫增殖疾病的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物。在体外hPBL BrdU掺入分析(BrdU incorporation assay)中,拟肽大环化合物可以减少活化hPBL的增殖超过大约5%、10%、20%、30%、40%或50%。免疫增殖疾病可能是,例如,淋巴增殖疾病或自身免疫性疾病,例如,系统性红斑狼疮。拟肽大环化合物可以是,例如,BID多肽。在某些情况下,BID多肽的氨基酸序列与序列DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI的同一性高于大约60%,而且其中,*为栓系氨基酸和N1e为正亮氨酸。或者,BID多肽的氨基酸序列与序列DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI的同一性高于大约80%,其中,*为栓系氨基酸和N1e为正亮氨酸。此外,所述BID多肽的氨基酸序列与序列DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI的同一性可以高于大约95%,其中,*为栓系氨基酸和N1e为正亮氨酸。拟肽大环化合物也可以是,例如,BIM多肽。在某些情况下,BIM多肽的氨基酸序列与氨基酸序列IWIAQELR*IGD*FNAYYARR的同一性高于大约60%一致,其中,*为栓系氨基酸。或者,BIM多肽的氨基酸序列与氨基酸序列IWIAQELR*IGD*FNAYYARR的同一性高于大约80%,其中,*为栓系氨基酸。此外,所述BIM多肽的氨基酸序列与氨基酸序列IWIAQELR*IGD*FNAYYARR的同一性可以高于大约95%,其中,*为栓系氨基酸。

[0017] 对于上述公开的任何拟肽大环化合物,所述拟肽大环化合物中的 α -碳原子可能另外被式R-的独立取代基取代,其中,R-为未取代的或被卤素取代的烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基。在某些实施方式中,交联剂与其连接的 α -碳原子另外被式R-的取代基取代。在其他的实施方式中,交联剂未与其连接的 α -碳原子另外被式R-的取代基取代。或者,拟肽大环化合物中的两个 α -碳原子另外被式R-的独立取代基取代。在某些实施方式中,交联剂与其连接的两个 α -碳原子另外被式R-的独立取

代基取代。在其他的实施方式中,交联剂未与其连接的两个 α -碳原子另外被式 R- 的独立取代基取代。R- 可能是,例如,烷基,如甲基、乙基、丙基或异丙基。交联剂可以连接两个 α -碳原子。在某些实施方式中,R- 与交联剂的任何部分一起形成环状结构。在其他的实施方式中,交联剂由连续的碳碳键形成。在更另外的实施方式中,交联剂包含大约 6、7、8、9、10、11、12 或 13 个连续的键。在更其他的实施方式中,交联剂包含至少大约 5、6、7、8 或 9 个碳原子。

[0018] 本发明还提供了治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,所述拟肽大环化合物与 Mcl-1 相互作用。在某些实施方式中,拟肽大环化合物拮抗 Mcl-1 与促凋亡蛋白(如 Bid、Bim、Bax 或 Bak)之间的相互作用。在其他的实施方式中,本发明的拟肽大环化合物用于治疗人类患者的癌症,其中,所述癌症对 ABT-737 或其类似物具有抗性,或对于具有大于 1、2、5 或 10 μ M 的对 Mcl-1 的亲力的化合物具有抗性。

[0019] 本发明进一步提供了治疗需要治疗的人类患者的 ABT-737 抗性小细胞肺癌的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。本发明还提供了治疗需要治疗的人类患者的前列腺癌的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。

[0020] 在本文所述的任何治疗方法中,拟肽大环化合物与标准的治疗方法结合施用。标准的治疗方法可以是,例如,化学疗法。或者,标准的治疗方法可以是放射疗法。在进一步的实施方式中,标准的治疗方法是手术。

[0021] 具体地,本发明涉及以下各项:

[0022] 1. 一种治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,所述癌症选自卵巢癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰癌和 Ph+ 急性淋巴细胞性白血病。

[0023] 2. 根据第 1 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。

[0024] 3. 根据第 1 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。

[0025] 4. 根据第 1 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物是 BIM 多肽。

[0026] 5. 根据第 4 项的方法,其中,所述 BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 60%,且其中,*为栓系氨基酸。

[0027] 6. 根据第 4 项的方法,其中,所述 BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 80%,且其中,*为栓系氨基酸。

[0028] 7. 根据第 4 项的方法,其中,所述 BIM 多肽的氨基酸序列与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 95%,且其中,*为栓系氨基酸。

[0029] 8. 根据第 1 项的方法,其中,所述癌症为乳腺癌。

[0030] 9. 根据第 8 项的方法,其中,所述乳腺癌是浸润性乳腺癌。

[0031] 10. 根据第 9 项的方法,其中,所述浸润性乳腺癌是浸润性导管癌。

[0032] 11. 根据第 1 项的方法,其中,所述癌症为前列腺癌。

[0033] 12. 根据第 1 项的方法,其中,所述癌症为卵巢癌。

[0034] 13. 根据第 1 项的方法,其中,所述癌症为胰癌。

[0035] 14. 根据第 1 项的方法,其中,所述癌症为肾癌。

- [0036] 15. 根据第 1 项的方法,其中,所述癌症为白血病。
- [0037] 16. 根据第 1 项的方法,其中,所述癌症为 Ph⁺ 急性淋巴细胞性白血病。
- [0038] 17. 一种治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,所述癌症为结肠癌。
- [0039] 18. 根据第 17 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。
- [0040] 19. 根据第 17 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。
- [0041] 20. 根据第 19 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物是 BID 多肽。
- [0042] 21. 根据第 20 项的方法,其中,所述 BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 60%,且其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0043] 22. 根据第 20 项的方法,其中,所述 BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 80%,且其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0044] 23. 根据第 20 项的方法,其中,所述 BID 多肽的氨基酸序列与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 95%,且其中,*为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0045] 24. 一种治疗需要治疗的人类患者的癌症的方法,包括向患者施用拟肽大环化合物,其中,当在针对源自所述癌症的细胞系的体外细胞活性分析中进行测试时,所述拟肽大环化合物显示低于 5 μ M 的 EC₅₀。
- [0046] 25. 根据第 24 项的方法,其中,EC₅₀低于 3 μ M。
- [0047] 26. 根据第 24 项的方法,其中,所述癌症选自卵巢癌、皮肤癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、小细胞肺癌、结肠癌、肝癌、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、T 细胞谱系或 B 细胞谱系或混合谱系的急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓性白血病和滤泡性淋巴瘤。
- [0048] 27. 根据第 26 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。
- [0049] 28. 根据第 26 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。
- [0050] 29. 根据第 26 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物是 BIM 多肽。
- [0051] 30. 根据第 29 项的方法,其中,所述 BIM 多肽与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 60%,且其中,*为栓系氨基酸。
- [0052] 31. 根据第 29 项的方法,其中,所述 BIM 多肽与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 80%,且其中,*为栓系氨基酸。
- [0053] 32. 根据第 29 项的方法,其中,所述 BIM 多肽与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 95%,且其中,*为栓系氨基酸。
- [0054] 33. 根据第 24 项的方法,其中,所述癌症选自结肠癌、小细胞肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、T 细胞谱系或 B 细胞谱系或混合谱系的急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓性白血病和滤泡性淋巴瘤。
- [0055] 34. 根据第 33 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。
- [0056] 35. 根据第 33 项的方法,其中,所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。

- [0057] 36. 根据第 33 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物是 BID 多肽。
- [0058] 37. 根据第 36 项的方法, 其中, 所述 BID 多肽与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 60%, 且其中, * 为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0059] 38. 根据第 36 项的方法, 其中, 所述 BID 多肽与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 80%, 且其中, * 为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0060] 39. 根据第 36 项的方法, 其中, 所述 BID 多肽与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 95%, 且其中, * 为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0061] 40. 一种治疗需要治疗的人类患者的病症的方法, 包括:
- [0062] a) 通过多肽的两个氨基酸残基之间引入交联制备拟肽大环化合物;
- [0063] b) 测试该拟肽大环化合物是否存在免疫原性反应; 和
- [0064] c) 如果所述免疫原性反应不引起实质性的副作用, 那么向患者施用该拟肽大环化合物。
- [0065] 41. 根据第 40 项的方法, 其中, 所述免疫原性反应由啮齿类动物的体内分析中的最小抗体反应证明。
- [0066] 42. 根据第 40 项的方法, 其中, 所述病症是癌症。
- [0067] 43. 根据第 40 项的方法, 其中, 所述病症是代谢障碍。
- [0068] 44. 根据第 40 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。
- [0069] 45. 根据第 40 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。
- [0070] 46. 一种治疗需要治疗的人类患者的免疫增殖疾病的方法, 包括向患者施用拟肽大环化合物。
- [0071] 47. 根据第 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。
- [0072] 48. 根据第 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。
- [0073] 49. 根据第 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物是 BID 多肽。
- [0074] 50. 根据第 49 项的方法, 其中, 所述 BID 多肽与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 60%, 且其中, * 为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0075] 51. 根据第 49 项的方法, 其中, 所述 BID 多肽与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 80%, 且其中, * 为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0076] 52. 根据第 49 项的方法, 其中, 所述 BID 多肽与序列 DIIRNIARHLA*VGD*N1eDRSI 的同一性高于大约 95%, 且其中, * 为栓系氨基酸和 N1e 为正亮氨酸。
- [0077] 53. 根据第 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物是 BIM 多肽。
- [0078] 54. 根据第 53 项的方法, 其中, 所述 BIM 多肽与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 60%, 且其中, * 为栓系氨基酸。
- [0079] 55. 根据第 53 项的方法, 其中, 所述 BIM 多肽与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 80%, 且其中, * 为栓系氨基酸。
- [0080] 56. 根据第 53 项的方法, 其中, 所述 BIM 多肽与氨基酸序列 IWIAQELR*IGD*FNAYYARR 的同一性高于大约 95%, 且其中, * 为栓系氨基酸。
- [0081] 57. 根据第 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物减少活化 hPBL 的增殖。
- [0082] 58. 根据第 57 项的方法, 其中, 在体外 BrdU 掺入分析中, 所述拟肽大环化合物减少活化 hPBL 的增殖超过 20%。

- [0083] 59. 根据第 46 项的方法, 其中, 所述免疫增殖疾病是淋巴增殖疾病。
- [0084] 60. 根据第 1、17、24、40 或 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物中的 α -碳原子另外被式 R- 的独立取代基取代, 其中, R- 为未取代的或被卤素取代的烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基。
- [0085] 61. 根据第 60 项的方法, 其中, 交联剂与其连接的 α -碳原子另外被式 R- 的取代基取代, 其中, R- 为未取代的或被卤素取代的烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基。
- [0086] 62. 根据第 60 项的方法, 其中, 交联剂未与其连接的 α -碳原子另外被式 R- 的取代基取代, 其中, R- 为未取代的或被卤素取代的烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基。
- [0087] 63. 根据第 1、17、24、40 或 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物中的两个 α -碳原子另外被式 R- 的独立取代基取代, 其中, R- 为未取代的或被卤素取代的烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基。
- [0088] 64. 根据第 63 项的方法, 其中, 交联剂与其连接的两个 α -碳原子另外被式 R- 的独立取代基取代, 其中, R- 为未取代的或被卤素取代的烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基。
- [0089] 65. 根据第 63 项的方法, 其中, 交联剂未与其连接的两个 α -碳原子另外被式 R- 的独立取代基取代, 其中, R- 为未取代的或被卤素取代的烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基。
- [0090] 66. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, R- 是烷基。
- [0091] 67. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, R- 是甲基。
- [0092] 68. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, 所述交联剂连接两个 α -碳原子。
- [0093] 69. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, R- 与交联剂的任何部分一起形成环状结构。
- [0094] 70. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, 所述交联剂由连续的碳碳键形成。
- [0095] 71. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, 所述交联剂包含大约 9 个连续的键。
- [0096] 72. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, 所述交联剂包含大约 12 个连续的键。
- [0097] 73. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, 所述交联剂包括至少大约 6 个碳原子。
- [0098] 74. 根据第 60 或 63 项的方法, 其中, 所述交联剂包括至少大约 9 个碳原子。
- [0099] 75. 根据第 1、17、24、40 或 46 项的方法, 其中, 拟肽大环化合物与标准的治疗方法结合施用。
- [0100] 76. 根据第 75 项的方法, 其中, 所述标准的治疗方法是化学疗法。
- [0101] 77. 根据第 75 项的方法, 其中, 所述标准的治疗方法是放射疗法。
- [0102] 78. 根据第 75 项的方法, 其中, 所述标准的治疗方法是手术。
- [0103] 79. 根据第 1、17、24、40 或 46 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物是细胞渗透性的。
- [0104] 80. 根据第 24 项的方法, 其中, 所述分析在存在 10% 血清的情况下进行。
- [0105] 81. 根据第 80 项的方法, 其中, 所述血清是人血清。
- [0106] 82. 根据第 24 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物对于 Mc1-1 具有小于 10 μ M 的亲合力。

[0107] 83. 根据第 82 项的方法, 其中, 所述拟肽大环化合物拮抗 Mc1-1 和促凋亡蛋白之间的相互作用。

[0108] 84. 根据第 24 项的方法, 其中, 所述癌症对于具有大于 10 μ M 的对 Mc1-1 的亲力的化合物具有抗性。

[0109] 85. 根据第 84 项的方法, 其中, 所述癌症对于 ABT-737 或其类似物具有抗性。

[0110] 86. 一种治疗需要治疗的人类患者中的 ABT-737 抗性小细胞肺癌的方法, 包括向所述患者施用拟肽大环化合物, 其中所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。

[0111] 87. 一种治疗需要治疗的人类患者的前列腺癌的方法, 包括向所述患者施用拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物包含 BH3 结构域。

[0112] 通过引用引入

[0113] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用方式结合在本文中, 就好像各个单独的出版物、专利或专利申请明确地和单独地表明通过引用结合在本文中一样。

[0114] 附图简述

[0115] 在所附的权利要求书中详细地阐明了本发明的新特征。通过参考下面的阐述利用本发明原理的说明性实施方式的详细说明和附图, 将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解, 附图中:

[0116] 图 1 显示 24 种不同的肿瘤细胞系对于用 20 μ M 的 SP-1 治疗的敏感性。

[0117] 图 2 显示 7 种人类白血病 / 淋巴瘤细胞系对于用 5 μ M 的 SP-1 或 SP-4 治疗的敏感性。

[0118] 图 3 显示 12 种人类实体瘤细胞系对于用 20 μ M 的 SP-1 或 SP-4 治疗的敏感性。

[0119] 图 4 显示 SP-1 或 SP-4 对于多种细胞系进行测试的 EC₅₀ 曲线。

[0120] 图 5-15 描述 SP-1、SP-2、SP-3、SP-4、SP-5 和 SP-6 对于几种单独的细胞系进行测试的 EC₅₀ 曲线。

[0121] 图 16 表明 SP-1 没有诱导静息的人类外周血淋巴细胞 (hPBL) 的程序性细胞死亡。

[0122] 图 17 举例说明 SP-1 在阻止由 PMA+ 离子霉素 (ionomycin)+LPS 处理活化的 hPBL 的增殖方面与雷帕霉素一样有效。

[0123] 图 18 和 19 表明, SP-1 在 SEMK2 人白血病异种移植模型中减少肿瘤负荷。

[0124] 图 20 显示 SP-1 没有在啮齿类动物中引发抗体反应。

[0125] 图 21 说明 SP-1 非常稳定, 并在温度升高达 64°C 时保持其螺旋构象。

[0126] 图 22 描述本发明的一系列拟肽大环化合物的人血浆稳定性。

[0127] 图 23 描述本发明的一系列拟肽大环化合物的小鼠血浆稳定性。

[0128] 图 24 显示在大鼠中表现的 SP-1 和 SP-4 的药代动力学性质。

[0129] 图 25 描述了本发明的拟肽大环化合物在缺乏人血清的情况下在 Jurkat 肿瘤细胞中诱导程序性细胞死亡, 并比较了本发明的 BH3 拟肽大环化合物与 BCL-2/BCL-XL- 特异性拮抗剂 (如 ABT-737) 的效能。

[0130] 图 26 描述了在存在 10% 人血清的情况下本发明的拟肽大环化合物在 Jurkat 肿瘤细胞中诱导程序性细胞死亡, 并比较了本发明的 BH3 拟肽大环化合物与 BCL-2/BCL-XL- 特异性拮抗剂 (如 ABT-737) 的效能。

[0131] 图 27 比较本发明的几种 BH3 拟肽大环化合物与 ABT-737 对于 Bcl-X_L、Bcl-2 和 Mcl-1 的结合亲和力。

[0132] 图 28 显示拟肽大环化合物对于许多种恶性血液病的效力。

[0133] 图 29 说明对本发明组合物的治疗敏感的细胞系的不同的 Bcl-2 家族蛋白表达谱。

[0134] 图 30 比较了拟肽大环化合物与 ABT-737 在 Raji (ABT-737 抗性的伯基特淋巴瘤细胞株) 的效力。

[0135] 图 31 说明 BH3 拟肽大环化合物对于多种实体瘤细胞系的效力。

[0136] 图 32 描述了本发明的拟肽大环化合物在 ABT-737 抗性的小细胞肺癌细胞系 (NCI-H82) 中诱导程序性细胞死亡。

[0137] 图 33 显示本发明的化合物对 NOD-SCID 小鼠中 SEMK-2 肿瘤进展的抑制。

[0138] 图 34 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的卵巢肿瘤细胞系 (OVCAR8) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0139] 图 35 描绘本发明的拟肽大环化合物在 2% 人血清存在下处理的卵巢肿瘤细胞系 (OVCAR8) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0140] 图 36 描绘本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的黑素瘤细胞系 (A375) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0141] 图 37 描绘本发明的拟肽大环化合物在 2% 人血清存在下处理的黑素瘤细胞系 (A375) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0142] 图 38 描绘本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的乳腺肿瘤细胞系 (MDA-MD-231-Met) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0143] 图 39 描绘本发明的拟肽大环化合物在 2% 人血清中处理的乳腺肿瘤细胞系 (MDA-MD-231-Met) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0144] 图 40 描绘本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的前列腺肿瘤细胞系 (PC3) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0145] 图 41 描绘本发明的拟肽大环化合物在 2% 人血清中处理的前列腺肿瘤细胞系 (PC3) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0146] 图 42 描绘本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的小细胞肺癌细胞系 (NCI-H-82) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0147] 图 43 描绘了显示在对于本发明的拟肽大环化合物敏感的癌症中各种 BCL- 家族蛋白的变化的表达的蛋白质印迹分析 (Western Blot)。

[0148] 图 44 描绘在前列腺癌原位异种移植模型中小鼠治疗的时间表 (timeline)。

[0149] 图 45 描绘本发明的拟肽大环化合物在前列腺癌原位异种移植模型中的效力。

[0150] 图 46 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的 T 细胞白血病细胞系 (Jurkat) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0151] 图 47 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的混合谱系 T/B- 细胞白血病细胞系 (SEMK2) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0152] 图 48 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的 T- 细胞白血病细胞系 (MOLT-4) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0153] 图 49 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的弥漫性大 B 细胞淋巴

瘤细胞系 (DHL-6) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0154] 图 50 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的混合谱系 T/B- 细胞白血病细胞系 (RS4 ;11) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0155] 图 51 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的伯基特淋巴瘤细胞系 (Raji) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0156] 图 52 描述本发明的拟肽大环化合物在无血清条件下处理的多发性骨髓瘤细胞系 (MM1S) 中对程序性细胞死亡的诱导。

[0157] 图 53 描绘了按照治疗的动物中减少的肿瘤负荷所计量的本发明的拟肽大环化合物在 SEMK2 白血病原位异种移植模型中的效力。

[0158] 图 54 描绘了按照治疗的动物中减少的肿瘤负荷所计量的本发明的拟肽大环化合物在 SEMK2 白血病原位异种移植模型中的效力。

[0159] 图 55 描绘了按照治疗动物的提高的存活率所计量的本发明的拟肽大环化合物在 SEMK2 白血病原位异种移植模型中的效力。

[0160] 图 56 显示了如用装订的 (stapled) SP-4 肽的免疫沉淀所表明的, 本发明的拟肽大环化合物对于多发性骨髓瘤 (MM1S) 细胞裂解液中的促凋亡靶蛋白 BAX 的序列特异性和结构特异性的结合。

[0161] 发明详述

[0162] 如本文所用的, 术语“治疗” (“treating” 和 “to treat”) 意思是暂时或永久地减轻症状、消除病因, 或防止或减缓症状的出现。术语“治疗” (“treatment”) 包括缓解、消除病因 (临时或永久), 或防止与任何状况相关的症状和疾病。治疗可以是预处理, 以及症状出现时的治疗。

[0163] 术语“标准的治疗方法”是指作为对于特定适应症的治疗标准的一部分的任何治疗性的或诊断性的方法、化合物或措施。“治疗标准”可以由任何权威机构 (例如健康护理提供者或国家性或地区性的研究所) 针对临床医生对于特定类型的患者、疾病或临床情况应该遵循的任何诊断或治疗过程来建立。对于各种癌症的示例性的治疗方法标准由例如美国国家癌症研究所提供。

[0164] 如本文所用, 术语“细胞增殖疾病”包括癌症、过度增殖疾病、肿瘤疾病、免疫增殖疾病和其他疾病。“细胞增殖疾病”涉及, 具有自发生长能力的细胞, 即, 以快速增殖的细胞生长为特征的异常状态或状况。过度增殖和肿瘤疾病状态可划分为病理性的, 即表现为或构成疾病状态, 或可划分为非病理性的, 即偏离正常状态但与疾病状态无关。该术语意思是包括癌性生长或致癌过程、转移性的组织或恶性转化的细胞、组织或器官, 而无论其组织病理类型或侵袭阶段。转移性的肿瘤可以由许多原发肿瘤类型引起, 包括但不限于乳腺癌、肺癌、肝癌、结肠癌和卵巢癌起源的类型。“病理性过度增殖的”细胞发生于以恶性肿瘤生长和免疫增殖疾病为特征的状态中。非病理性过度增殖细胞的例子包括与创伤修复相关的细胞的增殖。细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括癌症, 如癌瘤、肉瘤或转移性疾病。

[0165] 用于描述细胞系和相关的癌症之间的关系术语“源自”表示, 该细胞系可以由特定大类癌症中的任何癌症建立。

[0166] 如本文所用, 术语“大环化合物”指具有包含由至少 9 个共价键合的原子形成的环或环形的化学结构的分子。

[0167] 如本文所用,术语“拟肽大环化合物”、“交联的多肽”或“装订的肽”指包含通过多个肽键连接的多个氨基酸残基和至少一个形成大环的连接体的化合物,所述连接体在第一天然存在的或非天然存在的氨基酸残基(或类似物)与同一分子中的第二天然存在的或非天然存在的氨基酸残基(或类似物)之间形成大环。拟肽大环化合物包括其中形成大环的连接体连接第一氨基酸残基(或类似物)的 α 碳和第二氨基酸残基(或类似物)的 α 碳的实施方式。拟肽大环化合物任选地包含在一个或多个氨基酸残基和/或氨基酸类似物残基之间的一个或多个非肽键,且除了形成大环化合物的任意残基外,还任选地包含一个或多个非天然存在的氨基酸残基或氨基酸类似物残基。

[0168] 如本文所用,术语“稳定性”指如通过圆二色光谱、NMR 或另一种生物物理测量法测量的本发明的拟肽大环化合物在溶液中维持特定的二级结构,或对体外或体内蛋白水解降解作用具有抗性。本发明所预期的二级结构的非限制性的例子是 α -螺旋、 β -转角和 β -折叠片(pleated sheet)。

[0169] 如本文所用,术语“螺旋稳定性”指如通过圆二色光谱或 NMR 测量的本发明的拟肽大环维持 α -螺旋结构。例如,在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物相比于对应的非交联的多肽,如通过圆二色光谱测定的在 α -螺旋度方面显示至少 1.25、1.5、1.75 或 2 倍的增加。

[0170] 术语“ α -氨基酸”或简称为“氨基酸”指含有结合到被称为 α -碳的碳上的氨基和羧基的分子。合适的氨基酸包括但不限于天然存在的氨基酸的 D- 和 L- 异构体以及通过有机合成或其他代谢途径制备的非天然存在的氨基酸。除非上下文特别地指出,本文所用的术语氨基酸包括氨基酸类似物。

[0171] 术语“天然存在的氨基酸”指自然界合成的肽中通常发现的 20 种氨基酸中的任一种,单字母缩写表示为 A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 和 V。

[0172] 术语“氨基酸类似物”或“非天然氨基酸”指其结构上类似于氨基酸,且在形成拟肽大环化合物时可代替氨基酸的分子。如本文所定义的,氨基酸类似物包括但不限于在结构上与此处所定义的氨基酸相同的化合物,除了在氨基和羧基之间包括一个或多个额外的亚甲基基团(例如, α -氨基 β -羧酸)或以类似反应性的基团取代氨基或羧基(例如,用仲胺或叔胺取代伯胺,或用酯取代羧基)以外。

[0173] “非关键”氨基酸残基是可从多肽的野生型序列(例如,BH3 结构域或 p53MDM2 结合结构域)发生改变而不消除或实质改变其基本的生物学或生物化学活性(例如,受体结合或活化)的残基。“关键”氨基酸残基是,当从多肽的野生型序列发生改变时,导致消除或基本消除多肽的主要生物学或生物化学活性的残基。

[0174] “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替代的取代。现有技术已定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,K、R、H)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,D、E)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(例如,G、N、Q、S、T、Y、C)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,A、V、L、I、P、F、M、W)、具有 β 分支的侧链的氨基酸(例如,T、V、I)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如,Y、F、W、H)。因此,例如,BH3 多肽中预测的非关键氨基酸残基优选被来自同一侧链家族的另一种氨基酸残基所替代。可接受的取代的其他例子是基于电子等排考虑(例如,正亮氨酸取代甲硫氨酸)或其他性质(如 2-噻吩丙氨酸取代苯丙氨酸)的取代。

[0175] 如本文中使用的与大环化合物或形成大环的连接体相关的术语“元”是指形成或可以形成大环化合物的原子,并且取代基或侧链原子除外。以此类推,环癸烷、1,2-二氟-环癸烷和1,3-二甲基-环癸烷都被认为是十元大环化合物,因为氢或氟取代基或甲基侧链没有参与形成大环。

[0176] 当用作分子结构的一部分时,符号“”,指单键或者反式或顺式双键。

[0177] 术语“氨基酸侧链”指连接到氨基酸中的 α -碳上的部分。例如,丙氨酸的氨基酸侧链是甲基,苯丙氨酸的氨基酸侧链是苯甲基,半胱氨酸的氨基酸侧链是硫甲基,天冬氨酸的氨基酸侧链是羧甲基,酪氨酸的氨基酸侧链是4-羟基苯甲基,等等。也包括其他非天然存在的氨基酸侧链,例如,那些自然发生的氨基酸侧链(例如,氨基酸代谢物)或合成制备的氨基酸侧链(例如, α,α -二取代的氨基酸)。

[0178] 术语“ α,α -二取代的氨基酸”指包含结合到连接两个天然或非天然的氨基酸侧链的碳(α -碳)上的氨基和羧基的分子或部分。

[0179] 术语“多肽”包括通过共价键(例如,酰胺键)结合的两个或多个天然或非天然存在的氨基酸。本文所述的多肽包括全长蛋白质(例如,完全加工的蛋白质)以及较短的氨基酸序列(例如,天然存在的蛋白质的片段或合成的多肽片段)。

[0180] 如本文所用,术语“大环化试剂”或“形成大环的试剂”指任何可以用于通过介导两个反应性基团之间的反应制备本发明的拟肽大环化合物的试剂。反应性基团可以是,例如,叠氮和炔,在这种情况下,大环化试剂包括,但不限于Cu试剂,如提供反应性的Cu(I)物质的试剂,如CuBr、CuI或CuOTf;以及可以通过加入如抗坏血酸或抗坏血酸钠的还原剂原位转化为活性Cu(I)试剂的Cu(II)盐,如Cu(CO₂CH₃)₂、CuSO₄和CuCl₂。大环化试剂可以任选地包括,例如,本领域内已知的Ru试剂,如Cp*RuCl(PPh₃)₂、[Cp*RuCl]₄或可以提供反应性的Ru(II)物质的其他Ru试剂。在其他情况下,反应性基团为末端烯类。在这样的实施方式中,大环化试剂或形成大环的试剂为复分解催化剂,包括但不限于稳定的后过渡金属卡宾络合物催化剂,如VIII族过渡金属卡宾催化剂。例如,这类催化剂为具有+2氧化态、16的电子计数和五配位的Ru和Os金属中心。在Grubbs等人,“Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis”Acc.Chem.Res.1995,28,446-452和美国专利5,811,515中公开了另外的催化剂。在再其它的情况中,反应性基团为巯基。在这样的实施方式中,大环化试剂为,例如,用两个巯基反应性基团(如卤素基团)功能化的连接体。

[0181] 术语“卤代”或“卤素”指氟、氯、溴或碘或其基团。

[0182] 术语“烷基”指含有指定数目的碳原子的直链或支链烃链。例如,C₁-C₁₀表示该基团中具有1-10(包括端值)个碳原子。在没有指定任何数值时,“烷基”是其中具有1-20(包括端值)个碳原子的链(直链或支链)。

[0183] 术语“亚烷基”指二价烷基(即,-R-)。

[0184] 术语“链烯基”指作为具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链的烃链。链烯基部分含有指定数目的碳原子。例如,C₂-C₁₀表示该基团中具有2-10(包括端值)个碳原子。术语“低级链烯基”指C₂-C₆链烯基链。在没有指定任何数值时,“链烯基”是其中具有2-20(包括端值)个碳原子的链(直链或支链)。

[0185] 术语“炔基”指作为具有一个或多个碳-碳叁键的直链或支链的烃链。炔基部分

含有指定数目的碳原子。例如, C_2-C_{10} 表示该基团中具有 2-10 (包括端值) 个碳原子。术语“低级炔基”指 C_2-C_6 炔基链。在没有指定任何数值时,“炔基”是其中具有 2-20 (包括端值) 个碳原子的链 (直链或支链)。

[0186] 术语“芳基”指 6 碳单环或 10 碳双环的芳香环系统, 其中, 各环的 0、1、2、3 或 4 个原子被取代基取代。芳基的例子包括苯基、萘基等。术语“芳基烷基”或术语“芳烷基”指被芳基取代的烷基。术语“芳基烷氧基”指被芳基取代的烷氧基。

[0187] “芳基烷基”指如上定义的芳基, 其中, 芳基的氢原子中的一个氢原子已被如上定义的 C_1-C_5 烷基取代。芳基烷基的典型例子包括, 但不限于: 2-甲基苯基、3-甲基苯基、4-甲基苯基、2-乙基苯基、3-乙基苯基、4-乙基苯基、2-丙基苯基、3-丙基苯基、4-丙基苯基、2-丁基苯基、3-丁基苯基、4-丁基苯基、2-戊基苯基、3-戊基苯基、4-戊基苯基、2-异丙基苯基、3-异丙基苯基、4-异丙基苯基、2-异丁基苯基、3-异丁基苯基、4-异丁基苯基、2-仲丁基苯基、3-仲丁基苯基、4-仲丁基苯基、2-叔丁基苯基、3-叔丁基苯基和 4-叔丁基苯基。

[0188] “芳基酰氨基”指如上定义的芳基, 其中, 芳基的氢原子中的一个氢原子已被一个或多个 $-C(O)NH_2$ 基团取代。芳基酰氨基的典型例子包括: 2- $C(O)NH_2$ -苯基、3- $C(O)NH_2$ -苯基、4- $C(O)NH_2$ -苯基、2- $C(O)NH_2$ -吡啶基、3- $C(O)NH_2$ -吡啶基和 4- $C(O)NH_2$ -吡啶基。

[0189] “烷基杂环”指如上定义的 C_1-C_5 烷基, 其中, C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个氢原子已被杂环取代。烷基杂环的典型例子包括, 但不限于: $-CH_2CH_2-$ 吗啉、 $-CH_2CH_2-$ 哌啶、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 吗啉和 $-CH_2CH_2CH_2-$ 咪唑。

[0190] “烷基酰氨基”指如上定义的 C_1-C_5 烷基, 其中, C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个氢原子已被 $-C(O)NH_2$ 基团取代。烷基酰氨基的典型例子包括, 但不限于: $-CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_3$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3-CH_3$ 和 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH=CH_2$ 。

[0191] “链烷醇 (alkanol)”指如上定义的 C_1-C_5 烷基, 其中, C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个氢原子已被羟基取代。链烷醇基团的典型例子包括, 但不限于: $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2OH$ 。

[0192] “烷基羧基”指如上定义的 C_1-C_5 烷基, 其中, C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个氢原子已被 $-COOH$ 基团取代。烷基羧基的典型例子包括, 但不限于: $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(COOH)CH_2CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2COOH$ 。

[0193] 本文所用的术语“环烷基”包括具有 3-12 个碳、优选 3-8 个碳、更优选 3-6 个碳的饱和的及部分不饱和的环烷基, 其中, 环烷基另外任选地被取代。一些环烷基包括, 但不限于: 环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基和环辛基。

[0194] 术语“杂芳基”指芳香族的 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环系统, 如果是单环, 具有 1-3 个杂原子; 如果是双环, 具有 1-6 个杂原子; 或如果是三环, 具有 1-9 个杂原子, 所述杂原子选自 O、N 或 S (例如, 如果是单环、双环或三环, 分别具有碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 杂原子), 其中, 各环的 0、1、2、3 或 4 个原子被取代基取代。杂芳基的例子包括: 吡啶基、呋喃基 (furyl 或 furanyl)、咪唑基、苯并咪唑基、噻吩基、苯硫基或噻

吩基、喹啉基 (quinolinyl)、吡啶基、噻唑基等。

[0195] 术语“杂芳基烷基”或术语“杂芳烷基”指被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”指被杂芳基取代的烷氧基。

[0196] 术语“杂芳基烷基”或术语“杂芳烷基”指被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”指被杂芳基取代的烷氧基。

[0197] 术语“杂环基”指非芳香族的 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环系统,如果是单环,具有 1-3 个杂原子;如果是双环,具有 1-6 个杂原子;或如果是三环,具有 1-9 个杂原子,所述杂原子选自 O、N 或 S(例如,如果是单环、双环或三环,分别具有碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 杂原子),其中,各环的 0、1、2 或 3 个原子被取代基取代。杂环基的例子包括哌嗪基 (piperazinyl)、吡咯烷基、二氧杂环己基 (dioxanyl)、吗啉基 (morpholinyl)、四氢呋喃基等。

[0198] 术语“取代基”指取代任何分子、化合物或部分上的另一个原子或基团(如氢原子)的基团。合适的取代基包括,但不限于:卤素、羟基、巯基、氧代、硝基、卤代烷基、烷基、烷芳基、芳基、芳烷基、烷氧基、硫代烷氧基、芳氧基、氨基、烷氧羰基、酰胺基、羧基、链烷磺酰基、烷基羰基和氰基。

[0199] 在某些实施方式中,本发明的化合物包含一个或多个不对称中心,因而作为外消旋体或外消旋混合物、单一的对映异构体、单独的非对映异构体和非对映体混合物存在。除非另外清楚地指出,本发明包括这些化合物的所有这些异构形式。在某些实施方式中,本发明的化合物也以多种互变异构形式表示,在这些情况中,本发明包括本文所述化合物的所有互变异构形式(例如,如果环系统的烷基化作用导致在多个位置烷基化,那么本发明包括所有这些反应产物)。除非另外清楚地指出,本发明包括这些化合物的所有这些异构形式。除非另外清楚地指出,本发明包括本文所述化合物的所有晶形。

[0200] 如本文所用,术语“增加”或“减少”分别意味着导致统计上显著的(即, $p < 0.1$)至少 5% 的增加或减少。

[0201] 如本文所用,提及变量的数值范围意味着表示,可以采用等于该范围内的任何值的该变量实施本发明。因此,对于本身不连续的变量,该变量等于该数值范围内的任何整数值,包括该范围的端点。类似地,对于本身连续的变量,该变量等于该数值范围内的任何实值,包括该范围的端点。举例来说,但不是限制性的,如果变量本身是不连续的,描述为具有 0-2 之间的值的变量取 0、1 或 2 的值;而如果变量本身是连续的,则取 0.0、0.1、0.01、0.001 的值或 ≥ 0 且 ≤ 2 的其他任何实值。

[0202] 如本文所用,除非另外特别地指出,单词“或”以“和/或”的包含性的含义使用,而非“任一/或”的排它性的含义。

[0203] 术语“平均”表示对于每个数据点由进行至少 3 次独立的重复而获得的平均值。

[0204] 术语“生物活性”包括本发明的大环化合物的结构和功能特性。生物活性是,例如,结构稳定性、 α -螺旋性、对于靶标的亲和性、抗蛋白水解降解的抗性、细胞渗透性,细胞内稳定性、体内的稳定性或其任何组合。

[0205] 在下面的附图和描述中阐明了本发明的一种或多种具体实施方式的细节。从说明、附图和权利要求书中可以清楚地看出本发明的其他特征、目标和优势。

[0206] 本发明的拟肽大环化合物的设计

[0207] 具有已知的包含据信赋予生物活性的螺旋结构的一级氨基酸序列的任何蛋白质或多肽是本发明的主题。例如,可以分析多肽序列,且可以在适当的位置取代包含具有与大环化试剂的反应性的基团的氨基酸类似物。所述适当的位置通过查明二级结构的哪一个(哪些)分子表面是生物活性所需要的并因此本发明的形成大环的连接体可以在哪些另外的表面上形成大环而不会空间阻断生物活性所需要的表面而确定。使用如下方法进行这样的确定:如二级结构与天然的结合配偶体之间的复合物的X-射线结晶学分析以显现对于活性关键的残基(和表面);通过二级结构中的残基的顺序诱变以在功能上确定对于活性关键的残基(和表面);或通过其他方法。通过这样的确定,适当的氨基酸用本发明的氨基酸类似物和形成大环的连接体取代。例如,对于 α -螺旋的二级结构,可能需要螺旋的一个表面(例如,沿螺旋的轴纵向地和绕螺旋的轴大约45-135°径向地延伸的分子表面)在体内或体外与另一个生物分子接触而获得生物学活性。在这种情况下,形成大环的连接体设计为连接螺旋的2个 α -碳,同时沿活性不直接需要的表面的一部分中的螺旋表面纵向地延伸。

[0208] 在本发明的某些实施方式中,肽序列源自BCL-2家族的蛋白质。BCL-2家族被定义为存在多达4个保守的BCL-2同源(BH)结构域,称为BH1、BH2、BH3和BH4,所有这些结构域均包括 α -螺旋片段(Chittenden等人(1995),EMBO 14:5589;Wang等人(1996),Genes Dev. 10:2859)。抗凋亡蛋白质(如BCL-2和BCL-X_L)在所有BH结构域中显示出序列保守性。促凋亡蛋白质被分为“多结构域”家族成员(例如,BAK、BAX),其在BH1、BH2和BH3结构域中具有同源性;和“仅BH3结构域”家族成员(例如,BID、BAD、BIM、BIK、NOXA、PUMA),其只在BH3两亲性 α -螺旋片段中包含序列同源性。BCL-2家族成员具有形成同型二聚体或异二聚体的能力,表明竞争性结合和抗凋亡蛋白质与促凋亡蛋白质水平之间的比率决定了对于死亡刺激的易感性。抗凋亡蛋白质的功能是保护细胞免于促凋亡过量,即过度的程序性细胞死亡。另外的“安全”措施包括调节促凋亡蛋白质的转录和维持它们作为无活性的构象异构体,其需要蛋白水解活化、脱磷酸化或配体诱导的构象变化以激活促死亡功能。在某些细胞类型中,在质膜处接收到的死亡信号经线粒体途径触发细胞凋亡。线粒体可以通过整合细胞色素c(活化胱天蛋白酶(caspase)9的胞质复合体的关键成分)而起到细胞死亡的看门人(gatekeeper)的作用,从而导致致死性的下游蛋白水解事件。多结构域蛋白(如BCL-2/BCL-X_L和BAK/BAX)在线粒体膜处发挥护卫者和行刑者(guardian and executioner)的互相竞争的作用,其活性进一步受上游的BCL-2家族的仅BH3成员的调节。例如,BID是促凋亡蛋白质的仅BH3结构域家族中的成员,并将在质膜处接收到的死亡信号传递给线粒体膜处的效应物促凋亡蛋白质。BID具有与促凋亡蛋白质和抗凋亡蛋白质都发生相互作用的能力,并且在经胱天蛋白酶8活化时,就触发细胞色素c释放和线粒体凋亡。缺失和诱变研究确定,促凋亡家族成员的两亲性 α -螺旋BH3片段可以作为死亡结构域发挥功能,并因此可以代表与多结构域凋亡蛋白质相互作用的关键结构基序。结构研究已证明BH3螺旋可以通过插入由BH1、2和3结构域的界面形成的疏水沟槽而与抗凋亡蛋白质相互作用。活化的BID可以被抗凋亡蛋白质(例如,BCL-2和BCL-X_L)结合和隔离,并可以触发促凋亡蛋白质BAX和BAK的活化,从而导致细胞色素c释放和线粒体凋亡程序。BAD也是仅BH3结构域促凋亡家族的成员,其表达触发BAX/BAK的活化。但是,与BID相反,BAD显示出优先结合抗凋亡家族成员BCL-2和BCL-X_L。尽管BAD BH3结构域显示与BCL-2的高亲和力结合,

但 BAD BH3 肽不能激活线粒体的体外细胞色素 c 释放,表明 BAD 不是 BAX/BAK 的直接活化剂。过度表达 BCL-2 的线粒体对 BID 诱导的细胞色素 c 释放有抗性,但与 BAD 共同处理可以恢复 BID 的敏感性。BAD 对线粒体凋亡的诱导似乎是由于:(1)BAX/BAK 活化剂(如 BID 和 BID 样蛋白质)从 BCL-2/BCL-XL 结合袋(binding pocket)中移除;或者(2)BAD 选择性占据了 BCL-2/BCL-XL 结合袋,从而阻止了 BID 样蛋白质被抗凋亡蛋白质隔离。因此,已经出现两类仅 BH3 结构域的蛋白质:直接活化线粒体凋亡的 BID 样蛋白质,和具有通过占据多结构域抗凋亡蛋白质的结合袋而使线粒体对 BID 样促凋亡剂敏化的能力的 BAD 样蛋白质。已经公开了适合本文公开的方法的 BCL-2 家族成员蛋白质的各种 α -螺旋结构域(Walensky 等人(2004),Science 305:1466;和 Walensky 等人,美国专利公开 2005/0250680,本文通过引用引入其完整内容)。

[0209] 下面给出用于本发明的合适的肽序列的非限制性示例的列表:

[0210]

名称	序列 (黑体部分=关键的残基)	交联的序列 (<u>X</u> = x-连接残基)
BH3 肽		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLA QVGD SMDSIPP	QEDIIRNIARHLA <u>XVGD</u> XMDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIG DEF NAYYAR	DNRPEIWIAQELR <u>XIGD</u> XFNAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRR MSD EFVDSFKK	NLWAAQRYGRELR <u>XMSD</u> XFVDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYER	EEQWAREIGAQLR <u>XMAD</u> XLNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL GDEL HQRTM	RSSAAQLTAARLK <u>XLGD</u> XLHQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRKIG DKV YCTW	AELPPEFAAQLR <u>XIGD</u> XVYCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIG DKVN LRQKL	VPADLKDECAQLR <u>XIGD</u> XVNLRLQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIAD QF HRLHT	QHRAEVQIARKLQXIAD <u>XF</u> HRLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL GDEL HQRT	SSAAQLTAARLK <u>XLGD</u> XLHQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIG DEM DVSLRA	CMEGSDALALRLA <u>XIGD</u> XMDVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILKKN SD WIWDWSS	DIERRKEVESILK <u>XNSD</u> XIWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL GDE LEMIRP	GRLAEVCAVLL <u>XLGD</u> XLEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIG DEL DSNMEL	PQDASTKKSECLK <u>XIGD</u> XLDSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAI GDD INRR	PSSTMGQVGRQLA <u>XIGD</u> XINRR
BCL2L1-BH3	KQALREAG DEF ELR	KQALR <u>XAGD</u> XFELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAG DD FSRR	LSPPVVHLALALR <u>XAGD</u> XFSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG DEF ELRY	EVIPMAAVKQALR <u>XAGD</u> XFELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG DEF ETRF	PADPLHQAMR <u>XAGD</u> XFETRF
MCL1-BH3	ATSRKLETLLRV GD GVQRNHETA	ATSRKLETLLR <u>XVGD</u> XVQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL GDE LEQIR	LAEVCTVLL <u>XLGD</u> XLEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRLGHENG SL DP	MTVGELSRLG <u>XENG</u> XLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSAD WV SDWS	VVEGEKEVEALK <u>XSAD</u> XVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLV IQGD DRMKL	SMARDPQRYLV <u>XQGD</u> XRMKL

[0211] 表 1 列出了靶向于 BH3 结合位点, 并与癌症、自身免疫疾病、代谢疾病和其他人类疾病状态有关的人类序列。

[0212] 表 2

[0213]

名称	序列 (黑体部分=关键的残基)	交联的序列 (X = x-连接残基)
BH3 肽		
BID-BH3	QEDIIRNIARHLAQV GDS MDRSIPP	QEDIIRNI X RHL X QV GDS MDRSIPP
BIM-BH3	DNRPEIWIAQELRRIG DEF NAYYAR	DNRPEIW X QEL X RIG DEF NAYYAR
BAD-BH3	NLWAAQRYGRELRRMS DEF VDSFKK	NLWAAQRY X REL X RMS DEF VDSFKK
PUMA-BH3	EEQWAREIGAQLRRMADDLNAQYE R	EEQWAREI X AQL X RMADDLNAQYER
Hrk-BH3	RSSAAQLTAARLKAL GDEL HQRTM	RSSAAQLT X ARL X AL GDEL HQRTM
NOXAA-BH3	AELPPEFAAQLRKIG DKV YCTW	AELPPE X AQL X KIG DKV YCTW
NOXAB-BH3	VPADLKDECAQLRRIG DKV NLRQKL	VPADLKDE X AQL X RIG DKV NLRQKL
BMF-BH3	QHRAEVQIARKLQCIADQFHLHT	QHRAEVQI X RKL X CIADQFHLHT
BLK-BH3	SSAAQLTAARLKAL GDEL HQRT	SSAAQLT X ARL X AL GDEL HQRT
BIK-BH3	CMEGSDALALRLACIG DEM DVSLRA	CMEGSDAL X LRL X CIG DEM DVSLRA
Bnip3	DIERRKEVESILKKNS DWI WDWSS	DIERRKEV X SIL X KN S DWIWDWSS
BOK-BH3	GRLAEVCAVLLRL GDE LEMIRP	GRLAEV X AVL X RL GDE LEMIRP
BAX-BH3	PQDASTKKSECLKRIG DEL DSNMEL	PQDASTKK X ECL X RIG DEL DSNMEL
BAK-BH3	PSSTMGQVGRQLAI GDD INRR	PSSTMGQV X RQL X I GDD INRR
BCL2L1-BH3	KQALREAG DEF ELR	X QAL X EAG DEF ELR
BCL2-BH3	LSPPVVHLALALRQAG GDD FSRR	LSPPVVHL X LAL X QAG GDD FSRR
BCL-XL-BH3	EVIPMAAVKQALREAG DEF ELRY	EVIPMAAV X QAL X EAG DEF ELRY
BCL-W-BH3	PADPLHQAMRAAG DEF ETRF	PADPL X QAM X AAG DEF ETRF
MCL1-BH3	ATSRKLETLRRV GDG VQRNHETA	ATSRK X ETL X RV GDG VQRNHETA
MTD-BH3	LAEVCTVLLRL GDE LEQIR	LAEV X TVL X RL GDE LEQIR
MAP-1-BH3	MTVGELSRLGHENGSLDP	MTVGEL X RAL X HENGSLDP
NIX-BH3	VVEGEKEVEALKKSADWVSDWS	VVEGEKE X EAL X KSADWVSDWS
4ICD(ERBB4)-BH3	SMARDPQRYLVIQ GDD RMKL	SMARDP X RYL X IQ GDD RMKL

[0214] 表 2 列出了靶向于 BH3 结合位点, 并与癌症、自身免疫疾病、代谢疾病和其他人类疾病状态有关的人类序列。

[0215] 本发明的拟肽大环化合物

[0216] 在本方法的一些实施方式中, 本发明的多肽包含 1 个交联 (crosslink)。在本方法的其他实施方式中, 所述多肽包含 2 个交联。在本方法的某些实施方式中, 1 个交联连接 2 个 α -碳原子。在本方法的其他实施方式中, 1 个交联连接的 1 个 α -碳原子被式 R- 的取代基取代。在本方法的另一实施方式中, 1 个交联连接的 2 个 α -碳原子被式 R- 的独立的取代基取代。在本发明的方法的一个实施方式中, R- 为烷基。例如, R- 为甲基。可选择地, R- 与 1 个交联的任何部分一起可以形成环状结构。在本方法的另一个实施方式中, 1 个交联由连续的碳碳键形成。例如, 1 个交联可以包含至少 8、9、10、11 或 12 个连续的键。在其他的实施方式中, 1 个交联可以包含至少 7、8、9、10 或 11 个碳原子。

[0217] 在本方法的另一实施方式中,交联的多肽包含 BCL-2 家族成员的 α -螺旋结构域。例如,交联的多肽包含 BH3 结构域。在其他的实施方式中,交联的多肽包含表 1、2、3 和 4 中的任何序列的至少 60%、70%、80%、85%、90% 或 95%。在本方法的某些实施方式中,交联的多肽通过能量依赖性的过程穿透细胞膜,并结合细胞内的靶标。

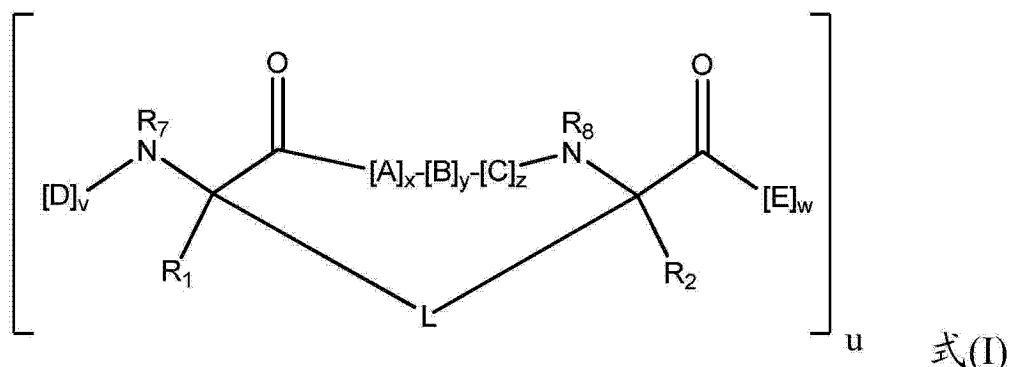
[0218] 在某些实施方式中,所述螺旋多肽包含 1 个交联。在其他的实施方式中,所述螺旋多肽包含 2 个交联。

[0219] 在某些实施方式中,1 个交联连接 2 个 α -碳原子。在其他实施方式中,1 个交联连接的 1 个 α -碳原子被式 R- 的取代基取代。在另一实施方式中,1 个交联连接的 2 个 α -碳原子被式 R- 的独立的取代基取代。在本发明的一个实施方式中,R- 为烷基。例如,R- 为甲基。可选择地,R- 与 1 个交联的任何部分一起可以形成环状结构。在另一个实施方式中,1 个交联由连续的碳碳键形成。例如,1 个交联可以包含 8、9、10、11 或 12 个连续的键。在其他的实施方式中,1 个交联可以包含至少 7、8、9、10 或 11 个碳原子。

[0220] 在另一实施方式中,交联的多肽包含 BCL-2 家族成员的 α -螺旋结构域。例如,交联的多肽包含 BH3 结构域。在其他的实施方式中,交联的多肽包含表 1、2、3 和 4 中的任何序列的至少 60%、70%、80%、85%、90% 或 95%。在某些实施方式中,交联的多肽通过能量依赖性的过程穿透细胞膜,并结合细胞内的靶标。

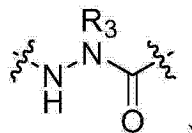
[0221] 在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物具有式 (I) :

[0222]



[0223] 其中 :

[0224] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸 ;

[0225] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、、 $-\text{NH-L}_3\text{-CO-}$ 、

$-\text{NH-L}_3\text{-SO}_2\text{-}$ 或 $-\text{NH-L}_3\text{-}$;

[0226] R_1 和 R_2 独立地是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的 ;

[0227] R_3 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选被 R_5 取代 ;

[0228] L 是式 $-\text{L}_1\text{-L}_2\text{-}$ 的形成大环的连接体 ;

[0229] L_1 和 L_2 独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $-\text{R}_4\text{-K-R}_4\text{-}$,各自任选地被 R_5 取代 ;

[0230] 各个 R_4 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

[0231] 各个 K 是 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 CO 、 CO_2 或 $CONR_3$ ；

[0232] 各个 R_5 独立地是卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0233] 各个 R_6 独立地是 $-H$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0234] R_7 是 $-H$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选被 R_5 取代，或者是与 D 残基的环状结构的一部分；

[0235] R_8 是 $-H$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选被 R_5 取代，或者是与 E 残基的环状结构的一部分；

[0236] v 和 w 各自独立地是 1-1000 的整数；

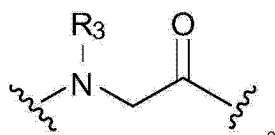
[0237] x 、 y 和 z 各自独立地是 0-10 的整数； u 是 1-10 的整数；和

[0238] n 是 1-5 的整数。

[0239] 在一个例子中， R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素取代的烷基。在另一个例子中， R_1 和 R_2 两者独立地是未取代的或被卤素取代的烷基。在某些实施方式中， R_1 和 R_2 中的至少一个是甲基。在其他的实施方式中， R_1 和 R_2 是甲基。

[0240] 在本发明的某些实施方式中， $x+y+z$ 至少是 3。在本发明的其他实施方式中， $x+y+z$ 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。独立地选择本发明的大环化合物或大环化合物前体中 A 、 B 、 C 、 D 或 E 的各具体值。例如，当 x 是 3 时，式 $[A]_x$ 代表的序列包括其中氨基酸不相同的实施方式，例如，Gln-Asp-Ala；以及其中氨基酸相同的实施方式，例如，Gln-Gln-Gln。这适用于指定范围内的 x 、 y 或 z 的任意值。

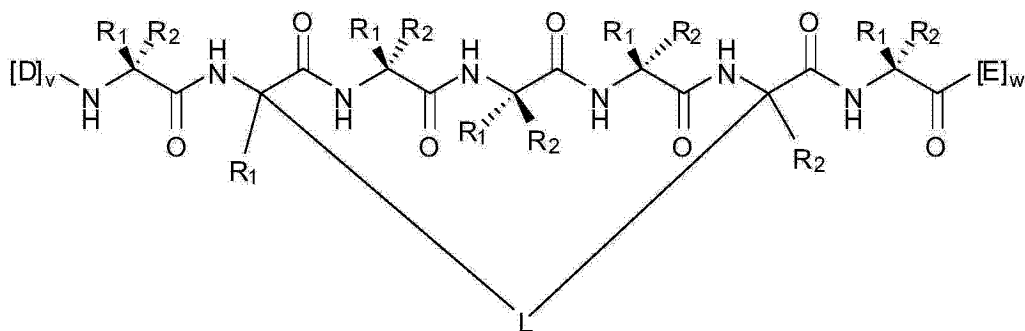
[0241] 在某些实施方式中，本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构，且 R_8 是 $-H$ ，从而允许螺旋内的氢键键合。在某些实施方式中， A 、 B 、 C 、 D 或 E 中的至少一个为 α ， α -二取代的氨基酸。在一个例子中， B 是 α ， α -二取代的氨基酸。例如， A 、 B 、 C 、 D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其他的实施方式中， A 、 B 、 C 、 D 或 E 中的至少一个为



[0242] 在其他实施方式中，选择从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测量的形成大环的连接体 L 的长度以稳定希望的二级肽结构，如由拟肽大环化合物的残基（包括但不限于位于第一 $C\alpha$ 和第二 $C\alpha$ 之间的残基）形成的 α -螺旋。

[0243] 在一个实施方式中，式 (I) 的拟肽大环化合物为：

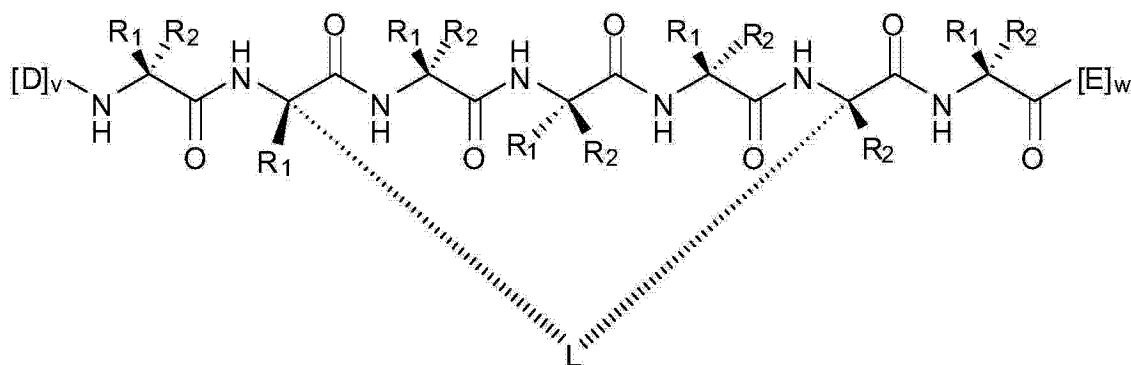
[0244]



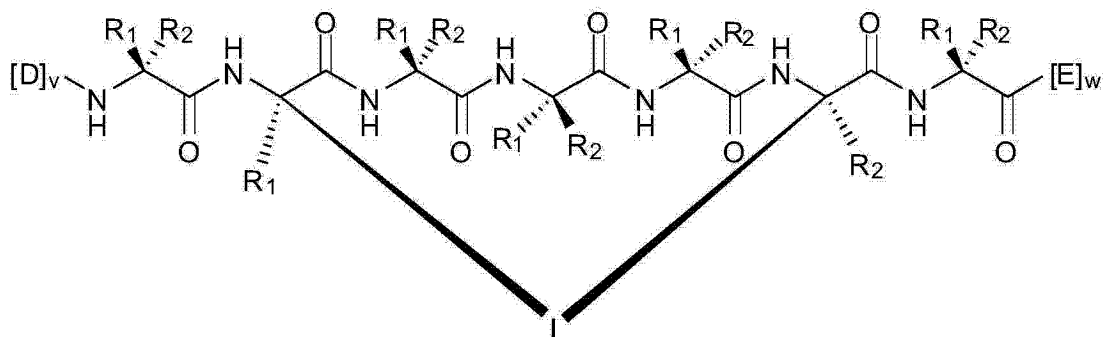
[0245] 其中, R_1 和 R_2 各自独立地是-H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的。

[0246] 在相关的实施方式中,式(I)的拟肽大环化合物为:

[0247]

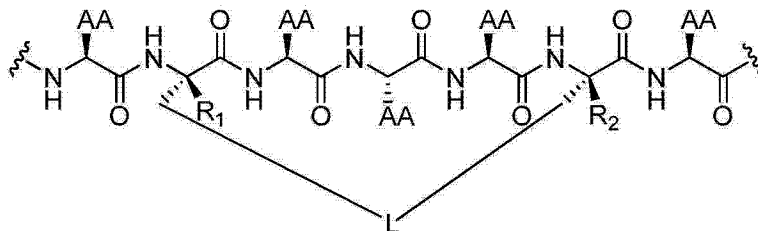


或

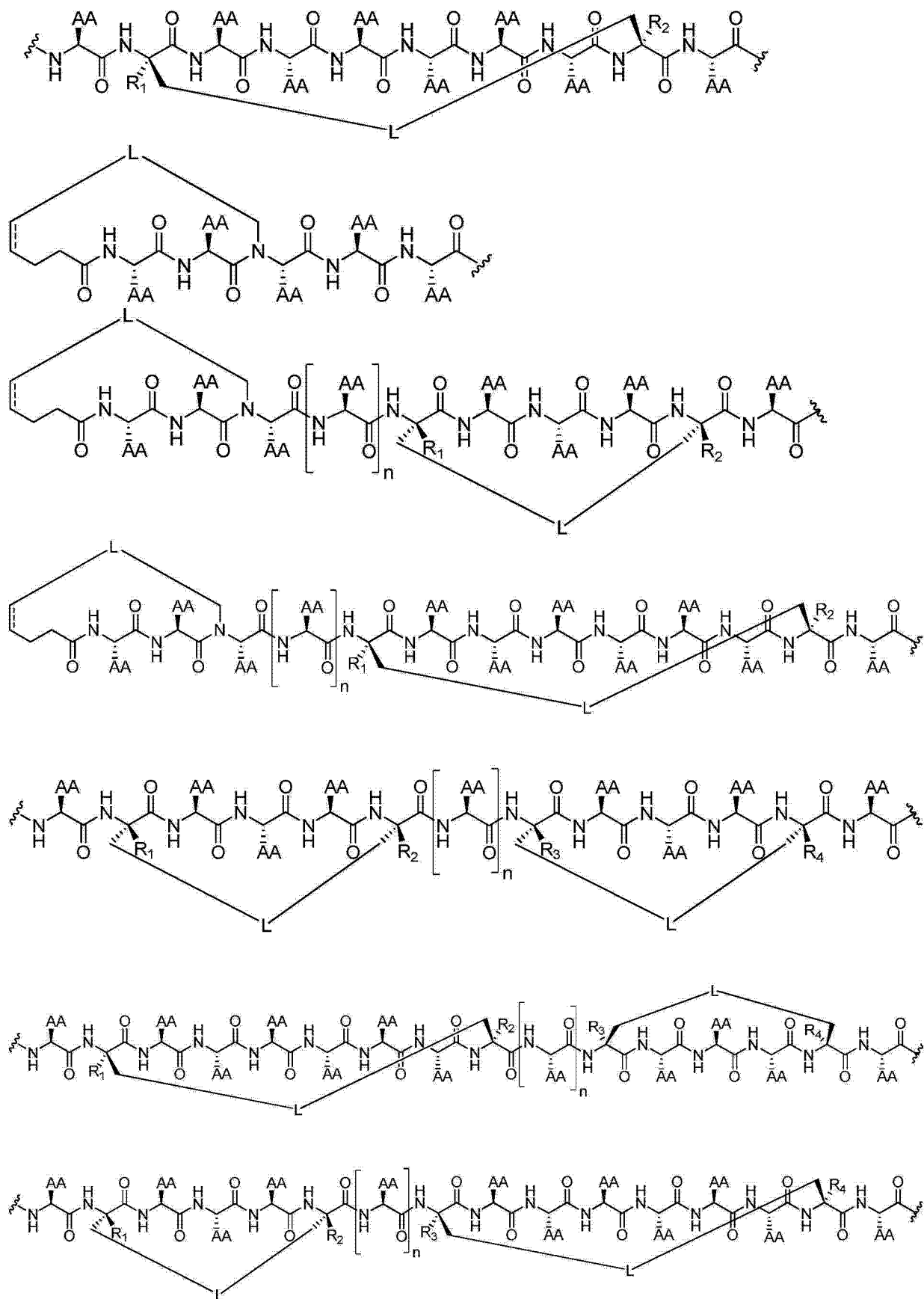


[0248] 在其他的实施方式中,式(I)的拟肽大环化合物为下面所示的任一式的化合物:

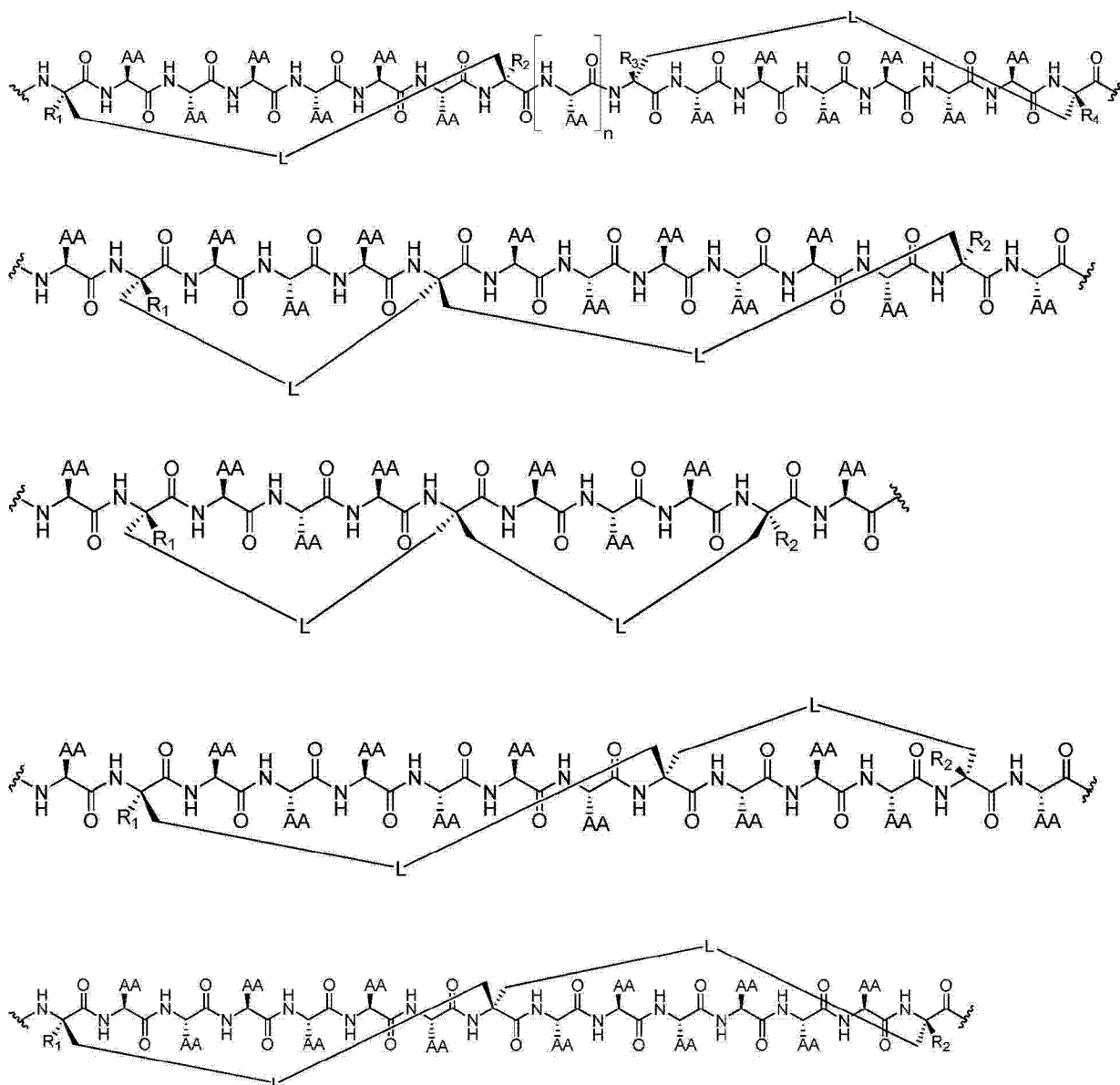
[0249]



[0250]



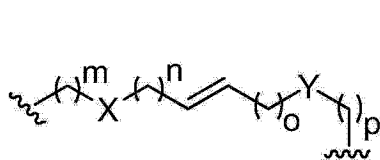
[0251]



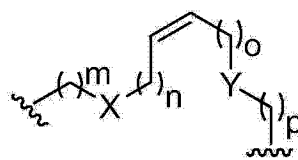
[0252] 其中,“AA”代表任何天然或非天然的氨基酸侧链,和“ --- ”为如上定义的 $[D]_v$ 、 $[E]_w$, n 是 0 和 20、50、100、200、300、400 或 500 之间的整数。在某些实施方式中, n 为 0。在其他的实施方式中, n 小于 50。

[0253] 形成大环的连接体 L 的示例性实施方式如下所示。

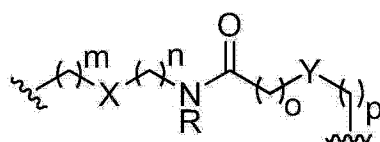
[0254]



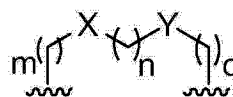
其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或NH
m, n, o, p = 0-10



其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或NH
m, n, o, p = 0-10



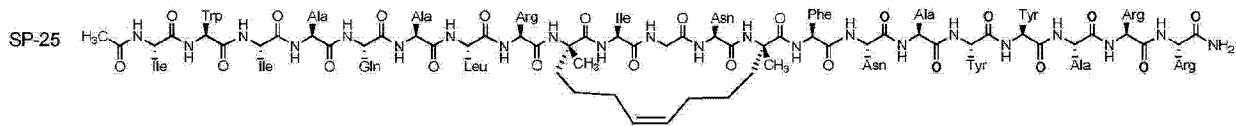
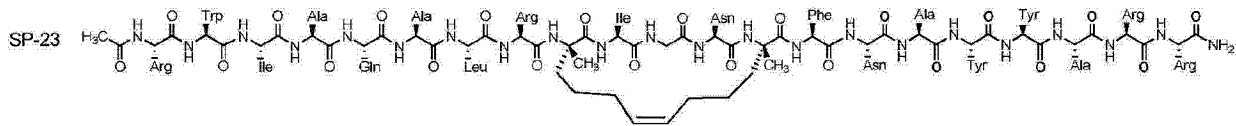
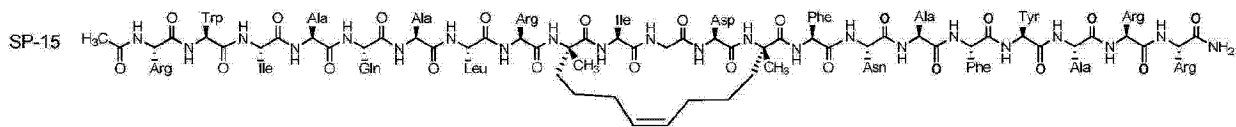
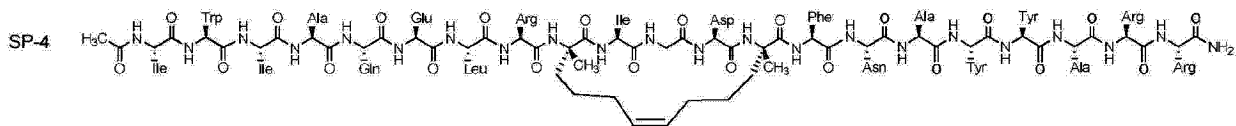
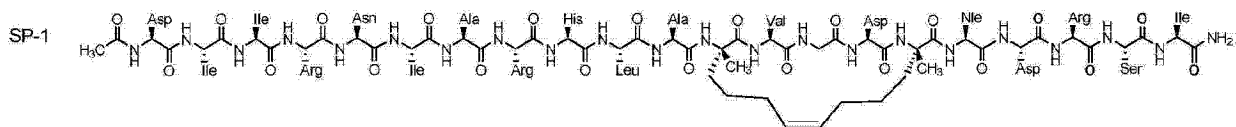
其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或NH
m, n, o, p = 0-10
R = H、烷基或其他取代基



其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或NH
m, n, o = 0-10

[0255] 本发明的拟肽大环化合物的示例性实施方式如下所示：

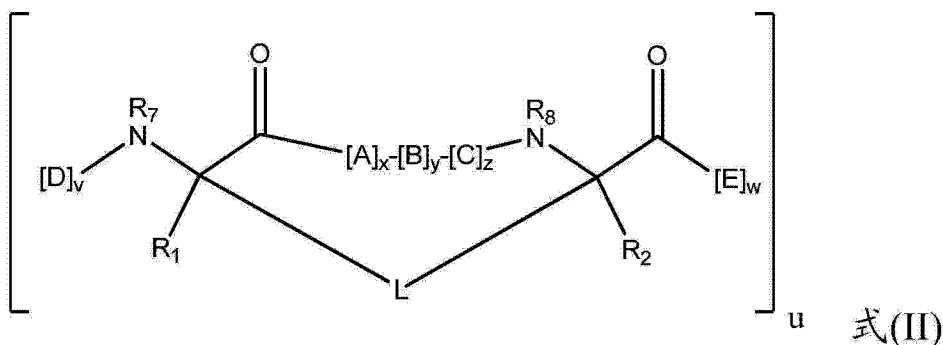
[0256]



[0257] 本发明的拟肽大环化合物的其他实施方式包括上面所示的大环化合物的类似物。

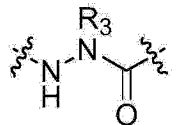
[0258] 在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物具有式 (II)：

[0259]



[0260] 其中：

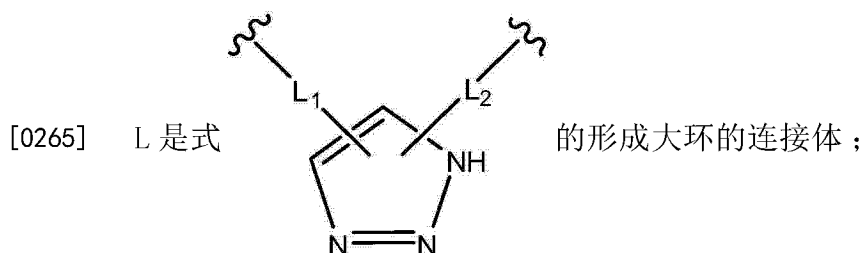
[0261] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸；

[0262] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 $-\text{[NH-L}_3\text{-CO-]}$ 、

$-\text{[NH-L}_3\text{-SO}_2\text{-]}$ 或 $-\text{[NH-L}_3\text{-]}$ ；

[0263] R_1 和 R_2 独立地是 $-\text{H}$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素取代的；

[0264] R_3 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选被 R_5 取代；



[0266] L_1 、 L_2 和 L_3 独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $-\text{[R}_4\text{-K-R}_4\text{-}]_n$ ，各自任选地被 R_5 取代；

[0267] 各个 R_4 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

[0268] 各个 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

[0269] 各个 R_5 独立地是卤素、烷基、 $-\text{OR}_6$ 、 $-\text{N}(\text{R}_6)_2$ 、 $-\text{SR}_6$ 、 $-\text{SOR}_6$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_6$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0270] 各个 R_6 独立地是 $-\text{H}$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0271] R_7 是 $-\text{H}$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选被 R_5 取代，或者是与 D 残基的环状结构的一部分；

[0272] R_8 是 $-\text{H}$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选被 R_5 取代，或者是与 E 残基的环状结构的一部分；

[0273] v 和 w 各自独立地是 1-1000 的整数；

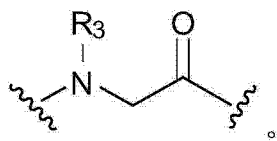
[0274] x、y 和 z 各自独立地是 0-10 的整数；u 是 1-10 的整数；和

[0275] n 是 1-5 的整数。

[0276] 在一个例子中, R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素取代的烷基。在另一个例子中, R_1 和 R_2 独立地都是未取代的或被卤素取代的烷基。在某些实施方式中, R_1 和 R_2 中的至少一个是甲基。在其他的实施方式中, R_1 和 R_2 是甲基。

[0277] 在本发明的某些实施方式中, $x+y+z$ 至少是 3。在本发明的其他实施方式中, $x+y+z$ 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。独立地选择本发明的大环化合物或大环化合物前体中 A、B、C、D 或 E 在的各具体值。例如, 当 x 是 3 时, 式 $[A]_x$ 代表的序列包括其中氨基酸不相同的实施方式, 例如, Gln-Asp-Ala; 以及其中氨基酸相同的实施方式, 例如, Gln-Gln-Gln。这适用于指定范围内的 x 、 y 或 z 的任意值。

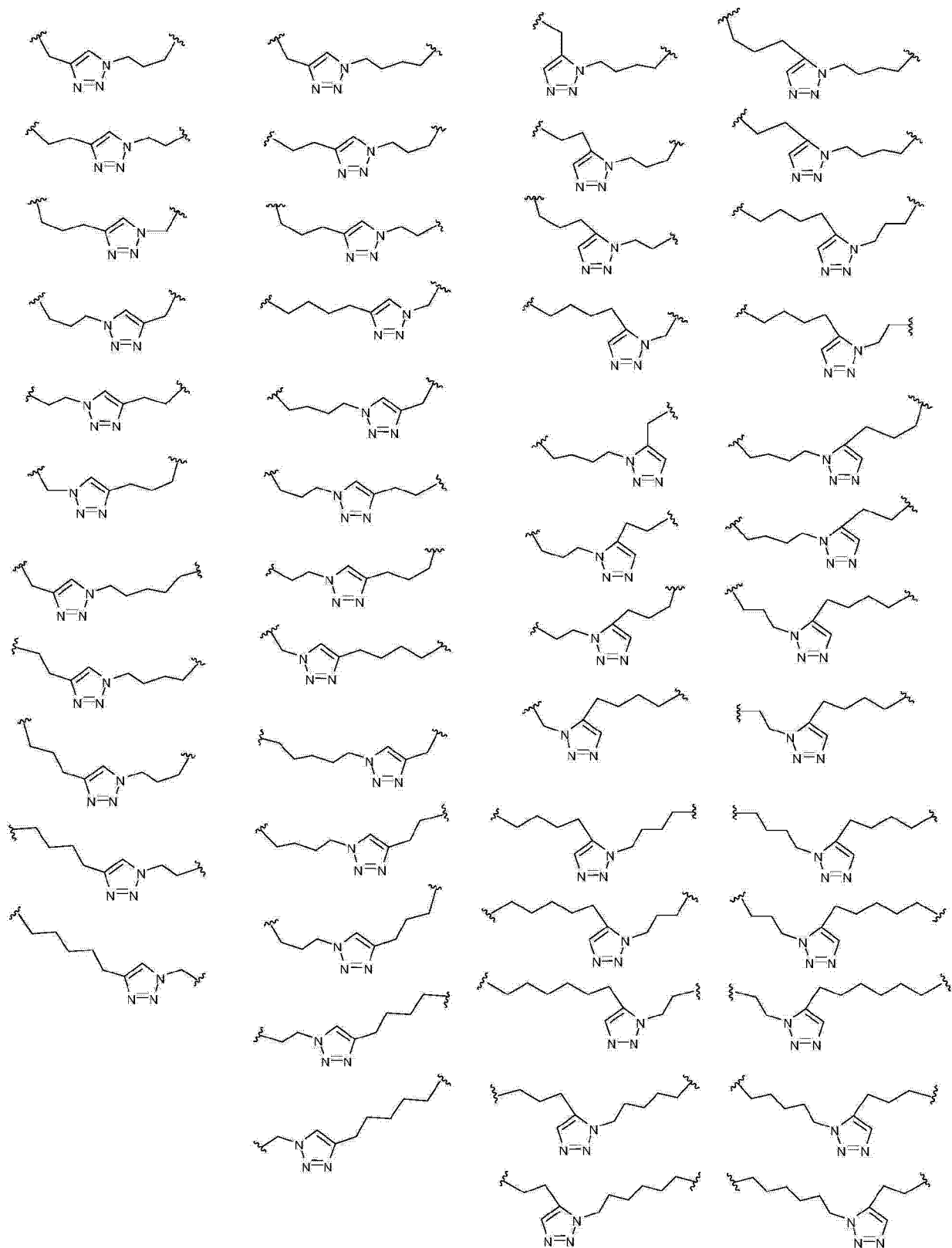
[0278] 在某些实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构, 且 R_8 是 -H, 从而允许螺旋内的氢键键合。在某些实施方式中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个例子中, B 是 α , α -二取代的氨基酸。例如, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其他的实施方式中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



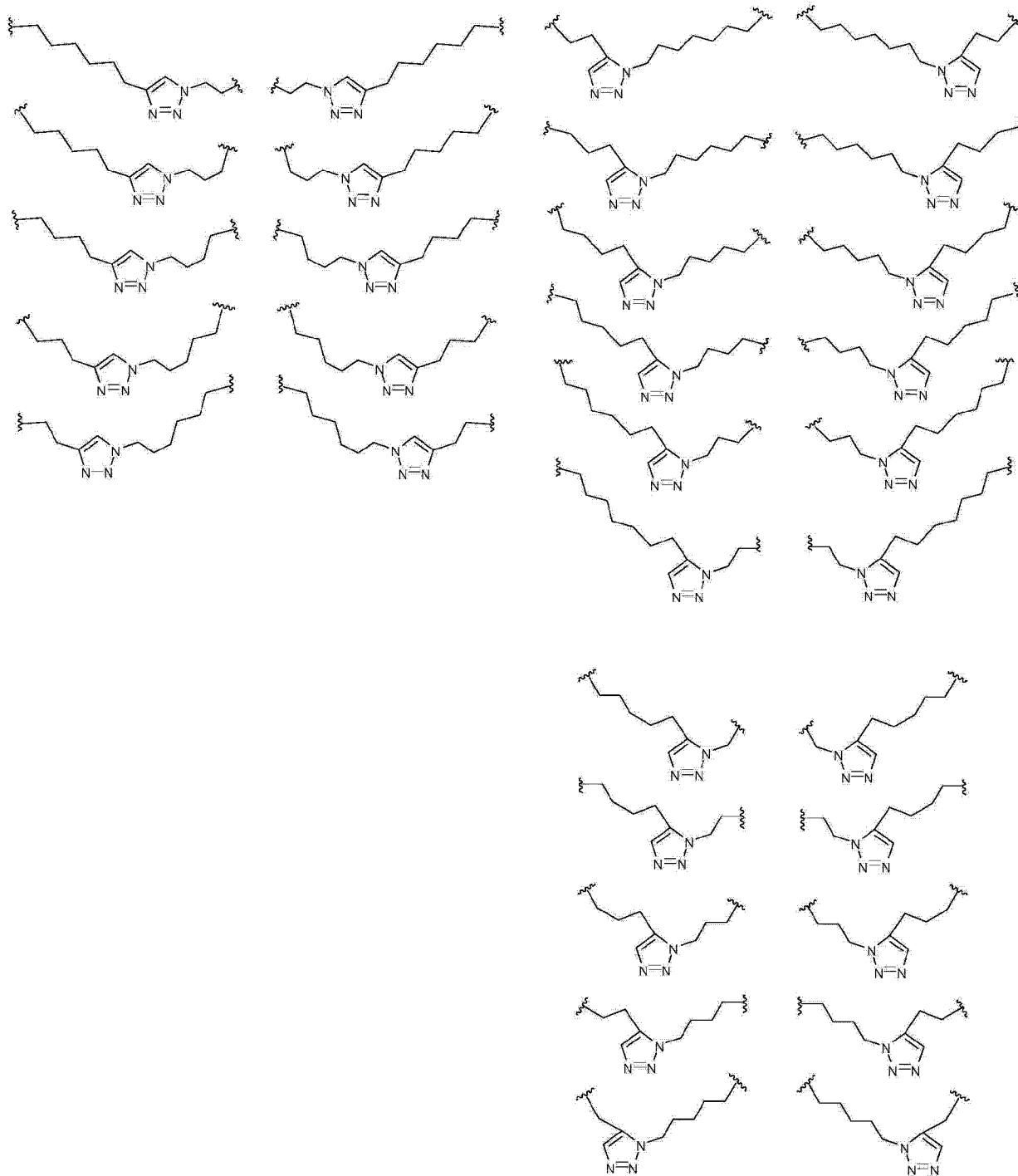
[0279] 在其他实施方式中, 选择按照从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测量的形成大环的连接体 L 的长度以稳定希望的二级肽结构, 如由拟肽大环化合物的残基 (包括但不是必须限于第一 $C\alpha$ 和第二 $C\alpha$ 之间的残基) 形成的 α -螺旋。

[0280] 形成大环的连接体 L 的示例性实施方式如下所示。

[0281]

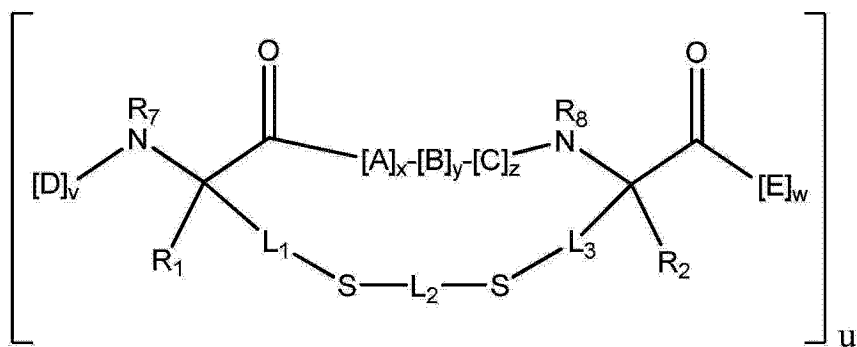


[0282]



[0283] 在其他的实施方式中,本发明提供了式(III)的拟肽大环化合物:

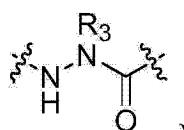
[0284]



式(III)

[0285] 其中：

[0286] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸；

[0287] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、、 $-\text{[NH-L}_4\text{-CO-]}$ 、

$-\text{[NH-L}_4\text{-SO}_2\text{-]}$ 或 $-\text{[NH-L}_4\text{-]}$ ；

[0288] R_1 和 R_2 独立地是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素取代的；

[0289] R_3 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们是未取代的或被 R_5 取代；

[0290] L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $-\text{[R}_4\text{-K-R}_4\text{-]}_n$ ，各自是未取代的或被 R_5 取代；

[0291] K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

[0292] 各个 R_4 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

[0293] 各个 R_5 独立地是卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0294] 各个 R_6 独立地是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0295] R_7 是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们是未取代的或被 R_5 取代，或者是与 D 残基的环状结构的一部分；

[0296] R_8 是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们是未取代的或被 R_5 取代，或者是与 E 残基的环状结构的一部分；

[0297] v 和 w 各自独立地是 1-1000 的整数；

[0298] x、y 和 z 各自独立地是 0-10 的整数；u 是 1-10 的整数；和

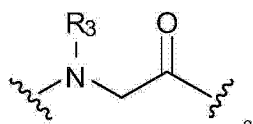
[0299] n 是 1-5 的整数。

[0300] 在一个例子中， R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素取代的烷基。在另一个例子中， R_1 和 R_2 独立地都是未取代的或被卤素取代的烷基。在某些实施方式中， R_1 和 R_2 中的至少一个是甲基。在其他的实施方式中， R_1 和 R_2 是甲基。

[0301] 在本发明的某些实施方式中，x+y+z 至少是 3。在本发明的其他实施方式中，x+y+z

是 3、4、5、6、7、8、9 或 10。独立地选择在本发明的大环化合物或大环化合物前体中 A、B、C、D 或 E 的各具体值。例如,当 x 是 3 时,式 $[A]_x$ 代表的序列包括其中氨基酸不相同的实施方式,例如, Gln-Asp-Ala; 以及其中氨基酸相同的实施方式,例如, Gln-Gln-Gln。这适用于指定范围内的 x、y 或 z 的任意值。

[0302] 在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构,且 R_8 是 -H,从而允许螺旋内的氢键键合。在某些实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个例子中,B 是 α , α -二取代的氨基酸。例如,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其他的实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



[0303] 在其他实施方式中,选择按照从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测量的形成大环的连接体 $[-L_1-S-L_2-S-L_3-]$ 的长度以稳定希望的二级肽结构,如由拟肽大环化合物的残基(包括但不限于必须限于第一 $C\alpha$ 和第二 $C\alpha$ 之间的残基)形成的 α -螺旋。

[0304] 例如,大环化合物或大环化合物前体通过溶液相或固相方法合成,且可以包含天然存在的和非天然存在的氨基酸。参见,例如, Hunt, Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids 中的 "The Non-Protein Amino Acids", 由 G. C. Barrett 编著, Chapman and Hall, 1985。在某些实施方式中,巯基部分是氨基酸残基 L-半胱氨酸、D-半胱氨酸、 α -甲基-L-半胱氨酸、 α -甲基-D-半胱氨酸、L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、 α -甲基-L-高半胱氨酸或 α -甲基-D-高半胱氨酸的侧链。双烷基化试剂具有 $X-L_2-Y$ 的通式,其中, L_2 是连接体部分,且 X 和 Y 是被 -SH 部分替代以与 L_2 形成键的离去基团。在某些实施方式中, X 和 Y 是如 I、Br 或 Cl 的卤素。

[0305] 在其他的实施方式中,为了促进细胞摄取,进一步修饰式 I、II 或 III 的化合物中的 D 和 / 或 E。在某些实施方式中,脂质化 (lipidating) 或 PEG 化 (PEGylating) 拟肽大环化合物有利于细胞摄取、提高生物利用度、增加血液循环、改变药物代谢动力学、降低免疫原性和 / 或降低需要的给药频率。

[0306] 在其他的实施方式中,式 I、II 或 III 的化合物中的 [D] 和 [E] 中的至少一个代表包含另外的形成大环的连接体的部分,使得拟肽大环化合物包含至少两个形成大环的连接体。在具体的实施方式中,拟肽大环化合物包含两个形成大环的连接体。

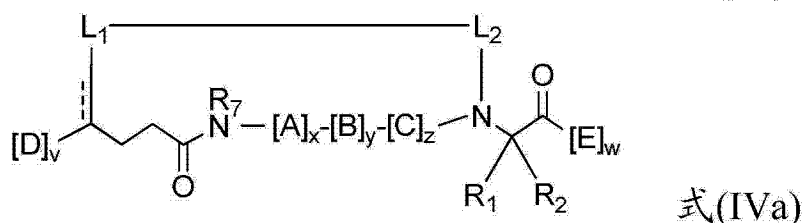
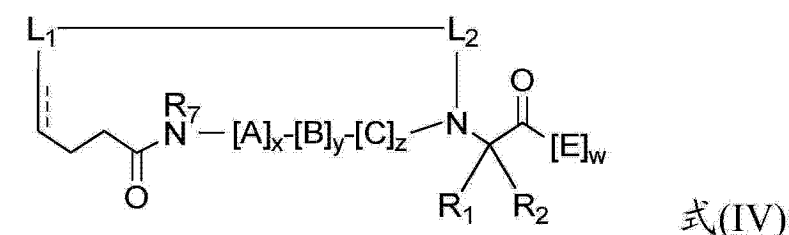
[0307] 在本发明的拟肽大环化合物中,本文所述的任何形成大环的连接体可以与表 1-4 所示的任何序列任意组合使用,也可以与本文所述的任何 R-取代基任意组合使用。

[0308] 在某些实施方式中,拟肽大环化合物包含至少一个 α -螺旋基序。例如,式 I、II 或 III 的化合物中的 A、B 和 / 或 C 包括一个或多个 α -螺旋。一般地说, α -螺旋包括 3-4 个氨基酸残基 / 圈。在某些实施方式中,拟肽大环化合物的 α -螺旋包括 1-5 个圈,因而包含 3-20 个氨基酸残基。在特定实施方式中, α -螺旋包括 1 个圈、2 个圈、3 个圈、4 个圈或 5 个圈。在某些实施方式中,形成大环的连接体稳定化包括在拟肽大环化合物内的 α -螺旋基序。因此,在某些实施方式中,选择从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 之间的形成大环的连接体 L 的长度,以提高 α -螺旋的稳定性。在某些实施方式中,形成大环的连接体跨越 α -螺旋的 1-5 个圈。在某些实施方式中,形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 1、2、3、4 或 5 个

圈。在某些实施方式中,形成大环的连接体的长度是每圈 α -螺旋的大约 $5 \text{ \AA}$ - $9 \text{ \AA}$,或每圈 α -螺旋大约 $6 \text{ \AA}$ - $8 \text{ \AA}$ 。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 1 个圈时,长度等于大约 5 个-13 个碳-碳键、大约 7 个-11 个碳-碳键或大约 9 个碳-碳键。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 2 个圈时,长度等于大约 8 个-16 个碳-碳键、大约 10 个-14 个碳-碳键或大约 12 个碳-碳键。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 3 个圈时,长度等于大约 14 个-22 个碳-碳键、大约 16 个-20 个碳-碳键或大约 18 个碳-碳键。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 4 个圈时,长度等于大约 20 个-28 个碳-碳键、大约 22 个-26 个碳-碳键或大约 24 个碳-碳键。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 5 个圈时,长度等于大约 26 个-34 个碳-碳键、大约 28 个-32 个碳-碳键或大约 30 个碳-碳键。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 1 个圈时,连接包含大约 4 个-12 个原子、大约 6 个-10 个原子或大约 8 个原子。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 2 个圈时,连接包含大约 7 个-15 个原子、大约 9 个-13 个原子或大约 11 个原子。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 3 个圈时,连接包含大约 13 个-21 个原子、大约 15 个-19 个原子或大约 17 个原子。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 4 个圈时,连接包含大约 19 个-27 个原子、大约 21 个-25 个原子或大约 23 个原子。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 5 个圈时,连接包含大约 25 个-33 个原子、大约 27 个-31 个原子或大约 29 个原子。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 1 个圈时,产生的大环形成包含大约 17 元-25 元、大约 19 元-23 元或大约 21 元的环。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 2 个圈时,产生的大环形成包含大约 29 元-37 元、大约 31 元-35 元或大约 33 元的环。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 3 个圈时,产生的大环形成包含大约 44 元-52 元、大约 46 元-50 元或大约 48 元的环。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 4 个圈时,产生的大环形成包含大约 59 元-67 元、大约 61 元-65 元或大约 63 元的环。在形成大环的连接体跨越 α -螺旋的大约 5 个圈时,产生的大环形成包含大约 74 元-82 元、大约 76 元-80 元或大约 78 元的环。

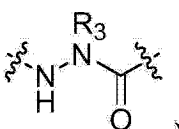
[0309] 在其他的实施方式中,本发明提供了式 (IV) 或 (IVa) 的拟肽大环化合物:

[0310]



[0311] 其中:

[0312] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸;

[0313] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 $-\text{[NH-L}_3\text{-CO-]}$ 、

$-\text{[NH-L}_3\text{-SO}_2\text{-]}$ 或 $-\text{[NH-L}_3\text{-]}$ ；

[0314] R_1 和 R_2 独立地是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素取代的，或者是与 E 残基的环状结构的一部分；

[0315] R_3 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选被 R_5 取代；

[0316] L 是式 $-\text{L}_1\text{-L}_2-$ 的形成大环的连接体；

[0317] L_1 和 L_2 独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $-\text{R}_4\text{-K-R}_4-$ ，各自任选地被 R_5 取代；

[0318] 各个 R_4 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

[0319] 各个 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

[0320] 各个 R_5 独立地是卤素、烷基、 $-\text{OR}_6$ 、 $-\text{N(R}_6)_2$ 、 $-\text{SR}_6$ 、 $-\text{SOR}_6$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_6$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0321] 各个 R_6 独立地是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

[0322] R_7 是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选被 R_5 取代；

[0323] v 是 1-1000 的整数；

[0324] w 是 1-1000 的整数；

[0325] x 是 0-10 的整数；

[0326] y 是 0-10 的整数；

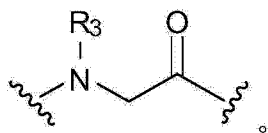
[0327] z 是 0-10 的整数；和

[0328] n 是 1-5 的整数。

[0329] 在一个例子中， R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素取代的烷基。在另一个例子中， R_1 和 R_2 独立地是未取代的或被卤素取代的烷基。在某些实施方式中， R_1 和 R_2 中的至少一个是甲基。在其他的实施方式中， R_1 和 R_2 是甲基。

[0330] 在本发明的某些实施方式中， $x+y+z$ 至少是 3。在本发明的其他实施方式中， $x+y+z$ 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。独立地选择本发明的大环化合物或大环化合物前体中 A、B、C、D 或 E 的各具体值。例如，当 x 是 3 时，式 $[\text{A}]_x$ 代表的序列包括其中氨基酸不相同的实施方式，例如，Gln-Asp-Ala；以及其中氨基酸相同的实施方式，例如，Gln-Gln-Gln。这适用于指定范围内的 x、y 或 z 的任意值。

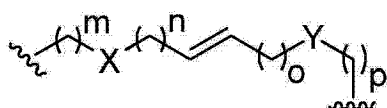
[0331] 在某些实施方式中，本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构，且 R_8 是 -H，从而允许螺旋内的氢键键合。在某些实施方式中，A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α ， α -二取代的氨基酸。在一个例子中，B 是 α ， α -二取代的氨基酸。例如，A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其他的实施方式中，A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



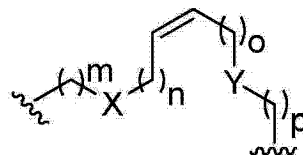
[0332] 在其他实施方式中,选择按照从第一 C α 到第二 C α 测量的形成大环的连接体 L 的长度以稳定希望的二级肽结构,如由拟肽大环化合物的残基(包括但不是必须限于第一 C α 和第二 C α 之间的残基)形成的 α -螺旋。

[0333] 形成大环的连接体 L 的示例性的实施方式如下所示。

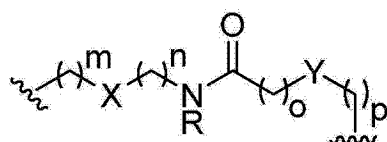
[0334]



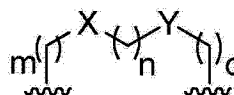
其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或 NH
m, n, o, p = 0-10



其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或 NH
m, n, o, p = 0-10



其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或 NH
m, n, o, p = 0-10
R = H、烷基或其他取代基



其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或 NH
m, n, o = 0-10

[0335] 拟肽大环化合物的制备

[0336] 本发明的拟肽大环化合物可以通过本领域已知的各种方法中的任何一种来制备。例如,表 1、2、3 或 4 中的由“X”表示的任何残基可以被能够与同一分子中的第二残基或这样的残基的前体形成交联的残基取代。

[0337] 各种实现拟肽大环化合物制备的方法是本领域已知的。例如, Schafmeister 等人, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister & Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky 等人, Science 305:1466-1470 (2004) 和美国专利 7,192,713 中描述了式 I 的拟肽大环化合物的制备。在所引用的参考文献中公开的 α , α -二取代的氨基酸和氨基酸前体可以用于拟肽大环化合物前体多肽的合成。在将这样的氨基酸掺入前体多肽中之后,末端烯烃与复分解反应催化剂反应,从而导致拟肽大环化合物的形成。

[0338] 在其他的实施方式中,本发明的拟肽大环化合物具有式 IV 或 IVa。例如,美国专利 7,202,332 描述了这样的大环化合物的制备方法。

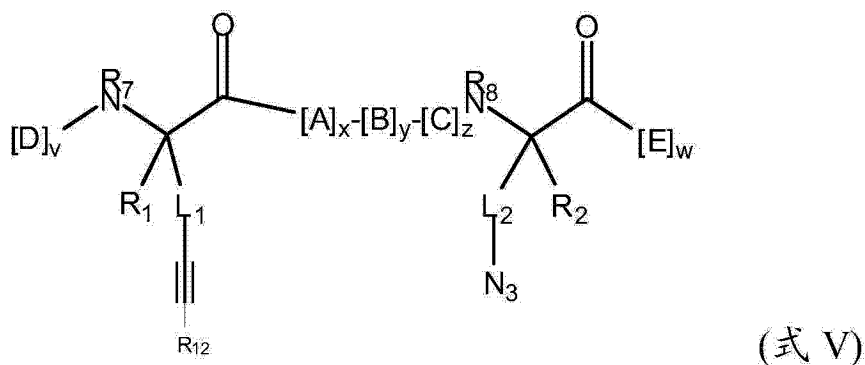
[0339] 在某些实施方式中,这些拟肽大环化合物的合成包括多步骤的过程,其特征在于:合成含有叠氮部分和炔部分的拟肽前体;接着将拟肽前体与大环化试剂接触以产生三唑连接的拟肽大环化合物。例如,大环化合物或大环化合物前体通过溶液相或固相方法

合成,且可以包含天然存在的和非天然存在的氨基酸。参见,例如, Hunt, Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids 中的 "The Non-Protein Amino Acids", 由 G. C. Barrett 编著, Chapman and Hall, 1985。

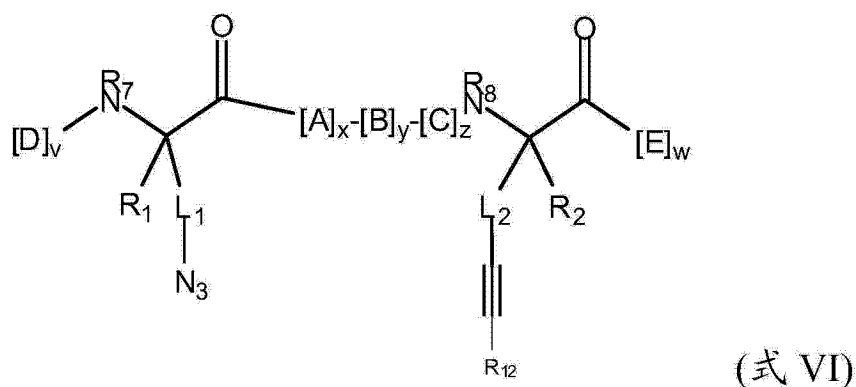
[0340] 在某些实施方式中,叠氮连接残基的 α -碳,且炔连接在另一个残基的 α -碳上。在某些实施方式中,叠氮部分是氨基酸 L-赖氨酸、D-赖氨酸、 α -甲基-L-赖氨酸、 α -甲基-D-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-鸟氨酸、 α -甲基-L-鸟氨酸或 α -甲基-D-鸟氨酸的叠氮基类似物。在另一种实施方式中,炔部分是 L-炔丙基甘氨酸。在更其他的实施方式中,炔部分是选自以下的氨基酸:L-炔丙基甘氨酸、D-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸和 (R)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸。

[0341] 在某些实施方式中,本发明提供了一种合成拟肽大环化合物的方法,该方法包括将式 V 或式 VI 的拟肽前体与大环化试剂接触的步骤:

[0342]



[0343]



[0344] 其中, v 、 w 、 x 、 y 、 z 、 A 、 B 、 C 、 D 、 E 、 R_1 、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 L_1 和 L_2 如上文所定义;当大环化试剂是 Cu 试剂时, R_{12} 是 $-H$, 且当大环化试剂是 Ru 试剂时, R_{12} 是 $-H$ 或烷基;而且进一步,其中,所述接触步骤导致在式 III 或式 IV 中的炔部分和叠氮部分之间形成共价连接。例如,当大环化试剂是 Ru 试剂时, R_{12} 可以是甲基。

[0345] 在本发明的拟肽大环化合物中, R_1 和 R_2 中的至少一个是烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的。在某些实施方式中, R_1 和 R_2 独立地是烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或

杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的。在某些实施方式中,A、B、C、D或E中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个例子中,B是 α , α -二取代的氨基酸。例如,A、B、C、D或E中的至少一个为2-氨基异丁酸。

[0346] 例如, R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素取代的烷基。在另一个例子中, R_1 和 R_2 独立地是未取代的或被卤素取代的烷基。在某些实施方式中, R_1 和 R_2 中的至少一个是甲基。在其他的实施方式中, R_1 和 R_2 是甲基。大环化试剂可能是Cu试剂或Ru试剂。

[0347] 在某些实施方式中,在接触步骤之前纯化拟肽前体。在其他的实施方式中,在接触步骤之后纯化拟肽大环化合物。在更其他的实施方式中,拟肽大环化合物在接触步骤之后重折叠。本方法可以在溶液中进行,或者,可选择地,本方法可以在固体载体上进行。

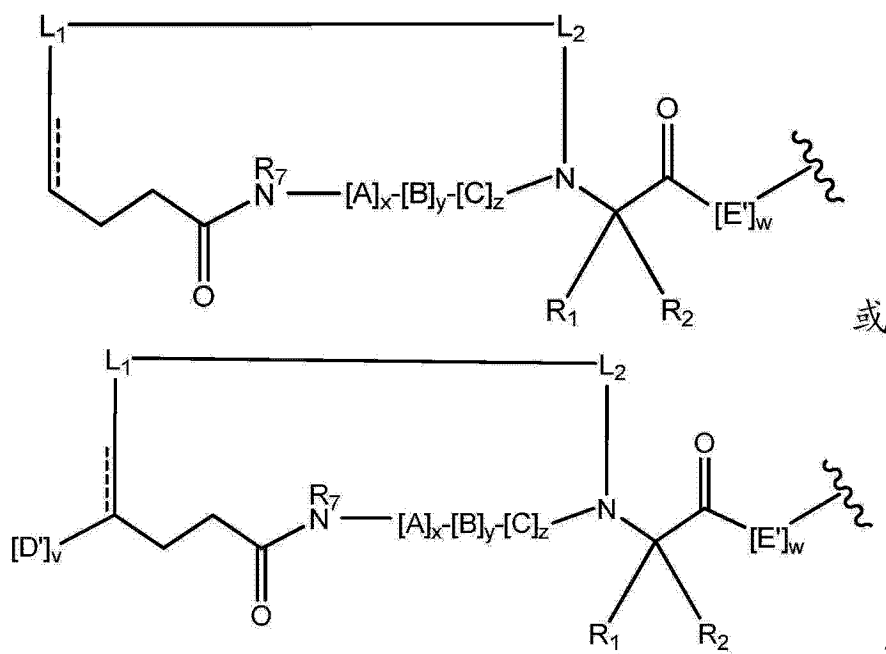
[0348] 本文也预想,在结合拟肽前体或拟肽大环化合物的目标大分子的存在下,在有利于所述结合的条件下进行本发明的方法。在某些实施方式中,在优先结合拟肽前体或拟肽大环化合物的目标大分子的存在下,在有利于所述结合的条件下进行本发明的方法。本方法也可应用于合成拟肽大环化合物的文库。

[0349] 在某些实施方式中,式V或式VI的拟肽前体的炔部分是选自以下的氨基酸的侧链:L-炔丙基甘氨酸、D-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸和(R)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸。在其他的实施方式中,式V或式VI的拟肽前体的叠氮部分是选自以下的氨基酸的侧链: ϵ -叠氮基-L-赖氨酸、 ϵ -叠氮基-D-赖氨酸、 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸、 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸、 δ -叠氮基- α -甲基-L-鸟氨酸和 δ -叠氮基- α -甲基-D-鸟氨酸。

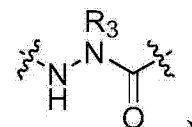
[0350] 在某些实施方式中, $x+y+z$ 为3,且A、B和C独立地是天然或非天然的氨基酸。在其他的实施方式中, $x+y+z$ 为6,且A、B和C独立地是天然或非天然的氨基酸。

[0351] 在本发明的拟肽大环化合物的某些实施方式中, $[D]_v$ 和/或 $[E]_w$ 包含另外的拟肽大环化合物或大环结构。例如, $[D]_v$ 可能具有下式:

[0352]



[0353] 其中, A、C、D' 和 E' 各自独立地是天然或非天然的氨基酸;

[0354] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 $-\text{[NH-L}_3\text{-CO-]}$ 、
 $-\text{[NH-L}_3\text{-SO}_2\text{-]}$ 或 $-\text{[NH-L}_3\text{-]}$;

[0355] R_1 和 R_2 独立地是 $-\text{H}$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基, 它们是未取代的或被卤素取代的, 或者是与 E 残基的环状结构的一部分;

[0356] R_3 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基, 它们任选被 R_5 取代;

[0357] L_1 和 L_2 独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $-\text{[R}_4\text{-K-R}_4\text{-]}_n$, 各自任选地被 R_5 取代;

[0358] 各个 R_4 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

[0359] K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

[0360] 各个 R_5 独立地是卤素、烷基、 $-\text{OR}_6$ 、 $-\text{N(R}_6\text{)}_2$ 、 $-\text{SR}_6$ 、 $-\text{SOR}_6$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_6$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

[0361] 各个 R_6 独立地是 $-\text{H}$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

[0362] R_7 是 $-\text{H}$ 、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基, 它们任选地被 R_5 取代;

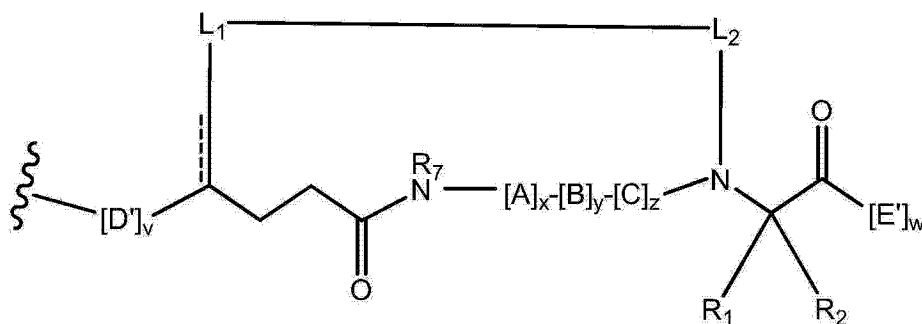
[0363] v 是 1-1000 的整数;

[0364] w 是 1-1000 的整数; 和

[0365] x 是 0-10 的整数。

[0366] 在另一实施方式中, $[\text{E}]_w$ 具有下式:

[0367]



[0368] 其中,取代基如上文定义。

[0369] 在某些实施方式中,接触步骤在选自质子溶剂、水性溶剂、有机溶剂及其混合物的溶剂中进行。例如,溶剂可以选自 H_2O 、THF、THF/ H_2O 、tBuOH/ H_2O 、DMF、DIPEA、 CH_3CN 或 CH_2Cl_2 、 $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 或其混合物。溶剂可以是有利于螺旋形成的溶剂。

[0370] 替换可选择的但等效的保护基团、离去基团或试剂,并按照可选择的序列或顺序进行特定的合成步骤,以产生需要的化合物。在合成本文所述的化合物中有用的合成化学转化和保护基团方法(保护和去保护)包括,例如,那些例如在 Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers(1989); Greene 和 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第 2 版, John Wiley and Sons(1991); Fieser 和 Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1994); 和 Paquette 编著, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1995) 及其后续的版本中所述的方法。

[0371] 例如,通过化学合成方法,如 Fields 等人, Synthetic Peptides: A User's Guide 中的第 3 章, Grant, W. H. 编著, Freeman & Co., New York, N. Y., 1992, 第 77 页中所述的方法,制备本发明的拟肽大环化合物。因此,例如,利用具有通过 tBoc 或 Fmoc 化学保护的胺的自动化 Merrifield 固相合成技术,在例如自动肽合成仪(例如, Applied Biosystems (Foster City, CA), 430A、431 或 433 型)上使用侧链保护的氨基酸合成肽。

[0372] 本文描述的一种产生本文所述的拟肽前体和拟肽大环化合物的方式使用固相肽合成(SPPS)。经与连接体分子的酸不稳定的键,将 C-末端氨基酸连接到交联的聚苯乙烯树脂上。这种树脂不溶于用于合成的溶剂,从而使得洗去过量的试剂和副产物相对简单和快速。用在酸中稳定、但可用碱去除的 Fmoc 基团保护 N-末端。如必要的话,用碱稳定的、酸不稳定的基团保护侧链官能团。

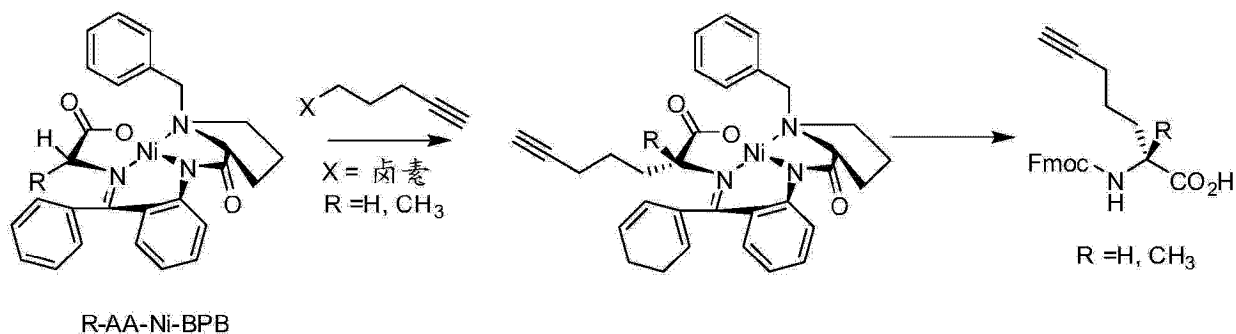
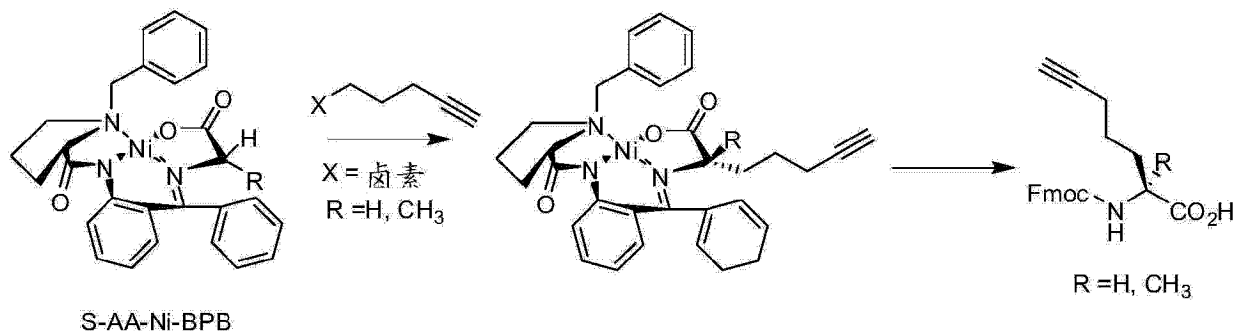
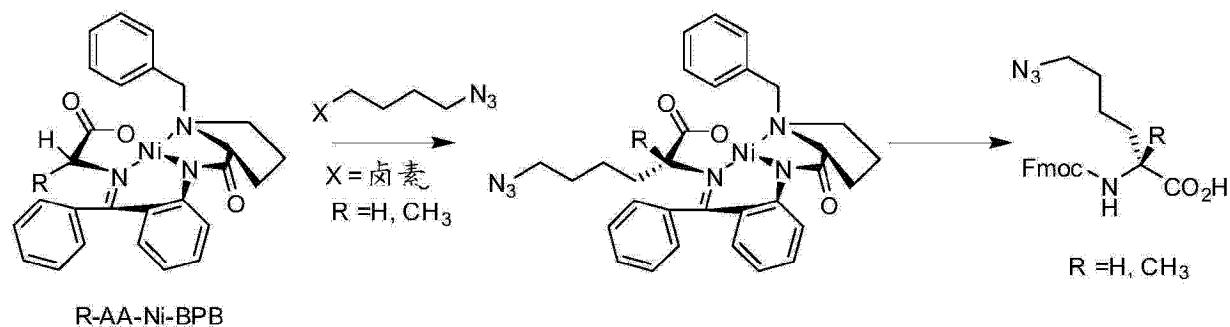
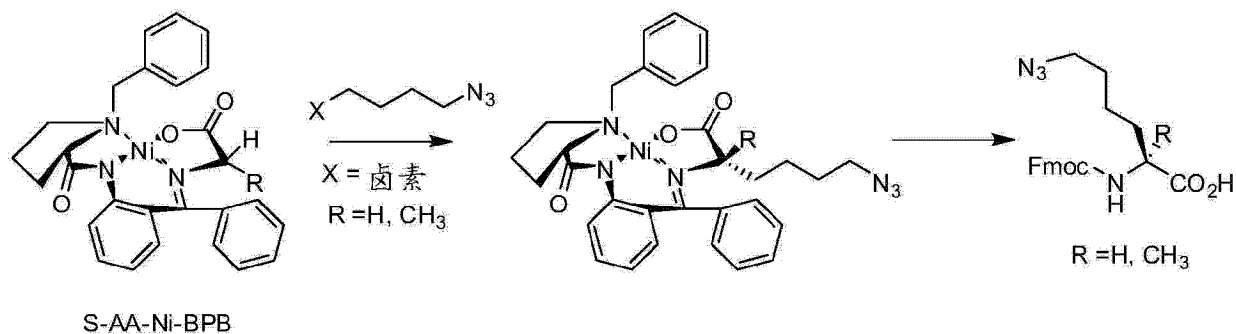
[0373] 例如,使用天然的化学连接通过结合单个的合成肽产生较长的拟肽前体。或者,通过众所周知的重组 DNA 和蛋白质表达技术生物合成较长的合成肽。众所周知的标准手册中提供了这些技术的详细方案。为了构建编码本发明的拟肽前体的基因,逆向翻译氨基酸序列以获得编码该氨基酸序列的核酸序列,优选使用对于将表达该基因的有机体优化的密码子。接下来,如果必要的话,通常通过合成编码肽的寡核苷酸和任何调节元件制备合成的基因。将合成的基因插入合适的克隆载体,并转染到宿主细胞中。然后在适用于选择的表达系统和宿主的合适条件下表达该肽。通过标准方法纯化并鉴定该肽。

[0374] 例如,使用例如高通量多通道组合合成仪(例如,来自 CreoSalus, Louisville, KY 的 Thuramed TETRAS 多通道肽合成仪或来自 AAPPTec, Inc., Louisville, KY 的 Apex 396 型多通道肽合成仪)以高通量的组合方式制备拟肽前体。

[0375] 提供了下面的合成方案仅用于说明本发明, 而并非意在限制本文所述的本发明的范围。为了简化图形, 示例性的方案显示了叠氮基氨基酸类似物 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸和 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸, 及炔基氨基酸类似物 L-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸和 (S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸。因此, 在下面的合成方案中, 各个 R_1 、 R_2 、 R_7 和 R_8 是 -H; 各个 L_1 是 $-(CH_2)_4-$; 且各个 L_2 是 $-(CH_2)-$ 。但是, 如以上整个发明详述部分所指出的, 可以采用许多其他的氨基酸类似物, 其中, R_1 、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 L_1 和 L_2 可以独立地选自本文公开的各种结构。

[0376] 合成方案 1:

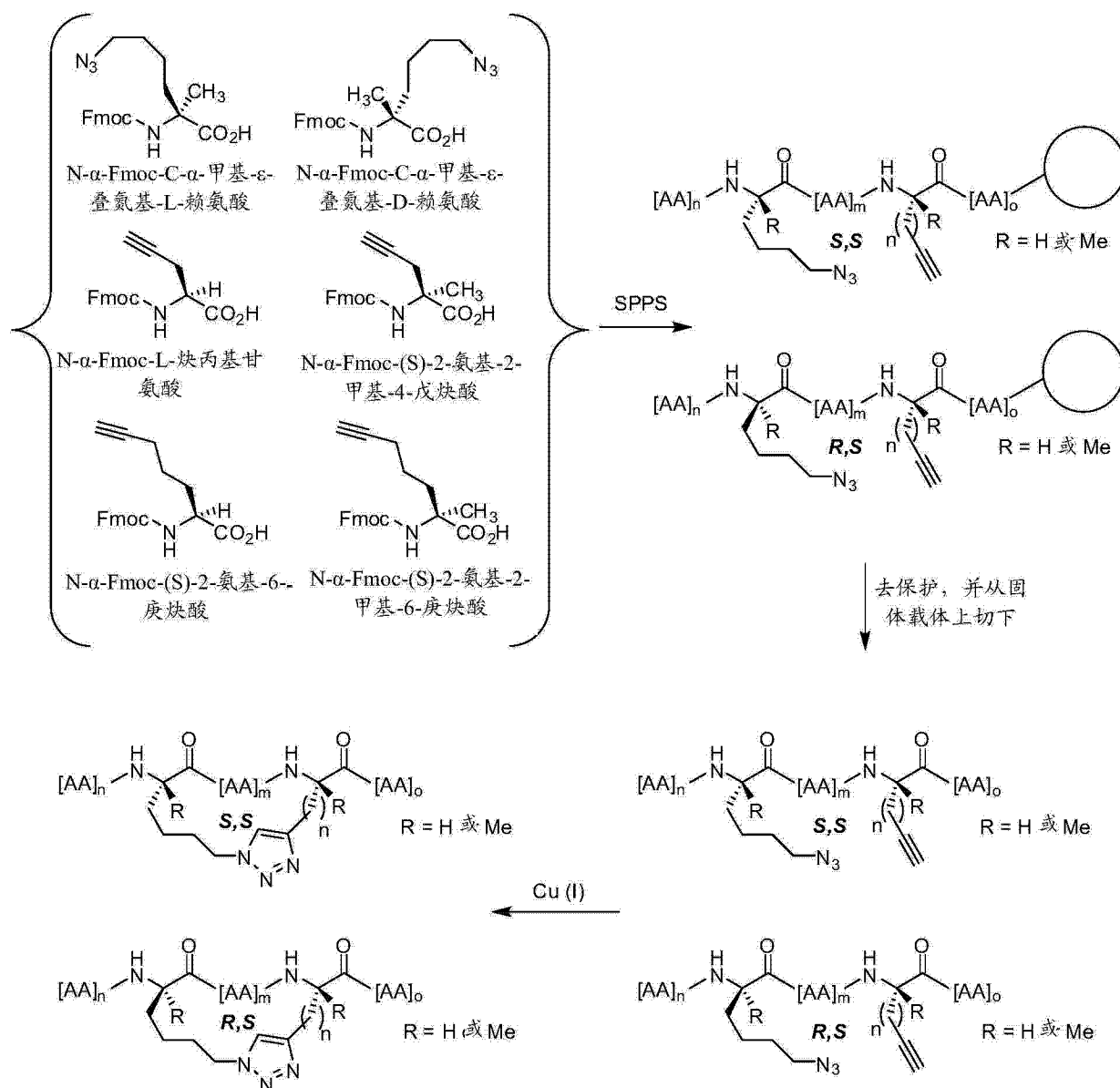
[0377]



[0378] 合成方案 1 描述了本发明的几种化合物的制备。如 Belokon 等人 (1998), Tetrahedron Asymm. 9:4249-4252 所述制备由手性辅剂 (S)-2-[N-(N'-苄基脯氨酰基) 氨基] 苯甲酮 (BPB) 得来的席夫碱 (Schiff bases) 和氨基酸 (如甘氨酸或丙氨酸) 的 Ni(II) 复合物。产生的复合物随后与包含叠氮部分或炔部分的烷基化试剂反应以产生本发明的光学异构富集的 (enantiomerically enriched) 化合物。如需要, 产生的化合物可以进行保护以用于肽合成。

[0379] 合成方案 2:

[0380]

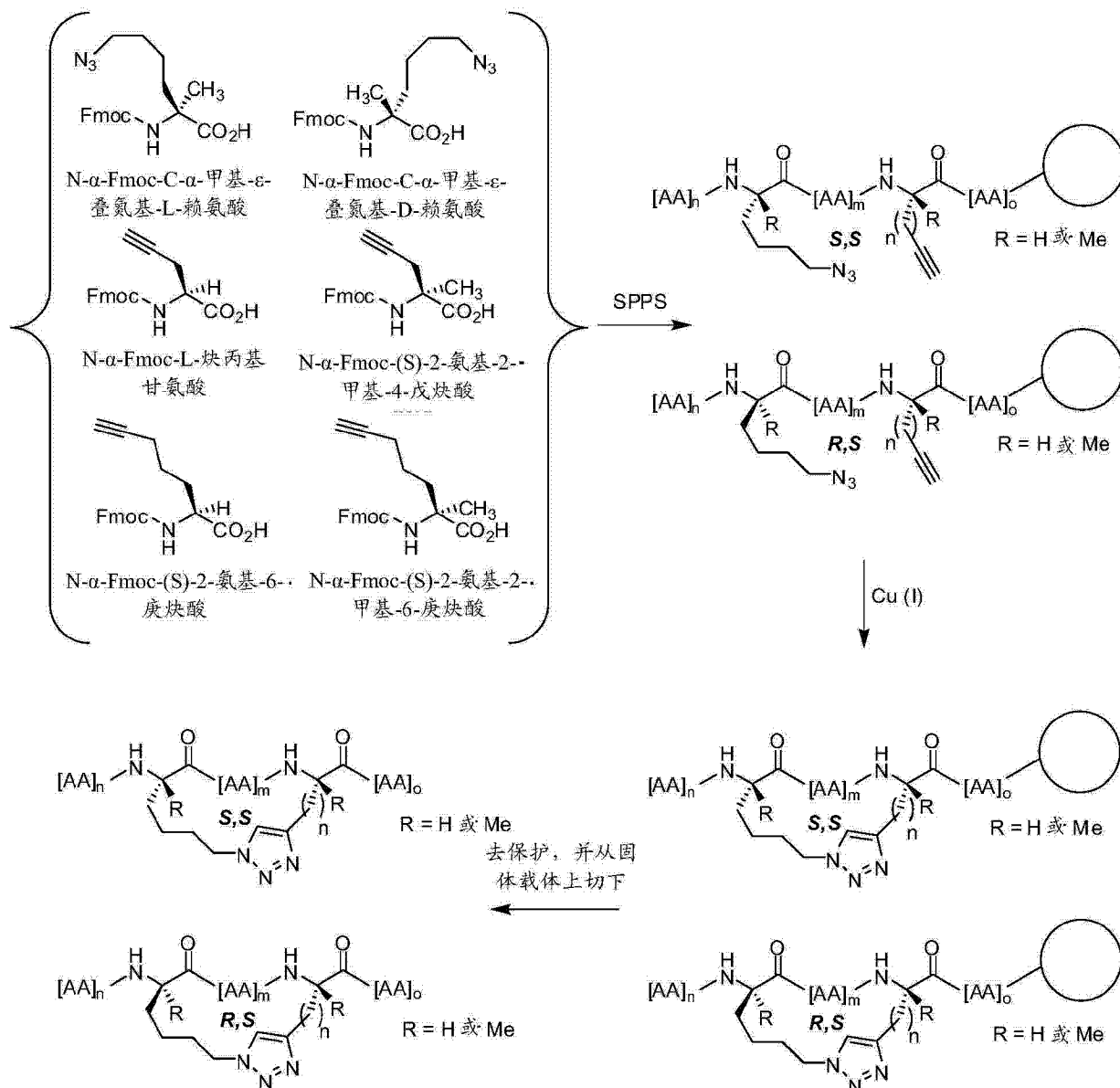


[0381] 在如合成方案 2 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中, 拟肽前体包含叠氮部分和炔部分, 且使用可商购的氨基酸 N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的 N- α -Fmoc 保护的形式通过溶液相或固相肽合成法 (SPPS) 来合成。然后通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 将拟肽前体去保护并从固相树脂上切下。拟肽前体以粗制混合物进行反应, 或者在有机溶液或

水性溶液中在与大环化试剂(如 Cu(I)) 反应前进行纯化(Rostovtsev 等人(2002), Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; Tornøe 等人(2002), J. Org. Chem. 67:3057-3064; Deiters 等人(2003), J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783; Punna 等人(2005), Angew. Chem. Int. Ed. 44:2215-2220)。在一种实施方式中,在有利于 α -螺旋形成的条件下进行三唑形成反应。在一种实施方式中,在选自 H_2O 、THF、 CH_3CN 、DMF、DIPEA、tBuOH 或其混合物的溶剂中进行大环化步骤。在另一种实施方式中,在 DMF 中进行大环化步骤。在某些实施方式中,在缓冲的水性溶剂或部分水性溶剂中进行大环化步骤。

[0382] 合成方案 3:

[0383]

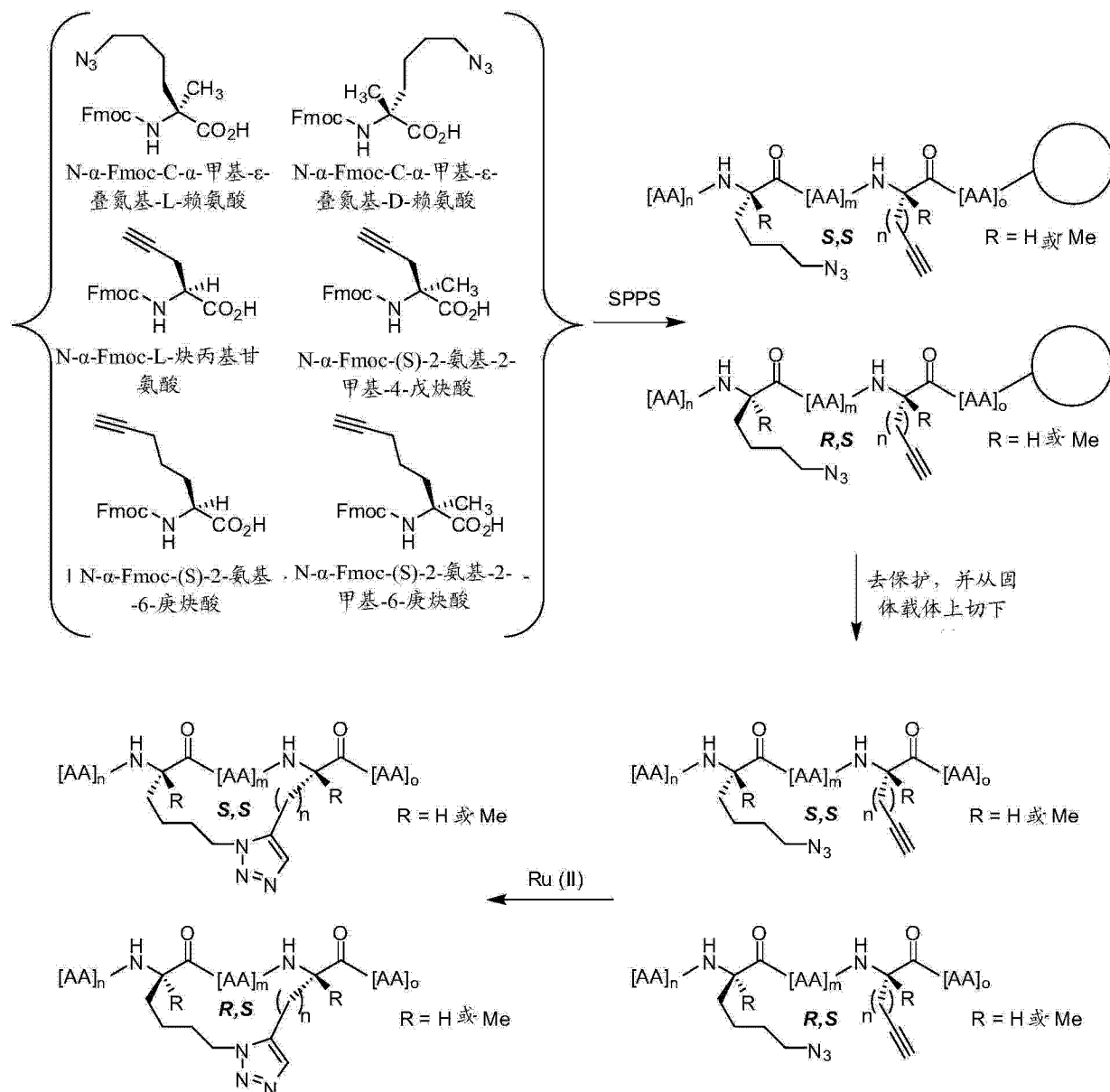


[0384] 在如合成方案 3 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中,拟肽前体包含叠氮部分和炔部分,且使用可商购的氨基酸 N - α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、 N -甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N -甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的 N - α -Fmoc 保护的形式通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成。拟肽前体作为粗制混合物与树脂上的大环化试

剂 (如 Cu(I) 试剂) 反应 (Rostovtsev 等人 (2002), Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; Tornoe 等人 (2002), J. Org. Chem. 67:3057-3064; Deiters 等人 (2003), J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783; Punna 等人 (2005), Angew. Chem. Int. Ed. 44:2215-2220)。然后通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 将合成的含三唑的拟肽大环化合物去保护并从固相树脂上切下。在某些实施方式中, 在选自 CH_2Cl_2 、 $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、DMF、THF、NMP、DIPEA、2, 6-二甲基吡啶、吡啶、DMSO、 H_2O 或其混合物的溶剂中进行大环化步骤。在某些实施方式中, 在缓冲的水性溶剂或部分水性溶剂中进行大环化步骤。

[0385] 合成方案 4:

[0386]

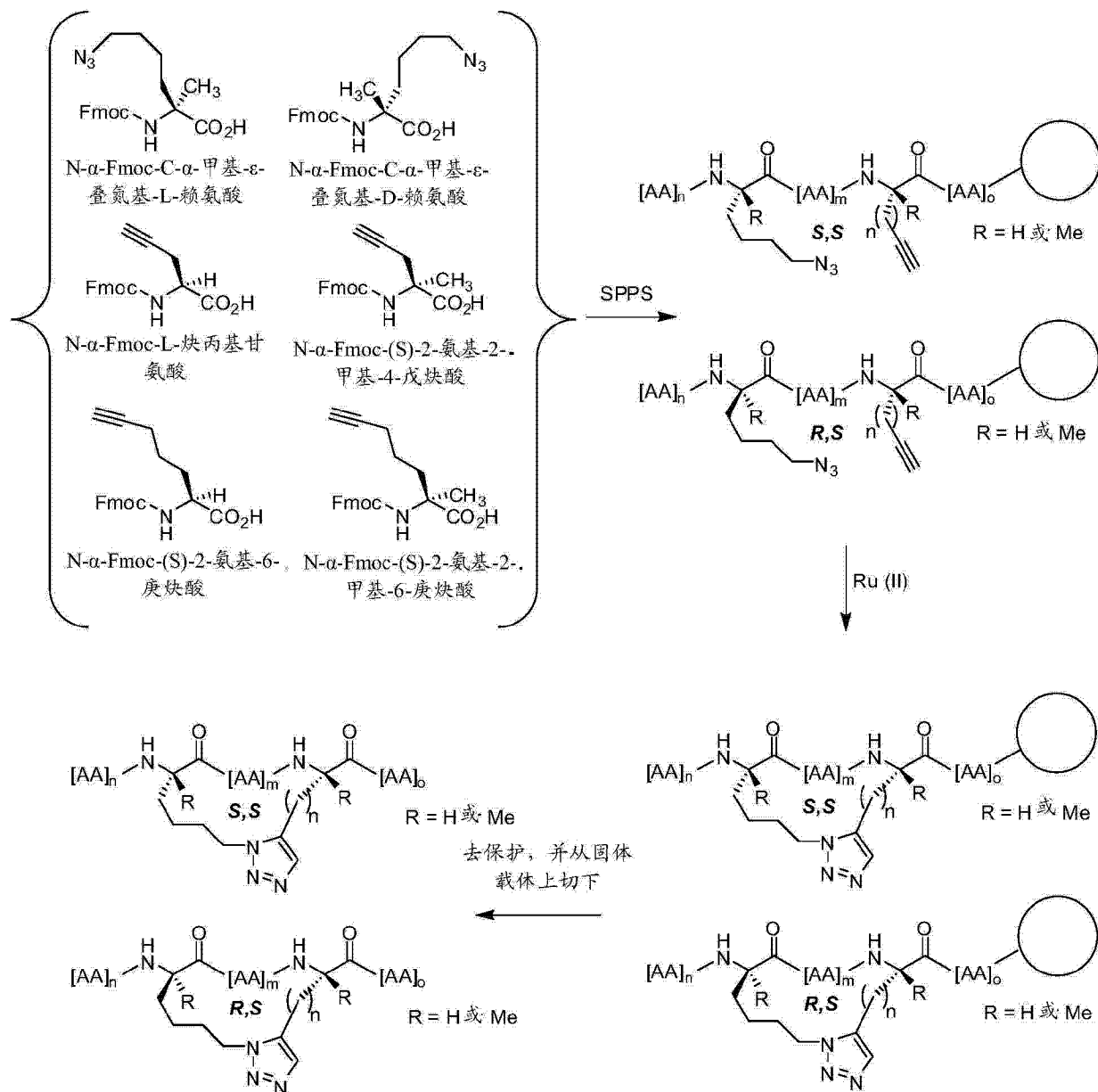


[0387] 在如合成方案 4 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中, 拟肽前体包含叠氮部分和炔部分, 且使用可商购的氨基酸 N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的 N- α -Fmoc 保护的形式通过

溶液相或固相肽合成法 (SPPS) 来合成。然后通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 将拟肽前体去保护并从固相树脂上切下。拟肽前体作为粗制混合物进行反应, 或者在与大环化试剂如 Cu(II) 试剂 (例如 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 或 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$) 反应前进行纯化 (Rasmussen 等人 (2007), Org. Lett. 9:5337-5339; Zhang 等人 (2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999)。在某些实施方式中, 在选自 DMF、CH₃CN 和 THF 的溶剂中进行大环化步骤。

[0388] 合成方案 5:

[0389]



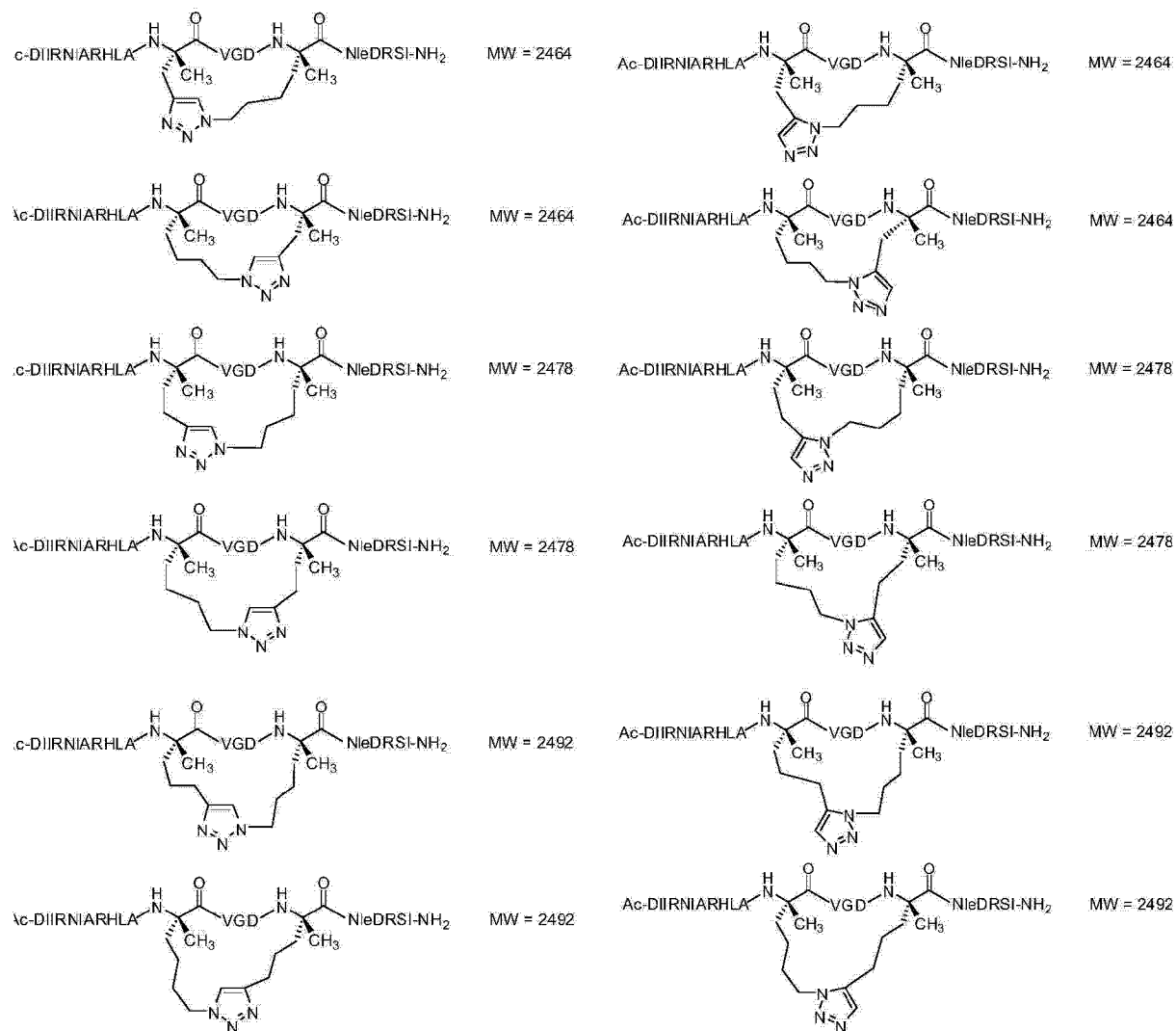
[0390] 在如合成方案 5 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中, 拟肽前体包含叠氮部分和炔部分, 且使用可商购的氨基酸 N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的 N- α -Fmoc 保护的形式通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成。拟肽前体作为粗制混合物与在树脂上的大环化试剂 (如 Cu(II) 试剂) 反应。例如, 该试剂可以是 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 或 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen 等人

(2007), Org. Lett. 9:5337-5339 ;Zhang 等人 (2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999)。在某些实施方式中,在选自 CH_2Cl_2 、 $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 CH_3CN 、DMF 和 THF 的溶剂中进行大环化步骤。

[0391] 表 5 显示几种示例性的拟肽大环化合物。“Nie”代表正亮氨酸并取代甲硫氨酸残基。可以想到根据表 1- 表 4 所公开的多肽序列,使用类似的连接体合成拟肽大环化合物。

[0392] 表 5

[0393]



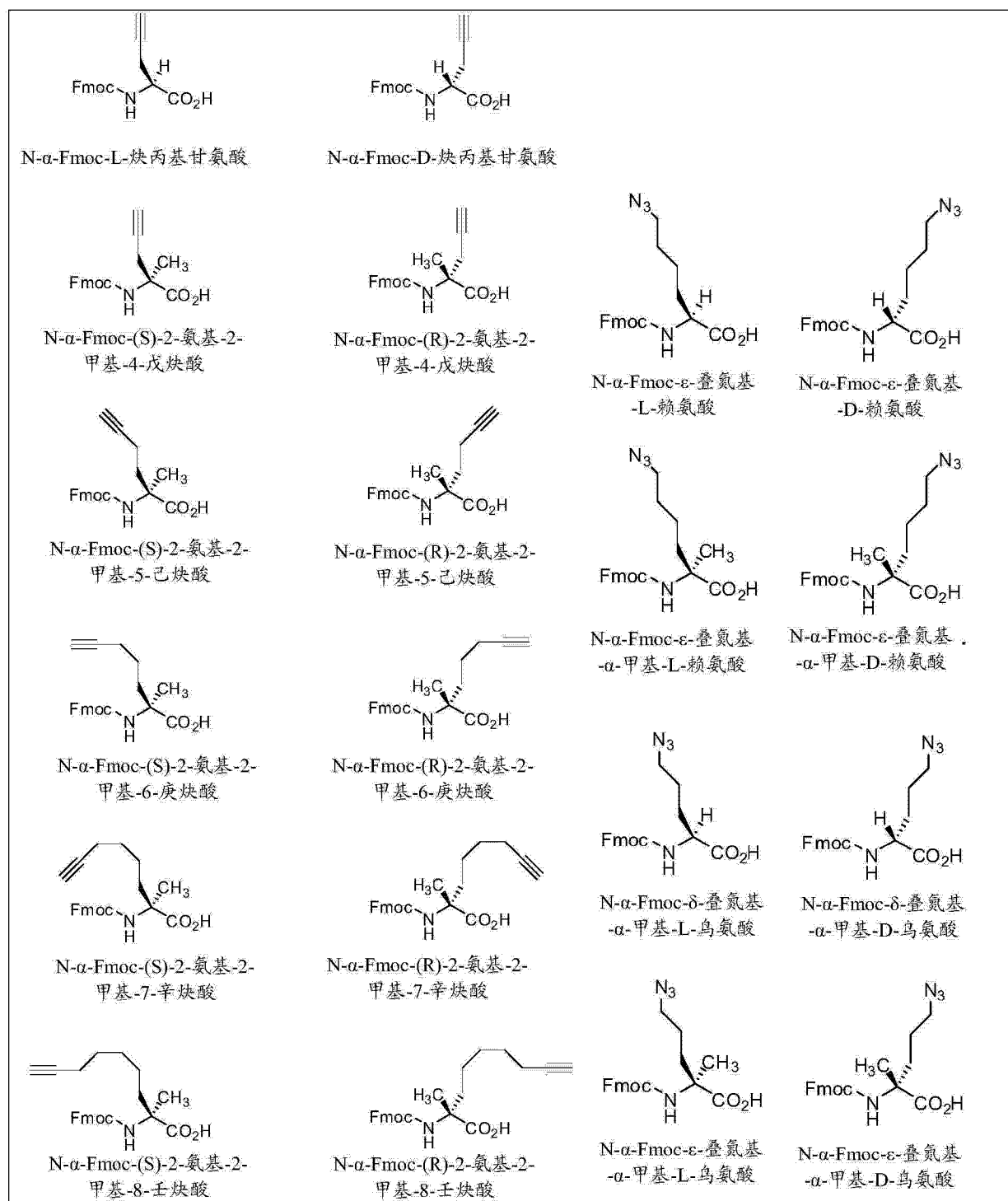
[0394] 表 5 显示本发明的示例性的拟肽大环化合物。“Nie”代表正亮氨酸。

[0395] 本发明包括使用非天然存在的氨基酸和氨基酸类似物合成本文所述的拟肽大环化合物。任何适合于用来合成稳定的含三唑的拟肽大环化合物的合成方法的氨基酸或氨基酸类似物都可以用于本发明中。例如,预计 L- 炔丙基甘氨酸是本发明中有用的氨基酸。但是,含有不同氨基酸侧链的其他含炔的氨基酸也可用于本发明中。例如,L- 炔丙基甘氨酸在氨基酸的 α - 碳和氨基酸侧链的炔之间含有一个亚甲基单元。本发明也包括使用在 α - 碳和炔之间具有多个亚甲基单元的氨基酸。同样,本发明也包括氨基酸 L- 赖氨酸、D- 赖氨酸、 α - 甲基 -L- 赖氨酸和 α - 甲基 -D- 赖氨酸的叠氮类似物也认为是本发明的有用氨基酸。但是,含有不同的氨基酸侧链的其他末端叠氮氨基酸也可以用于本发明中。例如, L- 赖氨酸的叠氮类似物在氨基酸的 α - 碳和氨基酸侧链的末端叠氮基之间含有 4 个亚甲基单元。

本发明也包括使用在 α -碳和末端叠氮基之间具有少于或多于 4 个亚甲基单元的氨基酸。表 6 显示一些可用于制备本发明的拟肽大环化合物的氨基酸。

[0396] 表 6

[0397]



[0398] 表 6 显示用于制备本发明的拟肽大环化合物的示例性的氨基酸。

[0399] 在某些实施方式中,氨基酸和氨基酸类似物是 D-构型。在其他的实施方式中,它们是 L-构型。在某些实施方式中,拟肽中包含的某些氨基酸和氨基酸类似物是 D-构型,而某些氨基酸和氨基酸类似物是 L-构型。在某些实施方式中,氨基酸类似物是 α , α -二取代

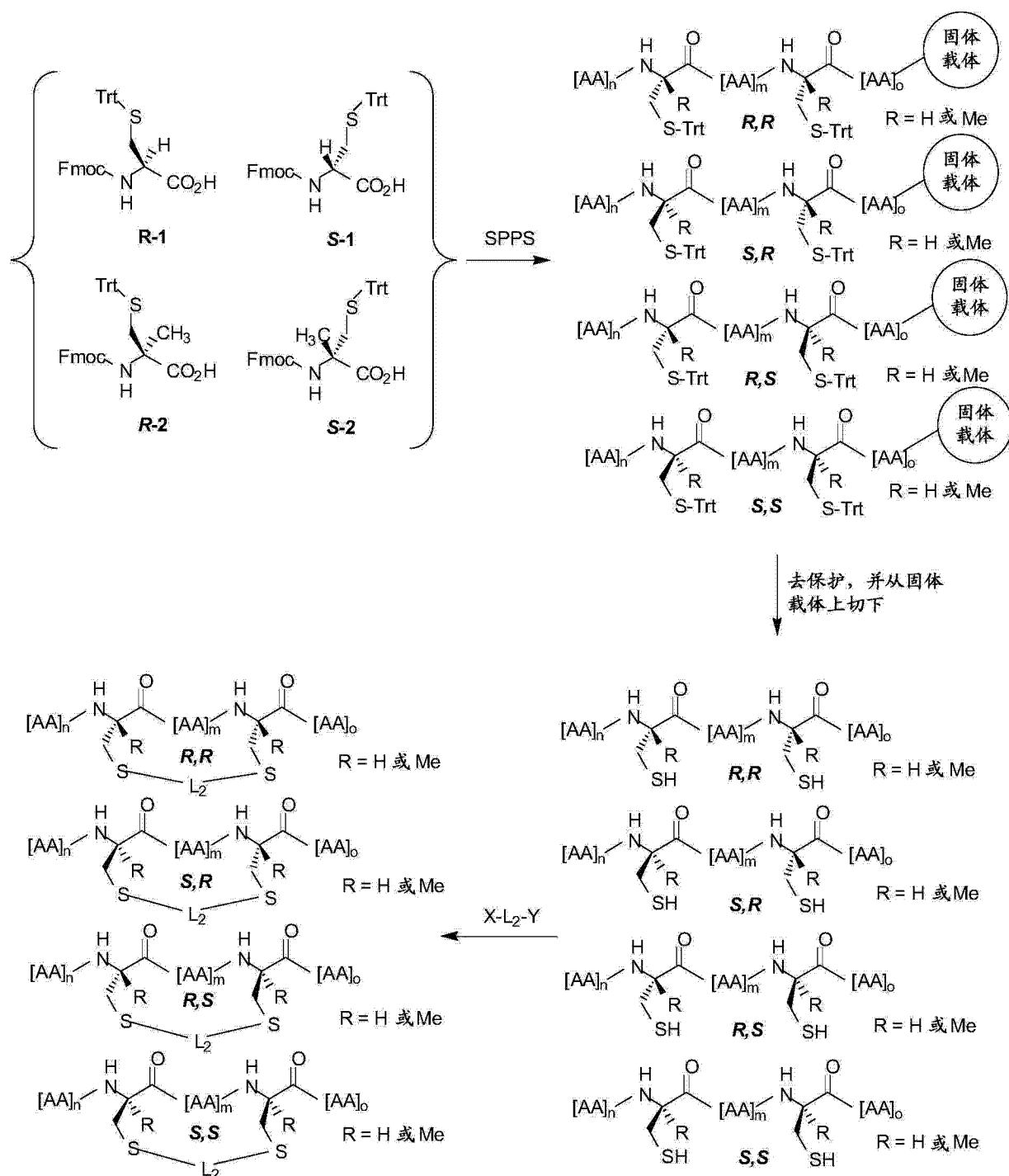
的,如 α -甲基-L-炔丙基甘氨酸、 α -甲基-D-炔丙基甘氨酸、 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸和 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸。在某些实施方式中,氨基酸类似物是 N-烷基化的,例如,N-甲基-L-炔丙基甘氨酸、N-甲基-D-炔丙基甘氨酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸。

[0400] 在某些实施方式中,使用保护基团(包括但不限于 -Fmoc 和 -Boc)保护氨基酸的 -NH 部分。在其他实施方式中,在合成拟肽大环化合物之前不保护氨基酸。

[0401] 在其他的实施方式中,合成式 III 的拟肽大环化合物。下面的合成方案描述这类化合物的制备。为了简化附图,示例性的方案描绘了源自 L-或 D-半胱氨酸的氨基酸类似物,其中, L_1 和 L_3 都是 $-(CH_2)-$ 。但是,如以上整个发明详述部分所指出的,可以采用许多其他氨基酸类似物,其中, L_1 和 L_3 可以独立地选自本文公开的各种结构。符号“ $[AA]_m$ ”、“ $[AA]_n$ ”、“ $[AA]_o$ ”代表酰胺键连接部分(如天然或非天然氨基酸)的序列。如前面所述,“AA”的各具体情况与“AA”的任何其他具体情况无关,而且如“ $[AA]_m$ ”的式子包括(例如)不相同氨基酸的序列以及相同氨基酸的序列。

[0402] 合成方案 6:

[0403]

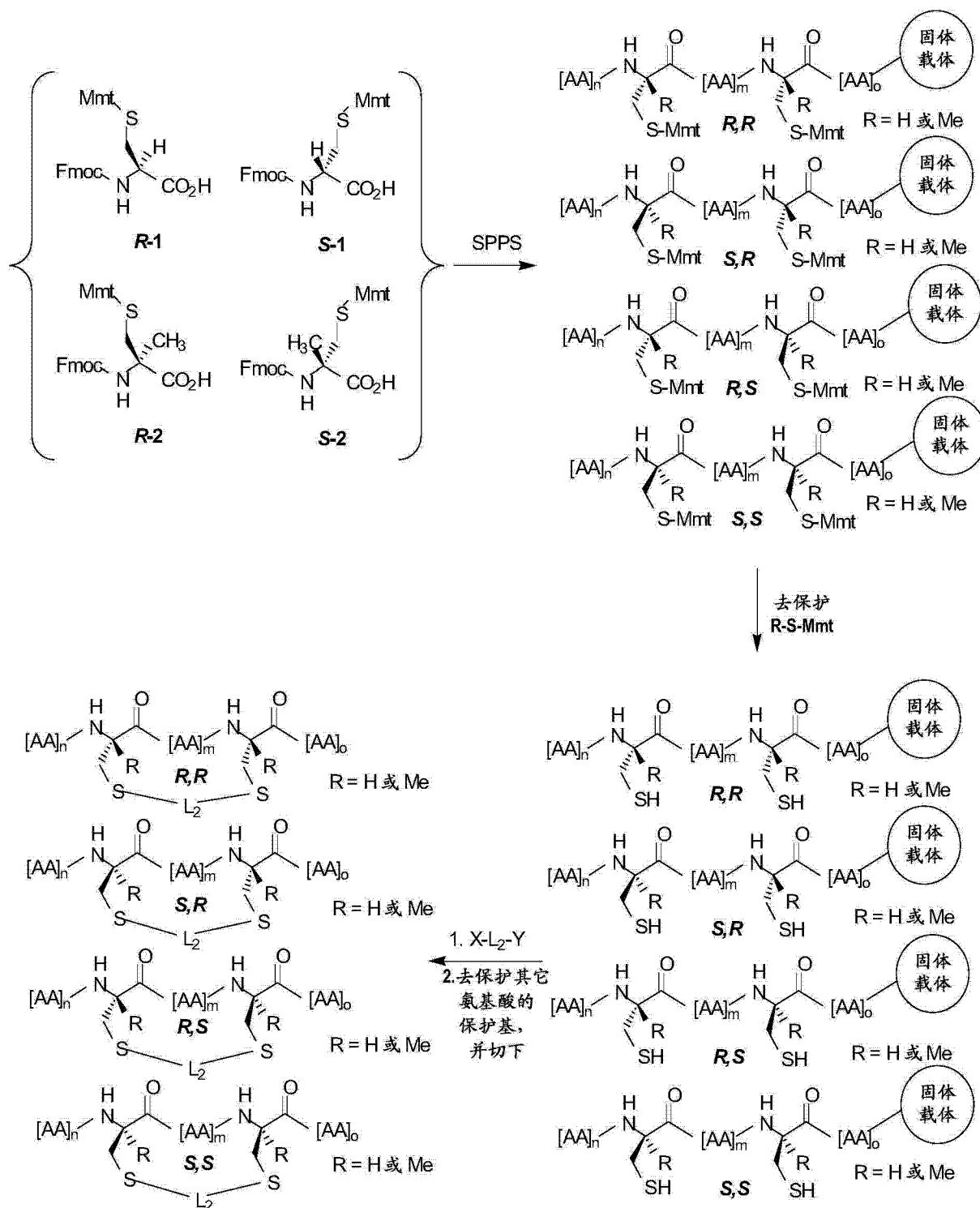


[0404] 在合成方案 6 中, 拟肽前体含有 2 个 -SH 部分, 而且使用可商购的 N- α -Fmoc 氨基酸如 N- α -Fmoc-S- 三苯甲基 -L- 半胱氨酸或 N- α -Fmoc-S- 三苯甲基 -D- 半胱氨酸通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成。通过已知方法 (Seebach 等人 (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:2708-2748 以及其中的参考文献) 产生 D- 半胱氨酸或 L- 半胱氨酸的 α - 甲基化形式, 然后通过已知方法 ("Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins", Oxford University Press, New York:1998, 本文通过引用引入其完整内容) 将其转化为适当保护的 N- α -Fmoc-S- 三苯甲基单体。接着通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 对前体拟肽去保护并从固相树脂上切下。前体拟肽作为粗混合物进行反应, 或者在有机溶液或水性溶液中在与 X-L₂-Y 反应前进行纯化。在某些实施方式中, 在稀释条件 (即, 0.15mmol/

L) 下进行烷基化反应, 以有利于大环化并避免聚合。在某些实施方式中, 在有机溶液如液 NH_3 中进行烷基化反应 (Mosberg 等人 (1985), J. Am. Chem. Soc. 107:2986-2987; Szewczuk 等人 (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40:233-242)、 NH_3/MeOH 或 NH_3/DMF (Or 等人 (1991), J. Org. Chem. 56:3146-3149)。在其他实施方式中, 在水性溶液如 pH 8 的 6M 盐酸胍中进行烷基化反应 (Brunel 等人 (2005), Chem. Commun. (20):2552-2554)。在其他实施方式中, 用于烷基化反应的溶剂是 DMF 或二氯乙烷。

[0405] 合成方案 7:

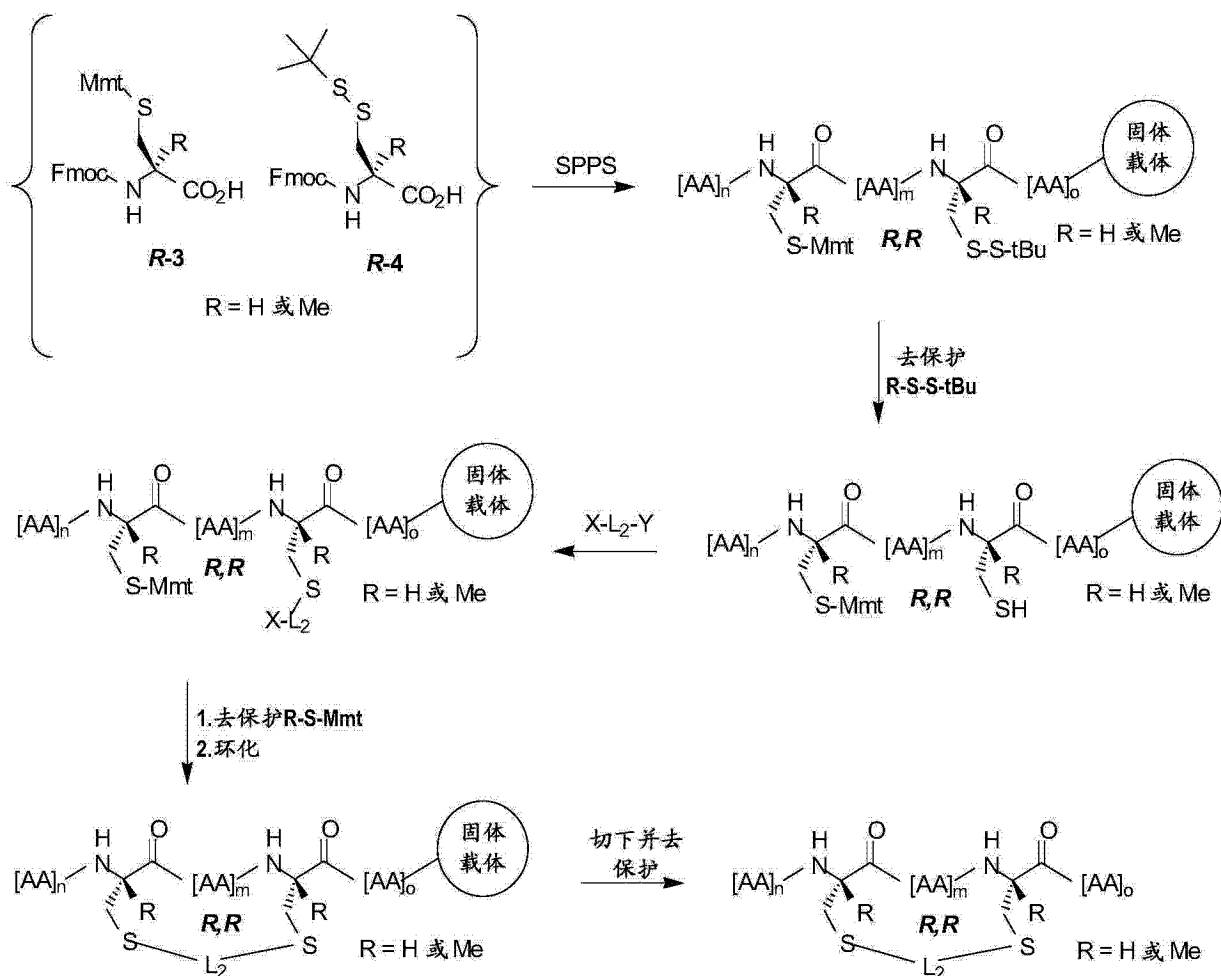
[0406]



[0407] 在合成方案 7 中,前体拟肽含有 2 个或多个 -SH 部分,其中的 2 个特别地进行保护以允许其选择性地保护并随后烷基化以形成大环。使用可商购的 N- α -Fmoc 氨基酸如 N- α -Fmoc-S- 对甲氧基三苯甲基 -L- 半胱氨酸或 N- α -Fmoc-S- 对甲氧基三苯甲基 -D- 半胱氨酸通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成前体拟肽。通过已知方法 (Seebach 等人 (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:2708-2748 以及其中的参考文献) 产生 D- 半胱氨酸或 L- 半胱氨酸的 α - 甲基化形式,然后通过已知方法 (Bioorganic Chemistry:Peptides and Proteins, Oxford University Press, New York:1998, 本文通过引用引入其完整内容) 将其转化为适当保护的 N- α -Fmoc-S- 对甲氧基三苯甲基单体。接着通过标准条件 (例如,弱酸如溶于 DCM 的 1% TFA) 选择性地切下拟肽前体的 Mmt 保护基团。然后前体拟肽在树脂上与有机溶液中的 X-L₂-Y 反应。例如,该反应在位阻碱 (hindered base) 如二异丙基乙胺的存在下发生。在某些实施方式中,在有机溶液如液 NH₃ 中进行烷基化反应 (Mosberg 等人 (1985), J. Am. Chem. Soc. 107:2986-2987; Szewczuk 等人 (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40:233-242)、NH₃/MeOH 或 NH₃/DMF (Or 等人 (1991), J. Org. Chem. 56:3146-3149)。在其他实施方式中,烷基化反应在 DMF 或二氯乙烷中进行。接着通过标准条件 (例如,强酸如 95% TFA) 将拟肽大环化合物去保护并从固相树脂上切下。

[0408] 合成方案 8:

[0409]

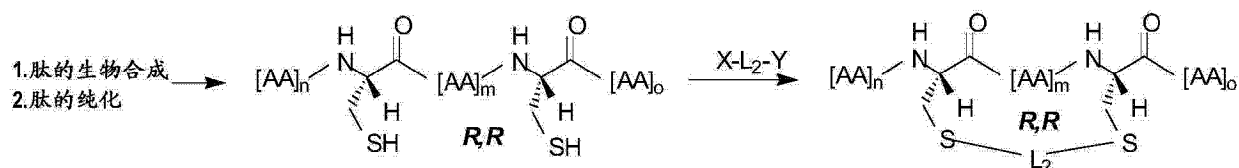


[0410] 在合成方案 8 中,拟肽前体含有 2 个或多个 -SH 部分,其中的 2 个进行特别保护

以允许其选择性地保护并随后烷基化以形成大环。使用可商购的 N- α -Fmoc 氨基酸如 N- α -Fmoc-S- 对甲氧基三苯甲基-L- 半胱氨酸、N- α -Fmoc-S- 对甲氧基三苯甲基-D- 半胱氨酸、N- α -Fmoc-S-S- 叔丁基-L- 半胱氨酸和 N- α -Fmoc-S-S- 叔丁基-D- 半胱氨酸通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成拟肽前体。通过已知方法 (Seebach 等人 (1996), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35:2708-2748 以及其中的参考文献) 产生 D- 半胱氨酸或 L- 半胱氨酸的 α - 甲基化形式, 然后通过已知方法 (*Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins*, Oxford University Press, New York:1998, 本文通过引用引入其完整内容) 将其转化为适当保护的 N- α -Fmoc-S- 对甲氧基三苯甲基或 N- α -Fmoc-S-S- 叔丁基单体。接着通过已知条件 (例如, DMF 中的 20% 的 2- 巯基乙醇, 参考文献: Galande 等人 (2005), *J. Comb. Chem.* 7:174-177) 选择性地切下拟肽前体的 S-S- 叔丁基保护基团。然后前体拟肽在树脂上与有机溶液中的摩尔过量的 X-L₂-Y 反应。例如, 反应在位阻碱如二异丙基乙胺的存在下发生。接着通过标准条件 (例如, 弱酸如 DCM 中的 1% TFA) 选择性地切下拟肽前体的 Mmt 保护基团。然后拟肽前体在树脂上通过有机溶液中的位阻碱的处理而环化。在某些实施方式中, 在如 NH₃/MeOH 或 NH₃/DMF (Or 等人 (1991), *J. Org. Chem.* 56:3146-3149) 的有机溶液中进行烷基化反应。接着通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 对拟肽大环化合物去保护并从固相树脂上切下。

[0411] 合成方案 9:

[0412]



[0413] 在合成方案 9 中, 拟肽前体含有 2 个 L- 半胱氨酸部分。通过已知的活细胞中的生物表达系统或通过已知的体外无细胞表达方法合成拟肽前体。前体拟肽作为粗混合物进行反应, 或者在有机溶液或水性溶液中在与 X-L₂-Y 反应前进行纯化。在某些实施方式中, 在稀释条件 (即, 0.15mmol/L) 下进行烷基化反应, 以利于大环化并避免聚合。在某些实施方式中, 在有机溶液如液 NH₃ 中进行烷基化反应 (Mosberg 等人 (1985), *J. Am. Chem. Soc.* 107:2986-2987; Szewczuk 等人 (1992), *Int. J. Peptide Protein Res.* 40:233-242)、NH₃/MeOH 或 NH₃/DMF (Or 等人 (1991), *J. Org. Chem.* 56:3146-3149)。在其他实施方式中, 在水性溶液如 pH 8 的 6M 盐酸胍中进行烷基化反应 (Brunel 等人 (2005), *Chem. Commun.* (20):2552-2554)。在其他实施方式中, 在 DMF 或二氯乙烷中进行烷基化反应。在另一种实施方式中, 在非变性水性溶液中进行烷基化; 在再另一种实施方式中, 在有利于 α -螺旋结构形成的条件下进行烷基化。在再另一种实施方式中, 在有利于前体拟肽与另一种蛋白质结合的条件下进行烷基化, 从而在烷基化过程中诱导结合的 α -螺旋构象的形成。

[0414] 本发明设想了适合与巯基反应的 X 和 Y 的各种实施方式。一般地, X 或 Y 各自独立地选自表 5 所示的一般种类。例如, X 和 Y 是如 -Cl、-Br 或 -I 的卤素。本文所述的任何形成大环的连接体可以与表 1-4 所示的任何序列任意组合使用, 也可以与本文表明的任何 R- 取代基任意组合使用。

[0415] 表 7: 能够与巯基反应的反应基团和产生的连接键的例子

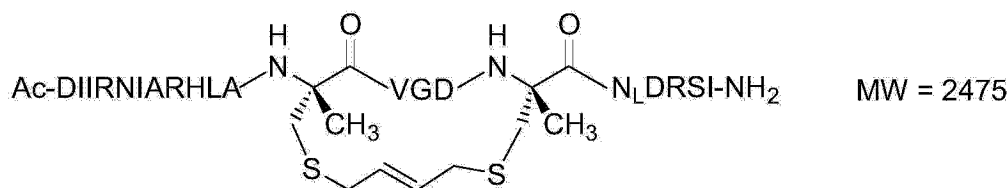
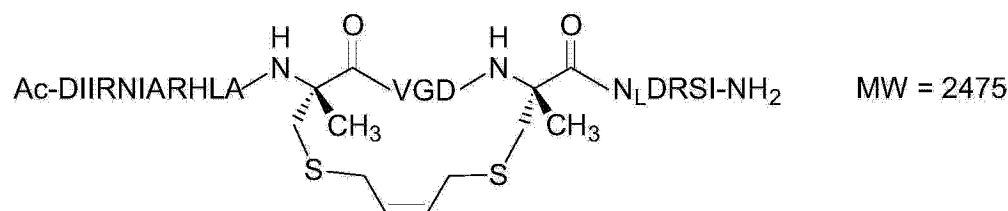
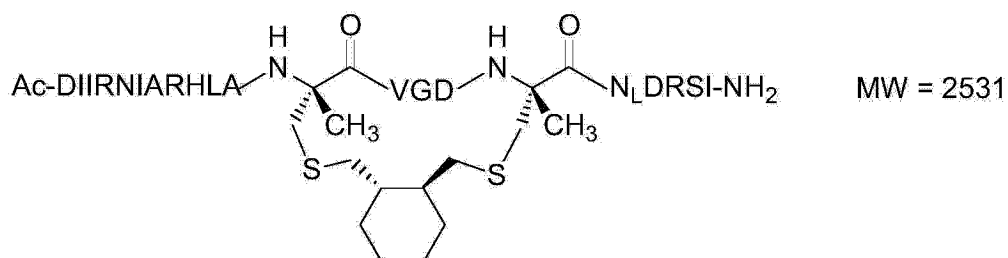
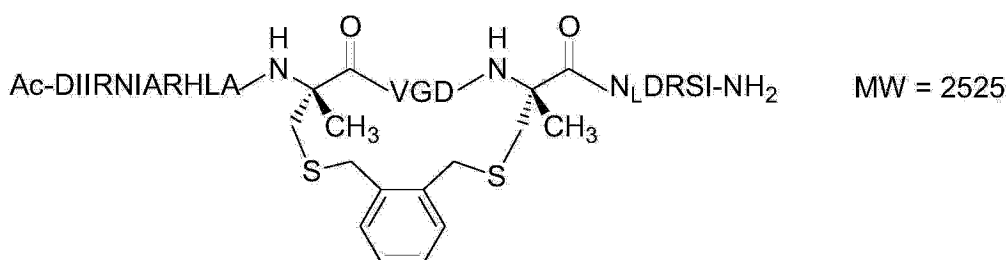
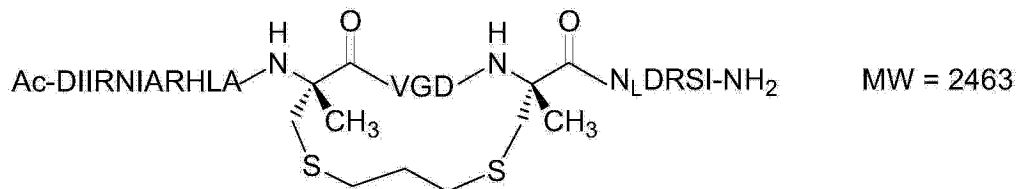
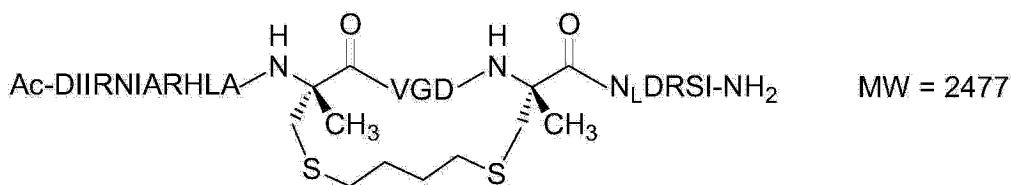
[0416]

(1) X 或 Y	(2) 产生的共价连接
(3) 丙烯酰胺	(4) 硫醚
(5) 卤化物 (例如, 烷基或芳基卤化物)	(6) 硫醚
(7) 磺酸 (sulfonate)	(8) 硫醚
(9) 氮丙啶 (aziridine)	(10) 硫醚
(11) 环氧化物	(12) 硫醚
(13) 卤代乙酰胺	(14) 硫醚
(15) 马来酰亚胺	(16) 硫醚
(17) 磺酸酯 (sulfonate ester)	(18) 硫醚

[0417] 表 8 显示了本发明的示例性大环化合物。“N_L”代表甲硫氨酸并替代了甲硫氨酸残基。可以预见, 类似的连接体是用来合成基于表 1-表 4 公开的多肽序列的拟肽大环化合物。

[0418] 表 8 : 本发明的拟肽大环化合物的例子

[0419]



[0420] 对于该表中所示的例子，“N_L”代表正亮氨酸。

[0421] 本发明包括天然存在的和非天然存在的氨基酸和氨基酸类似物在式 (III) 的拟肽大环化合物的合成中的应用。任何适合于用来合成稳定的含二巯基的拟肽大环化合物的合成方法的氨基酸或氨基酸类似物都可以用于本发明中。例如，预计半胱氨酸是本发明中有用的氨基酸。但是，除了半胱氨酸之外，其他含有不同氨基酸侧链的含硫的氨基酸也可用于本发明。例如，半胱氨酸在氨基酸的 α-碳和氨基酸侧链的末端 -SH 之间含有一个亚甲基单元。本发明也包括使用在 α-碳和末端 -SH 之间具有多个亚甲基单元的氨基酸。非限

制的例子包括 α -甲基-L-高半胱氨酸和 α -甲基-D-高半胱氨酸。在某些实施方式中,氨基酸和氨基酸类似物是 D-构型。在其他的实施方式中,它们是 L-构型。在某些实施方式中,拟肽中包含的某些氨基酸和氨基酸类似物是 D-构型,而某些氨基酸和氨基酸类似物是 L-构型。在某些实施方式中,氨基酸类似物是 α , α -二取代的,如 α -甲基-L-半胱氨酸和 α -甲基-D-半胱氨酸。

[0422] 本发明包括其中形成大环的连接体用来连接拟肽前体中的两个或多个 -SH 部分以形成本发明的拟肽大环化合物的大环化合物。如上所述,形成大环的连接体赋予构象刚性、更高的代谢稳定性和 / 或更高的细胞渗透性。另外,在某些实施方式中,形成大环的连接体稳定拟肽大环化合物的 α -螺旋二级结构。形成大环的连接体具有式 $X-L_2-Y$, 其中, X 和 Y 是如上定义的同或不同的部分。X 和 Y 二者都具有允许一个形成大环的连接体 $-L_2-$ 将含有二巯基的拟肽前体双烷基化的化学特性。如上定义,连接体 $-L_2-$ 包括亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基或亚杂环芳基或 $-R_4-K-R_4-$, 所有这都可以任选地被如上定义的 R_5 基团取代。另外,除了连接含巯基氨基酸的 -SH 的碳之外,形成大环的连接体 $-L_2-$ 中的 1-3 个碳原子任选地被如 N、S 或 O 的杂原子取代。

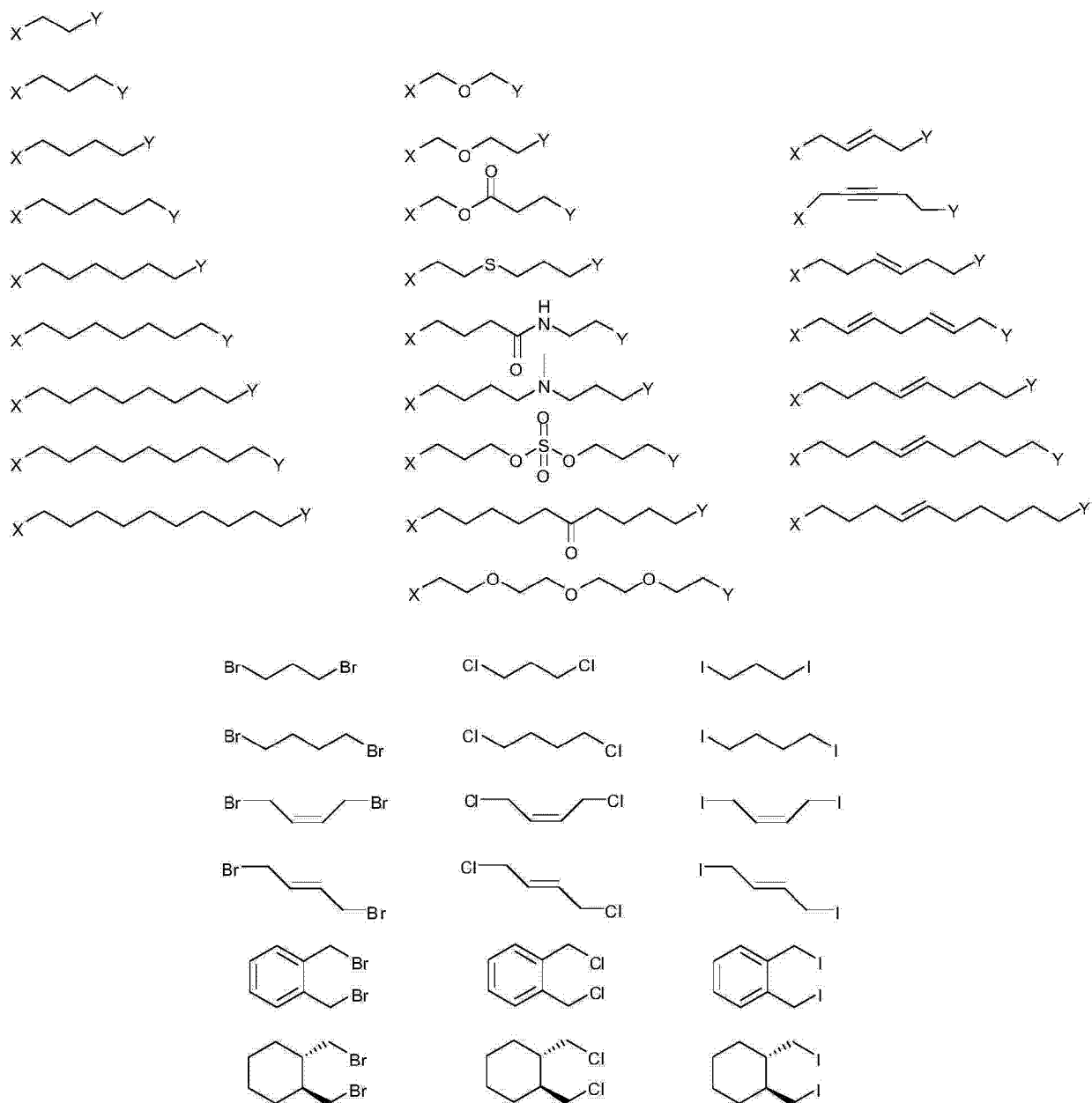
[0423] 形成大环的连接体 $X-L_2-Y$ 的 L_2 部分在长度上可以根据尤其是用来形成拟肽大环化合物的两个氨基酸类似物的位置之间的距离而变化。另外,随着形成大环的连接体的 L_1 和 / 或 L_3 部分的长度发生变化, L_2 的长度也可以变化以产生具有合适的总长度的连接体以形成稳定的拟肽大环化合物。例如,如果通过向 L_1 和 L_3 各添加另外的亚甲基单元来改变所使用的氨基酸类似物,那么 L_2 在长度上减少等同于大约两个亚甲基单元的长度,以抵消 L_1 和 L_3 的增加的长度。

[0424] 在某些实施方式中, L_2 是式 $-(CH_2)_n-$ 的亚烷基基团,其中, n 是大约 1- 大约 15 之间的整数。例如, n 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在其他实施方式中, L_2 是亚烯基基团。在更其他的实施方式中, L_2 是芳基。

[0425] 表 9 显示 $X-L_2-Y$ 基团的另外的实施方式。

[0426] 表 9. 本发明的示例性的 $X-L_2-Y$ 基团

[0427]



[0428] 例如,该表中的 X 和 Y 各自独立地是 Cl-、Br- 或 I-。

[0429] 预计适用于进行本发明的形成拟肽大环化合物的另外的方法包括以下文献中公开的方法:Mustapa, M. Firouz Mohd 等人, J. Org. Chem(2003), 68, 第 8193-8198 页; Yang, Bin 等人 Bioorg Med. Chem. Lett. (2004), 14, 第 1403-1406 页; 美国专利 5,364,851; 美国专利 5,446,128; 美国专利 5,824,483; 美国专利 6,713,280 和美国专利 7,202,332。在这样的实施方式中,使用在 α -位置含有另外的 R-取代基的氨基酸前体。这种氨基酸在需要的位置被掺入大环化合物前体中,其可能在交联剂被取代的位置,或者,可选择地,在大环化合物前体序列中的其他位置。然后根据指定的方法实现前体的环化。

[0430] 分析

[0431] 例如,本发明的拟肽大环化合物的性质通过使用下面所述的方法进行分析。

[0432] 测定 α -螺旋度的分析

[0433] 在溶液中,具有 α -螺旋结构域的多肽的二级结构在随机卷曲结构和 α -螺旋结

构之间达到动态平衡,这经常称为“百分螺旋度”。因此,例如,未修饰的促凋亡 BH3 结构域在溶液中主要是随机卷曲,具有通常低于 25% 的 α -螺旋含量。另一方面,具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如高于相应的非交联多肽至少 2 倍的 α -螺旋度。在某些实施方式中,本发明的大环化合物具有高于 50% 的 α -螺旋度。为了分析本发明的拟肽大环化合物(例如基于 BH3 结构域的大环化合物)的螺旋度,将化合物溶于水性溶液中(例如, pH 7 的 50mM 磷酸钾溶液或蒸馏水,达到 25–50 μ M 的浓度)。使用标准测量参数(例如,温度, 20°C;波长, 190–260nm;步分辨率(step resolution), 0.5nm;速度, 20nm/秒;累积, 10;响应, 1 秒;带宽, 1nm;路径长度, 0.1cm)在分光偏振计(例如, Jasco J-710)上获得圆二色性(CD)谱。通过将平均残基椭圆率(例如, $[\Phi]_{222\text{obs}}$)除以模型螺旋十肽的报道值(Yang 等人 (1986), Methods Enzymol. 130:208)来计算各个肽的 α -螺旋含量。

[0434] 测定熔解温度(T_m)的分析

[0435] 含有二级结构(如 α -螺旋)的本发明的拟肽大环化合物显示出例如比相应的非交联多肽更高的熔解温度。典型地,本发明的拟肽大环化合物显示 >60°C 的 T_m,表明在水溶液中非常稳定的结构。为了分析大环形成对熔解温度的效应,将拟肽大环化合物或未修饰的肽溶于蒸馏水中(例如,到 50 μ M 的终浓度),并且通过使用标准参数(例如,波长, 222nm;步分辨率, 0.5nm;速度, 20nm/秒;累积, 10;响应, 1 秒;带宽, 1nm;温度上升速度, 1°C/分钟;路径长度, 0.1cm)在分光偏振计(例如, Jasco J-710)上测量椭圆率在一定温度范围(例如, 4–95°C)内的变化来测定 T_m。

[0436] 蛋白酶抗性分析

[0437] 肽骨架的酰胺键易受到蛋白酶的水解,因而致使肽化合物在体内易于快速降解。但是,肽螺旋的形成通常包埋酰胺骨架,从而可以保护其免于蛋白水解裂解。本发明的拟肽大环化合物可以进行体外胰蛋白酶的蛋白水解以评价与相应的非交联多肽相比其降解速度的任何变化。例如,拟肽大环化合物和相应的非交联多肽与胰蛋白酶琼脂糖一起温育,并在各个时间点通过离心终止反应,随后注入 HPLC 以根据 280nm 处的紫外吸收定量残留的底物。简单地说,拟肽大环化合物和拟肽前体(5mcg)与胰蛋白酶琼脂糖(Pierce)(S/E ~ 125)温育 0、10、20、90 和 180 分钟。通过台式离心机高速离心终止反应;通过基于 HPLC 的在 280nm 处的峰检测对分离的上清液中残余的底物进行定量。蛋白水解反应显示出一级动力学,且速率常数 k 由 $\ln[S]$ 相对于时间的曲线确定($k = -1 \times \text{斜率}$)。

[0438] 体外稳定性分析

[0439] 具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如高于相应的非交联多肽至少 2 倍的体外半衰期,且具有 12 小时或更长的体外半衰期。对于体外血清稳定性研究,可以使用多种分析方法。例如,将拟肽大环化合物和/或相应的非交联多肽(2mcg)各与新鲜的小鼠、大鼠和/或人血清(例如, 1–2mL)一起在 37°C 下温育 0、1、2、4、8 和 24 小时。可以通过用血清进行系列稀释制备大环化合物的不同浓度的样品。为了测定完整化合物的含量,可以使用下面的程序:通过将 100 μ L 的血清转移到 2mL 离心管中,接着加入 10 μ L 的 50% 甲酸和 500 μ L 乙腈并在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 下以 14,000RPM 离心 10 分钟来提取样品。然后将上清液转移到新的 2mL 管中,并在 $N_2 < 10\text{psi}$ 、37°C 下在 Turbopap 上蒸发。样品在 100 μ L 的 50:50 乙腈:水中重构,并进行 LC-MS/MS 分析。测试体外稳定性的等效或类似的程序是已知的,且可以用来确定大环化合物在血清中的稳定性。

[0440] 体外结合分析

[0441] 为了评价拟肽大环化合物和拟肽前体与受体蛋白 (acceptor protein) 的结合和亲和力,使用例如荧光偏振分析 (FPA)。FPA 技术使用偏振光和荧光示踪剂测量分子取向和分子迁移率。当用偏振光激发时,由于附着在具有高表观分子量的分子 (例如,与大蛋白质结合的 FITC 标记的肽) 上的荧光示踪剂 (例如, FITC) 与附着在较小分子上 (例如,在溶液中游离的 FITC 标记的肽) 的荧光示踪剂相比具有较慢的旋转速度,附着在具有高表观分子量的分子上的荧光示踪剂发射较高水平的偏振荧光。

[0442] 例如,在室温下,荧光标记的 (fluoresceinated) 拟肽大环化合物 (25nM) 与受体蛋白 (25-1000nM) 在结合缓冲液 (140mM NaCl、50mM Tris-HCL, pH 7.4) 中温育 30 分钟。例如,用发光分光光度计 (例如,Perkin-Elmer LS50B) 通过荧光偏振测量结合活性。可以使用例如 Graphpad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 通过非线性回归分析确定 Kd 值。在某些情况下,本发明的拟肽大环化合物显示出与相应的非交联多肽类似的或更低的 Kd。

[0443] 例如,在该分析中可以使用 BH3-肽 (如 BCL-2、BCL-X_L、BAX 或 MCL1) 的受体蛋白。进行这种分析的另外的方法在下面的实施例部分中进行描述。

[0444] 表征肽-蛋白质相互作用的拮抗剂的体外置换分析

[0445] 为了评价拮抗肽 (例如, BH3 肽或 p53 肽) 和受体蛋白之间的相互作用的化合物的结合和亲和力,例如,使用利用源于拟肽前体序列的荧光标记拟肽大环化合物的荧光偏振分析 (FPA)。FPA 技术使用偏振光和荧光示踪剂测量分子取向和分子迁移率。当用偏振光激发时,由于附着在具有高表观分子量的分子 (例如,与大蛋白质结合的 FITC 标记的肽) 上的荧光示踪剂 (例如, FITC) 与附着在较小分子 (例如,在溶液中游离的 FITC 标记的肽) 上的荧光示踪剂相比具有较低的旋转速度,附着在具有高表观分子量的分子上的荧光示踪剂发射较高水平的偏振荧光。拮抗荧光标记的拟肽大环化合物与受体蛋白之间的相互作用的化合物在竞争性结合 FPA 实验中进行检测。

[0446] 例如,在室温下,假定的拮抗剂化合物 (1nM-1mM) 和荧光标记的拟肽大环化合物 (25nM) 与受体蛋白 (50nM) 一起在结合缓冲液 (140mM NaCl、50mM Tris-HCL, pH 7.4) 中温育 30 分钟。例如,用发光分光光度计 (例如,Perkin-Elmer LS50B) 通过荧光偏振测量拮抗剂的结合活性。使用例如 Graphpad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 通过非线性回归分析确定 Kd 值。

[0447] 在该分析中任一类型的分子 (如有机小分子、肽、寡核苷酸或蛋白质) 可以作为假定的拮抗剂进行检验。在该分析中可以使用 BH3-肽 (如 BCL-2、BCL-X_L、BAX 或 MCL1) 的受体蛋白。进行这种分析的另外的方法在下面的实施例部分进行描述。

[0448] 细胞裂解液或完整细胞中的结合分析

[0449] 有可能通过免疫沉淀和牵出 (pull-down) 实验测量肽或拟肽大环化合物与细胞裂解液或完整细胞中其天然受体的结合。例如,完整的细胞与荧光标记的 (FITC- 标记的) 或生物素化的化合物在无血清的情况下温育 4 小时,接着置换血清,并进一步温育 4-18 小时。可选择地,细胞可以在整个实验的过程中在 Opti-MEM (Invitrogen) 中进行温育。然后使细胞沉淀,并在 4℃ 下、在裂解缓冲液 (50mM Tris[pH7.6]、150mM NaCl、1% 的 CHAPS 和蛋白酶抑制剂混合物) 中温育 10 分钟。可以使用 1% NP-40 或 Triton X-100 来替换

CHAPS。以 14,000rpm 离心提取物 15 分钟,收集上清液,并与 10 μ l 山羊抗-FITC 抗体或抗生物素蛋白链菌素涂覆的微球一起温育 2 小时,在 4℃ 旋转,接着在 4℃ 进一步与蛋白 A/G Sepharose (50 μ l 的 50% 微球浆 (bead slurry)) 温育 2 小时。如果使用抗生物素蛋白链菌素珠来牵出生物素化的化合物,那么第二步骤不是必需的。可选择地, FITC 标记的化合物或生物素化的化合物与如上所述制备的细胞裂解液一起温育 2 小时,在 4℃ 旋转,接着与 10 μ l 山羊抗-FITC 抗体或抗生物素蛋白链菌素涂覆的微球一起温育 2 小时,在 4℃ 旋转,接着进一步与蛋白 A/G Sepharose (50 μ l 的 50% 微球浆) 在 4℃ 温育 2 小时,如果使用抗生物素蛋白链菌素微球来牵出生物素化的化合物,那么第二步骤不是必需的。快速离心之后,可以在含有增加的盐浓度 (例如, 150、300、500mM 的 NaCl) 的裂解缓冲液中洗涤沉淀物。随后可以在加入含有 SDS 的样品缓冲液和煮沸之前,以 150mM NaCl 再平衡微球。可以使用 4%–12% 梯度的 Bis-Tris 凝胶对微球和细胞裂解液进行电泳,接着转移到 Immobilon-P 膜上。封闭之后,将印迹分别与检测 FITC 或生物素的抗体一起温育,也与一种或多种检测与拟肽大环化合物结合的蛋白质的抗体一起温育,所述蛋白质包括 BCL2、MCL1、BCL-XL、A1、BAX 和 BAK。也用于加载对照的抗 Hsc-70 探测裂解液印迹。可选择地,电泳后,凝胶可以进行银染以检测特别地与 FITC- 标记或生物素化的化合物一起下来 (come down) 的蛋白质。

[0450] 细胞渗透性分析

[0451] 相比于相应的非交联多肽,拟肽大环化合物例如具有更好的细胞渗透性。在某些实施方式中,拟肽大环化合物比相应的非交联多肽具有更好的细胞渗透性。具有优化连接体的拟肽大环化合物具有例如高于相应的非交联多肽至少 2 倍的细胞渗透性,并且通常观察到 20% 或更多的应用的拟肽大环化合物在 4 小时后已渗透入细胞。为了测量拟肽大环化合物和相应的非交联多肽的细胞渗透性,在 37℃ 下在不含血清的培养基中将完整的细胞与荧光标记的拟肽大环化合物或相应的非交联多肽 (10 μ M) 一起温育 4 小时,用培养基洗涤 2 次,并在 37℃ 下与胰蛋白酶 (0.25%) 温育 10 分钟。再次洗涤细胞并将其再悬浮于 PBS 中。例如,通过使用 FACSCalibur 流式细胞仪或 Cellomics' KineticScan® HCS 阅读仪分析细胞荧光。可以使用另外的定量细胞渗透的方法。特定的方法在下面的实施例中更详细地描述。

[0452] 细胞的效力分析

[0453] 例如,在基于细胞的杀伤分析中,使用多种致瘤和非致瘤的细胞系及源自人类或小鼠细胞群体的原代细胞测定某些拟肽大环化合物的效力。例如,在与拟肽大环化合物 (0.5–50 μ M) 一起温育的 24–96 小时期间监测细胞的存活力,以鉴定那些以 $EC_{50} < 10 \mu$ M 杀死细胞的化合物。在本文中, EC_{50} 指半最大有效浓度,这是 50% 的群体存活的情况下的拟肽大环化合物浓度。测量细胞存活力的几种标准分析方法是可通过商业途径得到的,并任选地用来评价拟肽大环化合物的效力。另外,测量膜联蛋白 V (Annexin V) 和胱天蛋白酶 (caspase) 活化的分析方法任选地用来评价拟肽大环化合物能否通过激活凋亡机制杀死细胞。例如,使用 Cell Titer-glo 分析确定随细胞内 ATP 浓度变化的细胞活力。

[0454] 体内稳定性分析

[0455] 为了研究拟肽大环化合物的体内稳定性,例如,向小鼠和 / 或大鼠通过 IV、IP、SC、PO 或吸入途径以 0.1–50mg/kg 的浓度施用化合物,并在注射后 0'、5'、15'、30'、1 小时、4 小

时、8 小时、24 小时和 48 小时抽取血样。然后如上所述通过 LC-MS/MS 测量 25 μ L 新鲜血清中的完整化合物的含量。

[0456] 动物模型中的体内效力

[0457] 为了确定本发明的拟肽大环化合物在体内的抗致癌活性,例如,化合物单独施用(IP、IV、SC、PO、通过吸入或鼻途径)或与亚最佳剂量的相关化学治疗剂(例如,环磷酰胺、阿霉素、依托泊苷)联合施用。在一个实施例中,在 NOD-SCID、SCID-beige 或 NOD. IL2rgKO 小鼠遭受全身辐射 3 小时后,通过尾静脉注入稳定表达萤光素酶的 5×10^6 SEMK2 细胞(从急性淋巴细胞性白血病患者的骨髓建立)。未受辐射的小鼠也可用于这些研究。如果不予处理,在这一模型中这种形式的白血病在 3 周内是致命的。例如,通过对小鼠注射 D- 萤光素(60mg/kg) 并对麻醉的动物成像(例如, Xenogen In Vivo Imaging System, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) 很容易地监测该白血病。通过 Living Image Software (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) 进行光子通量 (photonic flux) (光子 / 秒) 的积分 (integration) 对全身生物发光量进行定量。例如,拟肽大环化合物单独或与亚最佳剂量的相关化学治疗剂联合通过尾静脉或 IP 途径以 0.1mg/kg-50mg/kg 的剂量在 7-21 天的时间内向白血病小鼠施用(注射 / 实验的第 1 天之后 8-10 天, 14-16 的生物发光)。任选地,在整个实验过程中每隔一天对小鼠成像,并在实验期间每天监测其存活。在实验结束时任选地对死亡的小鼠进行尸体检查。另一种动物模型是将稳定表达萤光素酶的 DoHH2 (源自人类滤泡性淋巴瘤的细胞系) 植入到 NOD-SCID 小鼠中。这些体内试验任选地产生初步的药代动力学、药效学和毒理学数据。

[0458] 临床试验

[0459] 为了确定本发明的拟肽大环化合物对于人类治疗的适用性,进行了临床试验。例如,选择出诊断为患有癌症并需要治疗的患者并将他们分成治疗组和一个或多个对照组,其中,对治疗组施用本发明的拟肽大环化合物,而对照组接受安慰剂、已知的抗癌药物或标准治疗。这样,可以通过对患者组就如生存率和生活质量的因素进行比较来评价本发明的拟肽大环化合物的治疗安全性和有效性。在这个实施例中,相比于用安慰剂或标准护理治疗的患者对照组,用拟肽大环化合物治疗的患者组显示提高的长期生存率。

[0460] 药物组合物和给药途径

[0461] 给药方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、口服、舌下、脑内、阴道内、经皮、直肠、通过吸入或通过涂覆于耳、鼻、眼睛或皮肤的局部施用。

[0462] 本发明的拟肽大环化合物也包括其药学上可接受的衍生物或前药。“药学上可接受的衍生物”指本发明的化合物的任何药学上可接受的盐、酯、酯的盐、前药或其他衍生物,其在向接受者施用后能够提供(直接或间接地)本发明的化合物。例如,当向哺乳动物施用时,药学上可接受的衍生物可以提高本发明的化合物的生物利用度(例如,通过提高口服施用的化合物进入血液的吸收),或相对于母体物质增加活性化合物向生物区室(例如,脑或淋巴系统)的递送。一些药学上可接受的衍生物包含提高水溶性或跨过胃肠粘膜的主动转运的化学基团。

[0463] 在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物通过共价或非共价地连接的合适的官能团修饰,以提高选择性的生物学性质。这样的修饰包括那些提高进入特定生物区室(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)的生物学渗透性、提高口服利用度、增加溶解性以

允许注射施用、改变代谢以及改变排泄率的修饰。

[0464] 本发明的化合物的药学上可接受的盐包括那些由药学上可接受的无机和有机的酸和碱。合适的酸式盐的例子包括乙酸盐、己二酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、棕榈酸盐 (palmoate)、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和十一酸盐 (undecanoate)。由合适的碱衍生的盐包括碱金属盐 (例如, 钠盐)、碱土金属盐 (例如, 镁盐)、铵盐和 N-(烷基)₄⁺ 盐。

[0465] 为了由本发明的化合物制备药物组合物, 药学上可接受的载体包括固体或液体载体。固体形式的制剂包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊剂、扁囊剂、栓剂和分散颗粒剂。固体载体可以是一种或多种物质, 其也可以作为稀释剂、调味剂、粘合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包封材料发挥作用。在科学文献和专利文献中详细描述了配制和给药技术的细节, 参见, 例如, 最新版本 of Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA。

[0466] 在粉剂中, 载体是细碎的固体, 其与细碎的活性成分混合。在片剂中, 活性成分与具有必要粘合性质的载体按照适当的比例混合, 并压制成需要的形状和大小。

[0467] 合适的固体赋形剂是碳水化合物或蛋白质填料, 包括但不限于: 糖, 包括葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇; 来自玉米、小麦、大米、马铃薯或其他植物的淀粉; 纤维素, 如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠; 和树胶, 包括阿拉伯树胶和黄蓍胶; 以及蛋白质, 如明胶和胶原蛋白。如果需要的话, 加入崩解剂或增溶剂, 如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐 (如海藻酸钠)。

[0468] 液体形式的制剂包括溶液、悬浮液和乳液, 例如, 水或水 / 丙二醇溶液。对于肠胃外注射, 液体制剂可以在水性聚乙二醇溶液中配制成溶液。本文所用的术语“肠胃外”是指施用模式, 包括静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内、胸骨内 (intrasternal) 和皮下施用。

[0469] 药物制剂优选为单位剂型。在这样的形式中, 制剂细分为含有适量活性成分的单位剂量。单位剂型可以是包装制剂, 该包装包含不连续量的制剂, 如包装的片剂、胶囊和小瓶或安瓿中的粉末。另外, 单位剂型可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身, 或者可以是适当数目的包装形式的这些剂型中的任一种。

[0470] 当本发明的组合物包含拟肽大环化合物和一种或多种另外的治疗剂或预防剂的组合时, 该化合物和另外的药剂都应该以通常在单一治疗方案中施用的剂量的大约 1-100% 的剂量水平, 更优选大约 5-95% 的剂量水平存在。在某些实施方式中, 另外的药剂作为多剂量方案的一部分与本发明的化合物分开施用。或者, 这些药剂是单一剂型的一部分, 在单一组合物中与本发明的化合物混合在一起。

[0471] 使用方法

[0472] 一方面, 本发明提供了新的拟肽大环化合物, 其可在竞争性结合分析中用于鉴别可结合拟肽大环化合物模拟的蛋白质或肽的天然配体的物质。例如, 在 BH3/BCL-X_L 抗凋亡系统中, 基于 BH3 的标记的拟肽大环化合物可以与竞争结合 BCL-X_L 的小分子一起用于 BCL-X_L 结合分析中。竞争结合研究允许在体外快速评价并确定对于 BH3/BCL-X_L 系统特异性的药物候选物。本发明进一步提供了产生针对拟肽大环化合物的抗体的方法。在某些实施方式中, 这些抗体特异性地结合拟肽大环化合物和衍生拟肽大环化合物的 BH3 拟肽前

体。例如,这样的抗体分别破坏 BH3/BCL-XL 系统。

[0473] 在其他方面,本发明提供了治疗处于患与(例如,不足或过量)BCL-2 家族成员的异常表达或活性(例如,外来或内在的凋亡途径异常)有关的疾病的危险中(或对所述疾病敏感)或患有所述疾病的受试者的预防方法和治疗方法。据信,某些 BCL-2 型疾病是由(至少部分地)一种或多种 BCL-2 家族成员的异常水平(例如,过度表达或不足表达)引起,或由一种或多种显示异常活性的 BCL-2 家族成员的存在引起。这样,BCL-2 家族成员的水平 and / 或活性的降低或者 BCL-2 家族成员的水平 and / 或活性的提高用来例如缓解或减轻疾病的负面症状。

[0474] 在一个实施方式中,本发明的化合物是用于治疗与 Mcl-1 的表达或过度表达有关的疾病。Mcl-1 已被证明在许多组织和肿瘤细胞系中表达,并且被认为参与肿瘤的发生(Thallinger 等人(2004)Clin. Cancer Res. 10:4185-4191)。本发明的拟肽大环化合物可用于治疗这种恶性肿瘤。

[0475] 在一个实施方式中,待治疗的疾病(如癌症)对本发明的拟肽大环化合物具有不同的反应。在某些实施方式中,癌症用 BIM 拟肽大环化合物来治疗,且如体外细胞活性分析所测量的,对于使用 BID 多肽(如 BID 拟肽大环化合物或非交联的多肽)的治疗的敏感性低至少 2 倍。在其他的实施方式中,如体外细胞活性分析所测量的,癌症对于使用 BID 多肽的治疗的敏感性低至少 5 倍。在更其他的实施方式中,如体外细胞活性分析所测量的,癌症对于使用 BID 多肽的治疗的敏感性低至少 8 倍。在其他的实施方式中,癌症用 BID 拟肽大环化合物来治疗,且如体外细胞活性分析所测量的,对于使用 BIM 多肽(如 BIM 拟肽大环化合物或非交联的多肽)的治疗的敏感性低至少 2 倍。在其他的实施方式中,如体外细胞活性分析所测量的,癌症对于使用 BIM 多肽的治疗的敏感性低至少 5 倍。在更其他的实施方式中,如体外细胞活性分析所测量的,癌症对于使用 BIM 多肽的治疗的敏感性低至少 8 倍。

[0476] 在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定 BCL- 家族蛋白的水平,并且如果检测到 BCL- 家族蛋白的异常或不规则表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。BCL- 家族蛋白包括例如,BCL-2、BCL-XL、MCL-1、Bfl1/A1、B00/DIVA、NRH/NR13、BAX、BAD、BAK、BOK、BIK、PUMA、BIM、BMF、BLK、BNIP3、HRK、NIX、SPIKE 和 Noxa。在一个实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BCL-2 的水平,并且如果检测到 BCL-2 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BCL-XL 的水平,并且如果检测到 BCL-XL 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 MCL-1 的水平,并且如果检测到 MCL-1 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BAX 的水平,并且如果检测到 BAX 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BAD 的水平,并且如果检测到 BAD 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BAK 的水平,并且如果检测到 BAK 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的

PUMA 的水平,并且如果检测到 PUMA 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 Noxa 的水平,并且如果检测到 Noxa 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 Noxa 的水平,并且如果检测到 Noxa 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 Bf11/A1 的水平,并且如果检测到 Bf11/A1 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 B00/DIVA 的水平,并且如果检测到 B00/DIVA 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 NRH/NR13 的水平,并且如果检测到 NRH/NR13 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BOK 的水平,并且如果检测到 BOK 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BIK 的水平,并且如果检测到 BIK 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BMF 的水平,并且如果检测到 BMF 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BLK 的水平,并且如果检测到 BLK 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 BNIP3 的水平,并且如果检测到 BNIP3 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 HRK 的水平,并且如果检测到 HRK 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 Nix 的水平,并且如果检测到 Nix 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。在另一种实施方式中,提供了治疗人类患者的方法,包括进行检测以确定患者中的 SPIKE 的水平,并且如果检测到 SPIKE 的异常或不规则的表达水平,那么向患者施用拟肽大环化合物。

[0477] 如本文所用,术语“治疗”定义为向患者应用或施用治疗剂,或者向从患者分离的组织或细胞系应用或施用治疗剂,所述患者患有疾病、疾病症状或具有患病倾向,目的是治愈、恢复、减轻、解除、改变、矫正、缓解、改善或影响疾病、疾病症状或患病倾向。

[0478] 在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物用来治疗、预防和 / 或诊断癌症和肿瘤病症。如本文所用,术语“癌症”、“过度增殖的”和“肿瘤性的”指具有自发生长能力的细胞,即,以快速增殖的细胞生长为特征的异常状态或疾病。过度增殖性的和肿瘤性的疾病状态可以分为病理性的,即,表现或构成疾病状态;或者可以分为非病理性的,即,偏离正常但与疾病状态无关。该术语意味着包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性的组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而与组织病理类型或侵入的阶段无关。转移性肿瘤可以由许多原发性肿瘤类型产生,包括但不限于:乳腺、肺、肝、结肠和卵巢源的肿瘤类型。“病理性过度增殖”细胞出现于以恶性肿瘤生长为特征的状态中。非病理性过度增殖细胞的

例子包括与创伤修复有关的细胞增殖。细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括癌症,例如,癌瘤、肉瘤或转移性疾病。在某些实施方式中,拟肽大环化合物是用于控制乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、这些癌症的转移等的新的治疗剂。

[0479] 癌症或肿瘤状态的例子包括但不限于:纤维肉瘤、肌肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胃癌、食道癌、直肠癌、胰癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、头颈癌、皮肤癌、脑癌、鳞状细胞癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯肿瘤、子宫颈癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、淋巴瘤或卡波西肉瘤。

[0480] 增殖性疾病的例子包括造血系统肿瘤性疾病。如本文所用,术语“造血系统肿瘤性疾病”包括涉及造血系统起源的(例如,源自骨髓、淋巴或红细胞谱系的)增生性 / 肿瘤性细胞或其前体细胞的疾病。优选地,疾病起因于分化不良的急性白血病,例如,成红细胞白血病和急性巨核母细胞性白血病。另外的示例性的骨髓疾病包括但不限于:急性早幼粒细胞白血病 (APML)、急性髓性白血病 (AML) 和慢性髓性白血病 (CML) (综述见于 Vaickus(1991), Crit Rev. Oncol. / Hemotol. 11:267-97); 淋巴恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴细胞性白血病 (ALL), 包括 B- 谱系 ALL 和 T- 谱系 ALL、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、幼淋巴细胞性白血病 (PLL)、毛细胞白血病 (HLL) 和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (WM)。其他形式的恶性淋巴瘤包括但不限于:非何杰金氏淋巴瘤及其变体、外周 T 细胞淋巴瘤、成人 T 细胞性白血病 / 淋巴瘤 (ATL)、皮肤 T 细胞性淋巴瘤 (CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病 (LGF)、何杰金氏病和里德 - 斯特恩伯格病。

[0481] 乳腺的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于:增殖性乳腺疾病,包括,例如,上皮细胞增生、硬化性腺病和小管乳头状瘤;肿瘤,例如,如纤维腺瘤、叶状肿瘤和肉瘤的基质肿瘤,和如大管乳头状瘤的上皮肿瘤;乳腺的癌,包括原位(非侵袭性)癌(包括原位导管癌(包括佩吉特病)和原位小叶癌)和侵袭性(浸润性)癌(包括但不限于,浸润性导管癌、浸润性小叶癌、髓样癌、胶样(粘液)癌、管状癌和浸润性乳头状癌);和混杂性的恶性肿瘤。男性乳房疾病包括但不限于男性乳房发育症和癌。

[0482] 肺的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于:支气管癌,包括副肿瘤综合征、细支气管肺泡癌、神经内分泌肿瘤,例如,支气管类癌瘤、混杂性的肿瘤和转移的肿瘤;胸膜的病状包括炎性胸腔积液、非炎性胸腔积液、气胸和胸膜肿瘤(包括孤立性纤维性肿瘤(胸膜纤维瘤)和恶性间皮瘤)。

[0483] 结肠的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于:非肿瘤性息肉、腺瘤、家族性综合征(familial syndromes)、结肠直肠癌形成、结肠直肠癌和类癌肿瘤。

[0484] 肝的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于:结节性增生、腺瘤和恶性肿瘤,包括肝的原发癌和转移性的肿瘤。

[0485] 卵巢的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于:卵巢肿瘤,例如,体腔上皮肿瘤、浆液性肿瘤、粘液瘤、子宫内膜样瘤、透明细胞腺癌、囊腺纤维瘤、布伦纳瘤、表面上皮性肿瘤;生殖细胞瘤,例如,成熟(良性)畸胎瘤、单胚层畸胎瘤、不成熟的恶性畸胎瘤、无性

细胞瘤、内胚窦瘤、绒膜癌；生殖索-间质肿瘤 (sexcord-stomal tumors)，例如，粒层-卵泡膜细胞瘤、泡膜细胞瘤 (thecoma)、男性母细胞瘤 (androblastomas)、希尔细胞瘤 (hill cell tumors) 和性腺母细胞瘤；和如克鲁肯贝格瘤的转移瘤。

[0486] 乳腺癌

[0487] 一个方面，本发明提供了通过施用本发明的拟肽大环化合物来治疗乳腺癌的方法。乳腺癌包括浸润性乳腺癌，如浸润性导管癌、浸润性小叶癌、管状癌、浸润性筛状癌、髓样癌、粘液癌和具有丰富的粘蛋白的其他肿瘤、囊腺癌、柱状细胞粘液癌、印戒细胞癌 (signet ring cell carcinoma)、神经内分泌肿瘤（包括固体神经内分泌癌、非典型类癌肿瘤、小细胞/燕麦细胞癌或大细胞神经内分泌癌）、浸润性乳头状癌、浸润性微乳头状癌、大汗腺癌、化生性癌 (metaplastic carcinoma)、纯上皮化生性癌、混合上皮/间质化生性癌、富含脂质的癌、分泌癌、嗜酸细胞癌 (oncocytic carcinoma)、腺样囊性癌、腺泡细胞癌、糖原丰富的透明细胞癌、皮脂腺癌 (sebaceous carcinoma)、炎性癌或双侧乳腺癌；间质细胞肿瘤，如血管瘤 (haemangioma)、血管瘤 (angiomatosis)、血管外皮瘤 (haemangiopericytoma)、假血管瘤样间质增生 (pseudoangiomatous stromal hyperplasia)、肌纤维母细胞瘤 (myofibroblastoma)、纤维瘤病（侵袭性的）、炎性成肌纤维细胞肿瘤、脂肪瘤、血管脂肪瘤、颗粒细胞瘤、神经纤维瘤、神经鞘瘤 (schwannoma)、血管肉瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌瘤或平滑肌肉瘤 (leiomyosarcoma)；肌上皮病变 (myoepithelial lesion)，如肌上皮瘤病 (myoepitheliosis)、腺肌上皮腺病 (adenomyoepithelial adenositis)、腺肌上皮瘤 (adenomyoepithelioma) 或恶性肌上皮瘤；纤维上皮肿瘤 (fibroepithelial tumour)，如纤维腺瘤、叶状肿瘤、低级管周间质肉瘤 (low grade periductal stromal sarcoma) 或乳腺错构瘤；以及乳头肿瘤，如乳头腺瘤、汗腺瘤样腺瘤 (syringomatous adenoma) 或乳头的 Paget 氏病。

[0488] 乳腺癌的治疗可以与任何其他疗法（如作为标准治疗的一部分的治疗方法）相结合实现。可以在用本发明的拟肽大环化合物的治疗之前、期间或之后，进行外科手术方法（如乳房肿瘤切除术或乳房切除术）。可选择地，放射治疗可以与本发明的拟肽大环化合物结合用于乳腺癌的治疗。在其他情况下，本发明的拟肽大环化合物的施用与第二治疗剂结合。这种治疗剂可以是化学治疗药物，如单独的药物或药物和治疗的组合。例如，化学治疗剂可以是辅助化学治疗，如 CMF（环磷酰胺、甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶）；FAC 或 CAF（5-氟尿嘧啶、阿霉素、环磷酰胺）；AC 或 CA（阿霉素和环磷酰胺）；AC-Taxol（AC 接着紫杉醇）；TAC（多西他赛、阿霉素和环磷酰胺）；FEC（5-氟尿嘧啶、表阿霉素和环磷酰胺）；FEC-D（FEC 接着多西他赛）；TC（多西他赛和环磷酰胺）。除了化学治疗，根据肿瘤特性（即，HER2/neu 状况）和复发的风险，也可以将曲妥珠单抗 (trastuzumab) 添加到治疗方案中。在化学治疗性治疗之前、期间或之后，激素治疗也可能是适当的。例如，可以施用他莫西芬或芳香酶抑制剂类的化合物，包括但不限于氨鲁米特 (aminoglutethimide)、阿那曲唑、依西美坦、福美坦、来曲唑或伏氯唑。在其他的实施方式中，抗血管生成剂可以用于乳腺癌的联合治疗中。抗血管生成剂可以是抗 VEGF 药物，包括但不限于贝伐单抗 (bevacizumab)。

[0489] 卵巢癌

[0490] 另一个方面，本发明的拟肽大环化合物可用于治疗卵巢癌。卵巢癌包括卵巢肿瘤，例如，体腔上皮瘤、浆液性瘤、粘液瘤、子宫内膜样瘤、透明细胞腺癌、囊腺纤维瘤、布伦纳

瘤、表面上皮性肿瘤；生殖细胞瘤，例如，成熟（良性）畸胎瘤、单胚层畸胎瘤、不成熟的恶性畸胎瘤、无性细胞瘤、内胚窦瘤、绒膜癌；生殖索-间质肿瘤（sex cord-stromal tumors），例如，粒层-卵泡膜细胞瘤、泡膜细胞瘤纤维瘤（thecoma fibromas）、男性母细胞瘤、希尔细胞瘤和性腺母细胞瘤；和转移瘤如克鲁肯贝格瘤

[0491] 本发明的拟肽大环化合物可以与第二治疗（如作为标准治疗的一部分的治疗方法）结合施用。外科手术、免疫治疗、化学治疗、激素治疗、放射治疗或其结合是可用于卵巢癌的一些可能的治疗方法。一些可能的外科手术方法包括减积（debulking）和单侧或双侧卵巢切除术和/或单侧或双侧输卵管切除术（salpingectomy）。

[0492] 可以使用的抗癌药物包括环磷酰胺、依托泊苷、六甲蜜胺（altretamine）和异环磷酰胺。使用药物他莫昔芬的激素治疗可用于缩小卵巢肿瘤。放射治疗可能是体外激光辐射治疗和/或短距离放射治疗。

[0493] 前列腺癌

[0494] 另一方面，本发明的拟肽大环化合物可用于治疗前列腺癌。前列腺癌包括腺癌和转移的腺癌。本发明的拟肽大环化合物可以与第二疗法（如作为标准治疗的一部分的治疗方法）结合施用。前列腺癌的治疗可以包括外科手术、放射治疗、高强度聚焦超声（HIFU）、化学治疗、冷冻手术、激素治疗或其任何组合。手术可以包括前列腺切除术、经会阴前列腺根治切除术、腹腔镜前列腺根治切除术、经尿道前列腺切除或睾丸切除术。放射疗法可包括体外激光辐射治疗和/或短距离放射治疗。激素治疗可以包括睾丸切除术；施用抗雄激素物质如氟他胺、比卡鲁胺、尼鲁米特或醋酸环丙孕酮；抑制肾上腺雄激素（如 DHEA）产生的药物，如酮康唑和氨鲁米特；和 GnRH 拮抗剂或激动剂，如 Abarelix（**Plenaxis®**）、西曲瑞克（**Cetrotide®**）、加尼瑞克（**Antagon®**）、亮丙瑞林（leuprolide）、戈舍瑞林、曲普瑞林或布舍瑞林。阻断体内雄激素活性的抗雄激素药物的治疗是另一种可用的治疗方法。这类药物包括氟他胺、比卡鲁胺和尼鲁米特。这种疗法通常结合 LHRH 类似物的施用或睾丸切除术，这被称为联合雄激素阻断（CAB）。化学治疗包括但不限于施用多西他赛，例如结合皮质类固醇如泼尼松。也可以施用抗癌药物如阿霉素、雌莫司汀、依托泊苷、米托蒽醌、长春碱、紫杉醇、卡铂，以减缓前列腺癌生长，减轻症状和提高生活质量。也可以施用另外的化合物，如双膦酸盐类药物。

[0495] 肾癌

[0496] 另一方面，本发明的拟肽大环化合物可用于治疗肾癌。肾癌包括但不限于，肾细胞癌、来自肾外的原发癌的转移癌、肾淋巴瘤、鳞状细胞癌、近肾小球的肿瘤（肾素分泌瘤（reninomas））、移行细胞癌、血管肌脂瘤、嗜酸粒细胞腺瘤和维尔姆斯肿瘤。施用本发明的拟肽大环化合物可以与第二疗法（如作为标准治疗的一部分的治疗方法）相结合。肾癌的治疗可以包括手术、经皮疗法、放射疗法、化学疗法、疫苗或其他药物。可用于与本发明的拟肽大环化合物结合治疗肾癌的外科手术技术包括肾切除术，其可以包括切除肾上腺、腹膜后淋巴结、以及任何受肿瘤侵袭影响的其他周围组织。经皮治疗包括，例如，图像引导治疗，其可能涉及肿瘤成像，接着是通过射频消融或冷冻治疗靶向破坏肿瘤。在某些情况下，其他化学治疗或其他用于治疗肾癌的药物可以是 α -干扰素、白介素-2、贝伐单抗、索拉非尼（sorafenib）、sunitib、temsirolimus 或其他的激酶抑制剂。

[0497] 胰腺癌

[0498] 在其他方面,本发明提供了通过施用本发明的拟肽大环化合物治疗胰腺癌的方法,例如选自如下的胰腺癌:胰管组织中的上皮癌和胰管中的腺癌。胰腺癌的最常见的类型是腺癌,其出现于胰管内层。可用于胰腺癌的可能的治疗方法包括手术治疗、免疫疗法、放射疗法和化学治疗。可能的手术治疗选项包括远侧或全胰切除术和胰十二指肠切除术(Whipple 程序)。放射治疗可以是胰腺癌患者的选择,特别是辐射通过在身体外部的机器聚焦于肿瘤的体外激光辐射。另一种选择是手术过程中施用的术中电子束辐射。化学治疗也可用于治疗胰腺癌患者。合适的抗癌药物包括但不限于,5- 氟尿嘧啶(5-FU)、丝裂霉素、异环磷酰胺、阿霉素、链脲菌素、吡葡亚硝脲(chlorozotocin)及其组合。本发明提供的方法可以通过施用本发明的多肽或通过施用拟肽大环化合物与手术、放射治疗或化学治疗的结合为胰腺癌患者提供有利的效果。

[0499] 结肠癌

[0500] 一方面,本发明的拟肽大环化合物可用于结肠癌的治疗,包括但不限于非肿瘤性息肉、腺瘤、家族性综合征、结肠直肠的癌发生、结肠直肠癌和类癌瘤。可以结合本发明的拟肽大环化合物使用的可能用于结肠癌的治疗包括手术、化学治疗、放射治疗或靶向药物治疗。

[0501] 放射疗法可以包括体外激光辐射治疗和/或短距离放射治疗。化学治疗可用于降低转移发生的可能性、缩小肿瘤的大小或减缓肿瘤的生长。化学治疗通常在手术后(辅助)、手术前(新辅助)应用,或如果不需要手术,则作为主要治疗(姑息的)。例如,辅助化学治疗的示例性的方案包括输注 5- 氟尿嘧啶、亚叶酸和奥沙利铂(FOLFOX)的组合。一线化学治疗方案可能包括输注 5- 氟尿嘧啶、亚叶酸和奥沙利铂(FOLFOX)与靶向药物(如贝伐单抗、西妥昔单抗(cetuximab)或帕尼单抗(panitumumab))组合,或输注 5- 氟尿嘧啶、亚叶酸和依立替康(FOLFIRI)与靶向药物(如贝伐单抗、西妥昔单抗或帕尼单抗)组合。可以用于与本发明的拟肽大环化合物结合治疗或预防结肠癌的其他化学治疗药物是硼替佐米(Bortezomib)(**Velcade®**)、奥利默森(Oblimersen)(**Genasense®**, G3139)、吉非替尼(Gefitinib)和厄洛替尼(Erlotinib)(**Tarceva®**)及拓扑替康(Topotecan)(**Hycamtin®**)。

[0502] 肺癌

[0503] 某些实施方式提供了使用本发明的拟肽大环化合物治疗肺癌的方法。肺的细胞增殖和/或分化疾病的例子包括但不限于,支气管癌,

[0504] 包括副肿瘤综合征、支气管肺泡癌、神经内分泌肿瘤,如支气管类癌瘤、混杂肿瘤和转移性肿瘤;胸膜病状,包括炎性胸腔积液、非炎性胸腔积液、气胸和胸膜肿瘤(包括单独纤维瘤(胸膜纤维瘤)和恶性间皮瘤)。

[0505] 肺癌的最常见的类型是非小细胞肺癌(NSCLC),其占肺癌的大约 80-85%,且被分为鳞状细胞癌、腺癌和大细胞未分化癌。小细胞肺癌(例如小细胞肺癌瘤),占肺癌的大约 15-20%。肺癌的治疗选项包括手术、免疫疗法、放射疗法、化学治疗、光动力学疗法或其组合。一些可能用于肺癌治疗的外科手术选项是分段切除术或楔形切除术、肺叶切除术或全肺切除术。放射治疗可能是体外激光辐射治疗或短距离放射治疗。一些可用于与本发明

的拟肽大环化合物结合治疗肺癌的化学治疗中的抗癌药物包括顺铂、卡铂、紫杉醇、多西他赛、吉西他滨、长春瑞滨、伊立替康、依托泊苷、长春碱、吉非替尼、异环磷酰胺、甲氨蝶呤或其组合。光动力学疗法 (PDT) 可用于治疗肺癌患者。本文所述的方法可以通过施用本发明的拟肽大环化合物或通过施用本发明的拟肽大环化合物施用与手术、放射治疗、化学治疗、光动力学疗法或其组合的结合为肺癌患者提供有利的效果。

[0506] 肝脏的细胞增殖和 / 或分化疾病的例子包括但不限于, 结节性增生、腺瘤和恶性肿瘤, 包括肝脏的原发癌和转移性肿瘤。

[0507] 免疫增殖疾病

[0508] 免疫增殖障碍 (也称为“免疫增殖疾病”或“免疫增殖肿瘤”) 是免疫系统的疾病, 其特征免疫系统的原代细胞 (包括 B 细胞、T 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞) 的异常增殖, 或免疫球蛋白 (也称为抗体) 的过度产生。这些疾病包括大类的淋巴增殖性疾病、高丙种球蛋白血症和异常血红蛋白症。这类疾病的例子包括但不限于, X 关联性淋巴组织增殖性疾病、常染色体淋巴增殖性疾病、高 IgM 综合征、重链病和冷球蛋白血症。其他免疫增殖疾病可以是移植物抗宿主病 (GVHD)、牛皮癣、与移植排斥反应有关的免疫系统疾病、T 细胞淋巴瘤、T 细胞急性淋巴细胞性白血病; 睾丸的血管中心性 (angiocentric) T 细胞淋巴瘤、良性淋巴细胞性血管炎和自身免疫性疾病 (如红斑狼疮、桥本甲状腺炎、原发性粘液性水肿、格雷夫斯氏病、恶性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、阿狄森病 (Addison's disease)、胰岛素依赖型糖尿病、戈德帕斯彻综合征、重症肌无力、天疱疮、克罗恩病、交感性眼炎、自身免疫性葡萄膜炎、多发性硬化、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少症、原发性胆汁性肝硬化、慢性作用的肝炎、溃疡性 (ulceratis) 结肠炎、干燥综合征、类风湿关节炎、多发性肌炎、硬皮病和混合性结缔组织病)。

[0509] 联合治疗

[0510] 在一个实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物可用于与烷基化与烷基化类药物结合治疗癌症。这类药物包括, 例如, 氮芥类, 如苯丁酸氮芥、甲川氯、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑; 亚硝基脲类, 如卡莫司汀、福莫司汀、洛莫司汀和链佐星; 铂类治疗药物, 如卡铂、顺铂、奥沙利铂、BBR3464 和沙铂 (satraplatin); 或其他药物, 包括但不限于白消安、达卡巴嗪、丙卡巴肼、替莫唑胺、噻替哌、曲奥舒凡或乌拉莫司汀。

[0511] 在另一实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物可以结合作为抗代谢物的抗肿瘤药物一起使用。例如, 这样的抗肿瘤药物可以是叶酸, 如氨基蝶呤、甲氨蝶呤、培美曲唑 (pemetrexed) 或雷替曲塞。可选择地, 抗肿瘤药物可以是嘌呤, 包括但不限于克拉屈滨、氯法拉滨 (clofarabine)、氟达拉滨、巯嘌呤、喷司他丁、硫鸟嘌呤。在进一步的实施方式中, 抗肿瘤药物可以是嘧啶类, 如卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氟尿苷 (Floxuridine) 和吉西他滨。

[0512] 在更其他的实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物可以与作为纺锤体抑制剂 / 有丝分裂抑制剂的抗肿瘤药物结合一起使用。这类药物包括紫杉烷类, 例如多西他赛和紫杉醇; 长春花属生物碱类, 例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。在更其他的实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物可以结合作为来自蒽环家族的细胞毒性 / 抗肿瘤抗生素的抗肿瘤药, 如柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、匹杉琼 (pixantrone) 或戊柔比星 (valrubicin); 来自链霉菌家族的抗生素, 如放线菌素、博来霉素、丝裂霉素或普卡霉

素 ;或羟基脲。可选择地,用于联合治疗的药物可以是拓扑异构酶抑制剂,包括但不限于喜树碱、拓扑替康、伊立替康、依托泊苷或替尼泊苷。

[0513] 可选择地,抗肿瘤药物可以是抗体或抗体衍生的药物。例如,可以使用靶向受体酪氨酸激酶的抗体(如西妥昔单抗、帕尼单抗或曲妥珠单抗)。可选择地,抗体可以是抗 CD20 抗体,如利妥昔单抗(rituximab)或托西莫单抗(tositumomab),或任何其他合适的抗体,包括但不限于阿伦单抗(alemtuzumab)、贝伐单抗和吉姆单抗。在其他的实施方式中,抗肿瘤药物是光敏剂,如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠或维替泊芬。在更其他的实施方式中,抗肿瘤药物是酪氨酸激酶抑制剂,如西地尼布(dediranib)、达沙替尼(dasatinib)、埃罗替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)、伊马替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、尼罗替尼(nilotinib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)或凡德他尼(vandetanib)。适用于本发明的其他肿瘤药物包括,例如,阿利维 A 酸(alitretinoin)、维 A 酸、六甲蜜胺、安吡啶、阿那格雷、三氧化二砷、天冬酰胺酶(培门冬酶)、蓓萨罗丁(bexarotene)、硼替佐米、地尼白介素-毒素连接物(denileukin diftitox)、雌莫司汀、伊沙匹隆(ixabepilone)、马索罗酚或米托坦。

[0514] 在其他或进一步的实施方式中,本文所述的拟肽大环化合物用于治疗、预防或诊断以过度活化的细胞死亡或由于生理损害导致的细胞死亡等为特征的状态。特征为过早的或不希望的细胞死亡或者不需要的或过度的细胞增殖的状态的一些例子包括但不限于细胞减少的/细胞减生的、非细胞的/再生障碍的或过多细胞的/增生性的状态。一些例子包括血液系统疾病,包括但不限于范可尼贫血、再生障碍性贫血、地中海贫血(thalassaemia)、先天性中性白细胞减少、脊髓发育不良。

[0515] 在其他或进一步的实施方式中,用于减少细胞凋亡的本发明的拟肽大环化合物用于治疗与不需要的细胞死亡水平有关的病症。因此,在某些实施方式中,本发明的抗凋亡拟肽大环化合物用来治疗诸如那些与病毒感染(例如,与人类免疫缺陷病毒(HIV)感染有关的感染)有关的导致细胞死亡的病症。许多种神经系统疾病特征在于特定集合的神经元的逐渐损失,且在某些实施方式中,本发明的抗凋亡拟肽大环化合物用于治疗这些病症。这些病症包括阿尔茨海默氏症、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、视网膜色素变性、脊髓性肌萎缩症和各种形式的小脑变性。这些疾病中的细胞损失不引发炎症反应,且细胞凋亡表现为细胞死亡的机制。此外,许多血液系统疾病与血细胞产生的减少有关。这些病症包括与慢性疾病有关的贫血、再生障碍性贫血、慢性中性粒细胞减少和骨髓发育异常综合征。有关血细胞的产生的病症(如骨髓发育异常综合征和某些形式的再生障碍性贫血)与骨髓内的凋亡性细胞死亡的增加有关。这些疾病可能由促进细胞凋亡的基因活化、基质细胞或造血存活因子的获得性缺陷、或毒素和免疫应答介质的直接作用而产生。与细胞死亡有关的两种常见的疾病是心肌梗塞和中风。在这两种疾病中,缺血(血流急性丧失事件中产生的)中心区域中的细胞似乎由于坏死而迅速死亡。然而,在缺血中心区域以外,细胞在更长的时期内死亡,且形态上表现为由于细胞凋亡而死亡。

[0516] 其他的使用方法

[0517] 在其他或进一步的实施方式中,本发明的抗凋亡拟肽大环化合物用于治疗所有与不需要的细胞死亡有关的病症。

[0518] 用本文所述的拟肽大环化合物治疗的免疫病症的一些例子包括但不限于器官移

植排斥反应、关节炎、狼疮、IBD、克罗恩病、哮喘、多发性硬化症、糖尿病等。

[0519] 用本文所述的拟肽大环化合物治疗的神经病症的一些例子包括但不限于阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、荷兰型遗传性脑出血的淀粉样变性、反应性淀粉样变性、带有荨麻疹和耳聋的家族性淀粉样肾病、穆-韦二氏综合征 (Muckle-Wells Syndrome)、特发性骨髓瘤；巨球蛋白血症相关的骨髓瘤、家族性淀粉样多发性神经病、家族性淀粉样心肌病、分离的心脏淀粉样蛋白 (Isolated Cardiac Amyloid)、全身性老年淀粉样变性、成人发病型糖尿病、胰岛瘤、分离的前房淀粉样蛋白 (Isolated Atrial Amyloid)、甲状腺的髓样癌、家族性淀粉样变性、具有淀粉样变性的遗传性脑出血、家族性淀粉样变性多发性神经病 (Familial Amyloidotic Polyneuropathy)、瘙痒病、克-雅氏病 (Creutzfeldt-Jacob Disease)、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克 (Gerstmann Straussler-Scheinker) 综合征、牛海绵状脑炎、朊病毒介导的疾病和亨廷顿氏病。

[0520] 用本文所述的拟肽大环化合物治疗的内分泌病症的一些例子包括但不限于糖尿病、甲状腺功能减退症、垂体功能减退、甲状旁腺功能低下症、性腺机能减退等。

[0521] 用本文所述的拟肽大环化合物治疗或预防的心血管病症（例如，炎性病症）的一些例子包括但不限于动脉粥样硬化、心肌梗塞、中风、血栓形成、动脉瘤、心力衰竭、缺血性心脏病、心绞痛、心源性猝死、高血压性心脏病；非冠状血管疾病如小动脉硬化、小血管疾病、肾病、高甘油三酯血症、高胆固醇血症、高脂血症、黄瘤症、哮喘、高血压、肺气肿和慢性肺疾病；或与介入过程（“过程性血管创伤”）相关的心血管状态，如血管成形术和分流管、支架、合成或天然的切除移植物、留置导管、阀或其他可植入装置的放置之后的再狭窄。优选的心血管疾病包括动脉粥样硬化、心肌梗塞、动脉瘤和中风。

实施例

[0522] 下面的部分提供了本发明的说明性的实施例。

[0523] 实施例 1. 本发明的拟肽大环化合物的合成

[0524] 如前所述 (Walensky 等人 (2004) Science 305:1466-70 ;Walensky 等人 (2006) Mol Cell 24:199-210) 且如下所示合成、纯化和分析 α -螺旋 BID 和 BIM 拟肽大环化合物。用于这一研究中的大环化合物如下面所示。相应的未交联的多肽表示为“WT 序列”，并代表本发明的拟肽大环化合物的天然对应物。

[0525]

大环 化合 物	WT 序列	序列	计算的 m/z 值 (M+H)	计算的 m/z 值 (M+3H)	实测的 m/z 值 (M+3H)
SP-1	BID-BH3	Ac-DIIRNIARHLA\$VGD\$NleDRSI-NH2	2438.40	813.47	813.7
SP-2	BID-BH3	Ac-DIIRNIARHLA\$VED\$NleDRSI-NH2	2510.42	837.48	837.25
SP-3	BID-BH3	Ac-DIIRNIARHLA\$VGD\$NleDRSI-NH2	2403.32	801.78	801.89
SP-4	BIM-BH3	Ac-IWIAQELR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2646.43	882.82	883.15
SP-5	BIM-BH3	Ac-IWIAQELR\$IED\$FNAYYARR-NH2	2718.45	906.82	906.9
SP-6	BIM-BH3	Ac-IWIAQELRRIGDEFNAYYARR-NH2	2681.41	894.47	894.69
SP-7	BID-BH3	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$NleDRSI-NH2	2139.25	713.76	713.79
SP-8	BID-BH3	Pr-RNIARHLAib\$VAibD\$NleDRSI-NH2	2153.27	718.43	718.56
SP-9	BID-BH3	Pr-RNIARHLA\$VAibD\$FARSI-NH2	2129.25	710.42	710.3
SP-10	BID-BH3	Pr-RNIARHLA\$VGD\$NleAibRSI-NH2	2081.25	694.42	694.42
SP-11	BIM-BH3	Ac-IWIAQALR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2588.43	863.48	863.85
SP-12	BIM-BH3	Ac-RWIAQALR\$IGNle\$FNAYYARR-NH2	2629.5	877.17	877.8

[0526]

		Pr-RNChgARHLA\$VAibD\$FNAYYARR-NH			
SP-13	BIM-BH3	2	2622.45	874.82	875.22
SP-14	BIM-BH3	Ac-IWIAQALR\$IGD\$FNAibYYARR-NH2	2602.44	868.15	868.54
SP-15	BIM-BH3	Ac-RWIAQALR\$IGD\$FNAFYARR-NH2	2615.45	872.49	872.64
SP-16	BIM-BH3	Ac-RWIAQALR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2587.45	863.16	863.39
SP-17	BIM-BH3	Ac-IWIAQAibLR\$IGD\$FNAibYYARR-NH2	2616.46	872.82	872.91
SP-18	BIM-BH3	Ac-IWIAQQLR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2645.45	882.49	882.62
SP-19	BIM-BH3	Ac-RWIAQQLR\$IGD\$FNAYYARR-NH2	2688.46	896.83	896.84
SP-20	BIM-BH3	Ac-IWIAQALR\$IGD\$FNARRA-NH2	2262.3	754.77	755.08
SP-21	BIM-BH3	Ac-IWIAQALR\$IGD\$FNAYKA-NH2	2241.26	747.76	748.12
SP-22	BIM-BH3	Ac-IWIAQALR\$IGD\$FNAYK-NH2	2170.22	724.08	724.35
SP-23	BIM-BH3	Ac-RWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH2	2630.45	877.48	877.36
SP-24	BIM-BH3	Ac-IWIAQAAR\$DIG\$ANAYYARR-NH2	2470.34	824.11	824.10
SP-25	BIM-BH3	Ac-IWIAQALR\$IGN\$FNAYYARR-NH2	2587.43	863.14	863.00
SP-26	BIM-BH3	Ac-IWIAQALRRIGDEFNAYYARR-NH2	2623.39	875.13	874.97

[0527] 根据 Williams 等人 (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:9276 ; 和 Schafmeister 等人 (2000) J. Am. Chem. Soc. 122:5891 的方法合成含有烯属侧链的 α , α -二取代的非天然氨基酸。通过用相应的合成氨基酸替代 2 个天然氨基酸来设计 BID-BH3 和 BIM-BH3 拟肽大环化合物。在 i 和 i+4 位置进行取代。通过固相肽合成和随后经其含烯的侧链进行合成氨基酸

的基于烯烃复分解反应的交联来产生 BID-BH3 和 BIM-BH3 大环化合物。BID 和 BIM 拟肽大环化合物的对照序列以及产生的特定的序列变异如上所示。

[0528] 在所示的序列中,“Nle”代表正亮氨酸,“Aib”代表 2-氨基异丁酸,“Chg”代表环己基甘氨酸,“Ac”代表乙酰基,和“Pr”代表丙酰基。\$ 表示的氨基酸连接包含 1 个双键的全碳交联剂,且其中交联剂连接的各 α -碳原子另外地被甲基取代。在所有情况下,交联剂是在各个氨基酸的 α -碳原子之间包含 8 个碳原子的线性全碳交联剂。如果存在双键,它位于第四和第五碳原子之间。

[0529] 非天然氨基酸 (5 碳烯属氨基酸的 R 和 S 对映异构体和 8 碳烯属氨基酸的 S 对映异构体) 由核磁共振 (NMR) 光谱 (Varian Mercury 400) 和质谱 (Micromass LCT) 进行鉴定。肽的合成使用固相条件, rink amideAM 树脂 (Novabiochem) 和 Fmoc 主链保护基化学手动地或在自动肽合成仪 (Applied Biosystems, model 433A) 上进行。对于天然的 Fmoc 保护的氨基酸 (Novabiochem) 的偶联,使用 10 当量的氨基酸和 1:1:2 摩尔比的偶联试剂 HBTU/HOBt (Novabiochem)/DIEA。非天然的氨基酸 (4 当量) 利用 1:1:2 摩尔比的 HATU (Applied Biosystems)/HOBt/DIEA 进行偶联。在固相中,使用溶于脱气二氯甲烷中的 10mM 的 Grubbs 催化剂 (Blackwell 等人 1994, 同上) (Strem Chemicals) 进行烯烃复分解反应,并在室温下反应 2 小时。通过三氟乙酸介导的去保护和切割实现复分解的化合物的分离,通过醚沉淀产生粗产物,和在反相 C18 柱 (Varian) 上进行高效液相 (HPLC) (Varian ProStar) 以产生纯化合物。通过 LC/MS 质谱 (Micromass LCT, 与 Agilent 1100HPLC 系统连接) 和氨基酸分析 (Applied Biosystems, 420A 型) 确认纯产物的化学组成。

[0530] 细胞系

[0531] 用于本研究的细胞系如下表所示:

[0532]

细胞	类型	来源
Jurkat	人急性 T 细胞白血病	ATCC
K562	人慢性粒细胞白血病	ATCC
Karpas299	人 T 细胞淋巴瘤	ATCC
MOLT4	人 T 细胞白血病	NCI
RPMI8226	人 B 型成淋巴细胞瘤	NCI
Ramos	人 B 细胞淋巴瘤	ATCC
Raji	人 B 细胞淋巴瘤	ATCC
HL-60	人骨髓性白血病	NCI
Malme-3M	肺恶性黑色素瘤	NCI

SKMEL2	人恶性黑素瘤	NCI
SKMEL5	人恶性黑素瘤	NCI
PC3	人前列腺腺癌	NCI
Caki1	人肾透明细胞癌	NCI

[0533]

HCT116	人结肠直肠癌	NCI
HT-29	结肠直肠腺癌	NCI
HEPG2	人肝细胞癌	ATCC
MDAMB231	人乳腺癌	NCI
MCF7	人乳腺癌	NCI
A549	人非小细胞肺癌	NCI
H460	人非小细胞肺癌	NCI
NCI-H220	人小细胞肺癌	NCI
NCI-H146	人小细胞肺癌	NCI
NCI-H128	人小细胞肺癌	ATCC
SKOV3	人卵巢腺癌	NCI
Panc-1	人胰癌	ATCC
U251	人成胶质细胞瘤	ATCC
NCI-H82	人小细胞肺癌	
Supt1	人 T 细胞淋巴瘤	
DHL-6	人 B 细胞淋巴瘤	
RS4 ;11	人淋巴性白血病	
MM1S	人多发性骨髓瘤	
SEMK2	人混合谱系白血病	

A375	人恶性黑色素瘤	
OVCAR8	人卵巢癌	

[0534] 实施例 2. 细胞活力检测：

[0535] 根据以下方案进行图 1-32 所示的细胞活力检测。根据需要,肿瘤细胞系在特定的补充血清的培养基(生长培养基)中生长。在研究开始的前一天,以最佳细胞密度(15,000 至 25,000 细胞/孔)将细胞接种在微滴定板中的 200 μ l 生长培养基中。第二天,在不含血清的/不含酚红的 RPMI 完全培养基(分析缓冲液)中洗涤细胞两次,并将各个孔添加至 100 μ l 终体积的分析缓冲液。使用 Ficoll-Paque 梯度分离从棕黄层(Buffy coats)(San Diego Blood Bank)分离人外周血淋巴细胞(hPBL),并在实验当天以 25000 细胞/孔的密度接种。

[0536] 拟肽大环化合物用无菌水从 1mM 的原液(100% DMSO)进行稀释,以制备 400 μ M 的工作溶液。然后,稀释拟肽大环化合物和对照物 10 或 40 倍,或者可选择地,在定量给药板中用分析缓冲液系列地进行 2 倍稀释,以分别提供 40 和 20 μ M 的或者 1.2 至 40 μ M 之间的浓度。然后向测试板的合适的孔中添加 100 μ L 的各稀释液,以分别获得等于 20 或 5 μ M 或者 0.6 至 20 μ M 之间的拟肽大环化合物的终浓度。对照包括与含有拟肽大环化合物的孔含有相同浓度的 DMSO 而没有拟肽大环化合物的孔、含有 0.1% Triton X-100 的孔、含有由 1 μ M Velcade、100 μ M 依托泊苷和 20 μ M Taxol 组成的化学混合物的孔及不含细胞的孔。板在 37°C 下在湿润的 5% CO₂ 气氛中温育 4 小时。

[0537] 在接近 4 小时温育时间结束时,向各个孔添加 22 μ l FBS 至 10% FBS 的总浓度。在添加血清后,板在 37°C 下在湿润的 5% CO₂ 气氛中温育另外的 44 小时。在温育期结束时,根据制造商的说明书(Sigma, 目录号 #M2128)进行 MTT 检测,并使用 Dynex Opsys MR 读板器在 560nm 处测量吸光度。

[0538] 在图 1-3 中,各值按百分细胞毒性作图,即作为对应于 100% 细胞死亡的阳性对照的百分比。在图 4-15、25 和 26 中,各值按存活百分比作图,即作为对应于 100% 存活细胞的阴性对照的百分比。所有的检测进行四次。

[0539] 图 1 显示用 SP-1(20 μ M)处理的人肿瘤细胞系,并在测试样品添加 48 小时后通过 MTT 分析评定细胞活力。所有测试的白血病/淋巴瘤细胞系对于 SP-1 敏感。此外,SP-1 也诱导几种实体瘤细胞系(包括三种小细胞肺癌(SCLC)细胞系,NCI-H220、NCI-H128 和 NCI-H146)的凋亡。相反,有几种实体瘤细胞系抗 SP-1,包括非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系 A-549 和 H-460、MCF7(乳腺癌)和 U251(神经胶质瘤)。图 2 显示,用 5 μ M 的 SP-1 或 SP-4 处理 7 种人白血病/淋巴瘤细胞系 48 小时,并评估细胞活力。如图所示,所有细胞系对于这种浓度的两种大环化合物均显示出类似的敏感性。

[0540] 图 3 显示测试了对于 SP-1 或 SP-4(20 μ M)的敏感性的 12 种人实体肿瘤细胞系。如图所示,它们似乎对于各种测试的大环化合物存在敏感性的细胞特异性差异。在图 4-15 中显示了单个细胞系对于 SP-1、SP-2、SP-3、SP-4、SP-5 和 SP-6 的 EC₅₀ 曲线。

[0541] 根据类似的方案进行图 34-52 所示的细胞活力分析。在开始这项研究前 1 天,以最佳细胞密度分割细胞。第二天,用不含血清的 Opti-MEM 培养基洗涤细胞 2 次,并向各个孔添加 4000 细胞/孔至 100 μ l Opti-MEM 的终体积。对于不含血清的实验,大环化合物用

无菌水从 2mM 的原液 (100% DMSO) 稀释,以制备 400 μ M 的工作溶液。然后,通过用分析缓冲液 10 倍稀释产生 40 μ M 的溶液。接着在定量给药板中,大环化合物和对照用分析缓冲液进行系列的 2 倍稀释,以分别提供 1.2 至 40 μ M 之间的浓度。对于在 2% 人血清中的实验,大环化合物用无菌水从 10mM 的原液 (100% DMSO) 稀释,以制备 1mM 的工作溶液。然后,通过用分析缓冲液 10 倍稀释产生 100 μ M 的溶液。接着在定量给药板中,大环化合物和对照用分析缓冲液系列地 2 倍稀释,以分别提供 3 至 100 μ M 之间的浓度。然后向测试板的合适的孔中添加 50 μ L 的各稀释液,以分别获得 0.6 至 20 μ M 之间 (对于不含血清的实验) 或 1.5 至 50 μ M 之间 (对于 2% 血清的实验) 的大环化合物浓度。对照包括与含拟肽大环化合物的孔含有相同浓度的 DMSO 而没有拟肽大环化合物的孔、含有 0.1% Triton X-100 的孔及不含有细胞的孔。板在 37°C 下在湿润的 5% CO₂ 气氛中温育 24 小时。在 24 小时温育期结束时,根据制造商的说明书 (Promega, 目录 #G7571) 进行 CellTiter-Glo 发光细胞活力分析,并使用 BIO-TEK synergy HT 读板器测量发光。各值作为存活百分比作图,即作为阴性对照 (得自仅暴露于 DMSO 的细胞) 的百分比。所有分析进行四次。

[0542] 下面的表格总结了在各种不同细胞系中,用本发明的拟肽大环化合物观察到的 EC₅₀ 值 (μ M) :

[0543] 不含血清的培养基中的 EC₅₀ 值

[0544]

化合物	MDA-MB231-Mc t	A375	PC3	OVCAR8	NCI-H82 (SCLC-MCL1+)
SP-1	9.8	11	20	20	2.5
SP-2	>20	>20	ND	>20	>20
SP-9	2.9	4.1	5.7	7.1	4.2
SP-10	3.1	5.2	6	8.1	5.7
SP-4	8.5	8	5	20	4.9
SP-11	2	4.3	4.6	3.2	1.2
SP-15	0.9	0.8	2.1	1.8	ND
SP-23	0.6	1	2	0.9	0.6
SP-12	0.5	0.7	1.9	0.7	0.9
SP-24	>20	>20	>20	>20	>20
SP-25	1	1	0.6	1.4	0.5

[0545] 2% 人血清中的 EC₅₀ 值

[0546]

化合物	MDA-MB231-Me t	A375	PC3	OVCAR8
SP-9	ND	ND	25.5	18.4
SP-10	ND	ND	24.4	19.1
SP-4	40	27	>50	>50
SP-11	ND	ND	23.4	10.7
SP-15	2.6	2.7	9.3	6.4
SP-23	3.8	2.7	4.2	4
SP-24	>50	>50	>50	>50
SP-25	4.3	3.8	9.5	6.9
SP-26	>50	>50	>50	>50

[0547] 各种液体肿瘤的 EC₅₀ 值

[0548]

化合物	Jurkat	SEMK2	Molt- 4	RS4; 11	Raji	DHL-6	MM1S
SP-1	2.5	10	4.3	>20	13	7	3.5
SP-2	>20	>20	>20	>20	>20	ND	>20
SP-3	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
SP-9	1.9	8.1	1	4.3	5.7	2.7	5.5
SP-10	1.9	8.2	1.9	3.5	5	1.9	2.5
SP-4	1.6	4	2.2	10	9	3.8	4.9
SP-11	0.9	2.6	1.6	3.7	2.7	0.9	1.9
SP-15	0.4	0.8	0.7	1.7	1	0.5	0.6
SP-23	0.9	1	0.6	1	1.8	0.5	0.7
SP-12	0.4	0.5	0.7	1.71	0.3	ND	ND
SP-24	>20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SP-25	0.5	0.9	0.9	1	1.8	0.6	0.6

[0549] 实施例 3. BrdU 细胞增殖分析

[0550] 用或不用 5 μg/ml PHA、1 μM 离子霉素和 1 μg/ml LPS 刺激从两个不同的供体分

离的 hPBL,并在分析缓冲液中用 5 或 20 μM 的 SP-1 进行处理。1 μM 的雷帕霉素用作抑制 BrdU 掺入的阳性对照。在图 17 所示的条件下温育细胞 48 小时。根据制造商的说明 (Roche, 目录编号 11444611001) 通过 ELISA 分析 BrdU 的掺入。在图 17 中, Y 轴显示 OD = 吸光度 ($A_{405\text{nm}}/A_{492\text{nm}}$)。

[0551] 实施例 4. 拟肽大环化合物在人类白血病异种移植模型中的效力

[0552] 如前所述 (Armstrong 等人 (2003) Cancer Cell 3:173-83) 产生稳定表达萤光素酶的 SEMK2-LN 细胞。通过尾静脉向 6-8 周大的雌性 NOD-SCID 小鼠 (Jackson Laboratory) 注入 5×10^6 SEMK2-LN 细胞。如前所述 (Walensky 等人, Science 305:1466-1470 (2004)) 使用 Xenogen's 活体成像系统 (Caliper Life Sciences) 对这些动物成像,并通过光子通量 (光子/秒) 的积分 (用于 Xenogen In Vivo Imaging System 的活体成像软件, Caliper Life Sciences) 定量全身生物发光。在对动物注射白血病细胞后的第 8 天和第 12 天对动物成像,以确定带有确立的白血病的动物。在第 12 天,在开始治疗 (治疗第 1 天) 前,将动物分为具有统计学等量的发光的同龄组 (cohort)。白血病小鼠每天以 3 或 10mg/Kg/ 天的剂量进行 21 天或以 30mg/Kg/ 天的剂量进行 12 天的拟肽大环化合物尾静脉注射。动物在治疗过程中的第 1、3、5、7、9、13 和 17 天成像,获得的肿瘤减小的结果如图 18 所示。

[0553] 实施例 5. 免疫原性测定:

[0554] 用非偶联的 SP-1 或 SP-4 免疫 6-8 周大的 Balb/c 或 KM 雌性小鼠。收集预免疫的血清,并使用以下免疫程序表通过尾静脉按 D5W 注射 25 μg 的各种肽:收集在第 7 天和第 14 天的前两次免疫后的 7 天的血清及第三次和第四次免疫后的 14 天的血清。通过间接 ELISA 法测定抗体滴度。简言之,微滴定板在 4 $^{\circ}\text{C}$ 用 SP-1 或 SP-3 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 涂覆过夜。第二天,板用 PBS/0.05% Tween20 (PBST) 洗涤 5 次,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用 5% 的脱脂乳/PBST 封闭 1 小时,随后用 PBST 两次洗涤。抗血清进行系列稀释,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下添加到涂覆的板持续 1 小时。然后用 PBST 充分洗涤板,并进一步在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用 HRP 偶联的抗小鼠 IgG 或 IgM 温育 1 小时,并在加入 HRP 底物前用 PBST 洗涤 5 次。板在室温下温育 10 分钟,并用 0.5M 的草酸溶液终止反应。用 ELISA 微量读板器在 450nm 下读取吸光度。以 1:100 的稀释度测定对照血清和抗血清的 OD 值。图 20 中的曲线作为抗血清的 OD/ 对照血清的 OD 的比例作图。低于 4 的比例被认为是阴性的。

[0555] 实施例 6. 熔融温度 (T_m) 的测定:

[0556] 将冻干的 SP-1 溶于 ddH₂O 中至 50 μM 的终浓度。通过用 Jasco-810 分光偏振计在温度 5-95 $^{\circ}\text{C}$ 之间以固定波长 222nm 测量圆二色光谱 (CD) 确定 T_m 。以下参数用于测量:数据间距 (data pitch): 0.1 $^{\circ}\text{C}$;带宽:1nm 和路径长度:0.1 厘米,平均 16 秒的信号。结果如图 21 所示。

[0557] 实施例 7. 用于血浆稳定性测定的样品制备:

[0558] 对于活体外的血浆稳定性研究,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 μM 的 SP-1、SP-3、SP-4 和 SP-6 与预清除的人类和小鼠血浆一起温育 0、15 和 120 分钟。在各次孵化时间结束时,除去 100 μL 的样品,置于具有 300 μL 的冰冷 ME₂OH 的新的低保留的埃彭道夫管 (eppendorf tube) 中。以 10,000rpm 对样品进行离心,移出上清液,并置于新的低保留的埃彭道夫管中,并向各个样品加入 200 μL 水。如下所示,然后通过 LC-MS/MS 分析样品。结果如图 22 和 23 所示。

[0559] 实施例 8. 静脉内药代动力学分析:

[0560] 通过将 SP-1 或 SP-4 溶于 5% DMSO/D5W 制备 IV 给药制剂,以获得 10mg/Kg/ 剂量。插管的 Cr1 :CD[®] (SD) 雄性大鼠 (7-8 周大, Charles River Laboratories) 用于这些研究中。通过股动脉套管 (femoral cannula) 施用静脉内的剂量,并且动物以每单次注射 10mL/kg 的剂量给药。在 10 个时间点 (给药后 0.0833、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 小时) 收集血液用于药代动力学分析。在最后的样品采集后处死动物 (不进行尸检)。

[0561] 在 ~4°C 下,全血样品离心 (~1500x g) 10 分钟。制备血浆并在血液采集 / 离心的 30 分钟内转移到在 ~-70°C 下冷冻并在黑暗中保存的新管中直到其准备用于 LC-MS/MS 分析。

[0562] 通过向 100 µL 血浆 (样品或标准品) 添加 10 µL 的 50% 的甲酸,接着涡旋 10 秒来实现样品提取。加入 500 µL 乙腈,接着涡旋 2 分钟,并在 ~4°C 下以 14,000rpm 离心 10 分钟。将上清液转移到清洁管中,并在 37°C 和 <10psi 下在 trubovap 上进行蒸发。在 LC-MS/MS 分析之前,用 100 µL 的 50:50 乙腈 : 水对样品进行重构。

[0563] 由血浆浓度数据计算血浆峰浓度 ($C_{\max}$)、达到血浆峰浓度所需的时间 ($t_{\max}$)、血浆终末半衰期 ($t_{1/2}$)、血浆浓度时间曲线下面积 (AUC)、清除率和分布体积。通过非房室分析,使用 WinNonlin version 4.1 (Pharsight Corp) 进行所有药代动力学计算。图 24 总结了观察结果。

[0564] 使用下面的 LC-MS/MS 方法。简言之,所用的 LC-MS/MS 仪器是 API 365 (Applied Biosystems)。分析柱为 Phenomenex Synergi (4 µ, Polar-RP, 50mm x 2mm),以 0.4 毫升 / 分钟的流速泵送流动相 A (0.1% 甲酸于水中) 和 B (0.1% 甲酸于甲醇中),以实现以下梯度:

[0565]

时间 (分钟)	% B
0	15
0.5	15
1.5	95
4.5	95
4.6	15
8.0	终止

[0566] MRM:814.0 至 374.2 (正电离)

[0567] 实施例 9. 处理的细胞中的 FITC- 标记的拟肽大环化合物检测的 FACS 分析

[0568] 在具有 2mM L- 谷氨酰胺 (Invitrogen) 和补充有 10% FBS 和 1% 的青霉素 - 链霉素的 RPMI1640 培养基悬浮液中培养细胞 (如 Jurkat 细胞)。在实验日的前一天分种细胞以保持它们处于指数生长期。为了通过 FACS 分析 FITC 标记的拟肽大环化合物的摄取,指数增长的 Jurkat 细胞以 1×10^6 细胞的密度接种在 0.9 毫升不含血清的培养基中。使得细胞沉降直到化合物被稀释。测试化合物在 DMSO 中稀释为 2mM 的原液,接着用无菌水稀释至

400 μM ;使用 OptiMEM 进行进一步稀释至 100 μM 。因此,随后向合适的孔中添加 100 μL 的 100 μM FITC- 标记的拟肽大环化合物,以在 1 毫升体积中达到 10 μM 的终浓度。将板返回到 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳的培养箱中持续指定的时间点。在各时间点末期,用培养基稀释细胞悬液,洗涤两次,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 经受胰蛋白酶 (0.25%) 处理 15 分钟。然后用 OptiMem 洗涤细胞,最后重悬浮在 500 μL 的 PBS 中。使用每个样品计数至少 20000 事件的 Beckman Coulter FACS 设备测量细胞荧光。使用 Summit version 4, Dako Colorado, Inc. 进行分析。

[0569] 实施例 10. 蛋白质 - 配体结合实验

[0570] 按照下面列出的系统宽度对照试验 (system-wide control experiment) 的代表性的程序,使用 1 μM SP-4 加 5 μM 的 Bcl- x_L 进行蛋白质 - 配体结合实验。将拟肽大环化合物的 40 μM 析液的 1 μL 的 DMSO 等分试样溶于 19 μL 的 PBS (磷酸盐缓冲盐水 :50mM, pH 值 7.5, 包含 150mM NaCl 的磷酸盐缓冲液)。通过重复的移液操作混合获得的溶液,并通过以 10000g 离心 10 分钟进行澄清。向 4 μL 等分的获得的上清液中加入 4 μL 的于 PBS 中的 10 μM BCL- x_L 。因此,中为各 8.0 μL 实验样品以 PBS 中的 5.0 μM 的浓度包含 40pmol (1.5 μg) 蛋白质加上 1 μM 的拟肽大环化合物和 2.5% DMSO。为各浓度点如此制备的双份样本在室温下温育 60 分钟,然后在进行 5.0 μL 注射的大小排阻色谱 -LC-MS 分析之前冷却到 4 $^{\circ}\text{C}$ 。将含有目标蛋白质、蛋白质 - 配体复合物和未结合的化合物的样品注射到 SEC 柱上,在此复合物通过快速 SEC 步骤与未结合的成分分离。使用紫外检测器监测 SEC 柱洗脱液以确认早洗脱的蛋白质部分 (其在 SEC 柱的空隙体积洗脱) 与保留在柱上的未结合的成分良好区分。在含蛋白质和蛋白质 - 配体复合物的峰从主紫外检测器洗脱后,它进入样品环,其在此从 SEC 段的流动流切除,并通过阀机构直接转移到 LC-MS。通过 ESI-MS 观察在 m/z 883.8 处的 ALRN-0034 的 $(M+3H)^{3+}$ 离子,从而确认蛋白质 - 配体复合物的检测。

[0571] 实施例 11. 竞争结合实验

[0572] 通过组合 3 种化合物中每一种的 400 μM 原液的 2 μL 等分试样与 14 μL 的 DMSO 制备每种成分 40 μM 浓度的配体混合物。接着,将这一每种成分 40 μM 浓度的混合物的 1 μL 等分试样与滴定拟肽大环化合物的系列稀释原液 (10、5、2.5、...、0.078mM) 的 1 μL DMSO 等分试样组合。将这些 2 μL 样品溶于 38 μL 的 PBS 中。通过重复的移液操作混合获得的溶液,并通过以 10000g 离心 10 分钟进行澄清。向产生的上清液的 4 μL 等分试样中加入 4 μL 的于 PBS 中的 10 μM BCL- x_L 。因此,各 8.0 μL 实验样品以 PBS 中的 5.0 μM 浓度含有 40pmol (1.5 μg) 蛋白质,加上 0.5 μM 的配体、2.5% DMSO 和不同浓度的滴定拟肽大环化合物 (125、62.5、...、0.98 μM)。为各浓度点如此制备的双份样本在室温下温育 60 分钟,然后在进行 2.0 μL 注射的 SEC-LC-MS 分析之前冷却到 4 $^{\circ}\text{C}$ 。在以下文献中提供了关于这些方法和其他方法的进一步的细节:“A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures.” Annis, D. A. ;Nazef, N. ;Chuang, C. C. ;Scott, M. P. ;Nash, H. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15495-15503; 还有“ALIS: An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions”D. A. Annis, C. -C. Chuang 和 N. Nazef. In Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Edited by Wanner K, Höfner G: Wiley-VCH; 2007: 121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (Series Editors): Methods and Principles in Medicinal

Chemistry。

[0573] 实施例 12. 使用荧光测定法定量分析 FITC 标记的拟肽大环化合物的摄取

[0574] 在具有 2mM L- 谷氨酰胺 (Invitrogen) 并补充 10% FBS 和 1% 的青霉素 - 链霉素以及在 INA-6 细胞的情况下有 1ng/ml 的重组人 IL-6 补充剂的 RPMI1640 培养基悬浮液中培养细胞 (例如, INA-6 或 Jurkat 细胞)。在实验日的前一天, 分种细胞以保持它们处于指数生长期。为了分析细胞中 FITC 标记的拟肽大环化合物的摄取, 指数生长的细胞在 0.9 毫升不含血清的培养基中以 0.5×10^6 细胞的密度接种。使细胞沉降直到化合物被稀释。测试化合物在 DMSO 中稀释为 2mM 的原液, 接着用无菌水稀释至 $400 \mu\text{M}$; 使用 OptiMEM 进行进一步稀释至 $100 \mu\text{M}$ 。因此, 随后向合适的孔中添加 $100 \mu\text{l}$ 的 $100 \mu\text{M}$ FITC- 标记的拟肽大环化合物, 以在 1 毫升体积中达到 $10 \mu\text{M}$ 的终浓度。将板返回到 37°C 、5% 的二氧化碳培养箱中持续指定的时间点。如果需要, 也在 OptiMEM 中进行测试化合物的进一步稀释。在各个时间点结束时收获细胞, 用补充有 FBS 的 RPMI 洗涤两次, 并用 PBS+0.5% BSA 洗涤一次。再悬浮沉淀的细胞, 并在 37°C 下 5% CO_2 中与 0.25% Trypsin-EDTA 一起温育 15 分钟。温育后, 用含有血清的培养基洗涤细胞一次并用具有 0.5% BSA 的 PBS 洗涤两次。在洗涤结束时, 用来自 Cell Signaling Technologies 的含有 Triton X-100 的细胞裂解缓冲液裂解细胞。在 BioTek Synergy 4 仪上测量荧光强度。在细胞裂解缓冲液中进行用于标准曲线的 FITC 标记拟肽大环化合物的稀释, 并用于定量细胞中的拟肽大环化合物的量。使用 Biotek Inc. 提供的 Gen 5 软件进行分析。

[0575] 实施例 13. 拟肽大环化合物在原位前列腺肿瘤模型中的效力

[0576] 使用 **Bioware®** 细胞系 (PC-3M-Luc-C6) 和 5×10^6 细胞 / 小鼠 / $100 \mu\text{l}$ 进行实验。使用总共 70 只 nu/nu 雄性小鼠 (7-10 周大)。麻醉雄性 nu/nu 小鼠, 并沿其腹部的后中线前列腺正上方切开。使膀胱回缩并轻轻挤压以暴露前列腺。将 PC-3M-luc-C6 细胞 (5×10^5) 缓慢注入任一个背侧前列腺叶中。缝合腹膜切口, 并闭合皮肤。手术后, 向小鼠皮下施用丁丙诺啡 (0.1mg/kg , $50 \mu\text{l}$)。在伤口愈合后第 7 天, 对动物首次成像。基于在开始处理前的 BLI 将最后的 50 只小鼠分为 5 组 (每组 10 只)。从第 14 天起每周两次对实验小鼠成像, 进行 2.5 周。在实验结束时, 切开肿瘤并称重。然后将肿瘤切成两片进行快速冷冻, 并在 10% 福尔马林中固定。在肿瘤细胞接种位点观察到两个稳定或增高的生物发光信号后, 开始用测试化合物进行处理。使用以下几个测试组: 第 1 组 (载体, 每天 IV 给药), 第 2 组 (测试化合物, 以 10mg/kg 剂量每天 IV 给药), 第 3 组 (载体, 每天 i. p. 给药), 第 4 组 (测试化合物, 以 10mg/kg 剂量每天 i. p. 给药), 和第 5 组 (多西他赛 (Taxotere), 以 30mg/kg 剂量每周两次 IV 给药)。如下配制测试拟肽大环化合物。只使用低保留 / 硅化塑料管和尖头。通过将 140mg 的各大环化合物溶于 2.3mL 的 100% DMSO 中来制备各拟肽大环化合物的 60mg/mL 的原液。将原液分成 0.23mL 的 10 个等分试样用于每日施用 (14 毫克每小瓶), 并在 -20°C 保持冷冻。在给药的各天, 将一个小瓶解冻。通过将一个等分的原液稀释到 6.5mL 的过滤消毒的 5% 葡萄糖中来制得各大环化合物的工作浓度 (2mg/mL)。恒速搅拌下, 将 DMSO 原液逐滴加入 D5W 中。用 5% 葡萄糖调整溶液至 7 毫升的最终体积, 无需过滤消毒最后的剂量组成。给药体积为 5 微升 / 克 (对于 25 克的小鼠为 $125 \mu\text{L}$)。通过缓慢推注 (超过 30 秒) 将这剂药物输送给小鼠。图 45 显示前列腺癌原位异种移植模型的时间 - 处理 (time treatment)。测量各个实验动物的前列腺区域的生物发光, 并表示为光子

/ 秒。对体内肿瘤的生长动力学作图, 并且对于重复测量进行比因素 ANOVA (使用时间和治疗作为两个主因素 (factor))。获得各组的代表性小鼠的动力学小鼠图像, 并如图 43 所示。

[0577] 实施例 14. 使用卵巢癌 (SKOV3-Luc) 肿瘤的原位异种移植肿瘤模型

[0578] 将稳定表达萤火虫萤光素酶的 1×10^6 SKOV3-Luc 细胞注入麻醉的 SCID-beige 小鼠 (9 周大, 雌性) 的卵巢囊中。通过生物发光成像 (BLI) 每周监测这些动物。在肿瘤细胞接种位点观察到两个稳定或增高的生物发光信号后 (在这种模型中最多 9 周), 开始测试化合物的处理。在处理开始之前, 将动物随机分为对照组和治疗组 (10 只小鼠 / 组)。根据需要, 动物通过每天注射 (IP、IV 或 SC) 测试化合物 (低、中、高剂量) 和载体对照 10、14 和 / 或 21 天进行处理。通过比较拟肽大环化合物和载体对照处理的动物之间的肿瘤负荷确定效力。在 IP 注射 150mg/kg D- 萤光素后, 通过 BLI 监测肿瘤生长 / 体积, 并通过 IVIS 成像系统在背侧和腹侧成像。可以通过屏蔽原发肿瘤生物发光对转移性病灶进行成像。在实验结束时, 将动物人道地处死并切除卵巢肿瘤, 称重并制备用于随后的分析。

[0579] 实施例 15. 使用乳腺癌 (MDA-MB-231-Luc) 肿瘤的原位异种移植瘤模型

[0580] 将 1×10^6 稳定表达萤火虫萤光素酶的 MDA-MB-231-Luc 细胞注入麻醉的 SCID- 米色小鼠乳房组织 (9 周大, 雌性)。通过生物发光成像每周监测这些动物。在肿瘤细胞接种位点观察到两个稳定或增加的生物发光信号后, 开始测试化合物的治疗。在治疗开始之前, 将动物随机分为对照组和治疗组 (10 只小鼠 / 组)。根据需要, 通过每天注射 (IP、IV 或 SC) 测试化合物 (低、中、高剂量) 和载体对照 10、14 和 / 或 21 天, 治疗动物。通过比较拟肽大环化合物和载体对照治疗的动物之间的肿瘤负荷, 确定效力。在 IP 注射 150mg/kg D- 萤光素后, 通过生物发光成像 (BLI) 监测肿瘤生长 / 体积, 并通过 IVIS 成像系统在背面和腹面成像。通过屏蔽原发肿瘤生物发光, 可以对转移性病灶成像。在实验结束时, 将动物人道地处死并切除乳腺肿瘤, 称重和制备用于随后的分析。

[0581] 实施例 16. 使用黑素瘤 (A375) 或小细胞肺癌 (NCI-H-82) 肿瘤的皮下异种移植肿瘤模型

[0582] 根据需要, 通过皮下注射将优化量的肿瘤细胞注入麻醉的 NOD/SCID 或 nu/nu 小鼠的肋腹。当肿瘤达到 $20-50\text{mm}^3$ 的平均体积时, 将动物分为对照组和治疗组 (10 只小鼠 / 组)。通过按照需要每天注射 (IP、IV 或 SC) 测试化合物 (低、中、高剂量) 和载体对照 10、14 和 / 或 21 天对动物进行处理。通过比较测试化合物和载体对照处理的动物之间的肿瘤体积确定效力。通过外部测径器测量 (LxWxD) 监测肿瘤生长 / 体积。在实验结束时, 将动物人道地处死并切除肿瘤, 称重和制备用于随后的分析。

[0583] 实施例 17. 使用转移性乳腺癌 (MDA-MB-231-Met-Luc) 肿瘤的转移性肿瘤模型

[0584] 将稳定表达萤火虫萤光素酶的优化量的 MDA-MB-213-MET-Luc 细胞注入麻醉的 NOD/SCID 小鼠 (9 周大, 雌性) 的左心室中 (因此, 直接进入动脉系统)。通过在第 0 天的显示遍布于动物全身的全身性生物发光的图像来表明成功的心内注射, 且只有证明了令人满意的注射的小鼠保留在实验中。将动物分为对照组和治疗组 (10 只小鼠 / 组)。根据需要, 通过在 10、14 和 / 或 21 天内每天注射 (IP、IV 或 SC) 测试化合物 (低、中和高剂量) 和载体对照对动物进行处理。在 IP 注射 150mg/kg D- 萤光素后, 通过 BLI 每周两次体内监测继发转移的发展, 并通过 IVIS 成像系统在背面和腹面成像。特别监测肺和骨转移。在实验结束时, 将动物人道地致死并切除和制备感兴趣的组织用于体外成像和随后的分析。

[0585] 以上的肿瘤模型在 Jenkins, D. E. 等人, Clin. & Exp. Metastasis. 2003, 20, 745-756. ; Scatena C. D. 等人, Prostate 2004, 59, 292-303 ; Greenaway J. 等人, Mol. Cancer Ther. 2009, 8, 64-74 ; Guan, J. 等人, Cancer Chemo Pharma. 2008, Online Pub Dec. 24 和 Lelekakis, M. 等人, Clin & Exp Metastasis. 1999, 163-170 中更详细地进行了描述。

[0586] 虽然本文已显示和描述了本发明的优选实施方式, 对于本领域的技术人员显而易见的是, 这些实施方式只是以举例的方式提供。在不背离本发明的情况下, 本领域的技术人员可以想到许多变型、改变和替换。应该理解, 在实践本发明时, 可以采用本文所述的本发明的实施方式的各种替代方式。意图的是下列权利要求限定本发明的范围, 且这些权利要求范围内的方法和结构及其等效形式也包括在本发明内。

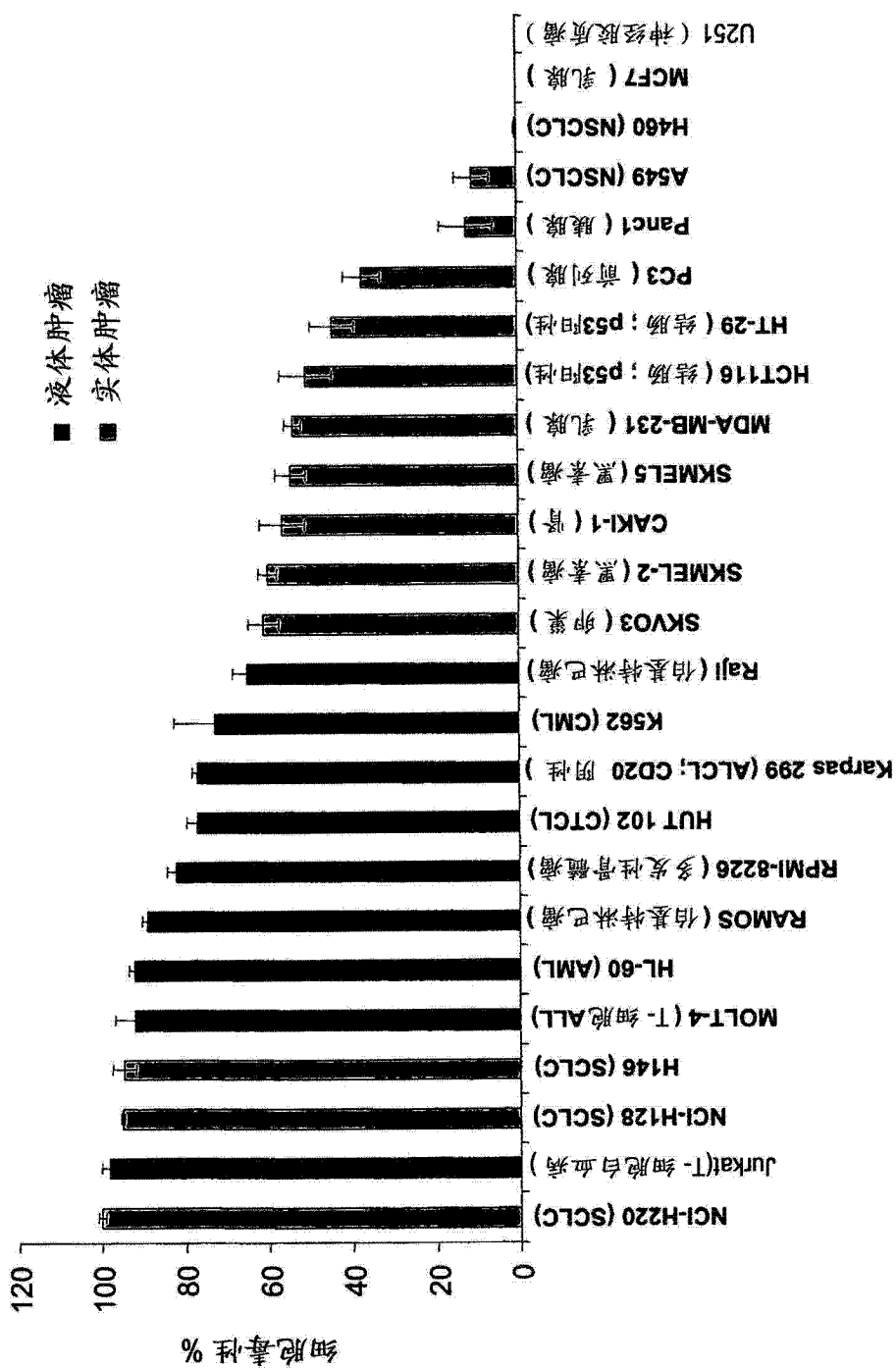


图 1

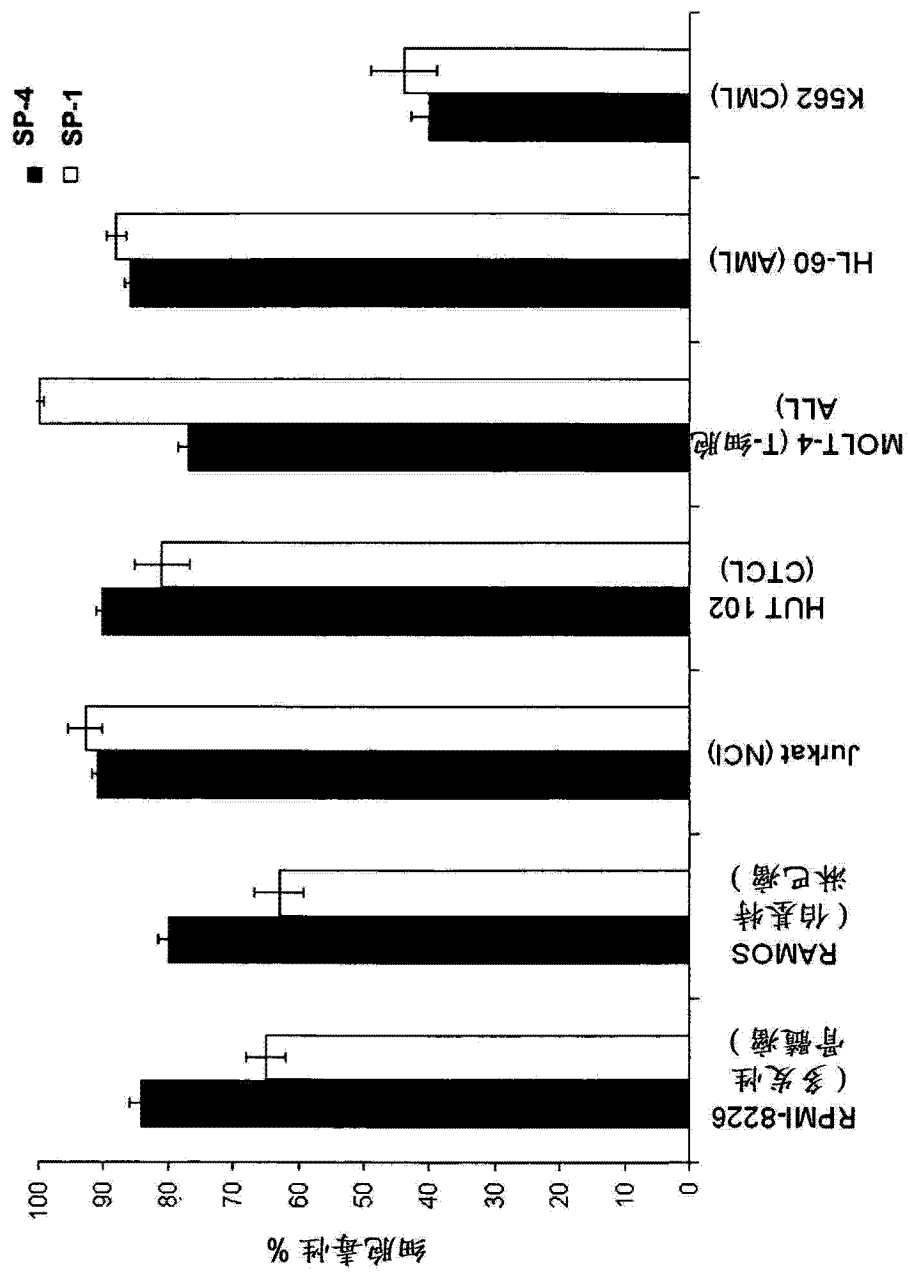


图 2

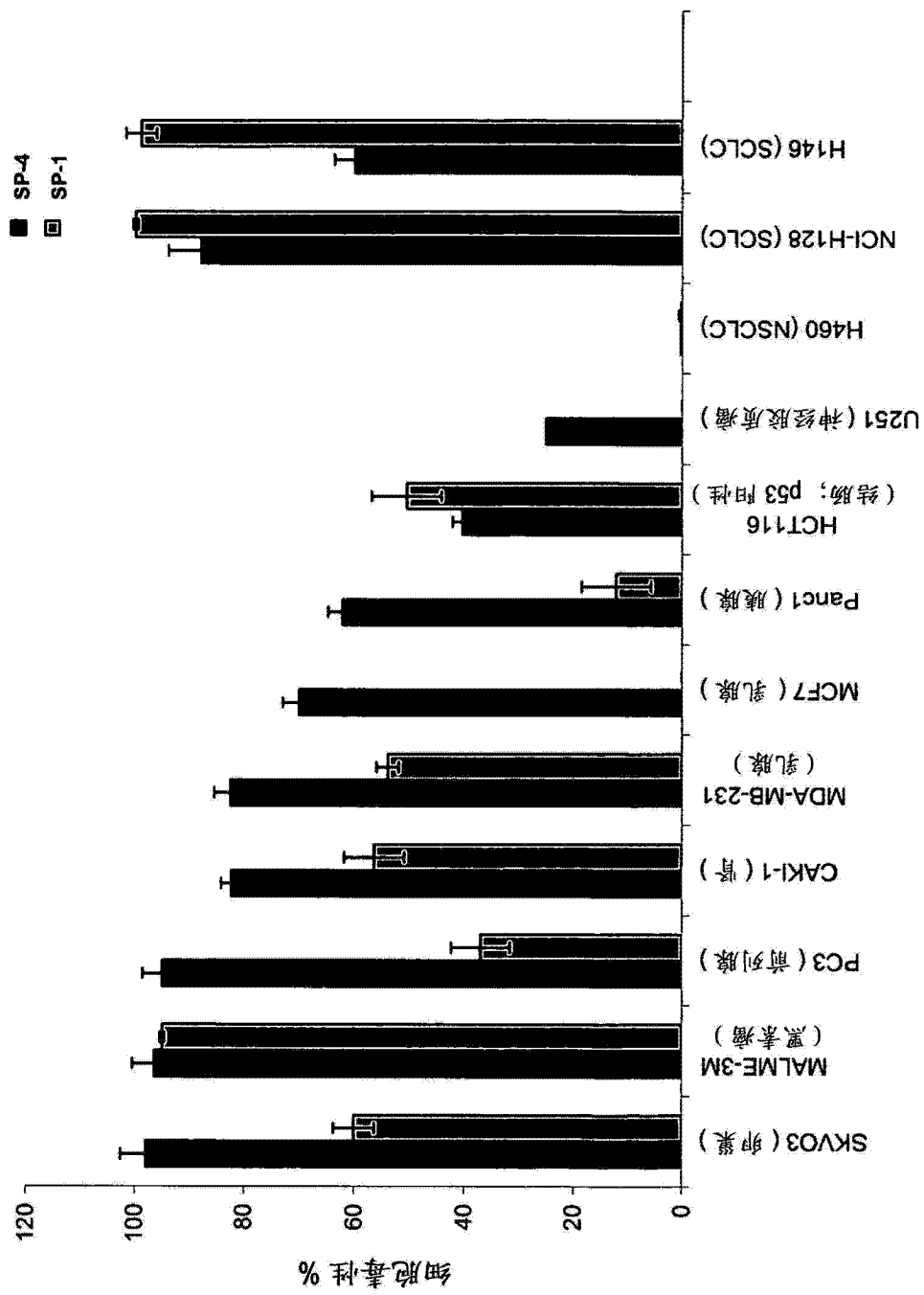


图 3

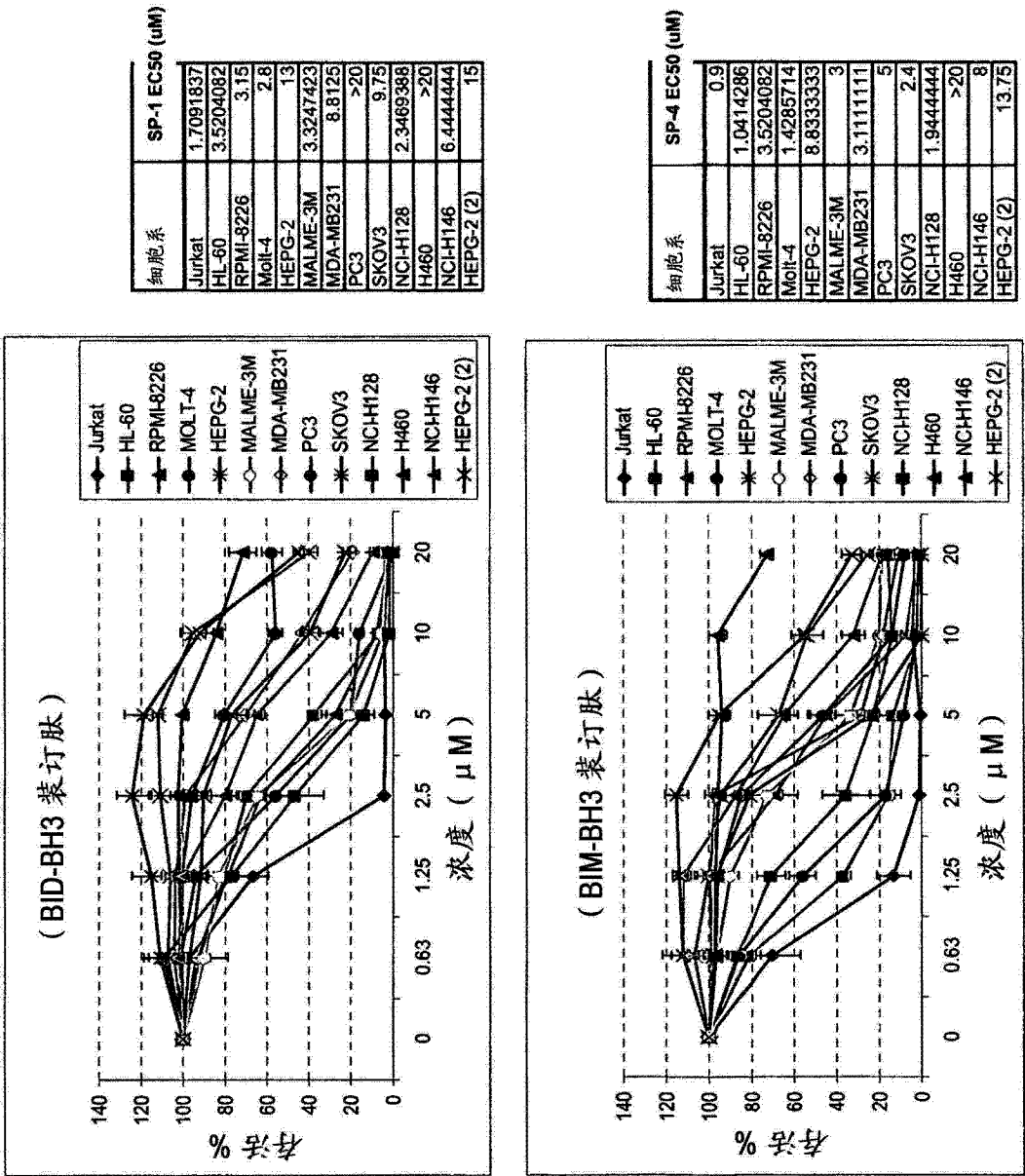


图 4

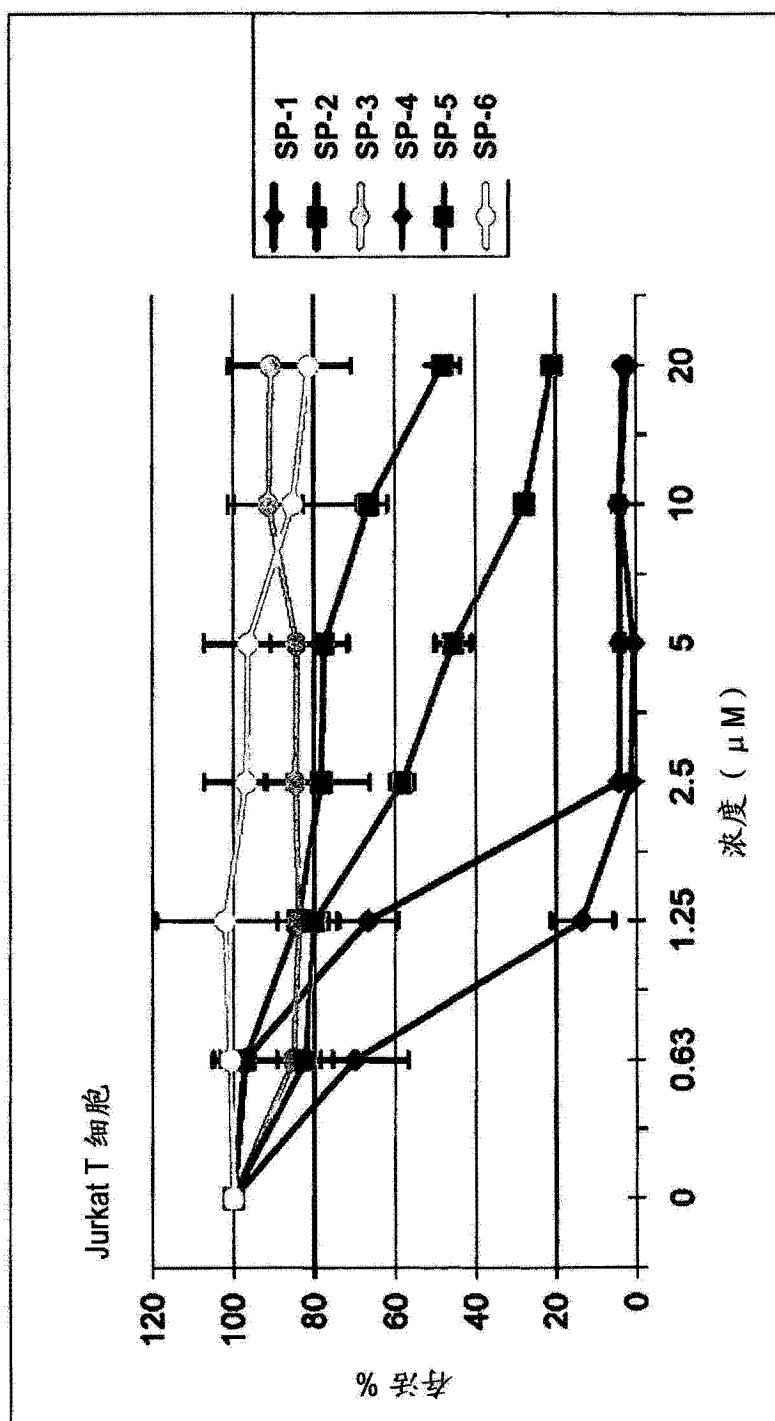


图 5

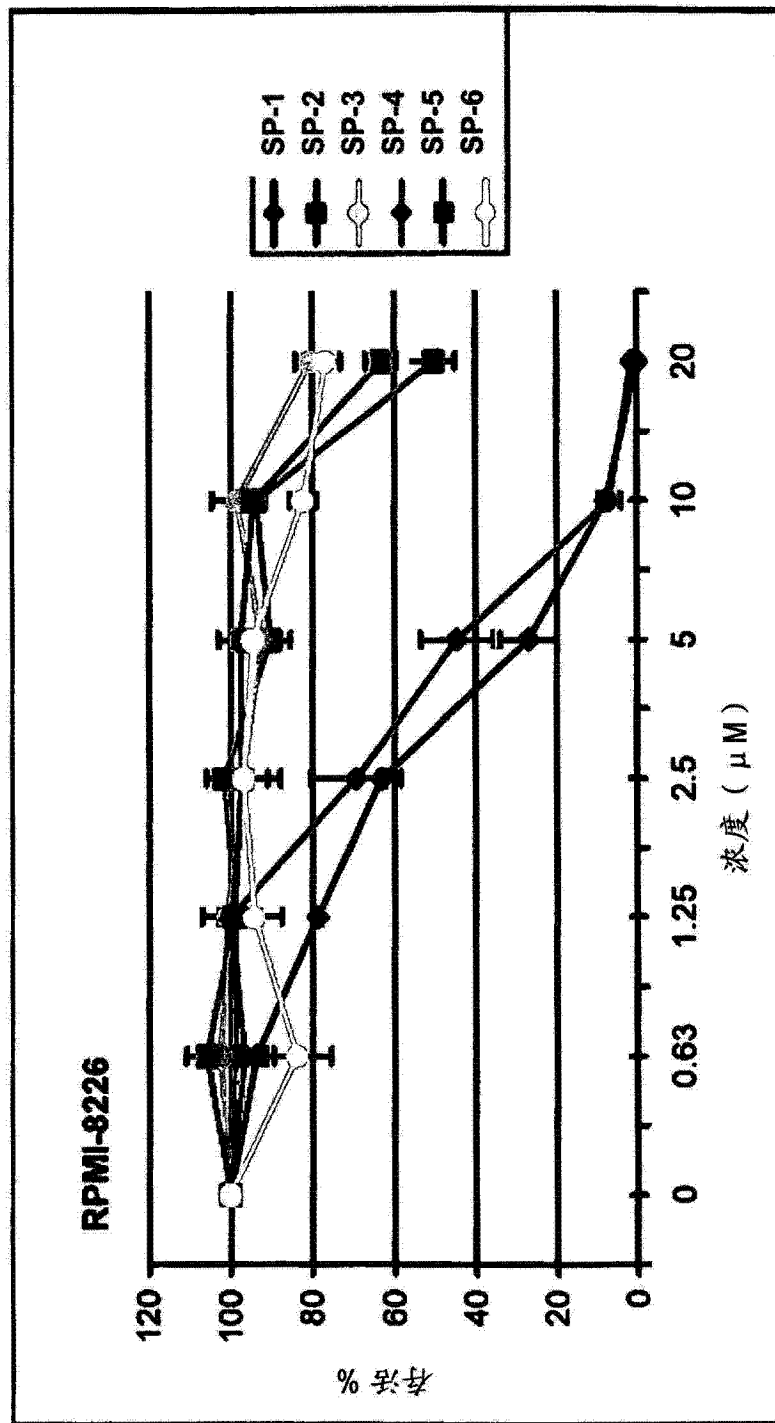


图 6

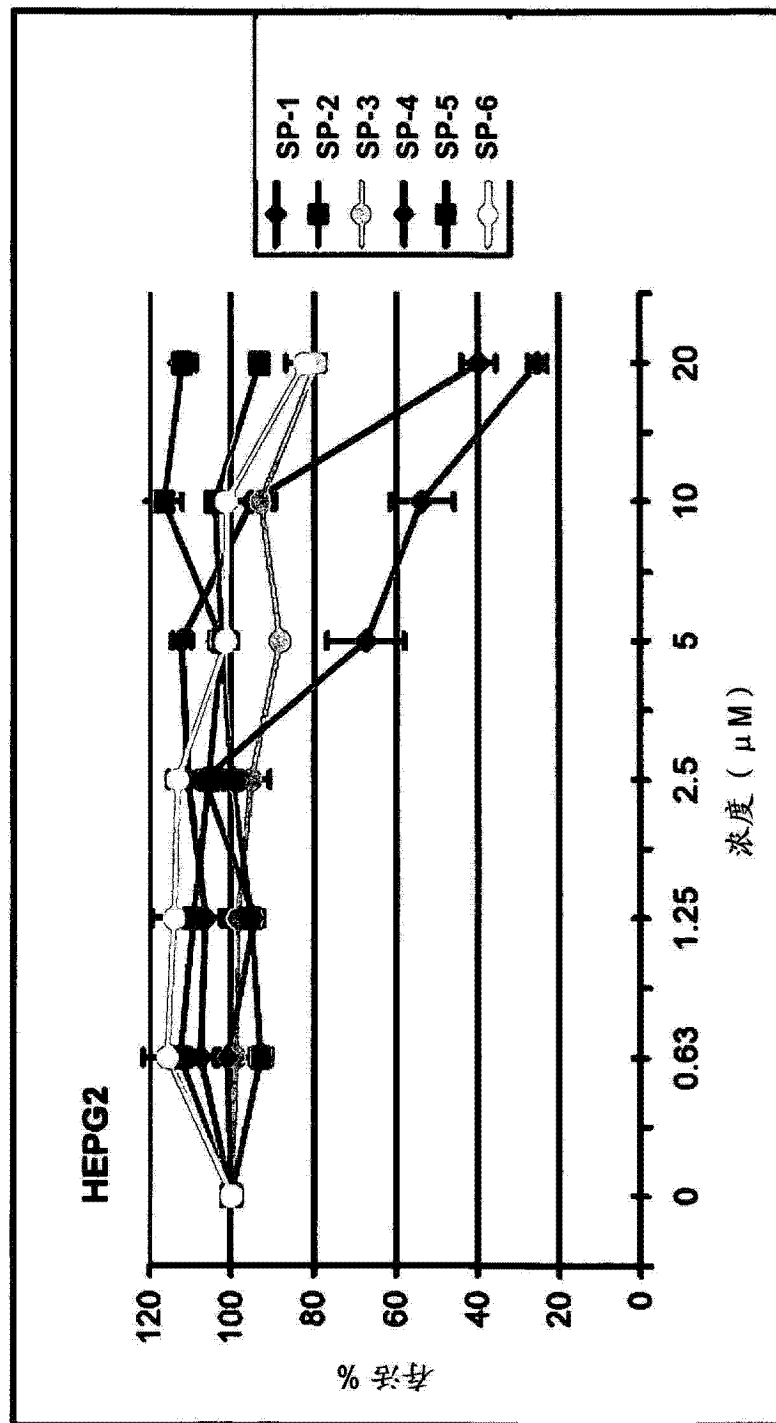


图 7

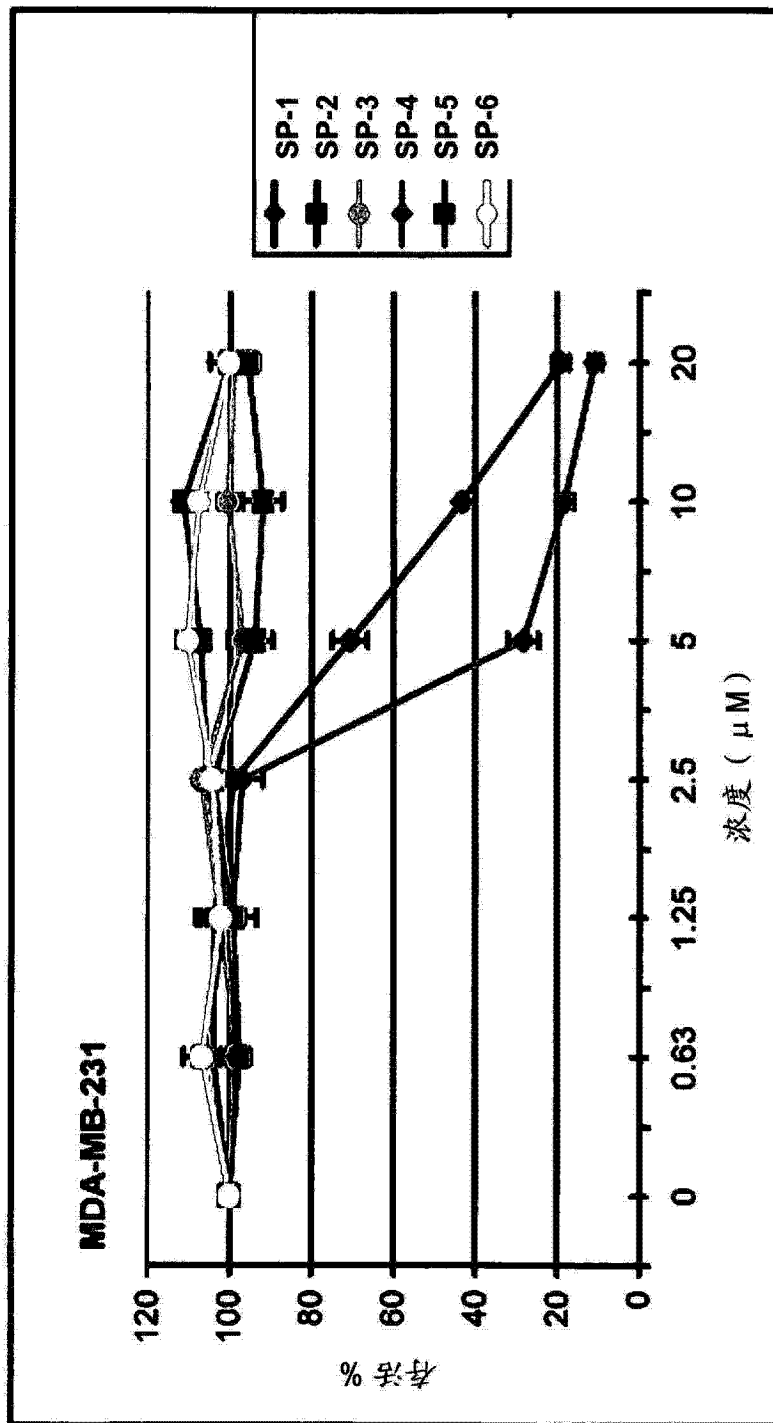


图 8

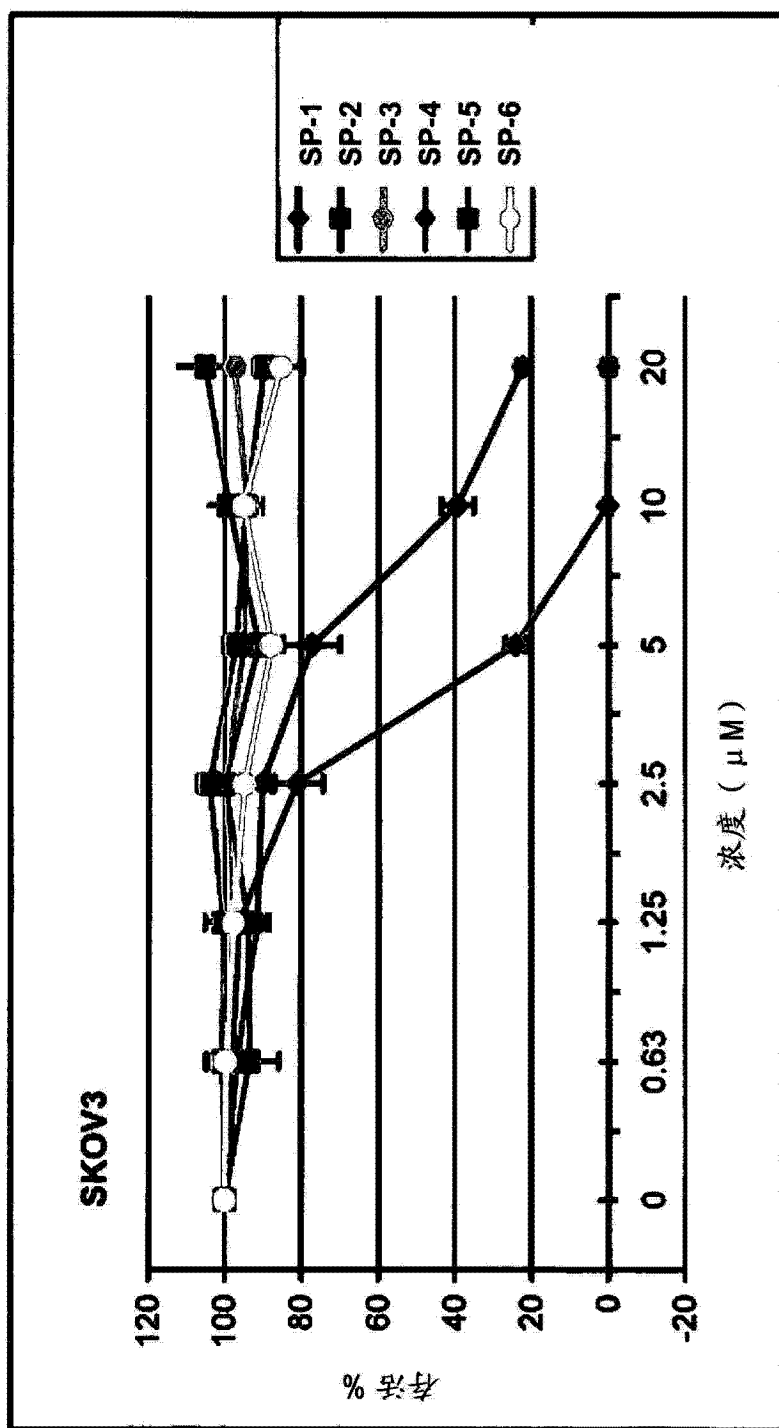


图 9

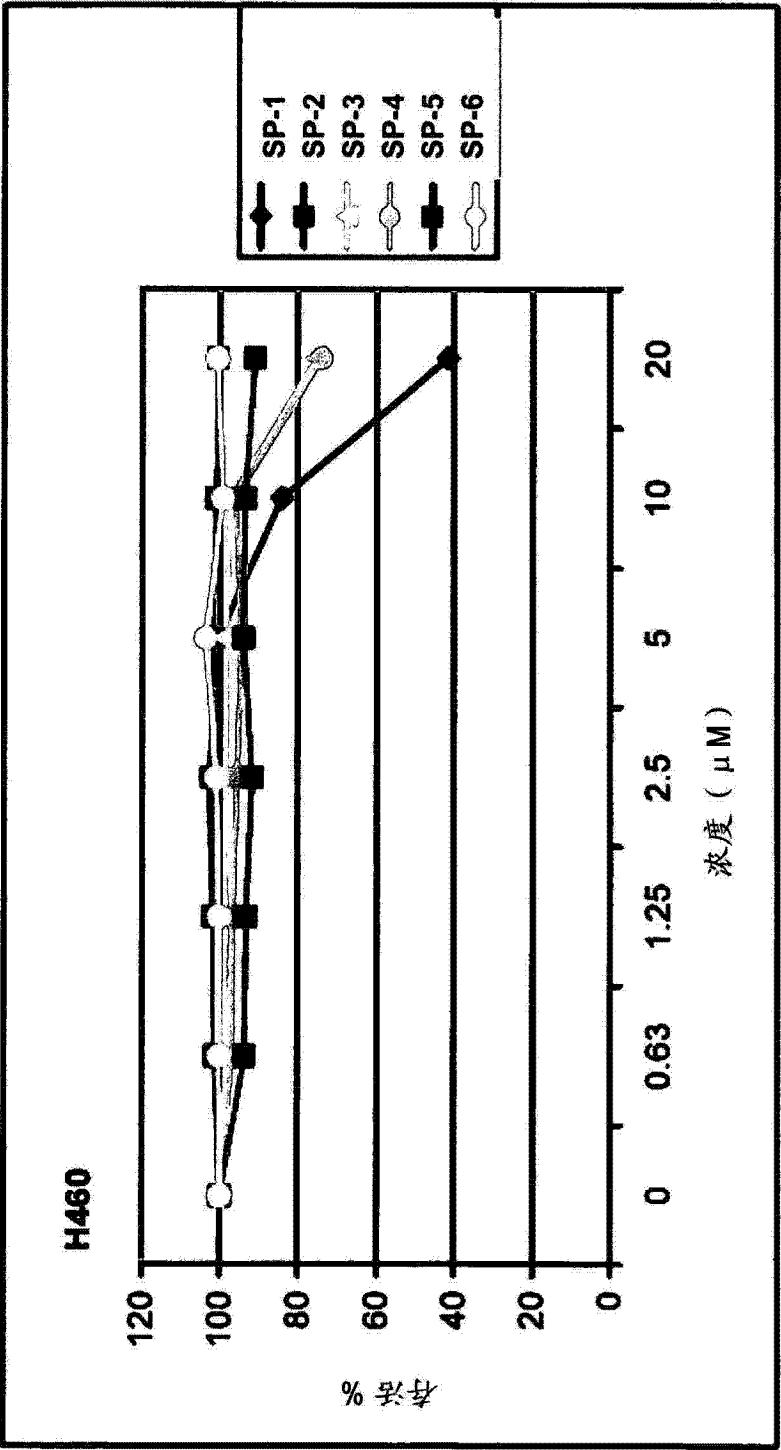


图 10

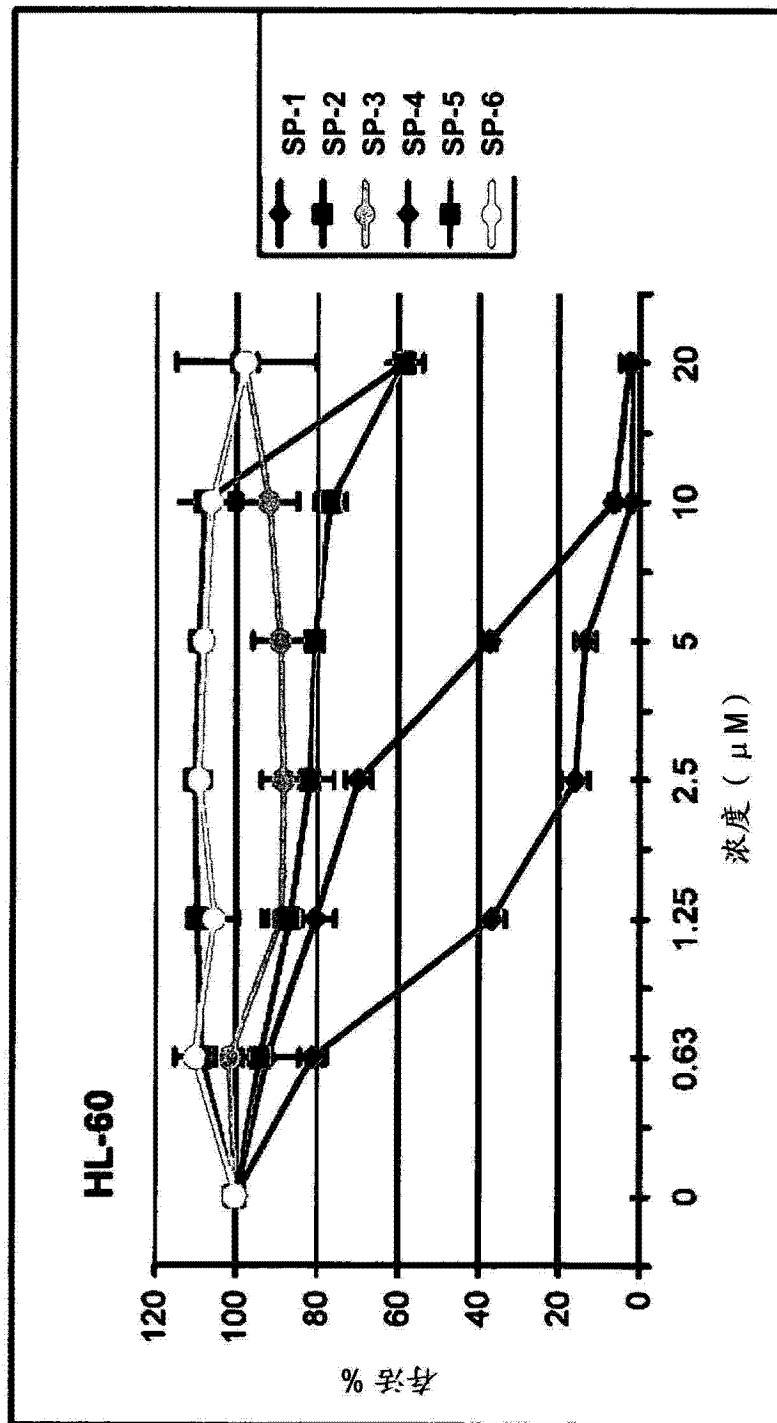


图 11

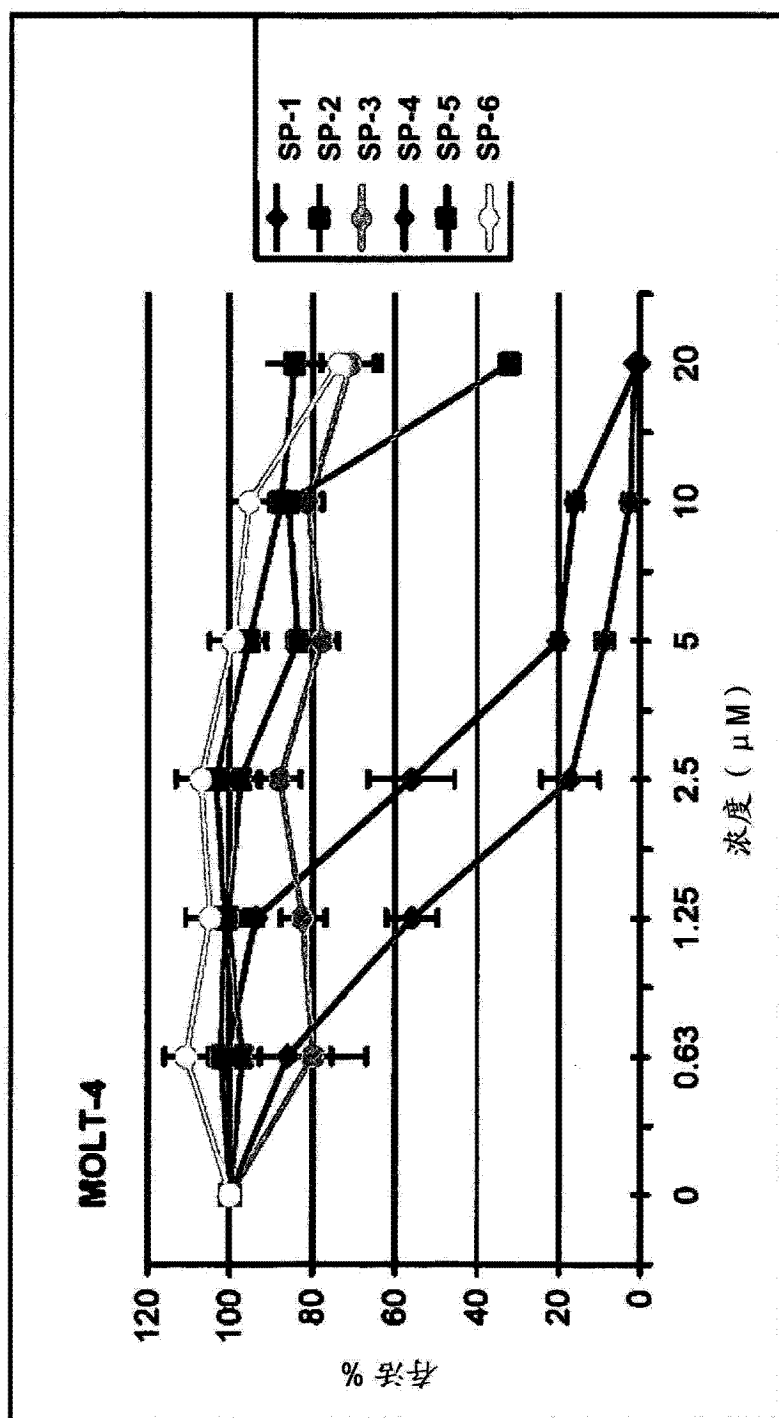


图 12

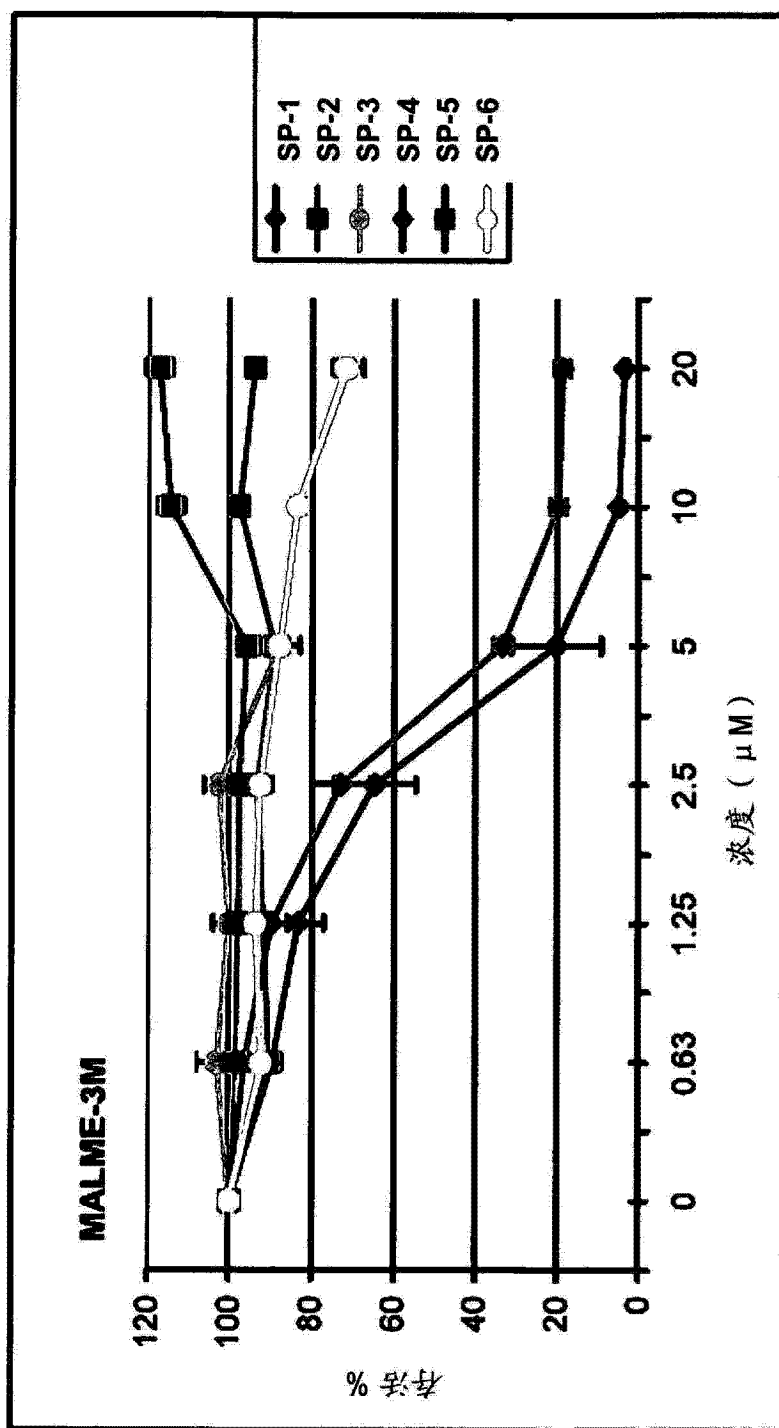


图 13

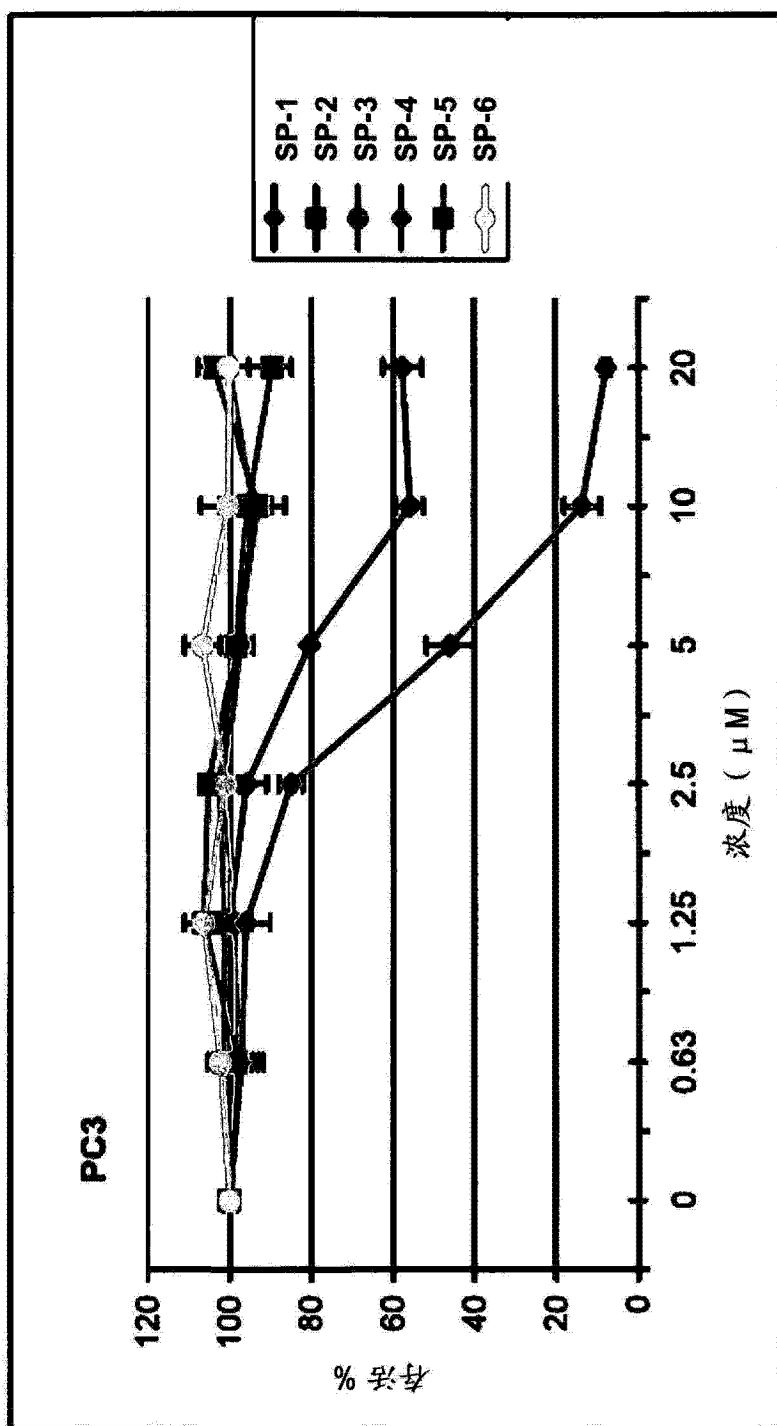


图 14

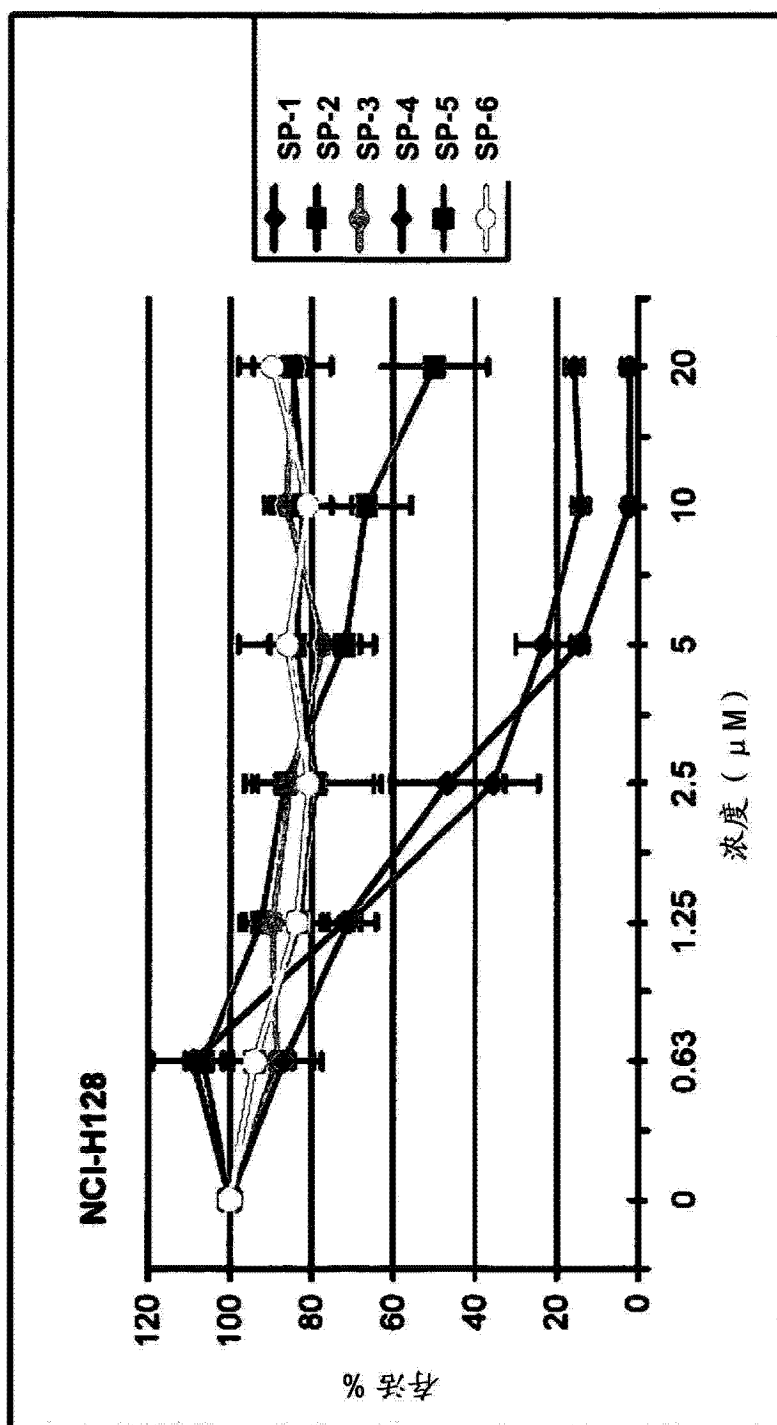


图 15

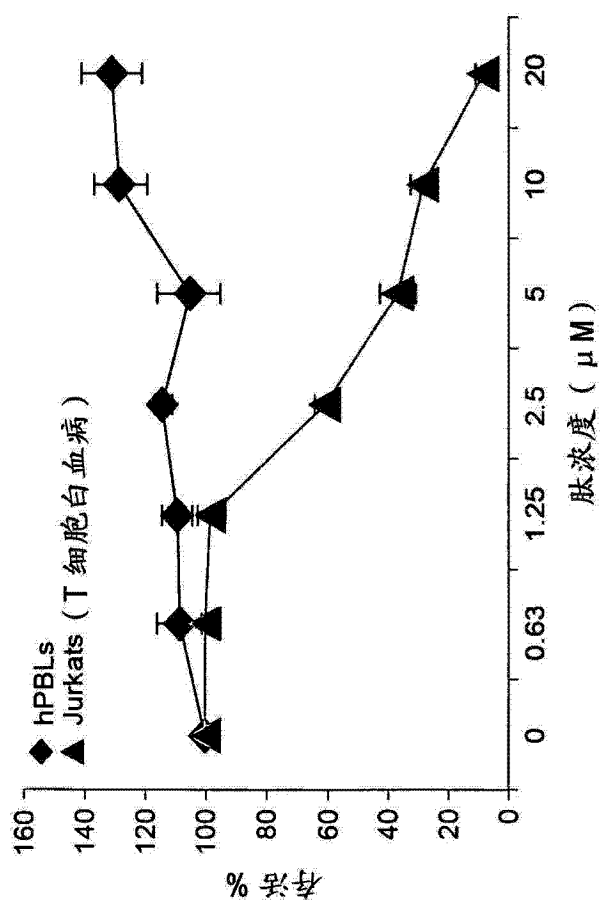


图 16

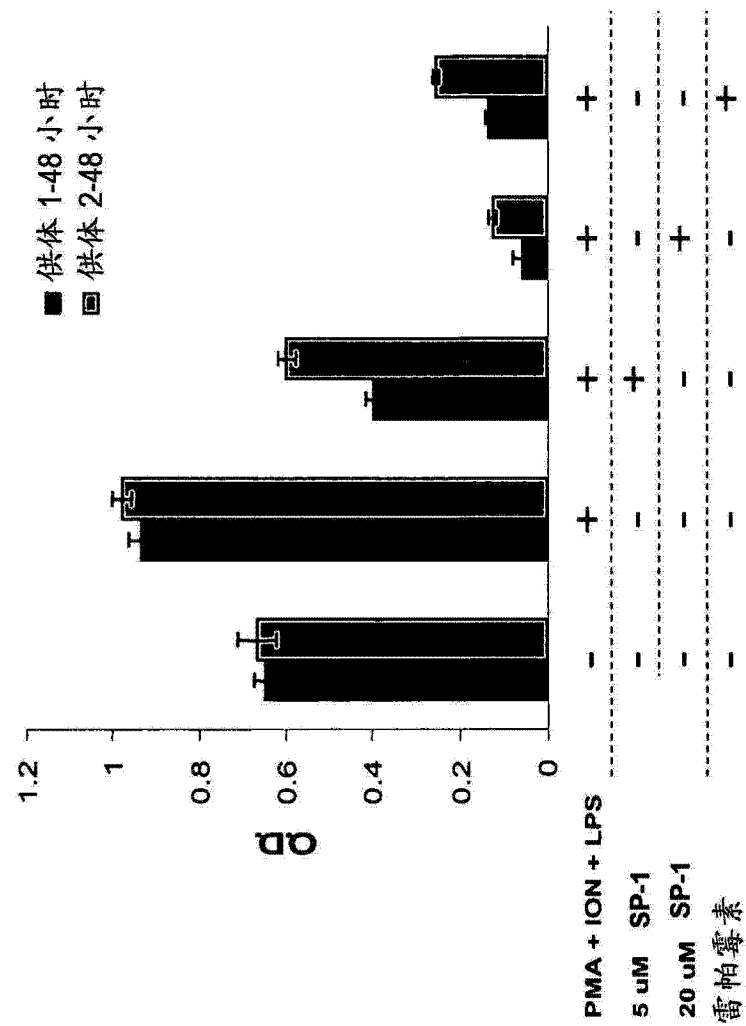


图 17

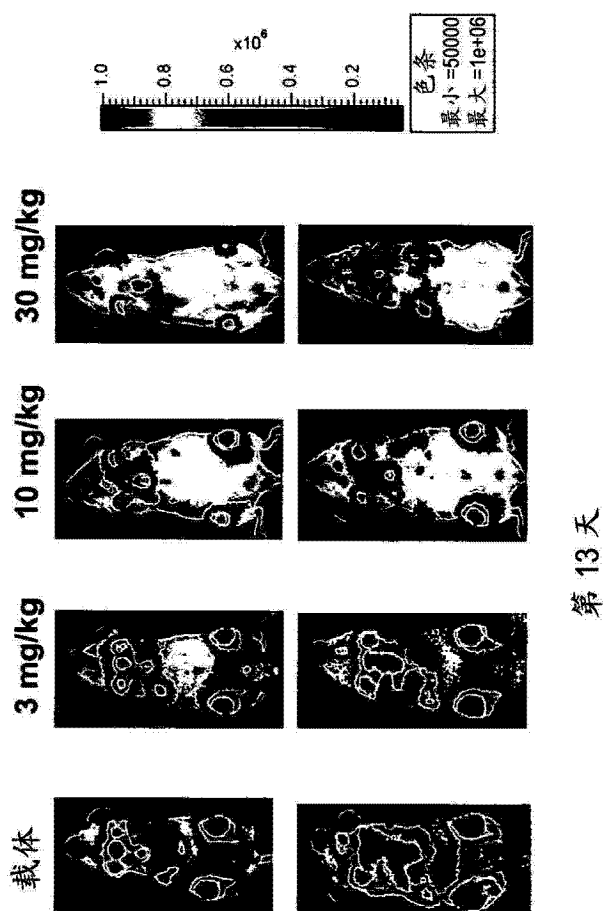


图 18

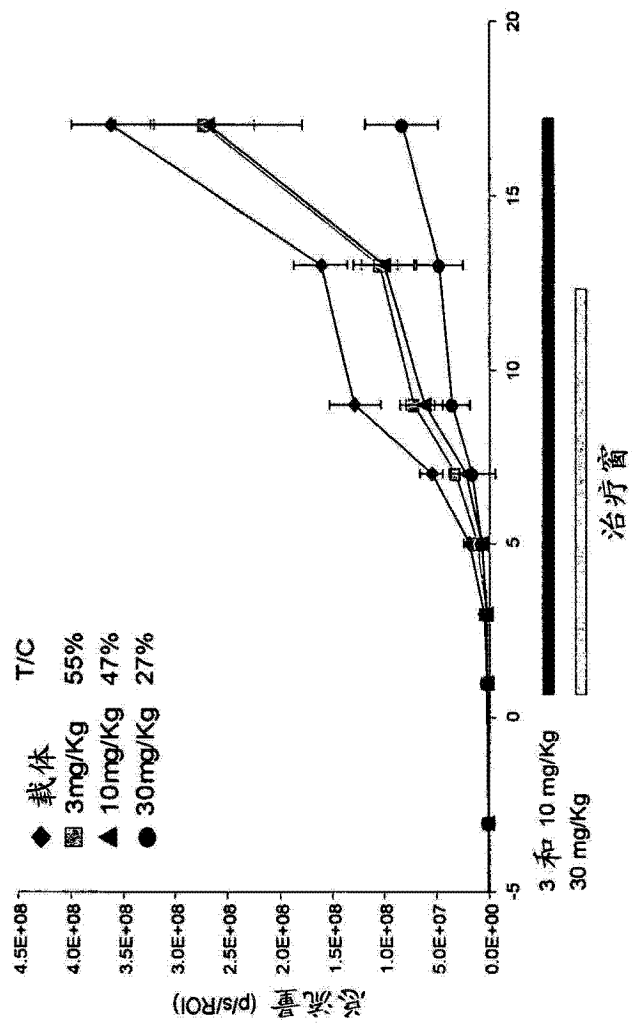


图 19

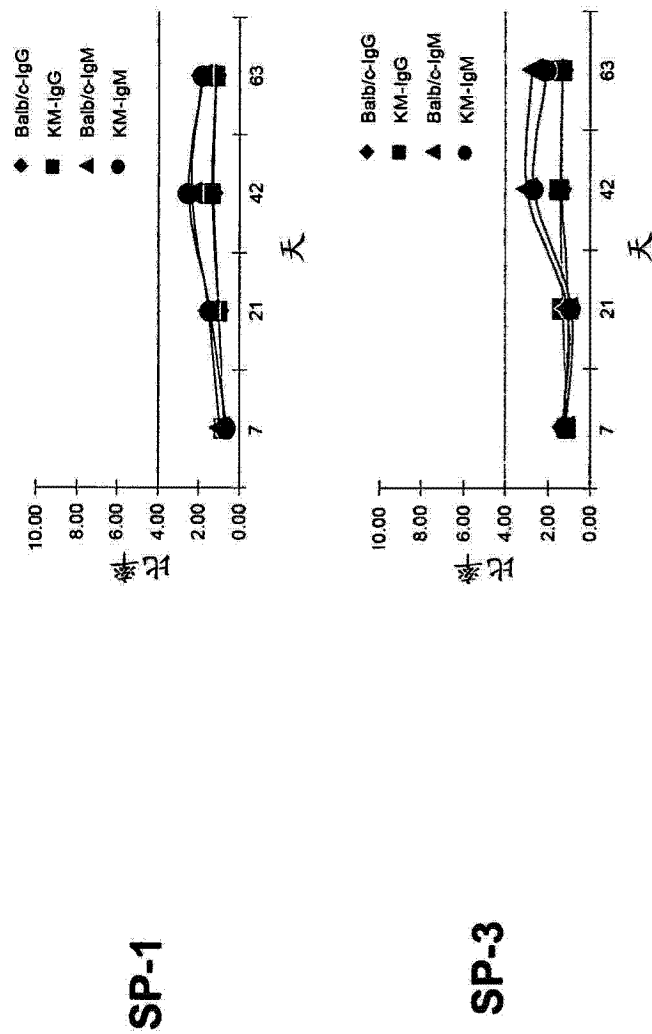


图 20

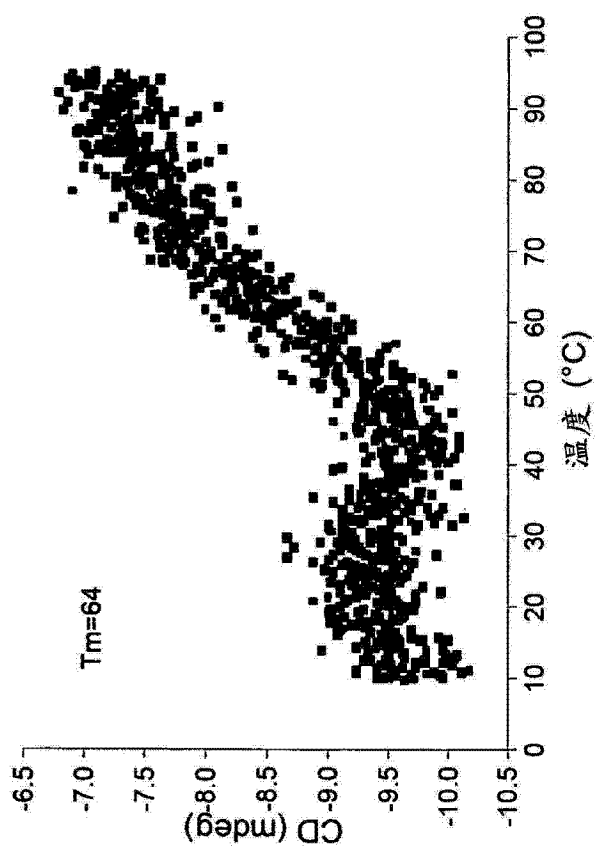


图 21

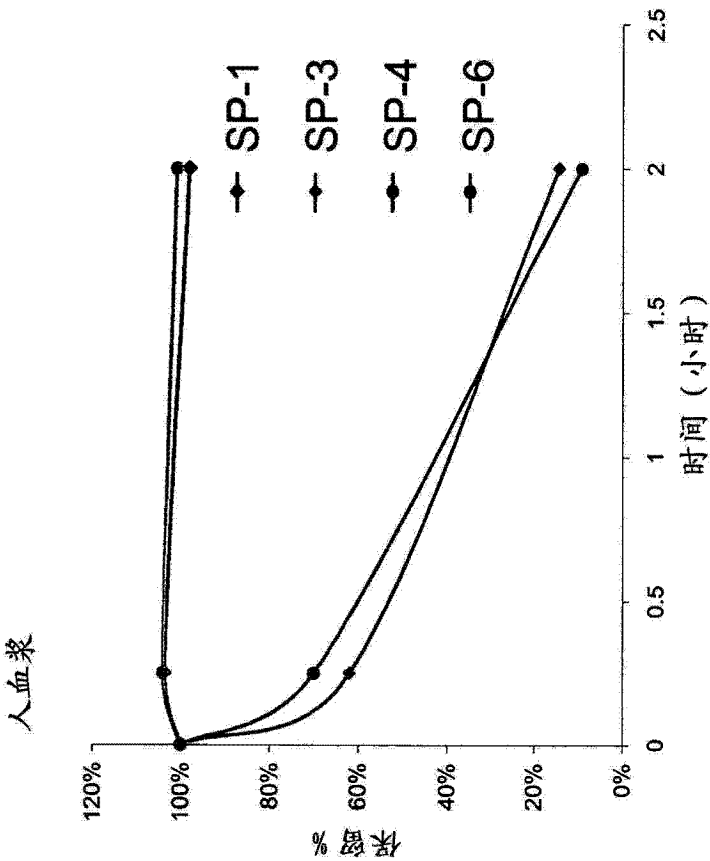


图 22

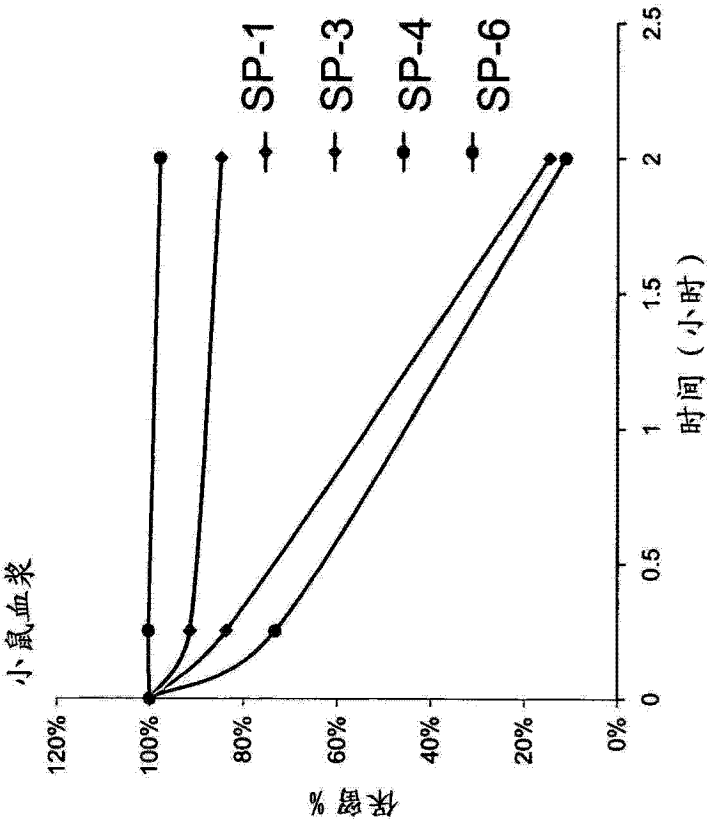


图 23

PK 参数	10 mg/Kg IV SP-1	10 mg/Kg IV SP-4
T 1/2 (hr)	3.3	2.96
Cmax (ng/ml)	125644	29655
AUC all (hr*ng/ml)	190195	90791
Vss (ml/Kg)	110	299
Cl (ml/hr/Kg)	53.4	110

图 24

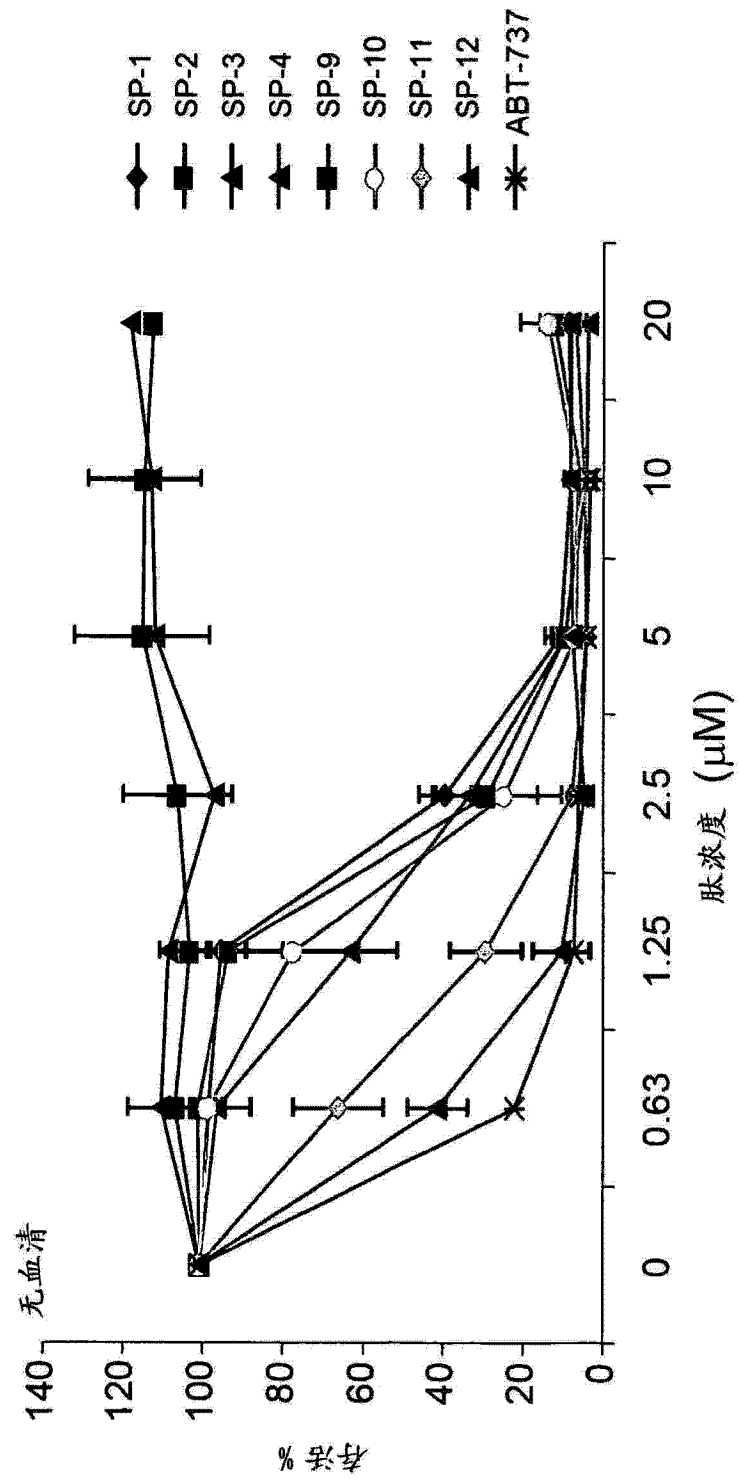


图 25

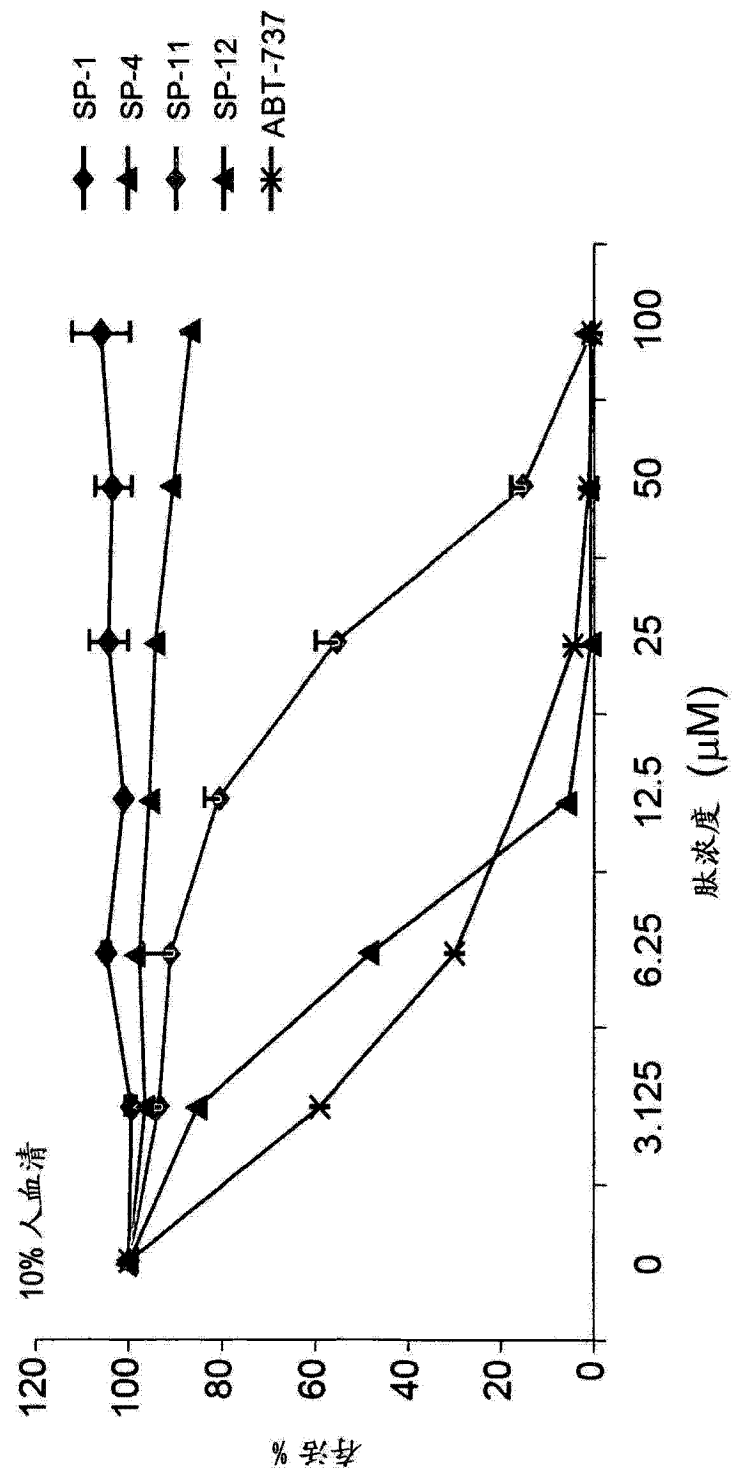


图 26

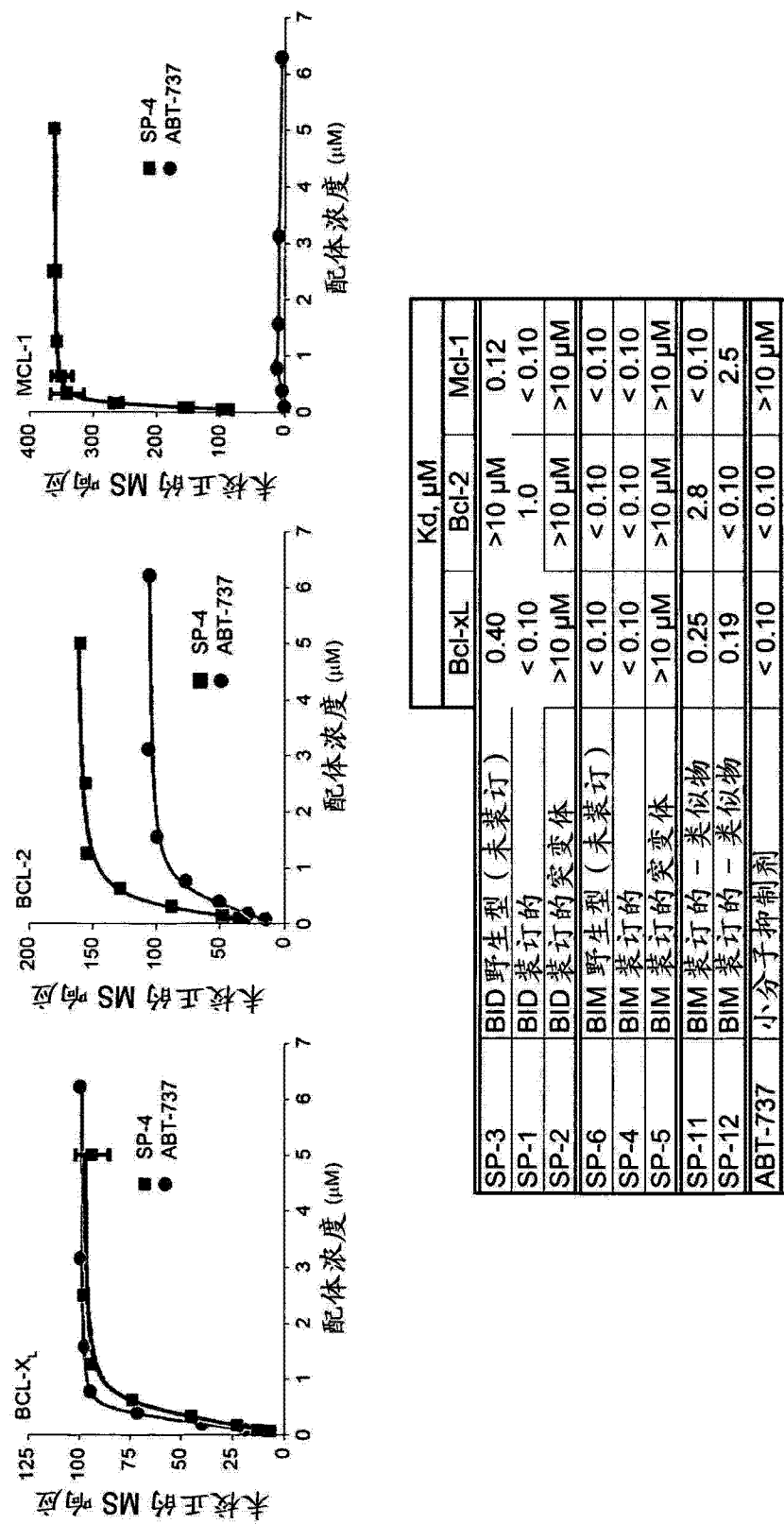


图 27

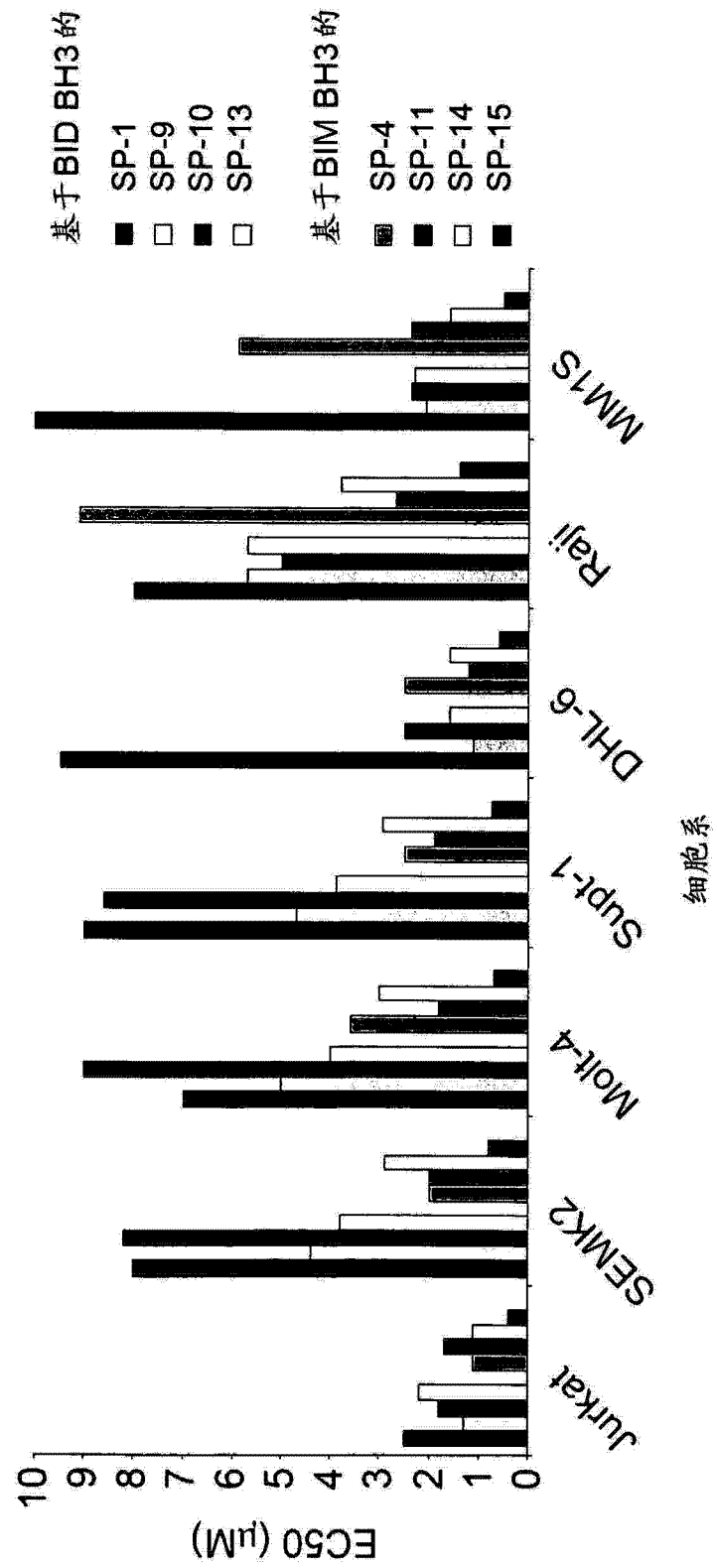


图 28

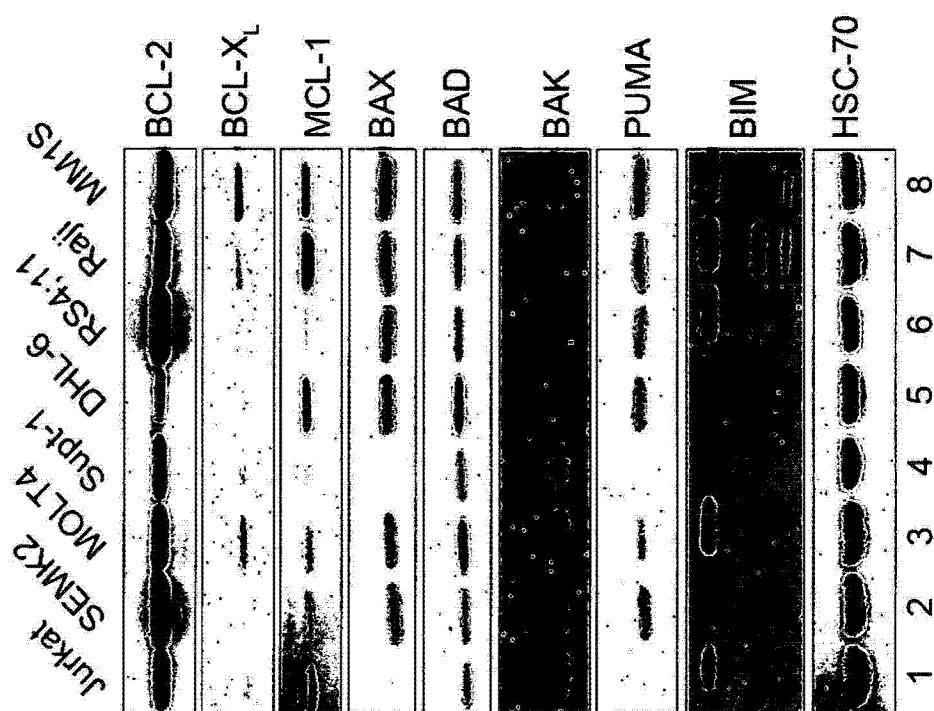


图 29

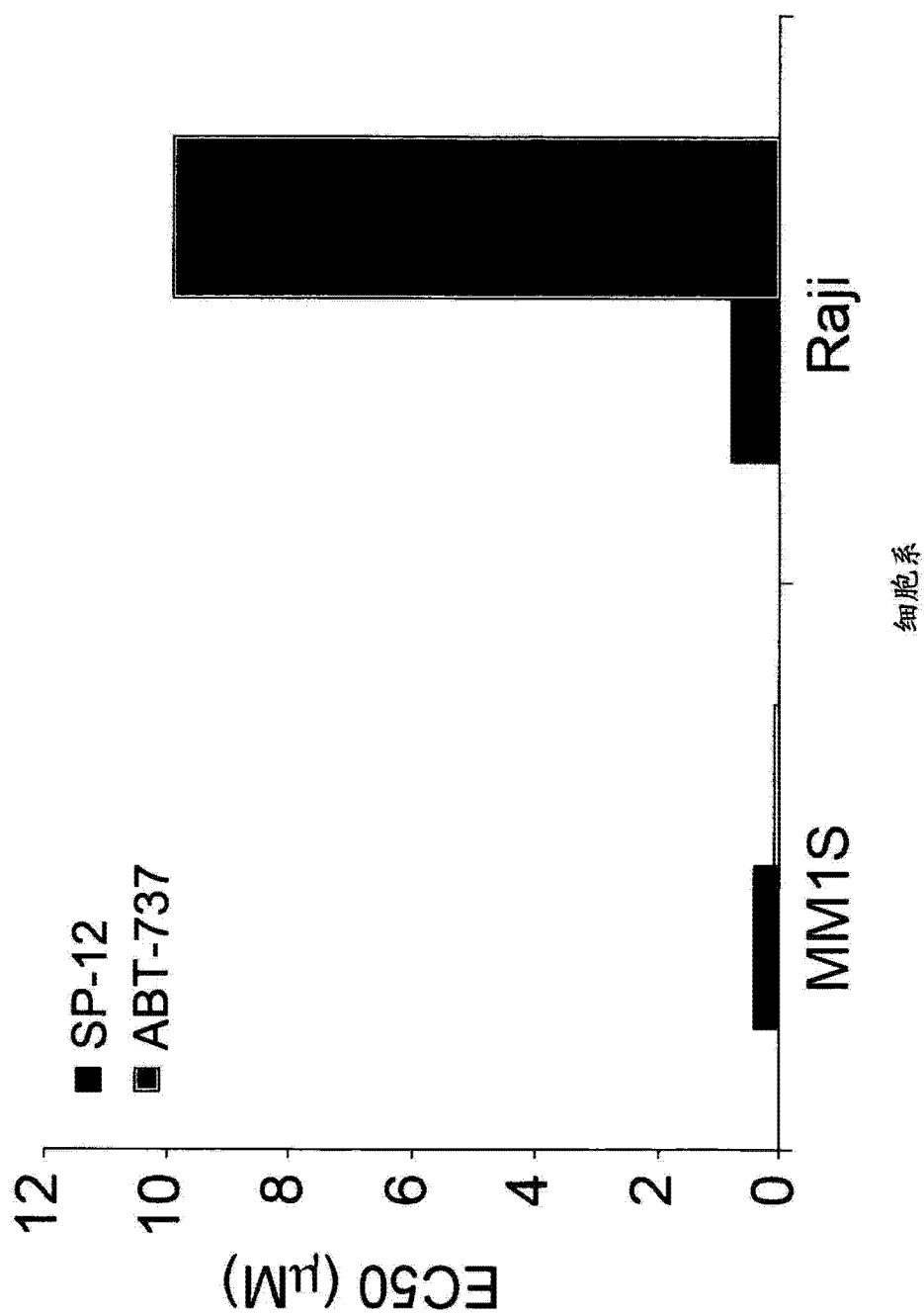


图 30

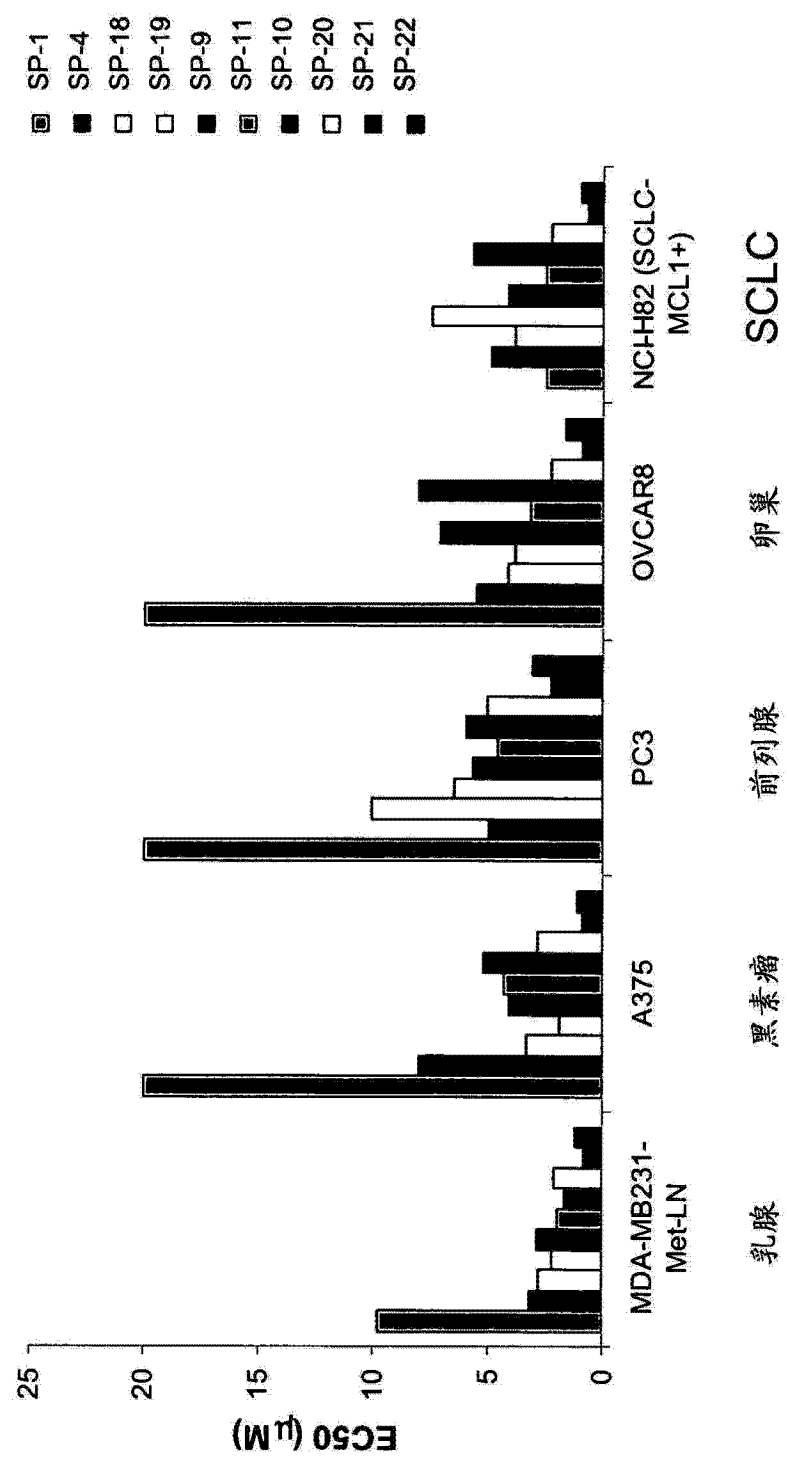


图 31

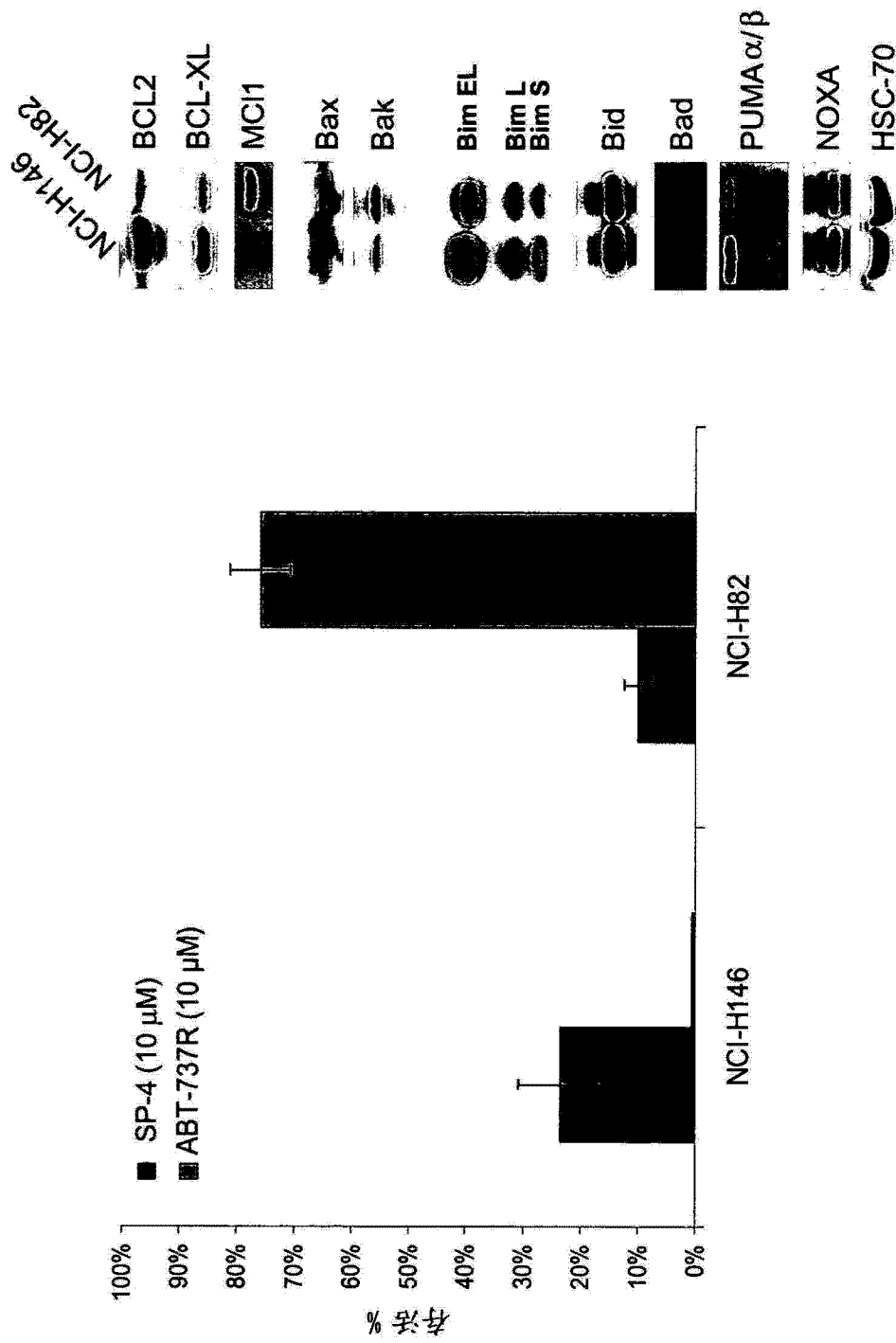


图 32

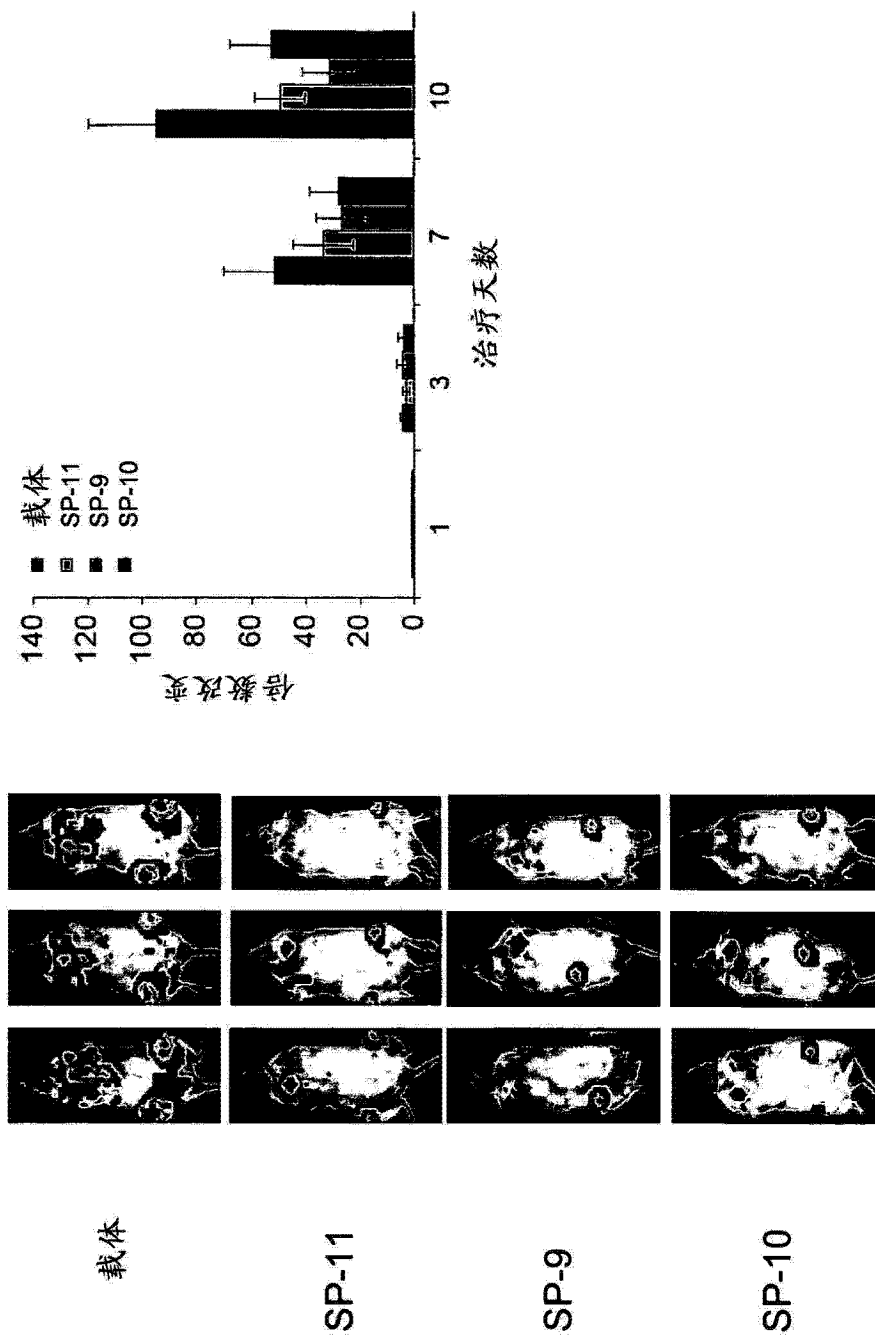


图 33

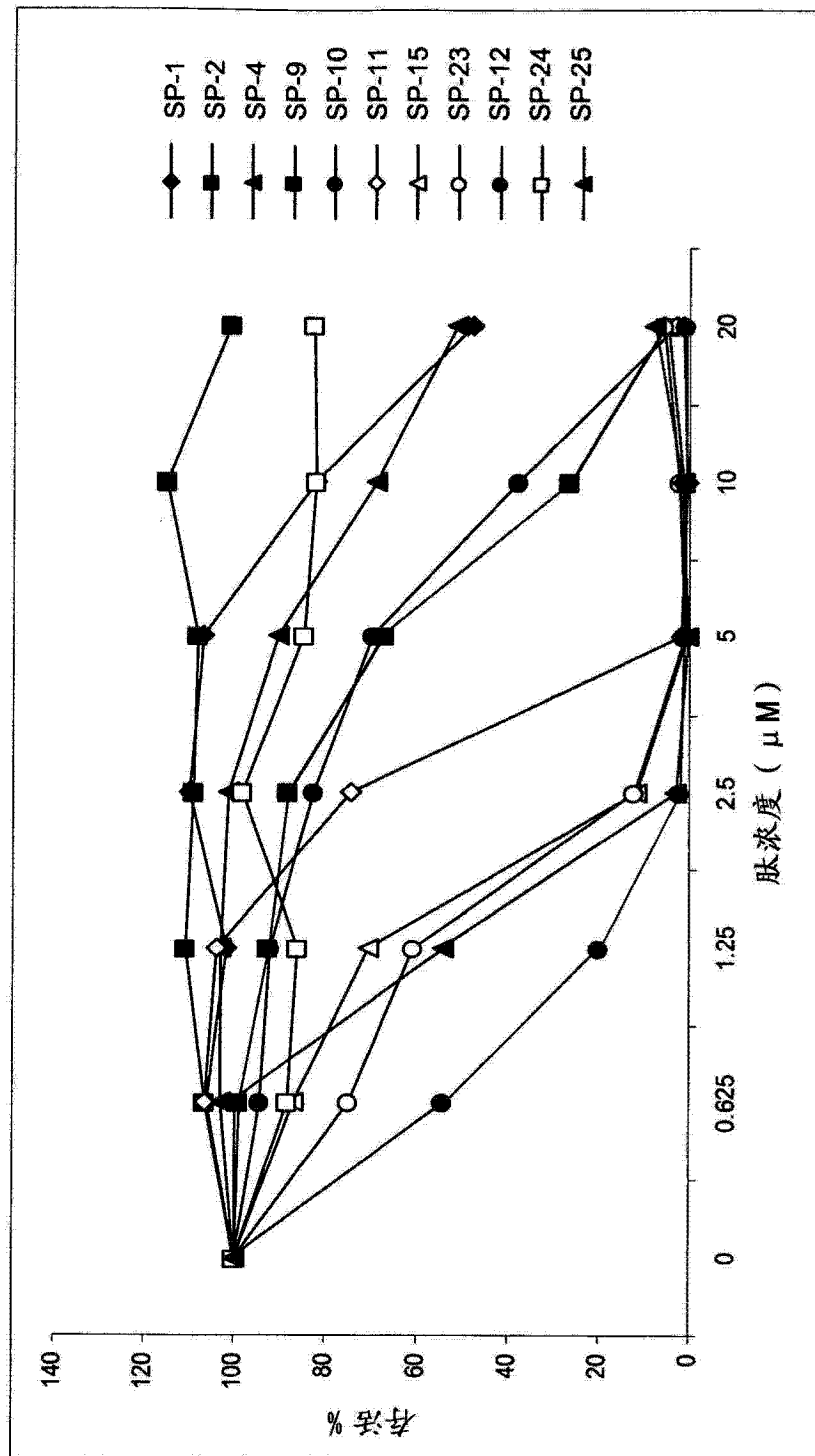


图 34

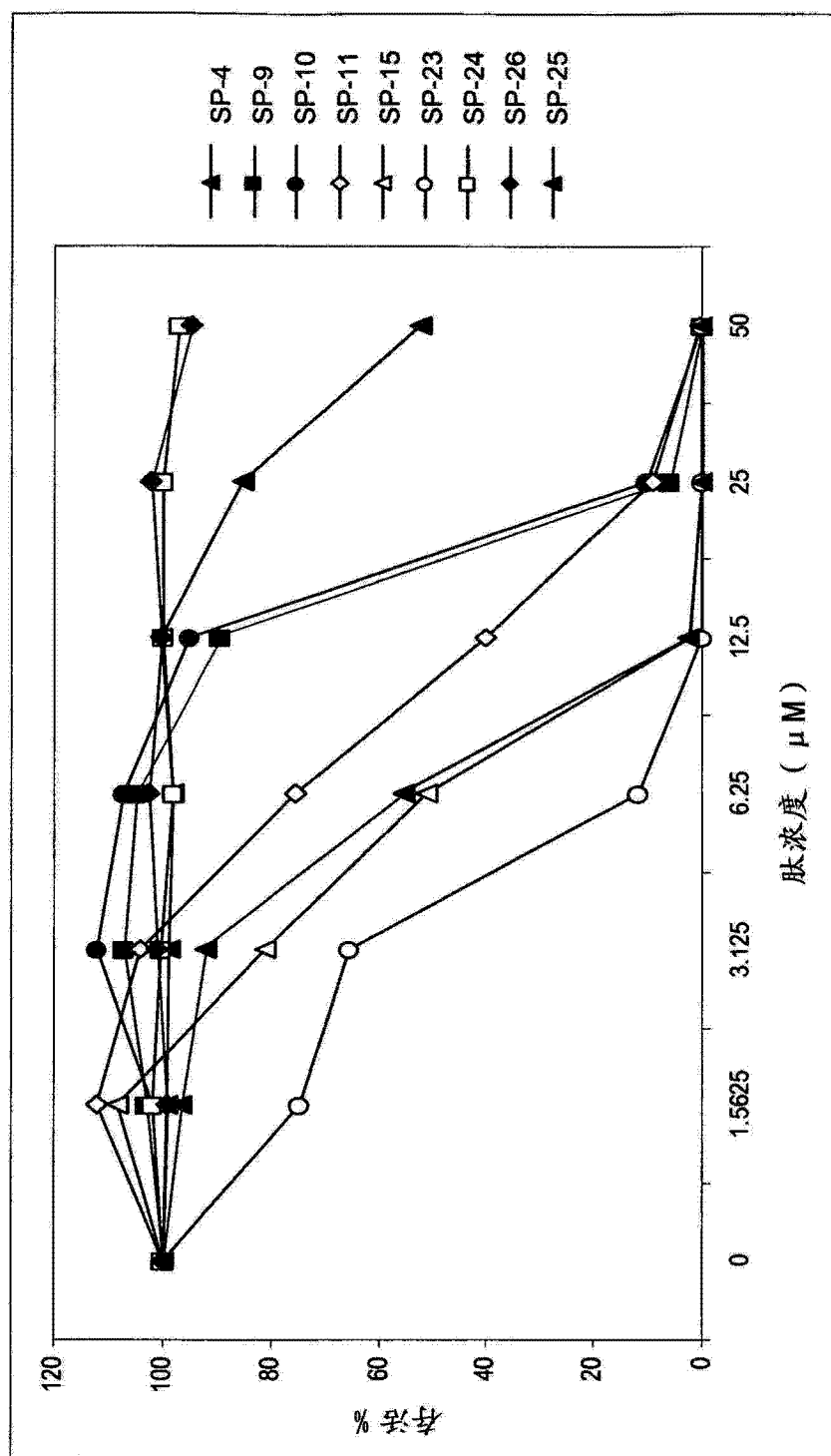


图 35

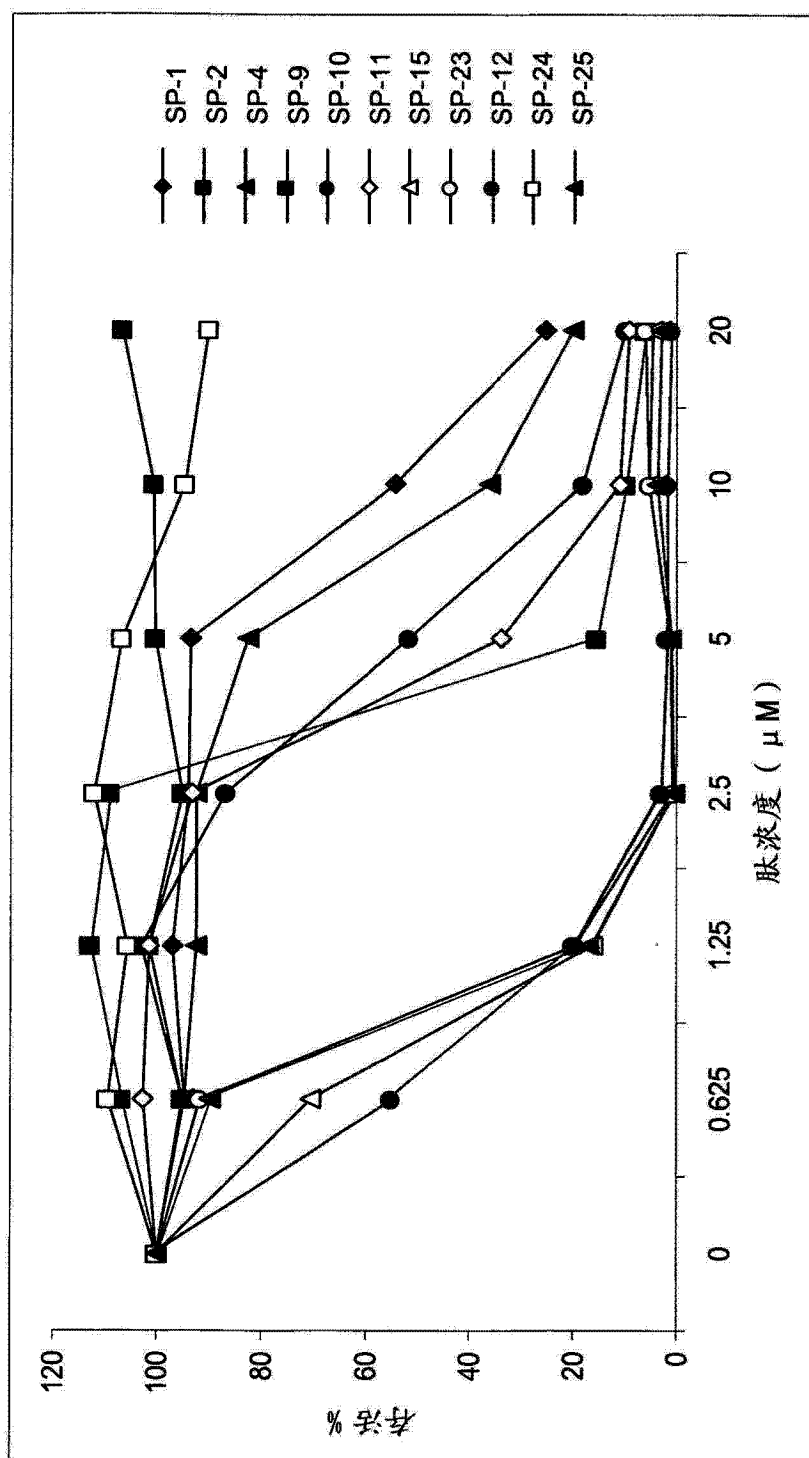


图 36

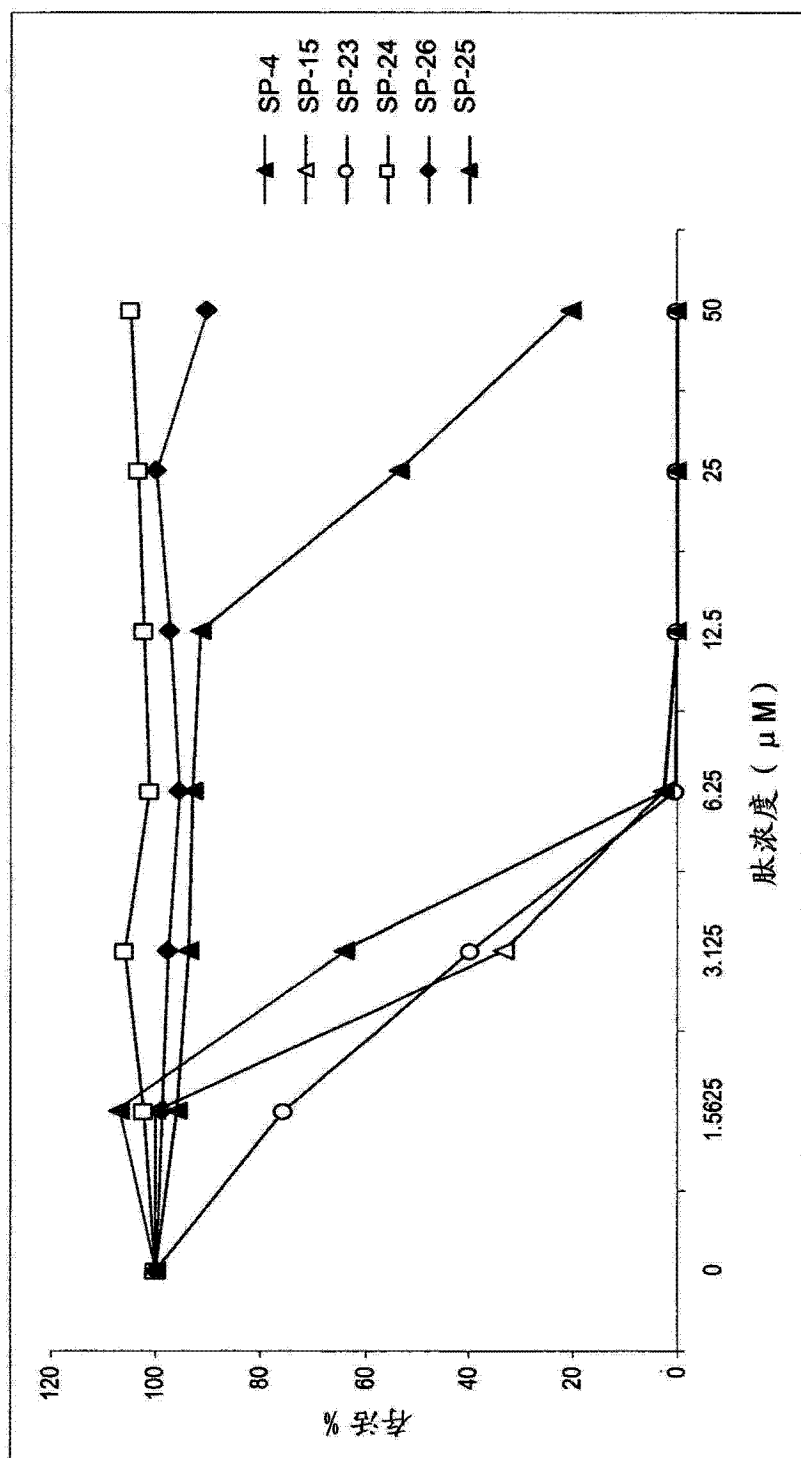


图 37

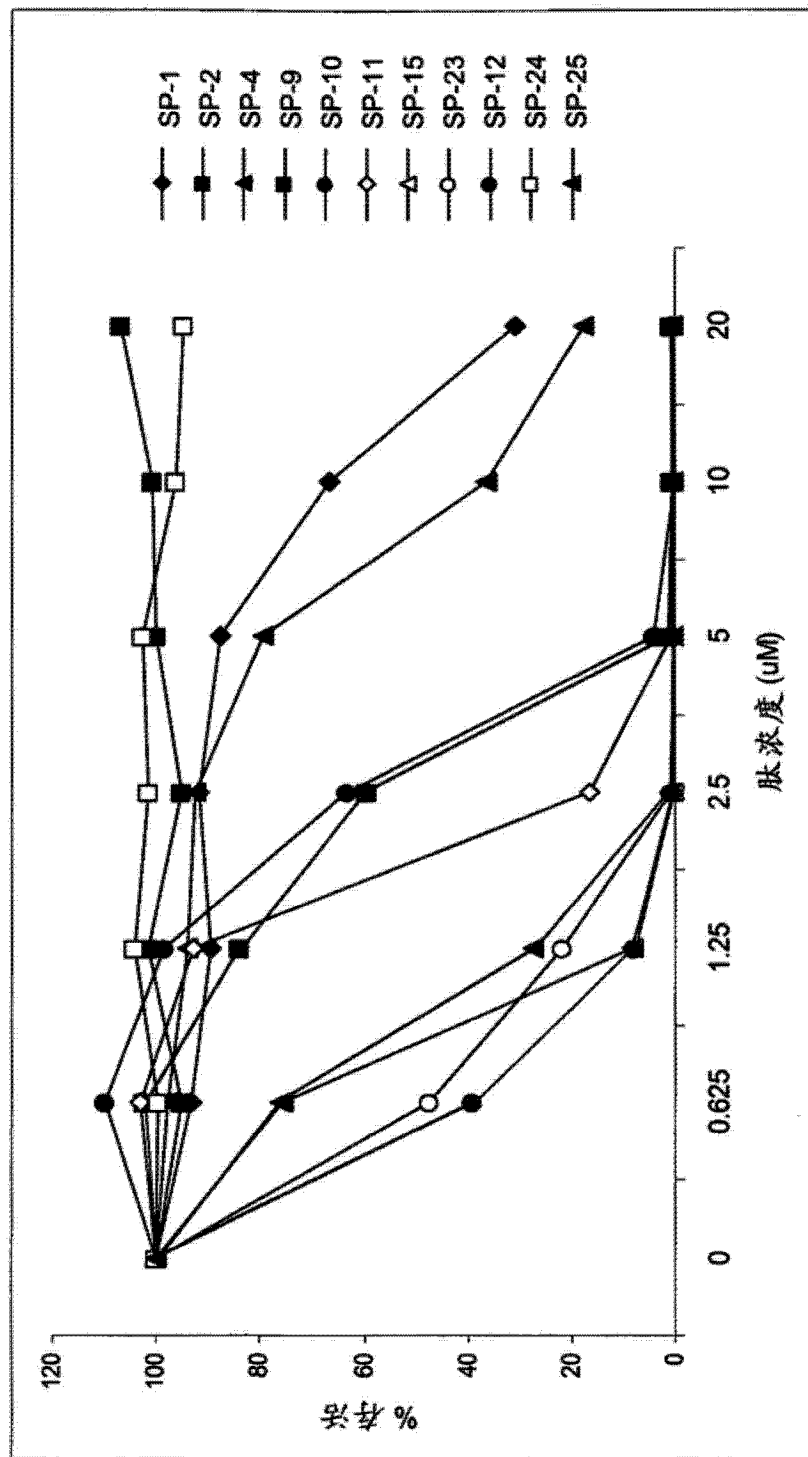


图 38

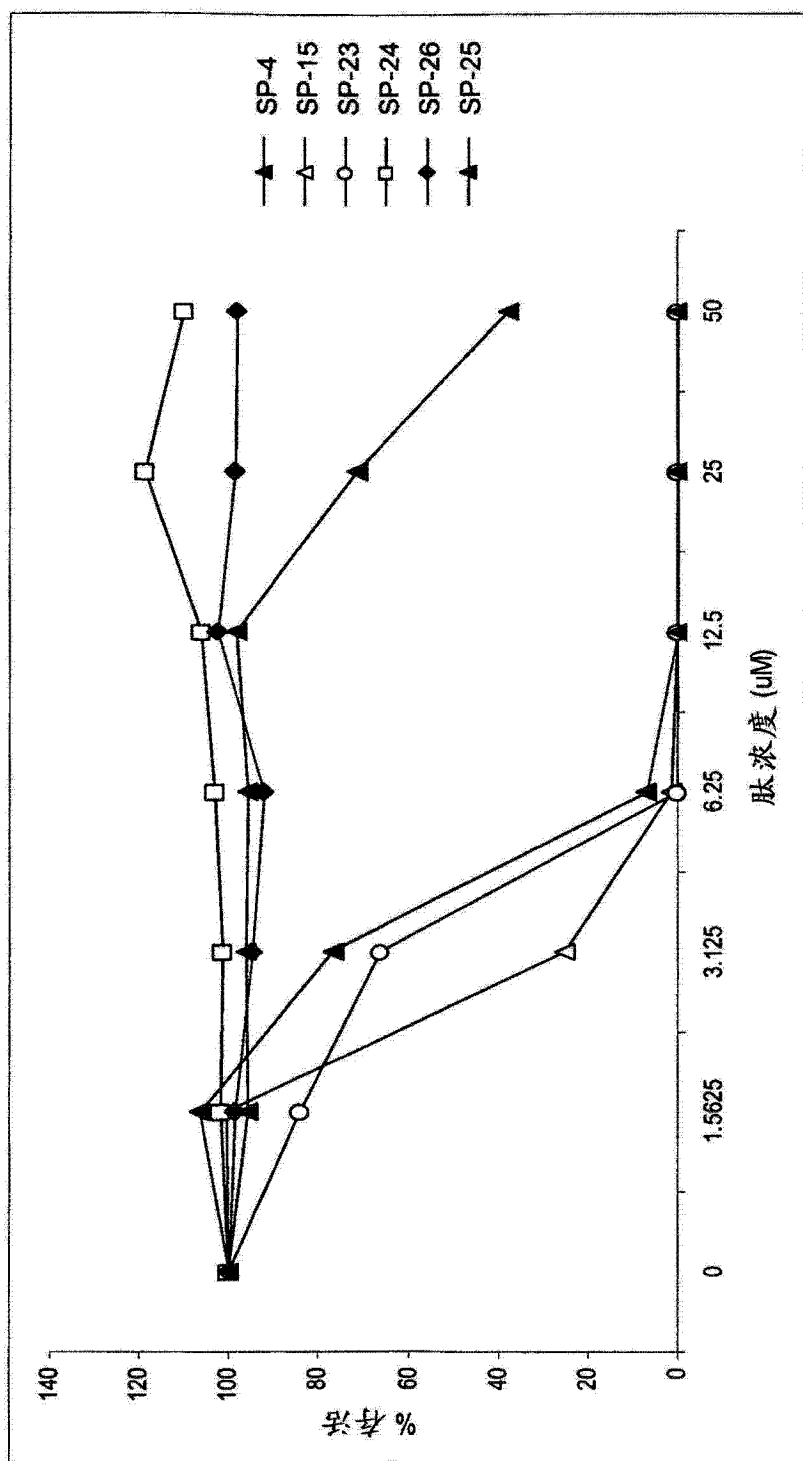


图 39

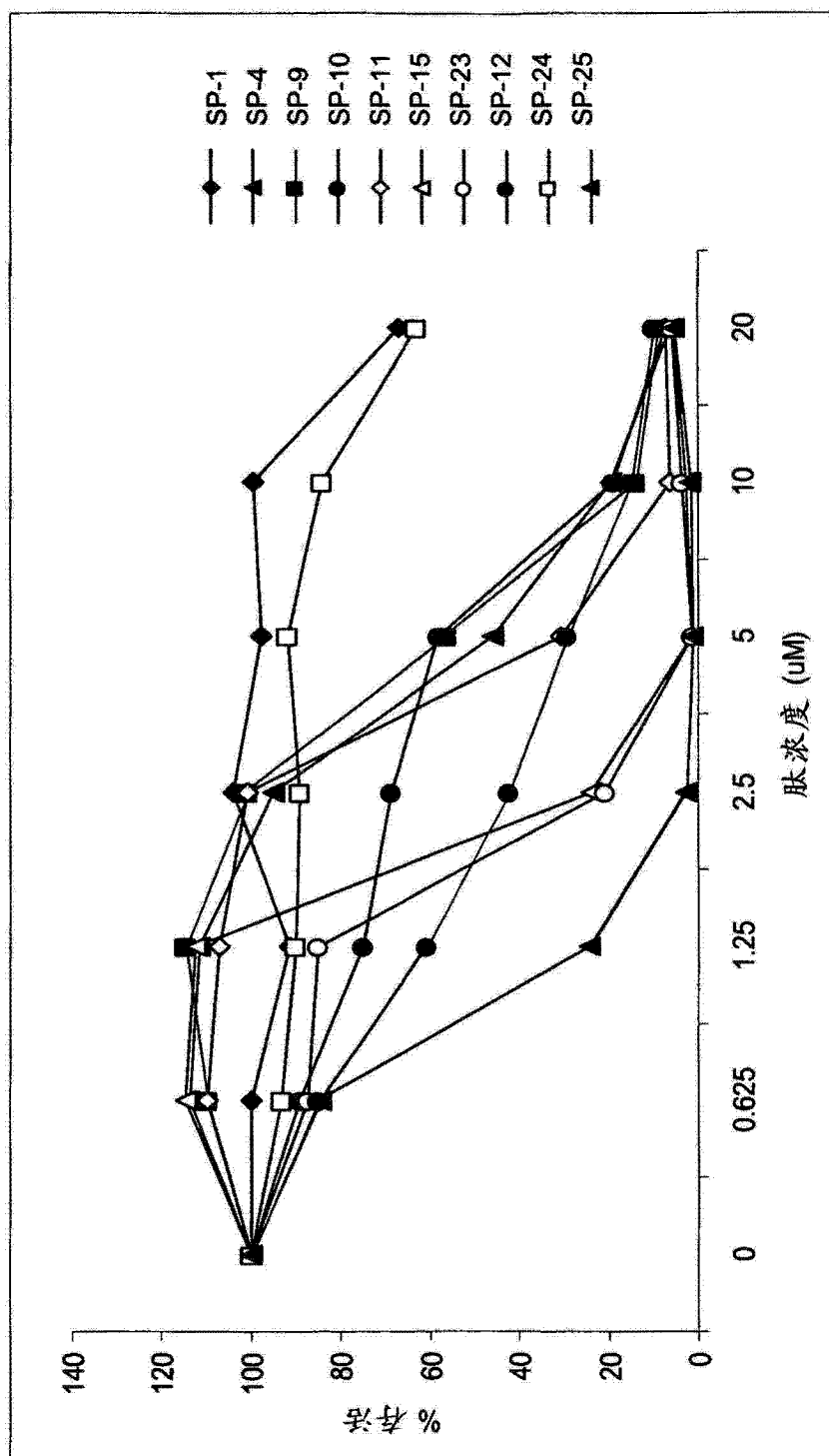


图 40

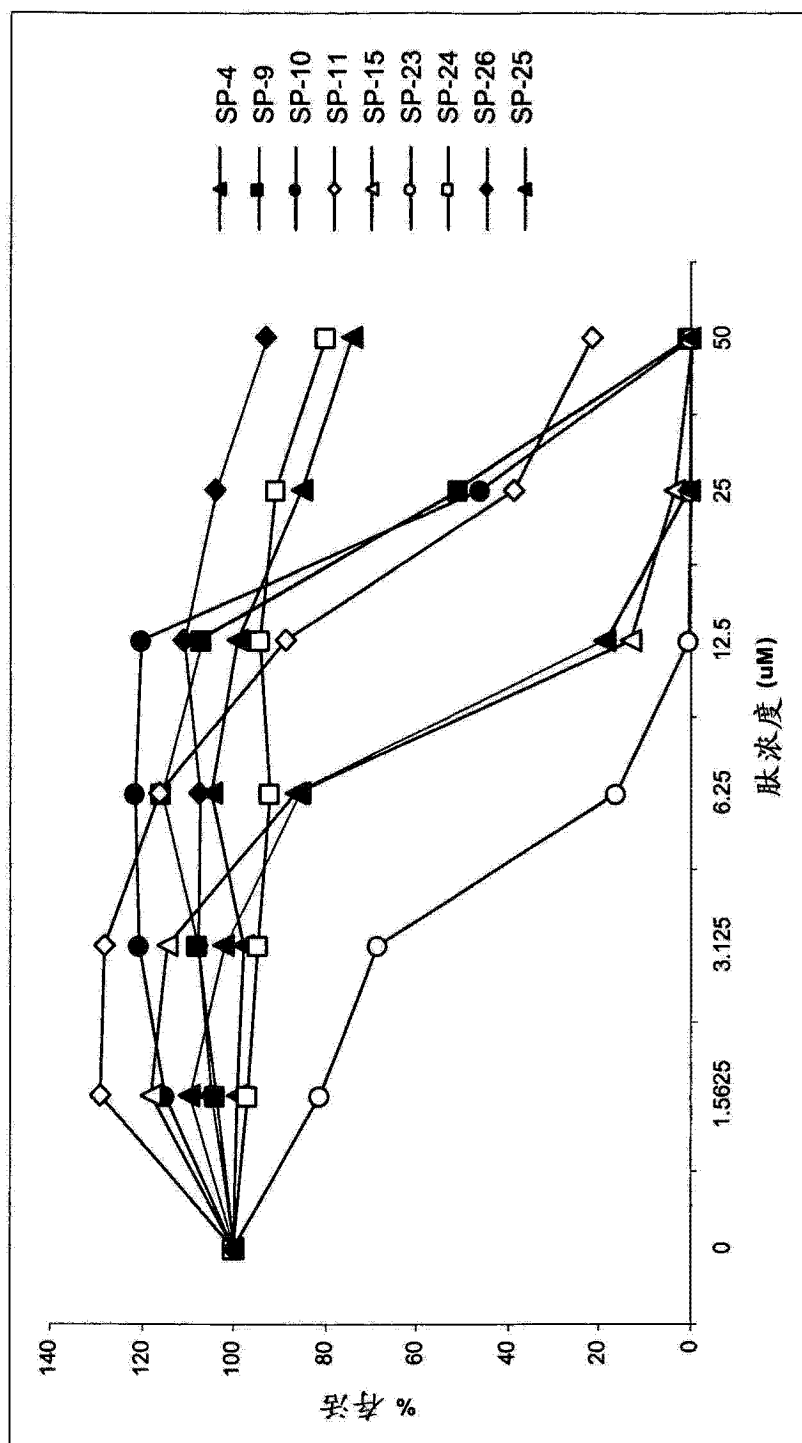


图 41

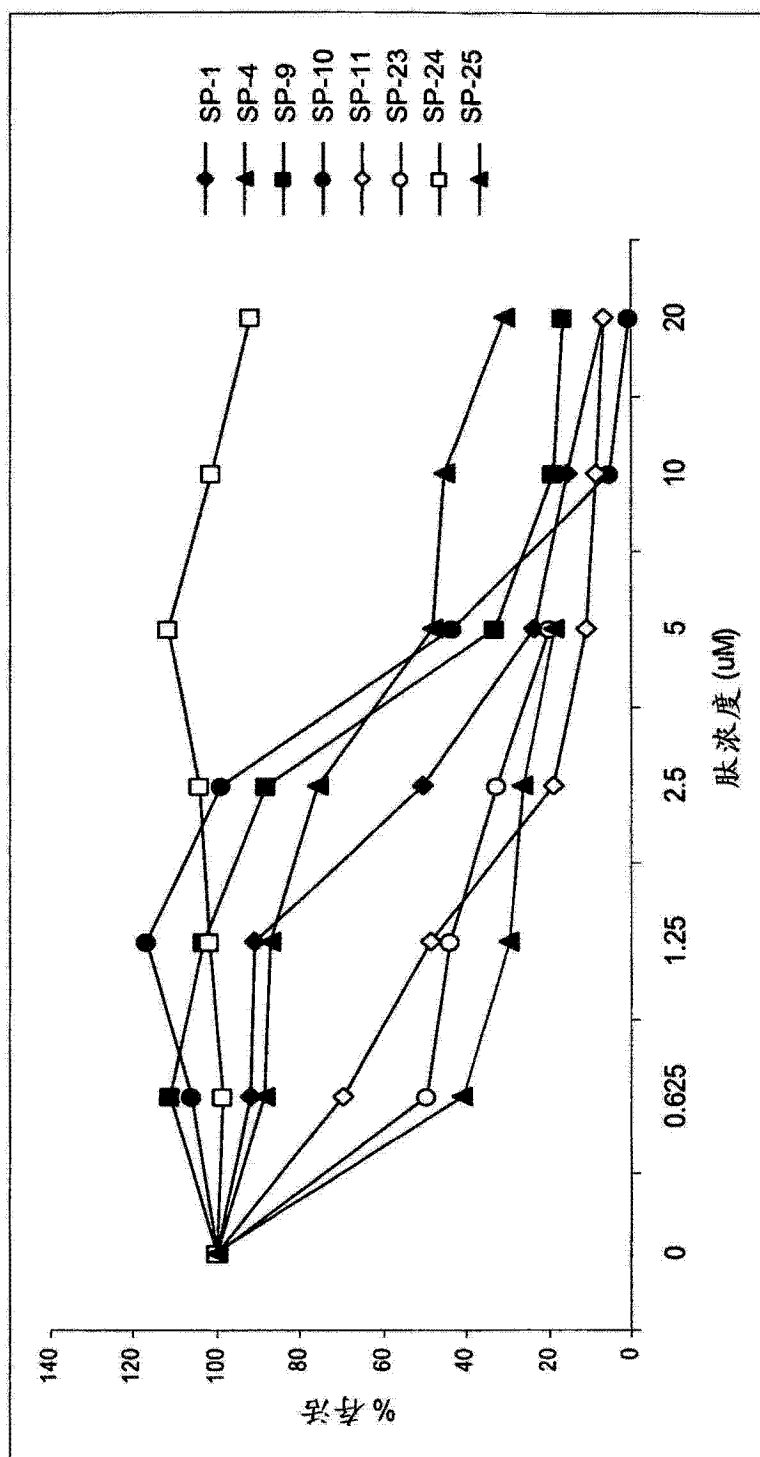


图 42

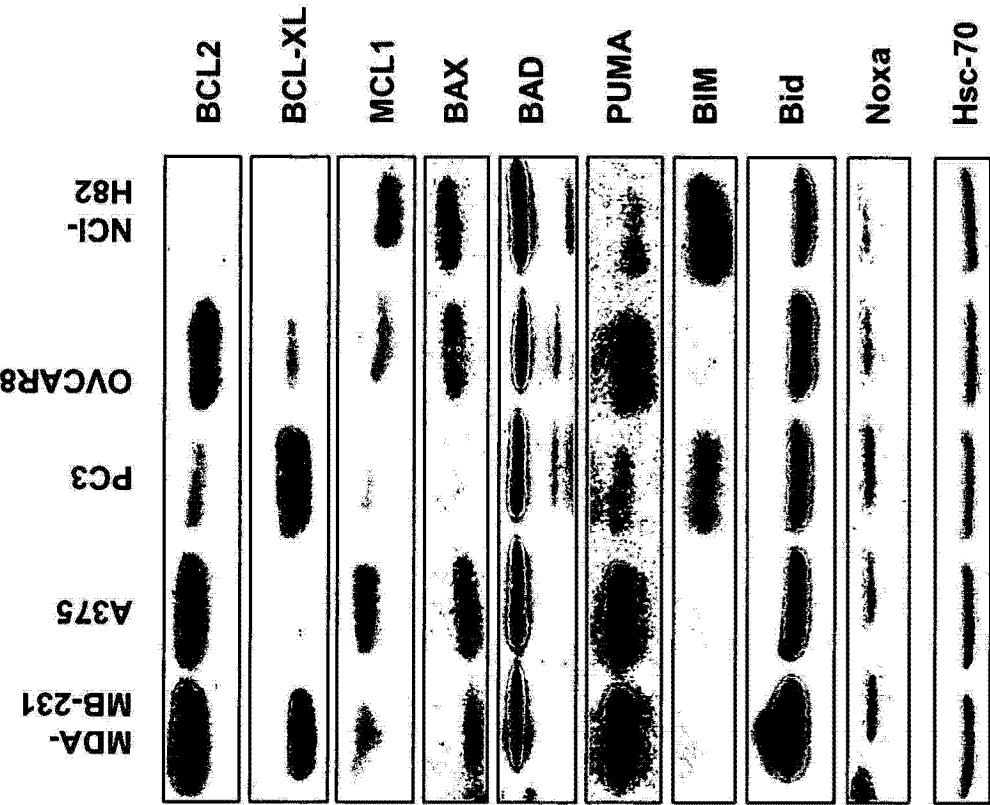


图 43

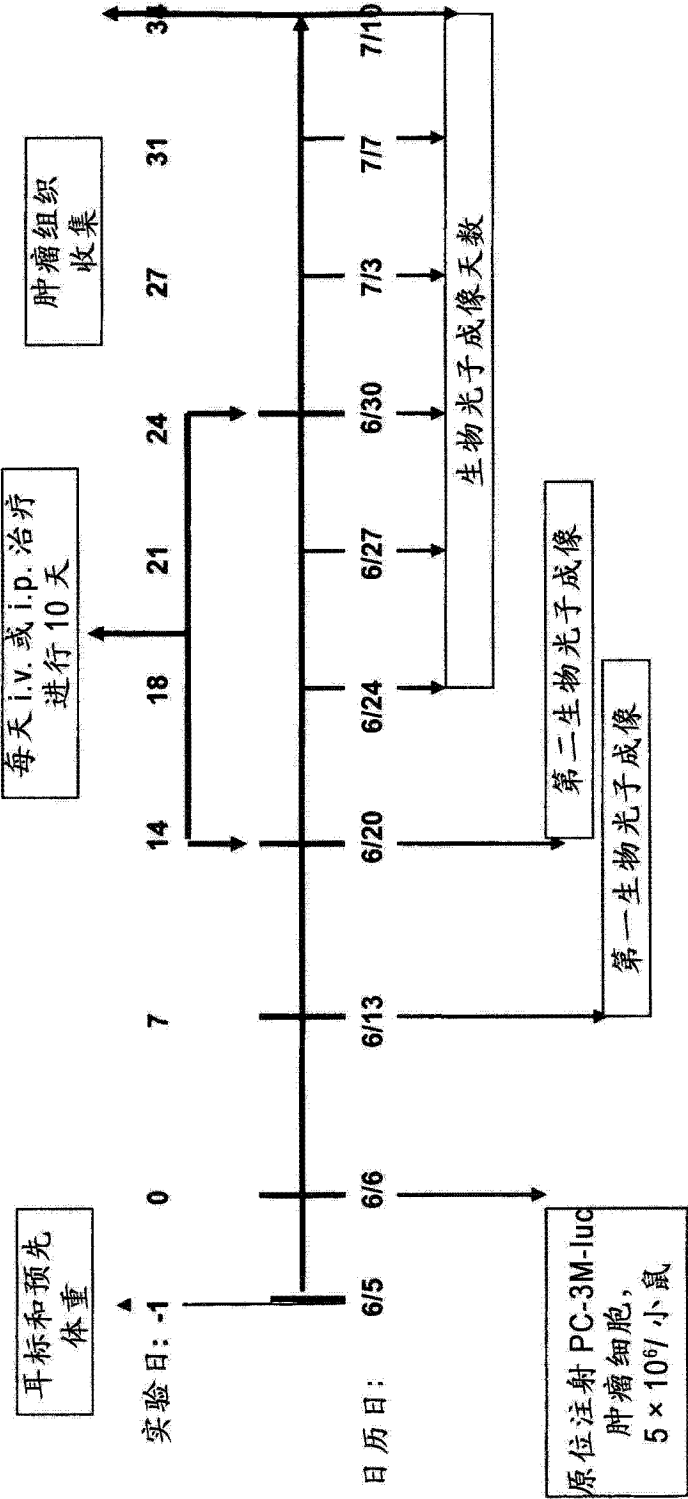


图 44

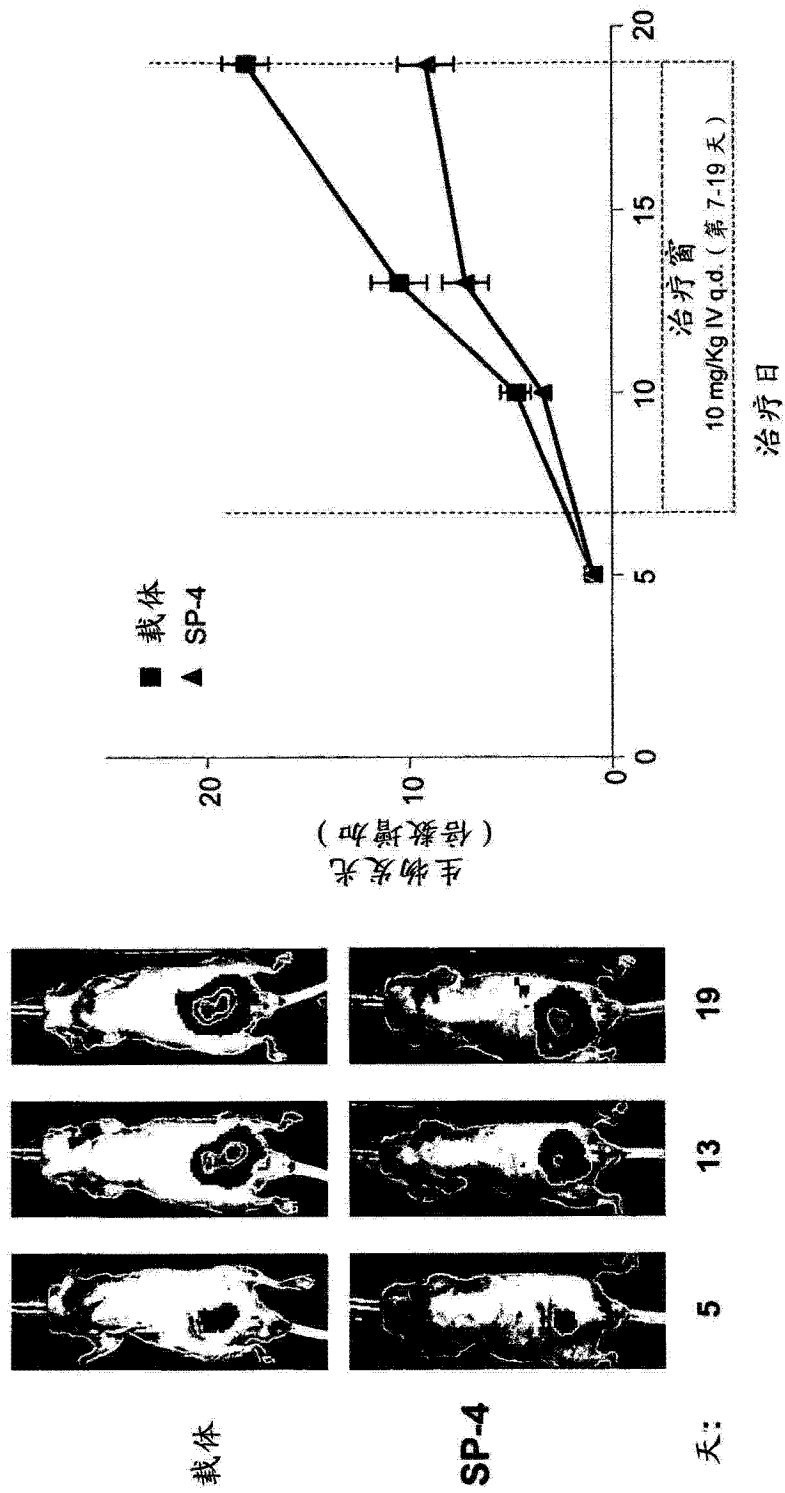


图 45

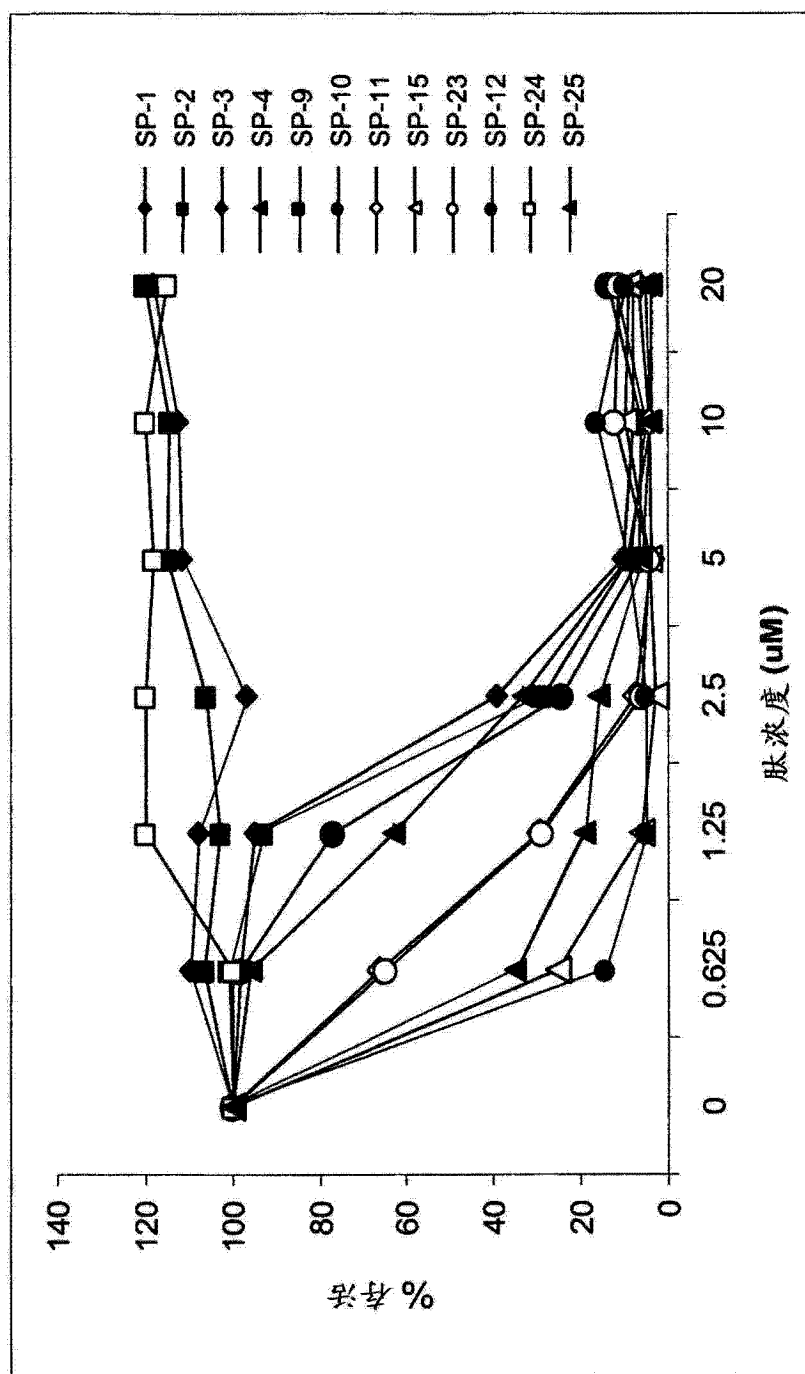


图 46

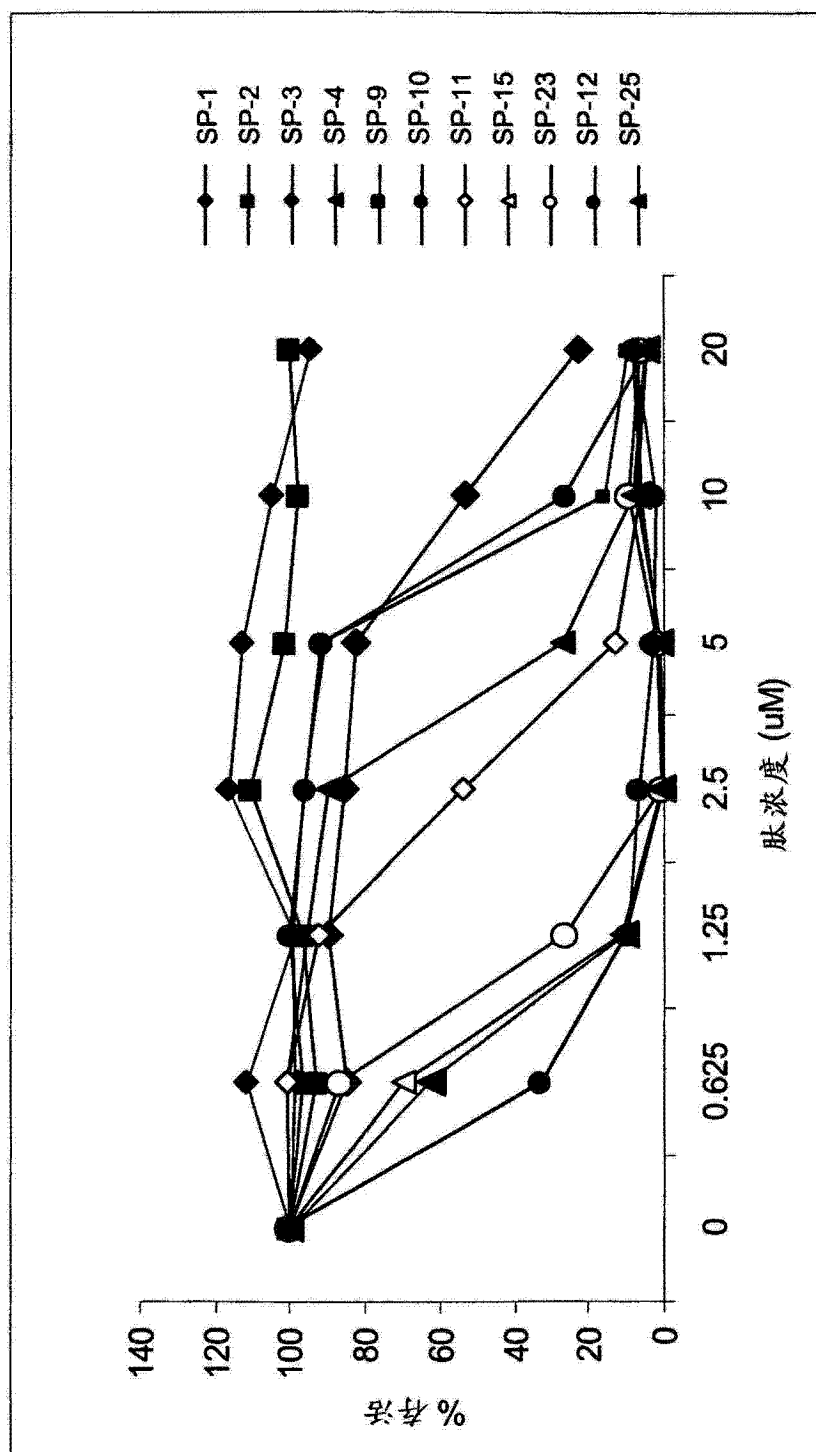


图 47

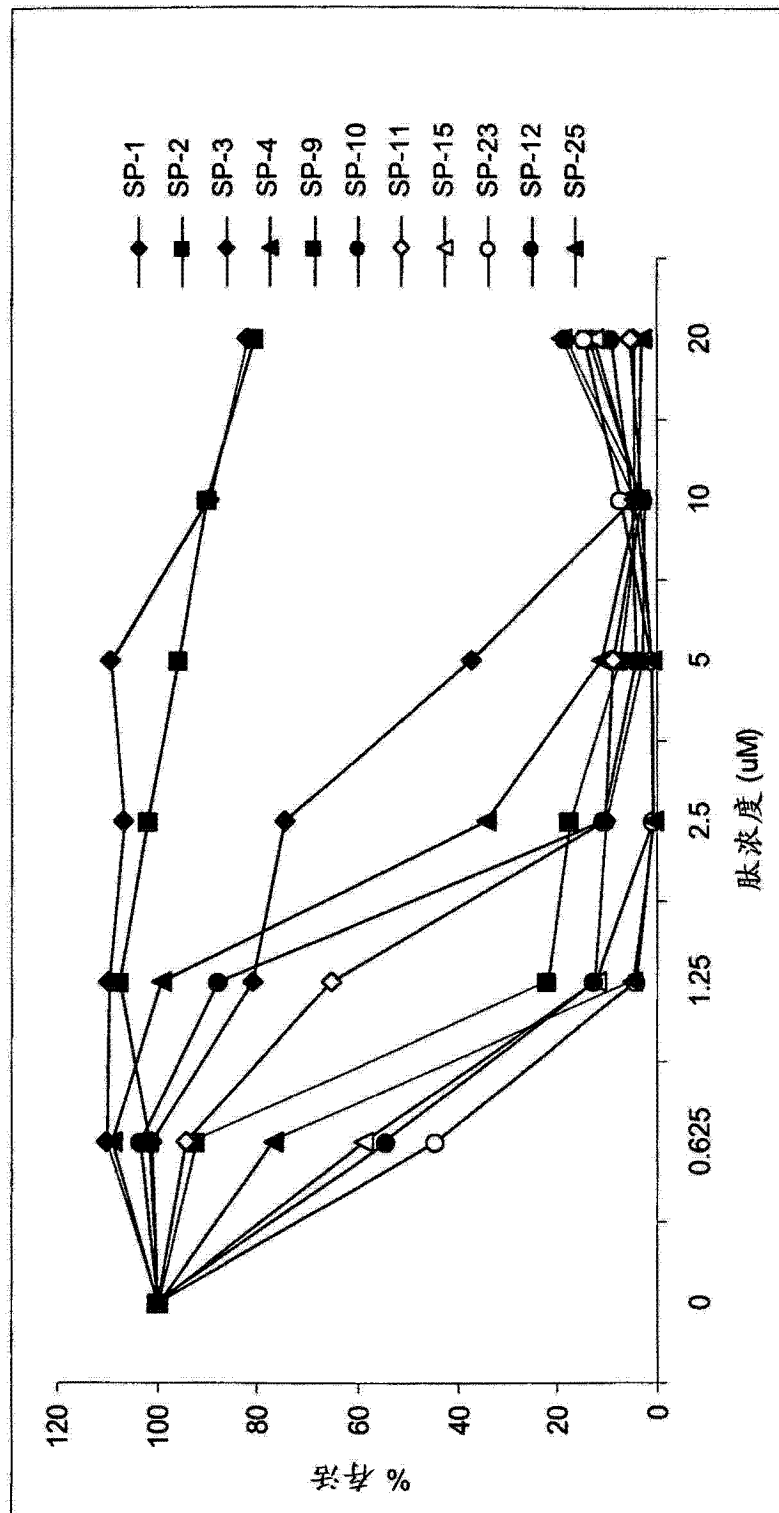


图 48

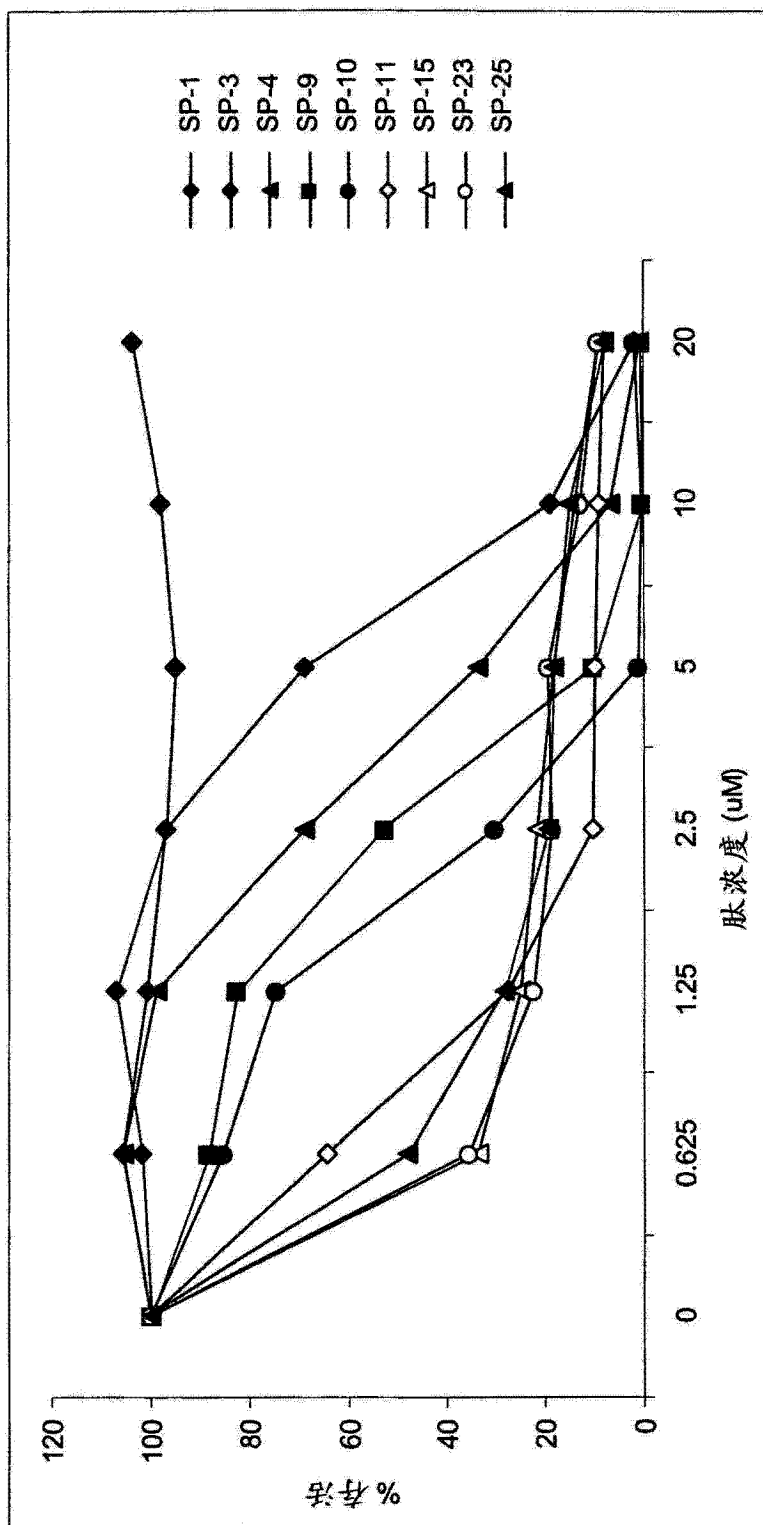


图 49

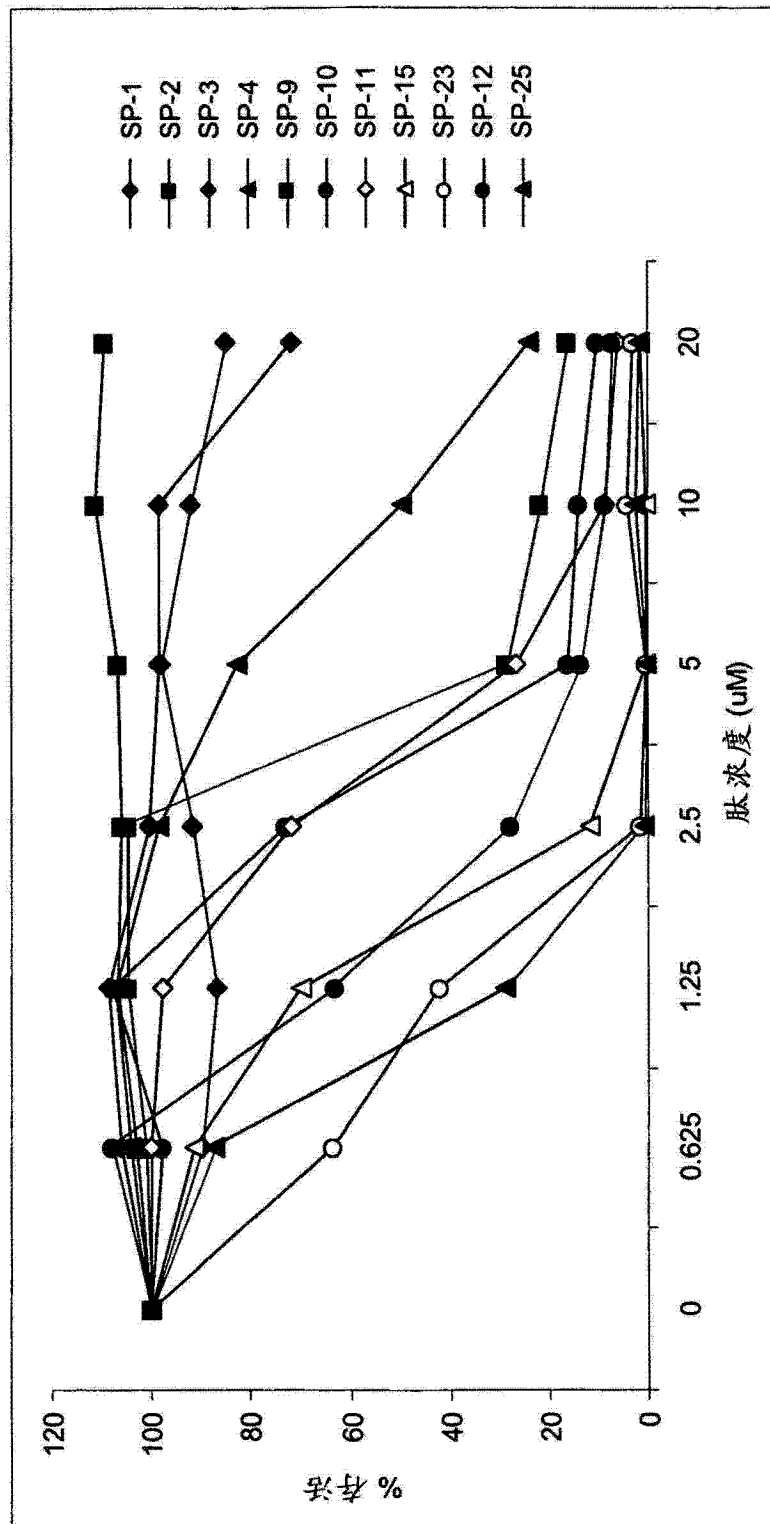


图 50

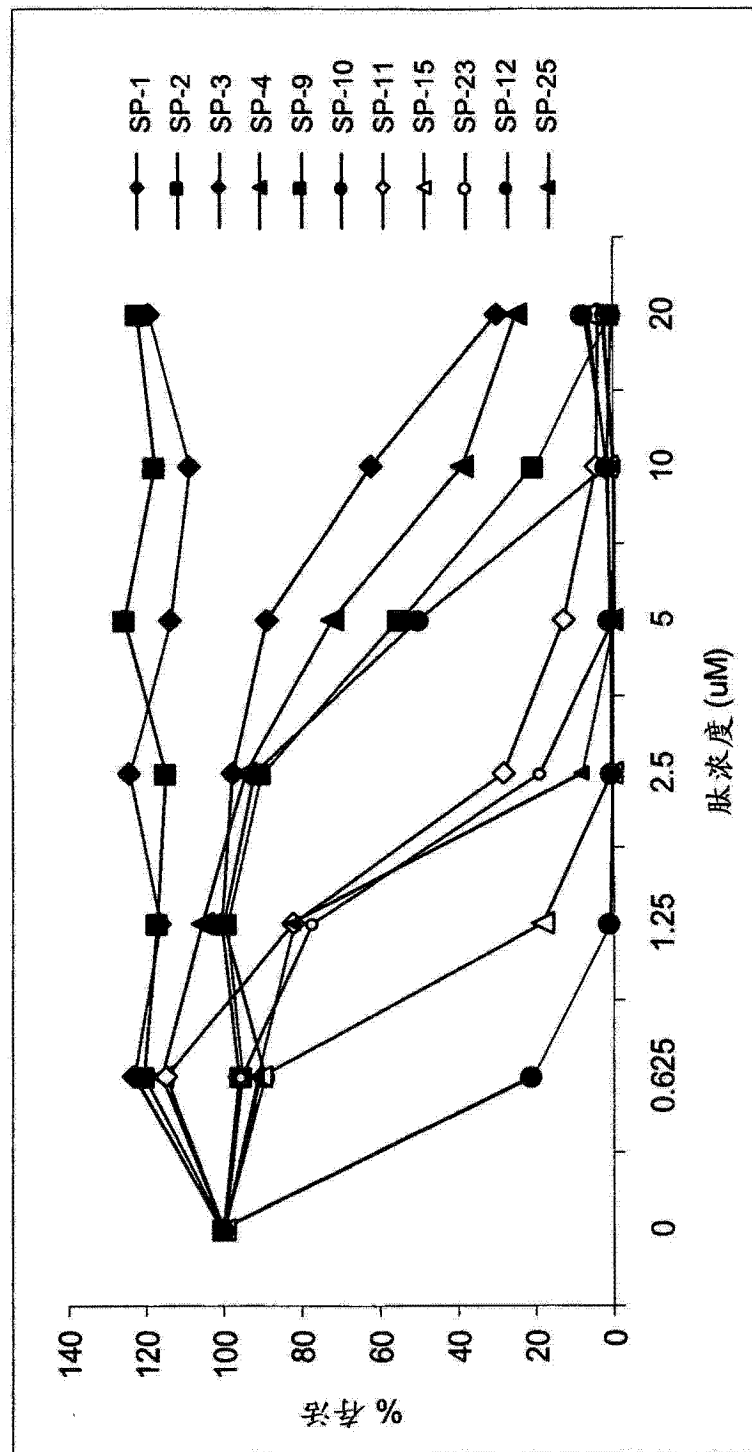


图 51

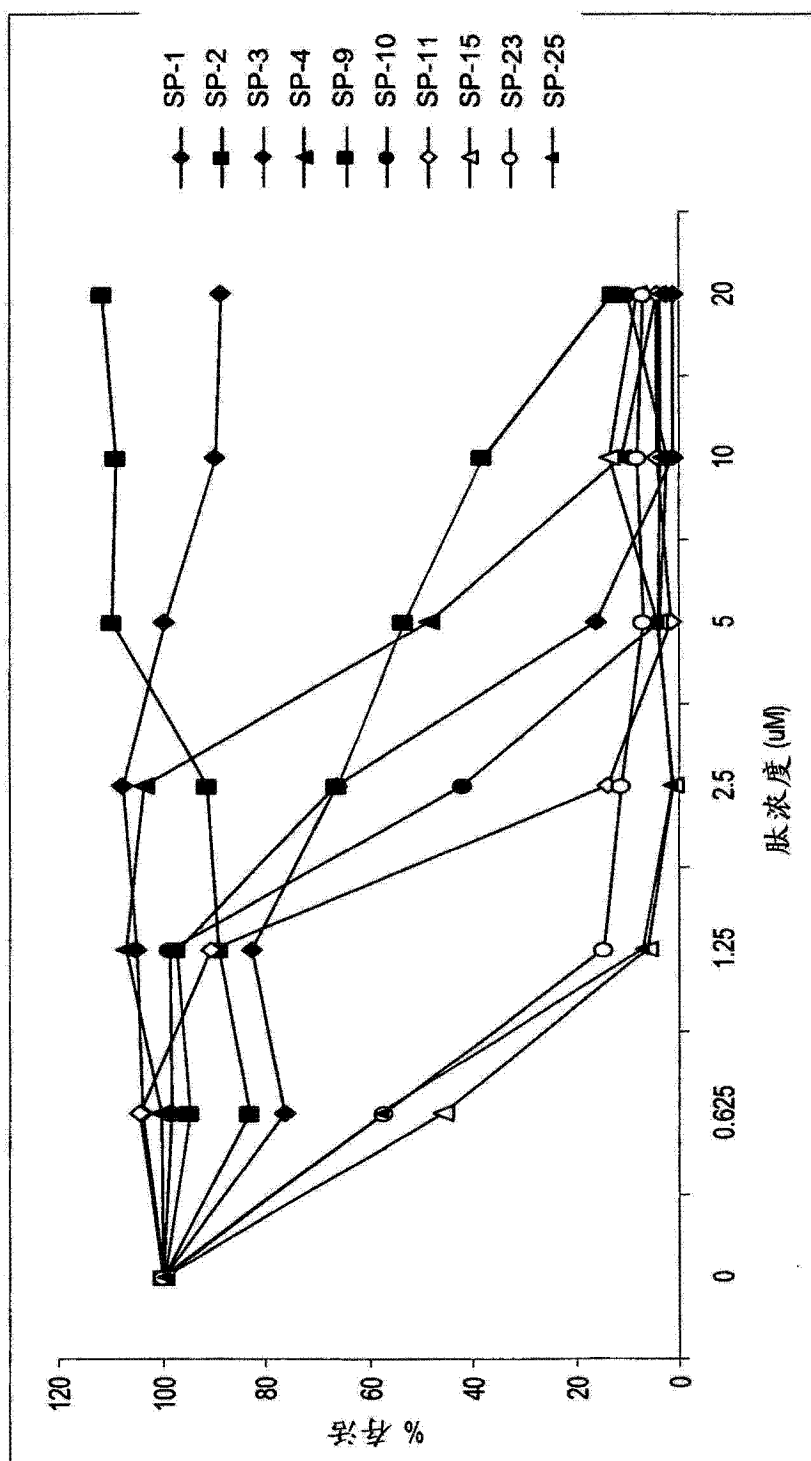


图 52

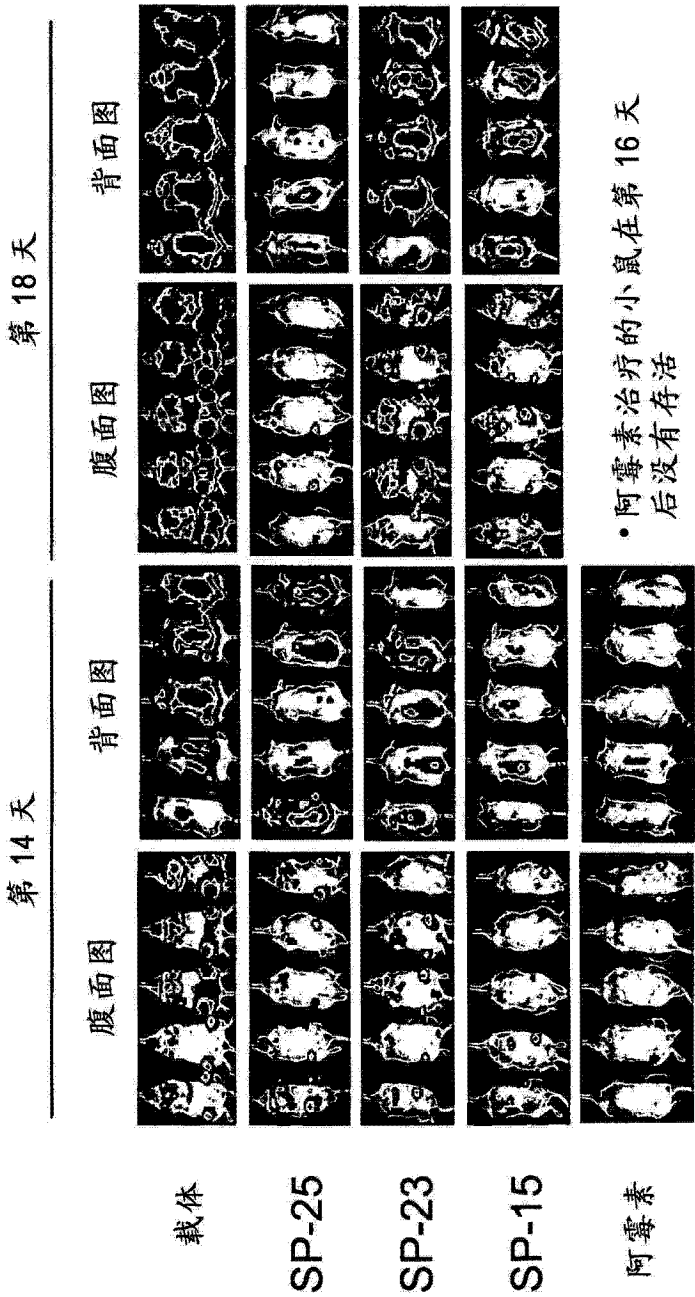


图 53

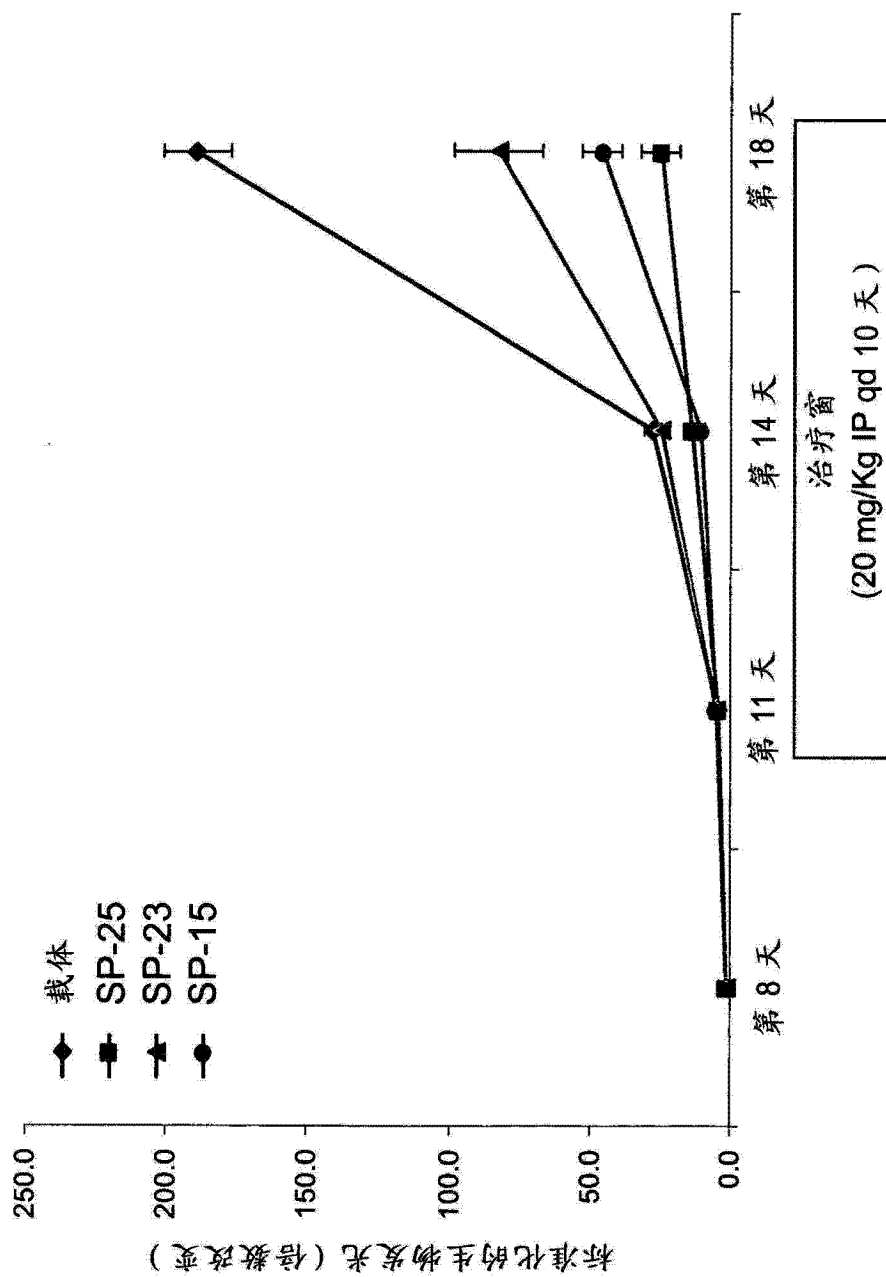


图 54

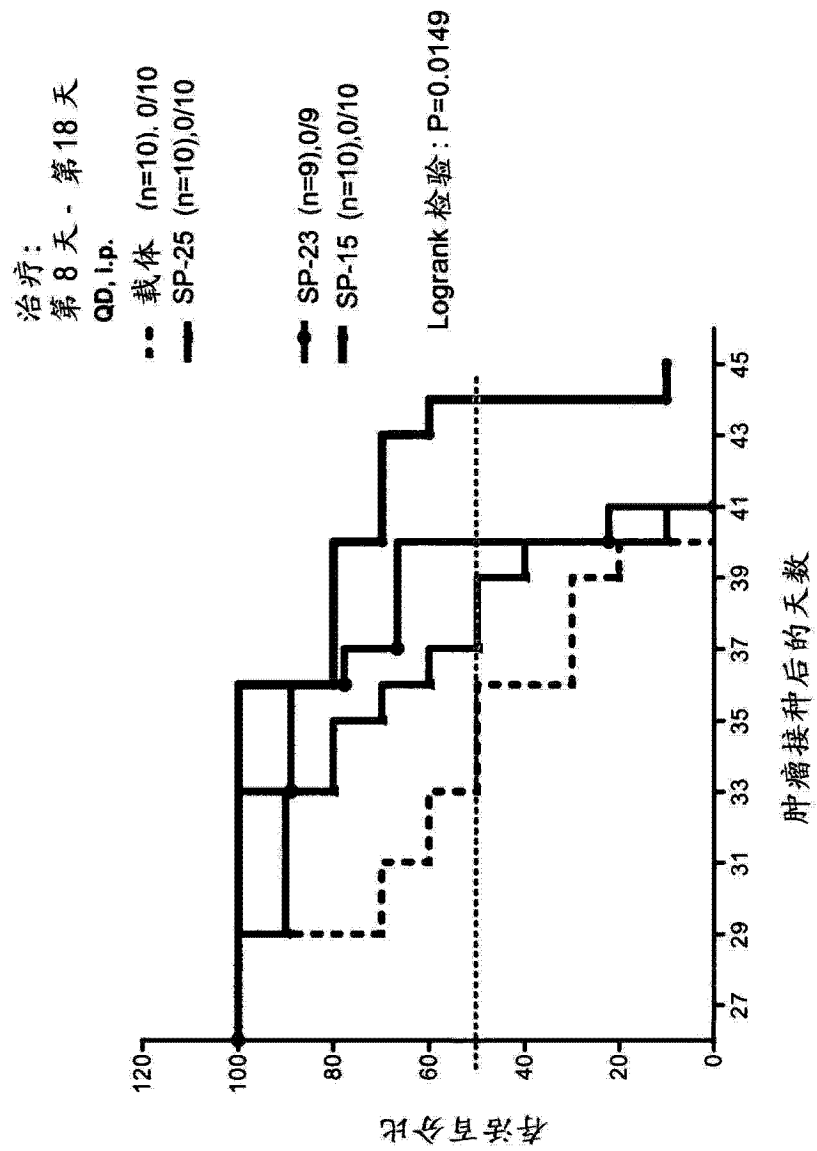


图 55

- 1- 输入: 细胞裂解液
- 2- 牵出: 抗生蛋白链菌素珠 + 细胞裂解液
- 3- 牵出: 抗生蛋白链菌素珠 + 生物素化的 SP-6 (线性) + 细胞裂解液
- 4- 牵出: 抗生蛋白链菌素珠 + 生物素化的 SP-4 (BIM BH3 装订的) + 细胞裂解液
- 5- 牵出: 抗生蛋白链菌素珠 + 生物素化的 SP-5 (BIM BH3 突变体) + 细胞裂解液

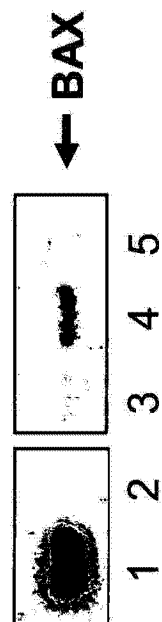


图 56