



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102197046 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 21

(21) 申请号 200980142296. 8

C07K 14/47(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 09. 22

(30) 优先权数据

61/099, 172 2008. 09. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/057927 2009. 09. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02010/034028 EN 2010. 03. 25

(71) 申请人 爱勒让治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 H·M·纳什 R·卡佩勒-利伯曼

J-w·韩 T·K·索耶 J·诺伊赫

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

C07K 7/56(2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 53 页 附图 4 页

(54) 发明名称

拟肽大环化合物

(57) 摘要

本发明提供了新的拟肽大环化合物以及使用这类拟肽大环化合物治疗疾病的方法。

1. 包含与选自表 1 中氨基酸序列的氨基酸序列至少大约 60% 相同的氨基酸序列的拟肽大环化合物。

2. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物的氨基酸序列与选自表 1 中氨基酸序列的氨基酸序列至少大约 80% 相同。

3. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物的氨基酸序列与选自表 1 中氨基酸序列的氨基酸序列至少大约 90% 相同。

4. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物的氨基酸序列选自表 1 中的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物包含螺旋。

6. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。

7. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物包含通过非螺旋连接体连接的两个或多个 α -螺旋。

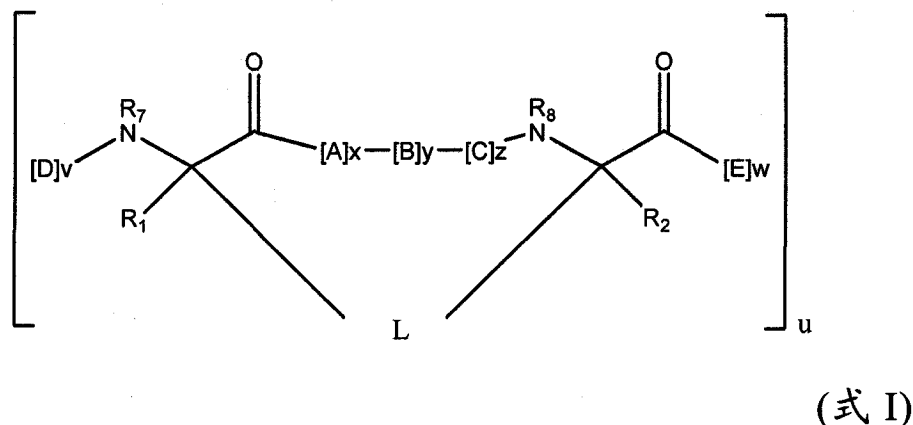
8. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 两个或多个 α -螺旋的拟肽大环化合物通过非螺旋连接体连接。

9. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物包含 α , α -二取代的氨基酸。

10. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物包含连接至少两个氨基酸的 α -位的连接体。

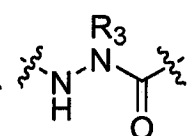
11. 根据权利要求 10 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述两个氨基酸中的至少一个是 α , α -二取代的氨基酸。

12. 根据权利要求 10 所述的拟肽大环化合物, 其中, 所述拟肽大环化合物具有下式:



其中:

A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸;

B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、

$[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

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;

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;

L 是式 $-L_1-L_2-$ 的形成大环的连接体;

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 $[-R_4-K-R_4-]_n$,各自任选地被 R_5 取代;

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;

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

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;

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;

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;

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;

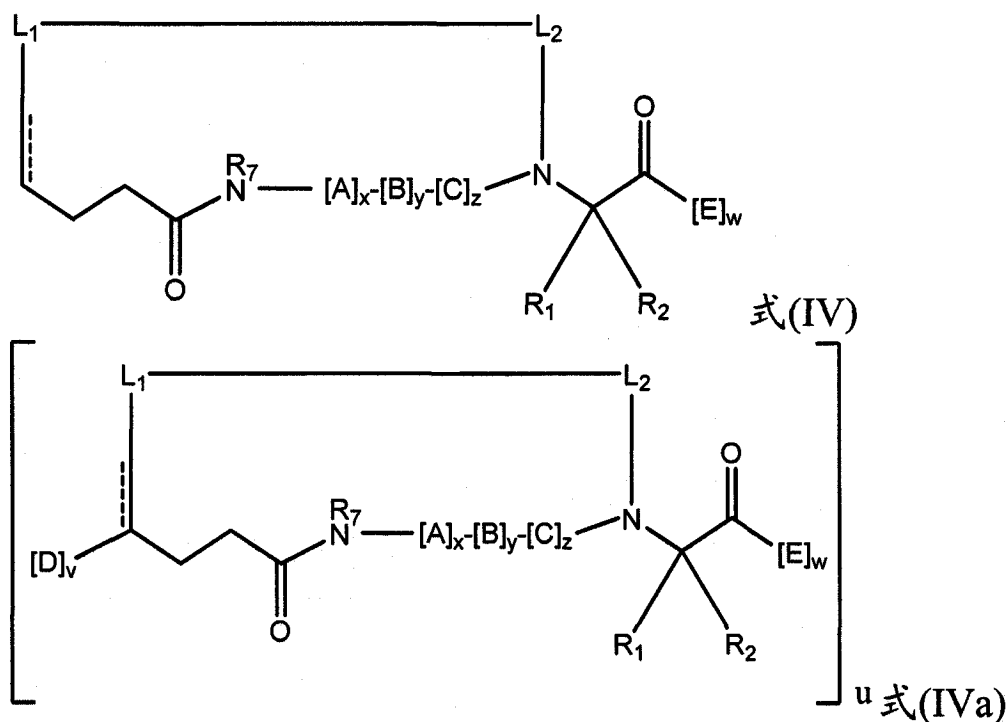
v 和 w 独立地是 1-1000 的整数;

u 、 x 、 y 和 z 独立地是 0-10 的整数;和

n 是 1-5 的整数。

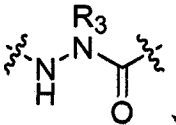
13. 根据权利要求 1 所述的拟肽大环化合物,其中,所述拟肽大环化合物包含连接第一氨基酸的骨架氨基与拟肽大环化合物中的第二氨基酸的连接体。

14. 根据权利要求 13 所述的拟肽大环化合物,其中,所述拟肽大环化合物具有式 (IV) 或 (IVa):



其中:

A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸；

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

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；

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；

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 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，各自任选地被 R_5 取代；

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；

各个 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

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；

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；

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；

v 和 w 独立地是 1-1000 的整数；

u、x、y 和 z 独立地是 0-10 的整数；和

n 是 1-5 的整数。

15. 治疗受试者的癌症的方法，包括向受试者施用权利要求 1 所述的拟肽大环化合物。

16. 治疗受试者的年龄相关性黄斑变性或糖尿病性视网膜病的方法，包括向受试者施用权利要求 1 所述的拟肽大环化合物。

17. 治疗受试者的由过度血管生成引起的病症的方法，包括向受试者施用权利要求 1 所述的拟肽大环化合物。

18. 调节受试者中的 HIF1 α 活性的方法，包括向受试者施用权利要求 1 所述的拟肽大环化合物。

19. 拮抗受试者中的 CBP/p300 和 HIF1 α 蛋白之间的相互作用的方法，包括向受试者施用权利要求 1 所述的拟肽大环化合物。

拟肽大环化合物

[0001] 交叉参考

[0002] 本申请要求 2008 年 9 月 22 日提交的美国临时申请 61/099,172 的优先权,本文通过引用引入该申请。

[0003] 发明背景

[0004] 缺氧诱导因子 (HIF) 是响应于细胞环境中的有效氧的变化 (具体而言,氧减少或缺氧) 的转录因子。大多数情况下,如果不是全部的话,呼吸氧的物种表达高度保守的转录复合物 HIF-1,它是 α 和 β 亚基的异二聚体, β 亚基是组成性表达的芳香烃受体核转位蛋白 (ARNT)。HIF-1 属于转录因子碱性-螺旋-环-螺旋 (bHLH) 家族的 PER-ARNT-SIM (PAS) 亚家族。HIF-1 的 α 亚基是 HIF 脯氨酰-羟化酶的脯氨酰羟基化作用的靶标,这使得 HIF-1 α 成为 E3 泛素连接酶复合物降解的靶标,从而导致被蛋白酶体迅速降解。这只发生在含氧量正常的条件下。在缺氧条件下,HIF 脯氨酰-羟化酶受抑制,因为它利用氧作为辅底物 (cosubstrate)。

[0005] HIF 通过调节参与许多细胞过程 (包括葡萄糖的吸收和代谢、血管生成、红细胞生成、细胞增殖和细胞凋亡) 的基因的表达同时促进氧输送和缺氧的适应 (Semenza GL. Curr Opin Cell Biol 2001;13:167-171)。它们是作为由氧敏感的 α 亚基和组成性表达的 β 亚基 (也被称为 ARNT) 组成的异二聚体与 DNA 结合的碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 转录因子的 PAS (PER-ARNT (芳香烃受体核转位蛋白)-SIM) 家族的成员。迄今为止,已经鉴定了三种 HIF (HIF-1、-2 和 -3),其响应于低氧水平来调节转录程序。

[0006] HIF 是介导针对缺氧的细胞适应的转录因子。已经鉴定了超过 100 种直接 HIF 靶向基因,其调节包括葡萄糖代谢、血管生成、红细胞生成、细胞增殖和侵入的许多细胞过程。HIF 也可以通过与其他信号蛋白质 (如 C-Myc 和 Notch) 的相互作用间接调节诸如增殖和分化的细胞过程 (Rankin EB 和 AJ Giaccia, Cell Death and Differentiation, 15, 2008)。

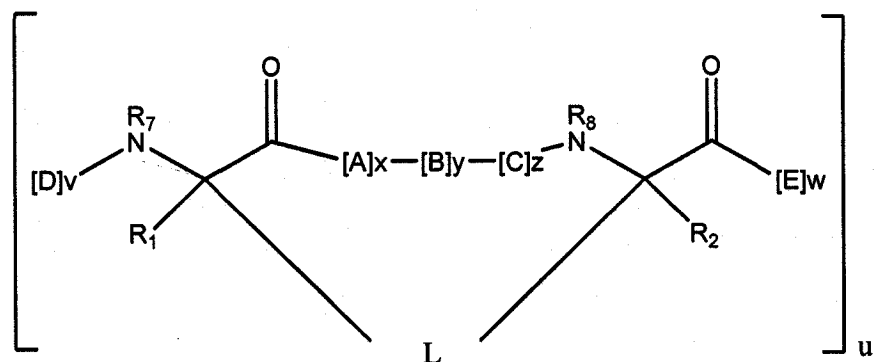
[0007] 慢性缺氧是许多肿瘤的特征,并与血管生成和更具侵袭性的肿瘤表型有关。HIF 调节肿瘤发生的多个步骤,包括肿瘤形成、进展和对治疗的响应。存在多种 HIF 可以被激活和促进肿瘤进展的机制。因此,很明显,HIF 系统的下调是对于癌症治疗有吸引力的目标。

[0008] 发明概述

[0009] 在一个方面,本发明提供了包含与选自表 1 中氨基酸序列的氨基酸序列至少大约 60%、80%、90%、或 95% 相同的氨基酸序列的拟肽大环化合物。或者,所述拟肽大环化合物的氨基酸序列选自表 1 中的氨基酸序列。在某些实施方式中,拟肽大环化合物包含螺旋,如 α -螺旋。在其他实施方式中,拟肽大环化合物包含 α , α -二取代的氨基酸。本发明的拟肽大环化合物可以包含连接至少两个氨基酸的 α -位的连接体。所述两个氨基酸中的至少一个可以是 α , α -二取代的氨基酸。

[0010] 在一些实施方式中,拟肽大环化合物具有下式:

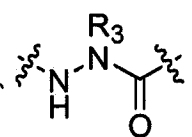
[0011]



(式 I)

[0012] 其中：

[0013] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸；

[0014] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 [-NH-L₃-CO-]、

[-NH-L₃-SO₂-] 或 [-NH-L₃-]；

[0015] R₁ 和 R₂ 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；

[0016] R₃ 是氢、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基 (cycloaryl) 或杂环芳基 (heterocycloaryl)，它们任选被 R₅ 取代；

[0017] L 是式 -L₁-L₂- 的形成大环的连接体；

[0018] L₁ 和 L₂ 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 (cycloarylene)、亚杂环芳基 (heterocycloarylene) 或 [-R₄-K-R₄-]_n，各自任选地被 R₅ 取代；

[0019] 各个 R₄ 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；

[0020] 各个 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

[0021] 各个 R₅ 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；

[0022] 各个 R₆ 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；

[0023] R₇ 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 R₅ 取代，或者是与 D 残基的环状结构的一部分；

[0024] R₈ 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 R₅ 取代，或者是与 E 残基的环状结构的一部分；

[0025] v 和 w 独立地是 1-1000 的整数；

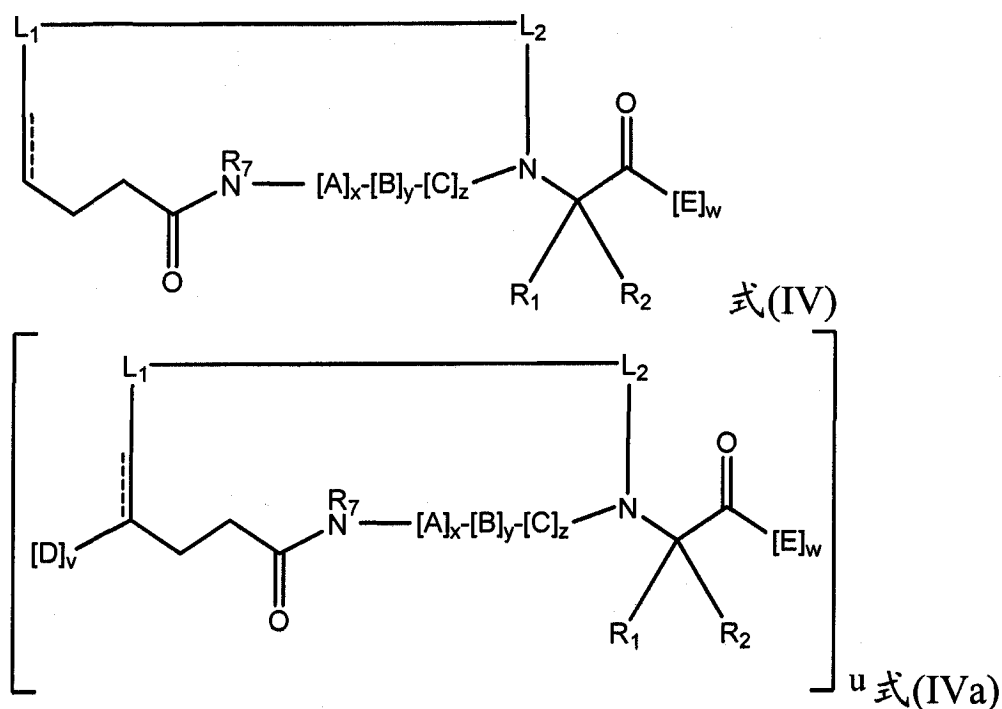
[0026] u、x、y 和 z 独立地是 0-10 的整数；和

[0027] n 是 1-5 的整数。

[0028] 在其他实施方式中，拟肽大环化合物可以包含连接第一氨基酸的骨架氨基与拟肽

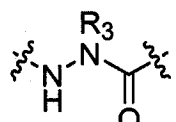
大环化合物中的第二氨基酸的交联连接体。例如,本发明提供了式 (IV) 或 (IVa) 的拟肽大环化合物:

[0029]



[0030] 其中:

[0031] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸;

[0032] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

[0033] 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;

[0034] 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;

[0035] 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 $[-R_4-K-R_4-]_n$,各自任选地被 R_5 取代;

[0036] 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;

[0037] 各个 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

[0038] 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;

[0039] 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;

[0040] 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;

[0041] v 和 w 独立地是 1-1000 的整数;

[0042] u、x、y 和 z 独立地是 0-10 的整数;和

[0043] n 是 1-5 的整数。

[0044] 此外,本发明提供了治疗受试者的癌症的方法,包括向受试者施用本发明的拟肽大环化合物。还提供了调节受试者中的 HIF1 α 活性的方法,包括向受试者施用本发明的拟肽大环化合物;或拮抗受试者中的 CBP/p300 和 HIF1 α 蛋白之间的相互作用的方法,包括向受试者施用这种拟肽大环化合物。

[0045] 通过引用引入

[0046] 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。

[0047] 附图简述

[0048] 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:

[0049] 图 1 说明本发明的 HIF-1 α 螺旋 A 和 HIF-1 α 螺旋 B 拟肽大环化合物前体与 CBP/p300 的可能的结合模式。HIF-1 α 螺旋 A 的残基 796 至 805 是 TSYDCEVNAP。HIF-1 α 螺旋 B 的残基 814 至 823 是 QGEELLRALD。可用于交联连接的溶剂暴露的侧链加下划线。

[0050] 图 2 说明本发明的 HIF-1 α 螺旋 A 拟肽大环化合物前体与 CBP/p300 的可能的结合模式。HIF-1 α 螺旋 A 的残基 796 至 805 是 TSYDCEVNAP。可用于交联连接的溶剂暴露的侧链加下划线。

[0051] 图 3 说明本发明的 HIF-1 α 螺旋 B 拟肽大环化合物前体与 CBP/p300 的可能的结合模式。HIF-1 α 螺旋 B 的残基 814 至 823 是 QGEELLRALD。可用于交联连接的溶剂暴露的侧链加下划线。

[0052] 图 4 显示本发明的示例性的拟肽大环化合物。

[0053] 发明详述

[0054] 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。

[0055] 如本文所用,术语“拟肽大环化合物”或“交联的多肽”指包含通过多个肽键接合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。当提及拟肽大环化合物时,“相应的非交联的多肽”理解为涉及具有与大环化合物相同长度并包含对应于大环化合物的野生型序列的相当天然氨基酸的多肽。

[0056] 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,或在体外或体内对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)。

[0057] 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化合物维持 α -螺旋结构。例如,在某些实施方式中,相比于对应的非交联的大环化合物,本发明的拟肽大环化合物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。

[0058] 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。除非上下文另外特别地指出,本文所用的术语氨基酸意图包括氨基酸类似物。

[0059] 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。

[0060] 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。氨基酸类似物包括但不限于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) 或以类似的反应性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,在结构上与此处所定义的氨基酸相同的化合物。

[0061] “非必需的”氨基酸残基是可从多肽的野生型序列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。“必需的”氨基酸残基是,当从多肽的野生型序列发生改变时,导致多肽的主要生物学或生物化学活性消除或基本消除的残基。

[0062] “保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替代的氨基酸置换。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 多肽中预测的非必需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。可接受的置换的其他例子是基于电子等排考虑 (例如, 正亮氨酸替代甲硫氨酸) 或其他性质 (如 2-噻吩丙氨酸替代苯丙氨酸) 的置换。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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,那些天然存在的氨基酸侧链(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)。

[0066] 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。

[0067] 术语“多肽”包括通过共价键(例如,酰胺键)接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)。

[0068] 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 ;以及可以通过加入还原剂(如抗坏血酸或抗坏血酸钠)原位转化为活性 Cu(I) 试剂的 Cu(II) 盐,如 $\text{Cu}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2$ 、 CuSO_4 和 CuCl_2 。大环化试剂可以另外地包括,例如,本领域内已知的 Ru 试剂,如 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 、 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$,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。在再其他的情况下,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。

[0069] 术语“卤代”或“卤素”指氟、氯、溴或碘或其基团。

[0070] 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, C_1 - C_{10} 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)。

[0071] 术语“亚烷基”指二价烷基(即, $-\text{R}-$)。

[0072] 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, C_2 - C_{10} 表示该基团中具有 2-10(包括端值)个碳原子。术语“低级链烯基”指 C_2 - C_6 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)。

[0073] 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)。

[0074] 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。

[0075] “烷基芳基”指其中芳基的氢原子中的一个被如上定义的 C_1 - C_5 烷基取代的如上定义的芳基。烷基芳基的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。

[0076] “酰胺基芳基”指其中芳基的氢原子中的一个被一个或多个 $-C(O)NH_2$ 基团取代的如上定义的芳基。酰胺基芳基的典型例子包括： $2-C(O)NH_2$ -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。

[0077] “杂环基烷基”指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被杂环取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。杂环基烷基的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。

[0078] “酰胺基烷基”指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被 $-C(O)NH_2$ 基团取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。酰胺基烷基的典型例子包括但不限于： $-CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_3$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2CH_3$ 和 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH=CH_2$ 。

[0079] “羟烷基 (alkanol)”指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被羟基取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。羟烷基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 $-C(CH_3)_2CH_2OH$ 。

[0080] “羧基烷基”指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被 $-COOH$ 基团取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。烷基羧基的典型例子包括但不限于： $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(COOH)CH_2CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2COOH$ 。

[0081] 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烃基，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。

[0082] 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，其如果是单环，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，分别为碳原子和 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 (quinoliny)、吲哚基、噻唑基等。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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，其如果是单环，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，分别为碳原子和 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。

[0086] 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。

[0087] 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体形式。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, 在这些情况下, 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体形式。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。

[0088] 如本文所用, 术语“增加”或“减少”分别意味着导致至少 5% 的统计上显著的 (即, $p < 0.1$) 增加或减少。

[0089] 如本文所用, 提及变量的数值范围意味着表示, 本发明可以采用等于该范围内的任何值的该变量实施。因此, 对于本身不连续的变量, 该变量等于该数值范围内的任何整数值, 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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、对于蛋白水解降解的抗性、细胞渗透性, 细胞内稳定性、体内稳定性或其任何组合。

[0093] 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。从说明书、附图和权利要求书中可以清楚地看出本发明的其他特征、目的和优势。

[0094] 在某些实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物与缺氧诱导因子 (HIF) 蛋白相关。慢性缺氧是许多肿瘤的特征, 并与血管生成和更具侵袭性的肿瘤表型有关。缺氧适应是通过由与 CBP 和 p300 转录辅激活物复合的缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 引起的缺氧响应基因 (VEGF、Glut-1 及其它) 的反式激活介导的。缺氧诱导因子 (HIF) 是通过激活参与肿瘤发生和血管生成的特定基因的转录介导对于低氧浓度的响应的 α , β -异二聚体转录因子, 从而调节氧输送、葡萄糖水平、代谢活性, 血管生成、红细胞生成、细胞增殖和细胞凋亡。 α 亚基被认为响应于低氧水平而表达, 而 β 亚基为组成性地表达。

[0095] HIF-响应基因的激活需要诸如 p300、CBP 或 SRC-1 的转录辅激活物的募集。CBP 和 p300 是种内同源的 (paralogous)、多结构域蛋白质, 其通过结合广范围的转录因子的反

式激活结构域和通过结合通用转录器官的组件而作为转录辅激活物发挥作用。此外,它们具有组蛋白乙酰转移酶 (HAT) 活性。

[0096] 在含氧量正常情况下, HIF 通过 von Hippel-Lindau (VHL) 肿瘤抑制物 pVHL 靶向蛋白酶体降解。已经表明, pVHL 是以氧依赖的方式与 HIF- α 相互作用的 E3 泛素连接酶复合物的底物识别元件。由含脯氨酰-4-羟化酶结构域 (PHD) 的蛋白质引起在 HIF- α ODD 中的保守脯氨酸残基的羟基化作用介导 pVHL 结合和降解。在缺氧条件下, HIF- α 亚基被稳定, 并转位到细胞核, 它们在此处与 ARNT 异二聚化并结合位于 HIF 靶基因的调控元件内的 HRE (Jaakkola P, 等人 Science 2001 ;292 :468-472)。HIF 稳定和 DNA 结合活性在低于 6% 的氧浓度下被诱导, 并且在 0.5% 的氧张力 (oxygen tension) 下最大。一旦被稳定, HIF- α /ARNT 异二聚体通过募集转录激活因子 p300 和 CBP 来激活转录。HIF 和 p300/CBP 之间的相互作用通过抑制 HIF-1 的因子 (FIH-1) (2-酮戊二酸和 Fe(II)-依赖的加氧酶超家族的成员) 也以氧依赖的方式调节。FIH 使位于 HIF- α 的 C-末端反式激活结构域 (CTAD) 中的天冬酰胺残基羟基化, 并阻止 p300/CBP 结合 (Mahon PC, 等人 Genes Dev 2001 ;15 :2675-2686)。

[0097] HIF-1 α 蛋白质表达水平的增加与许多实体肿瘤类型呈正相关, 包括膀胱肿瘤、乳腺肿瘤、结肠肿瘤、神经胶质肿瘤、肝细胞肿瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、前列腺肿瘤和肾肿瘤 (Cancer Res. 1999, 59 :5830-5835; Talks 等人, Am J Pathol 2000 ;157 :411-421)。HIF-1 α 也被认为涉及头颈癌、鼻咽癌、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、子宫颈癌、骨肉瘤、子宫内膜癌、卵巢癌、膀胱癌、胶质母细胞瘤和胃癌 (Rankin 等人, Cell Death and Differentiation (2) 15,)。在用同步放化疗治疗的局部晚期的不能手术的头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 中 HIF-1 α 的过度表达与生存率降低有关 (Koukourakis 等人, 2002), 正如在经治愈为目的的初步手术治疗的 HNSCC 中 HIF-1 α 的过度表达 (Winter 等人, 2006)。在用放射治疗的口咽部鳞状细胞癌中, HIF-1 α 的过度表达与无局部损伤的存活、无疾病存活和总存活呈负相关 (Aebbersold 等人, 2001)。HIF-1 α 的高水平与患有淋巴结阳性 (Gruber 等人, 2004; Schindl 等人, 2002) 和淋巴结阴性的乳腺癌的患者的存活时间缩短相关 (Bos 等人, 2003)。在食管癌中 HIF-1 α 的高水平与使用或未使用辅助治疗的患者的存活率降低相关 (Kurokawa 等人, 2003)。

[0098] 在异种移植的免疫缺陷小鼠中进行的实验表明, HIF-1 α 的丧失减少了源自小鼠胚胎成纤维细胞的纤维肉瘤 (Ryan 等人, 2000) 和源自小鼠胚胎干细胞的畸胎瘤 (Ryan 等人, 1998) 的生长。这与以下报导一致: 毛壳菌素 (chetomin) (HIF 结合其转录辅激活物 p300 的阻断剂) 对 HIF-1 α 的药理抑制抑制了 HCT116 肿瘤异种移植植物中的缺氧诱导转录和抑制其生长 (Kung 等人, 2004)。来自胰腺导管腺癌细胞系的显性阴性 HIF-1 α 转染细胞在严重的联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠的异种移植模型中显示出降低的致肿瘤性 (tumorigenicity) (Chen 等人, 2003)。与此一致地, 在裸鼠的功能增进研究中, 来自对于 HIF-1 α 阴性的胰腺癌细胞系的 HIF-1 α 转染细胞显示提高的致肿瘤性 (tumorigenicity) (Akakura 等人, 2001)。与此相反, 源自小鼠胚胎干细胞的 HIF-1 α 基因敲除肿瘤显示出由于降低的缺氧诱导的细胞凋亡和增加的应激诱导的增殖而在裸鼠中加速生长 (Carmeliet 等人, 1998)。

[0099] HIF-1 α 在对于缺氧的适应性反应中的核心作用及其与不良预后的相关性使之

成为抗癌药物开发的潜在的靶标。对抗 HIF-1 α 的反义治疗已被证明减少 HIF-1 α 的表达和转录活性;但在目前的技术状态下,还只是在细胞培养中进行实验,因而很难临床应用(Yeo 等人,2004)。因此,HIF-1 α 作为癌症治疗靶标的潜力在于对 HIF-1 的小分子抑制剂的开发。已经有相当的驱动力来鉴别和开发抑制 HIF-1 α 的化合物并建立其作用机制。许多抗癌药物已被证明抑制 HIF,但这些药物都没有被证明直接和特异性地靶向 HIF-1(Giaccia 等人 2003, Semenza 2003, 2006, Powis&Kirkpatrick 2004, Yeo 等人 2004, Belozarov&Van Meir 2005, Escuin 等人 2005, Wiedmann&Caca 2005, Generali 等人 2006)。这种特异性的缺乏增加了将这些药物的任何致肿瘤的效力做到特异性地抑制 HIF-1 α 的困难。代表美国国家癌症研究所化学库的“多样性集合 (Diversity Set)”的 2000 个化合物的高通量筛选已鉴定 4 种特异性的 HIF-1 抑制剂 (Rapisarda 等人,2002)。虽然一些干扰 p300 和 HIF-1 α 的相互作用的抑制剂已知是抑制肿瘤内缺氧诱导的转录和抑制肿瘤生长 (Nat. Med. 2000, 6 :1335-1340&Cancer Cell 2004, 6 :33-43),但是 HIF-1 α 和 p300 之间的广泛的相互作用使得小分子抑制剂很难有效。因此,破坏这种相互作用的新方法是非常需要的。

[0100] HIF-1 α 与 CBP/p300 的复合物的结构受到关注,不仅因为其提供对于缺氧反应的分子基础的了解,而且也作为抗癌药物设计的潜在靶标。对于 HIF-1 α 和 p300 之间的相互作用已经描绘清楚 (Kung A L, 等人 (2000) Nat Med 6 :1335-1340)。HIF-1 α 的转录调控完全依赖于 HIF-1 α 的 C-末端激活结构域 (CTAD) 和 CBP/p300 的 CH1 结构域 (也称为 TAZ 1 结构域) 之间的相互作用 (Kallio PJ, 等人, EMBO 17, 1998)。HIF-1 α 还包含比 CTAD 单独更低效地反式激活的 N-末端反式激活结构域 (NTAD);但是, NTAD 和 CTAD 一起协同地作用。CH1 和 CH3 是含有大量的半胱氨酸和组氨酸残基的 CBP/p300 的同源的 Zn²⁺-结合结构域。CH2 结构域也结合 Zn²⁺,但在结构上与 CH1 和 CH3 结构域无关。与 HIF-1 α 的 CTAD 结合的 p300CH1 结构域的结构已被确定 (Freedman SJ. 等人 PNAS 第 99 卷, 2002)。结构表明, CH1 结构域提供了诱导 HIF-1 α CTAD 折叠的支架。更具体地, p300 的 CH1 结构域由 4 个 α -螺旋和 HCCC 序列基序形成的 3 个 Zn²⁺ 配位位点组成。HIF-1 α CTAD 包括 4 个结构部件: N-末端延伸区、2 个螺旋 (α A 和 α B) 和 1 个间插环 (intervening loop)。延伸的 N-末端片段和 C-末端螺旋 α B 与 CH1 的 3 个主要螺旋的每个螺旋中的、但在三角结构域对侧的残基接触。螺旋间的环横跨 CH1 中的 α 3, 且 α A 和 α B 以几乎平行排列的方式包埋在其任一侧的沟槽中。螺旋 α A 和 α B 夹置在 CH1 结构域中的 α 3 周围。随机诱变筛选已确认了 4 个 HIF-1 α 残基 (Leu-795、Cys-800、Leu-818 和 Leu-822) 对于 p300 募集是关键。所有这些残基都包埋在复合物的核心中。4 个 p300 残基也被确认为对于与 HIF-1 α 的相互作用是关键 (残基 Leu-344、Leu-345、Cys-388 和 Cys-393)。这两个亮氨酸发现在 HIF-1 α 界面中,而两个半胱氨酸参与 Zn²⁺ 配位,因此是 HIF-1 α 结合间接需要的。HIF-1 α 的 CTAD 中 40 个残基的超过四分之三接触 p300 的 CH1 结构域,且这两种蛋白缠结以形成具有共同的疏水核心的单一结构域。保守的 Asn-803 作为缺氧开关 (hypoxic switch) 发挥功能。Asn-803 在含氧量正常条件下的羟基化导致 HIF-1 α CAD 与 CBP 结合的取消 (Lando D 等人 Science 295, 2002)。Asn-803 位于 α B-螺旋上并深深包埋于蛋白质-蛋白质界面中,相对于 Ile-353 及 Lys-349 侧链的疏水部分包装 (Dames SA, 等人 PNAS 第 99 卷, 2002)。这也形成了侧链氢键相互作用的网络,这可能在 α A-螺旋和复合物的稳定中发挥重要作用。这种

结构的确定为破坏 HIF-1 α 和 CBP/p300 之间相互作用的抑制剂的设计提供了基础。

[0101] 本发明提供了可以阻断 HIF1 α 与 CBP/p300 辅激活物的结合的拟肽大环化合物。下面给出用于本发明中的合适的 HIF1 α /CBP/p300 肽的非限制性示例的列表：

[0102] 表 1

[0103]

适于合成拟肽大环化合物的 HIF-1 α 序列 (黑体部分=关键的残基; X=交联的氨基酸; 连接 = 非螺旋连接体)																																
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D	-NH2	螺旋 α/β		
Ac-	T	X	Y	D	C	X	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D	-NH2	i-> i+4 #1		
Ac-	T	S	X	D	C	E	X	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D	-NH2	i-> i+4 #2		
Ac-	T	S	Y	X	C	E	V	X	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D	-NH2	i-> i+4 #3		
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	X	E	L	L	X	A	L	D	-NH2	i-> i+4 #4		
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	X	L	L	R	X	L	D	-NH2	i-> i+4 #5		
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	X	E	L	L	R	A	L	X	-NH2	i-> i+7 #1		
Ac-	T	X	Y	D	C	X	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	X	E	L	L	X	A	L	D	-NH2	i-> i+4, i->i+4 #1		
Ac-	T	S	X	D	C	E	X	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	X	L	L	R	X	L	D	-NH2	i-> i+4, i->i+4 #2		
Ac-	T	S	Y	X	C	E	V	X	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	X	E	L	L	R	A	L	X	-NH2	i-> i+4, i->i+7 #1		
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P																		-NH2	螺旋 α			
Ac-	T	X	Y	D	C	X	V	N	A	P																		-NH2	i-> i+4 #1			
Ac-	T	S	X	D	C	E	X	N	A	P																		-NH2	i-> i+4 #2			
Ac-	T	S	Y	X	C	E	V	X	A	P																		-NH2	i--> i+4 #3			
Ac-																																
Ac-																					Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D	-NH2	螺旋 β
Ac-																					Q	G	X	E	L	L	X	A	L	D	-NH2	i--> i+4 #1
Ac-																					Q	G	E	X	L	L	R	X	L	D	-NH2	i--> i+4 #2
Ac-																					Q	G	X	E	L	L	R	A	L	X	-NH2	i--> i+7#1
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	连接	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D								-NH2	螺旋 $\alpha+\beta$ 连接		
Ac-	T	X	Y	D	C	X	V	N	A	P	连接	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D								-NH2	i-> i+4 #1		
Ac-	T	S	X	D	C	E	X	N	A	P	连接	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D								-NH2	i-> i+4 #2		
Ac-	T	S	Y	X	C	E	V	X	A	P	连接	Q	G	E	E	L	L	R	A	L	D								-NH2	i-> i+4 #3		
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	连接	Q	G	X	E	L	L	X	A	L	D								-NH2	i-> i+4 #4		

Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	连接	Q	G	E	X	L	L	R	X	L	D						-NH ₂	i-> i+4 #5		
Ac-	T	S	Y	D	C	E	V	N	A	P	连接	Q	G	X	E	L	L	R	A	L	X						-NH ₂	i-> i+7 #1		
Ac-	T	X	Y	D	C	X	V	N	A	P	连接	Q	G	X	E	L	L	X	A	L	D						-NH ₂	i-> i+4, i->i+4 #1		
Ac-	T	S	X	D	C	E	X	N	A	P	连接	Q	G	E	X	L	L	R	X	L	D						-NH ₂	i-> i+4, i->i+4 #2		
Ac-	T	S	Y	X	C	E	V	X	A	P	连接	Q	G	X	E	L	L	R	A	L	X						-NH ₂	i-> i+4, i->i+7 #1		
适于合成拟肽大环化合物的 HIF-1α 序列（黑体部分=突变的残基； \$ = S5 烯 aa; \$r8 = R8 烯 aa）																												pH 7.4 时的电 荷		
Ac-	T	\$	Y	D	C	\$	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	\$	E	L	L	\$	A	L	D	-NH ₂	-2
Ac-	T	\$	Y	N	C	\$	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	\$	Q	L	L	\$	A	L	D	-NH ₂	0
Ac-	T	\$	Y	N	C	\$	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	\$	E	L	L	\$	A	L	N	-NH ₂	0
Ac-	T	\$	Y	N	C	\$	V	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	\$	Q	L	L	\$	A	L	N	-NH ₂	1
Ac-	T	S	\$	D	C	E	\$	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	\$	L	L	R	\$	L	D	-NH ₂	-2
Ac-	T	S	\$	N	C	E	\$	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	E	\$	L	L	R	\$	L	N	-NH ₂	0
Ac-	T	S	\$	D	C	Q	\$	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	Q	\$	L	L	R	\$	L	D	-NH ₂	0
Ac-	T	S	\$	N	C	Q	\$	N	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	Q	\$	L	L	R	\$	L	N	-NH ₂	2
Ac-	T	S	Y	\$	C	E	V	\$	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	\$r8	E	L	L	R	A	L	\$	-NH ₂	0
Ac-	T	S	Y	\$	C	Q	V	\$	A	P	I	Q	G	S	R	N	L	L	Q	G	\$r8	Q	L	L	R	A	L	\$	-NH ₂	2
Ac-	T	\$	Y	D	C	\$	V	N	A	P																	-NH ₂		-1	
Ac-	T	\$	Y	N	C	\$	V	N	A	P																	-NH ₂		0	
Ac-	T	S	\$	N	C	E	\$	N	A	P																	-NH ₂		-1	
Ac-	T	S	\$	D	C	Q	\$	N	A	P																	-NH ₂		-1	
Ac-	T	S	\$	N	C	Q	\$	N	A	P																	-NH ₂		0	
Ac-	T	S	Y	\$	C	E	V	\$	A	P																	-NH ₂		-1	
Ac-	T	S	Y	\$	C	Q	V	\$	A	P																	-NH ₂		0	
Ac-																				Q	G	\$	E	L	L	\$	A	L	D	

16

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;

[0121] R_6 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;

[0122] v 和 w 独立地是 1-1000 的整数;

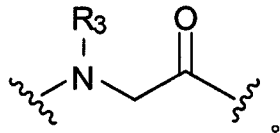
[0123] u 、 x 、 y 和 z 独立地是 0-10 的整数;和

[0124] n 是 1-5 的整数。

[0125] 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。

[0126] 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。类似地,当 u 大于 1 时,本发明的各个化合物可以包括相同或不同的拟肽大环化合物。例如,本发明的化合物可以包括包含不同的连接体长度或化学组成的拟肽大环化合物。

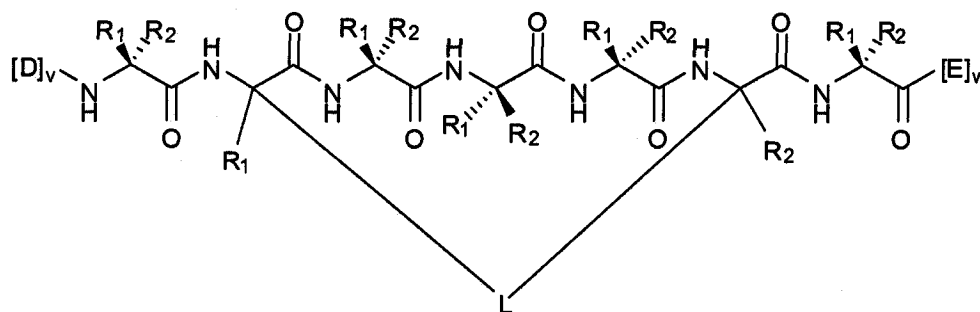
[0127] 在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构,且 R_6 是 -H,从而允许螺旋内的氢键键合。在某些实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个例子中,B 是 α , α -二取代的氨基酸。例如,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其他的实施方式中,A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



[0128] 在其他实施方式中,选择如从第一 $C\alpha$ 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位于第一 $C\alpha$ 和第二 $C\alpha$ 之间的残基)形成的 α -螺旋。

[0129] 在一个实施方式中,式 (I) 的拟肽大环化合物为:

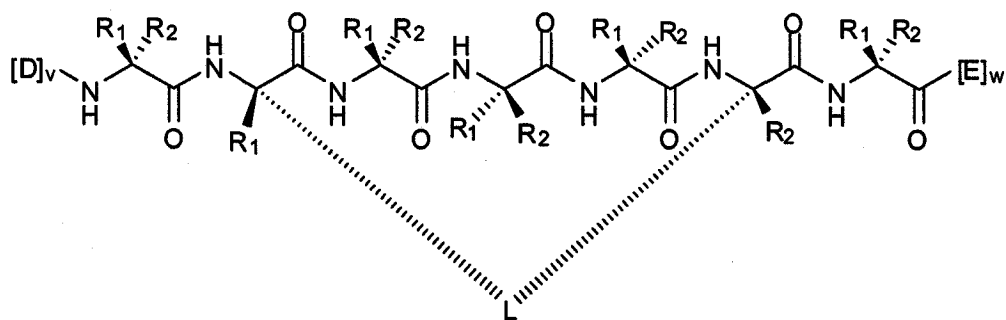
[0130]



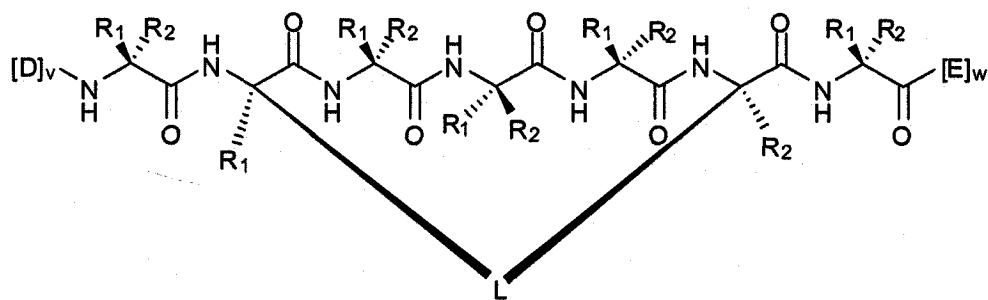
[0131] 其中, R_1 和 R_2 各自独立地是 -H、烷基、链烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素取代的。

[0132] 在相关的实施方式中,式 (I) 的拟肽大环化合物为:

[0133]

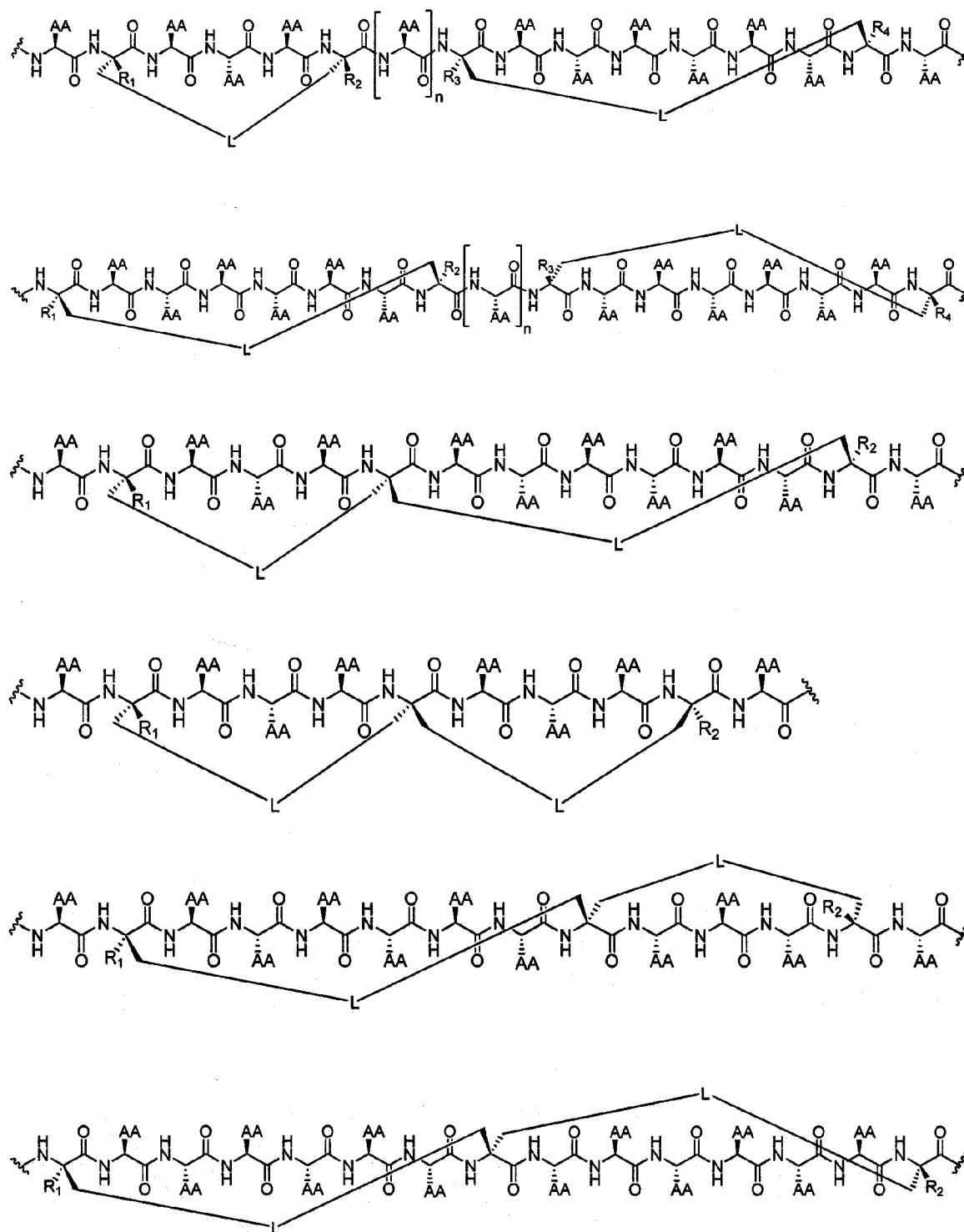


或



[0134] 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:

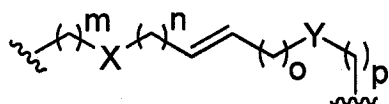
[0135]



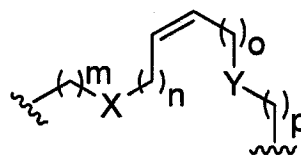
[0137] 其中,“AA”代表任何天然或非天然的氨基酸侧链,和“”为如上定义的 [D]_v、[E]_w, n 是 0 至 20、50、100、200、300、400 或 500 之间的整数。在某些实施方式中, n 为 0。在其他的实施方式中, n 小于 50。

[0138] 形成大环的连接体 L 的示例性实施方式如下所示。

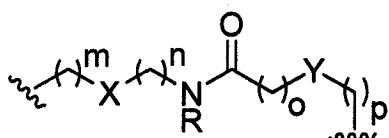
[0139]



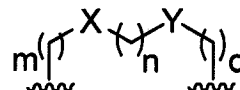
其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或 NH
m, n, o, p = 0-10



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



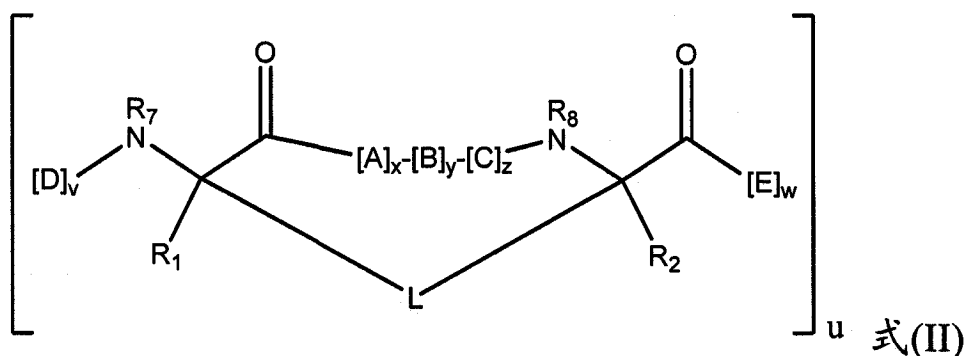
其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或 NH
m, n, o, p = 0-10
R = H、烷基或其他取代基



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

[0140] 在某些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物具有式 (II) :

[0141]



[0142] 其中 :

[0143] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸 ;

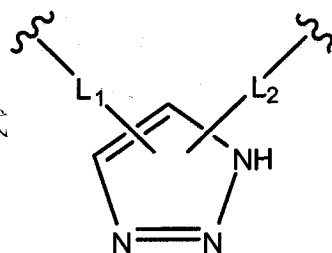
[0144] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 [-NH-L₃-CO-],

[-NH-L₃-SO₂-] 或 [-NH-L₃-] ;

[0145] R₁ 和 R₂ 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 ;

[0146] R₃ 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 R₅ 取代 ;

[0147] L 是式



的形成大环的连接体 ;

[0148] 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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 各自任选地被 R_5 取代;

[0149] 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;

[0150] 各个 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

[0151] 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;

[0152] 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;

[0153] 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;

[0154] 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;

[0155] v 和 w 独立地是 1-1000 的整数;

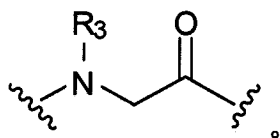
[0156] u 、 x 、 y 和 z 独立地是 0-10 的整数; 和

[0157] n 是 1-5 的整数。

[0158] 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。

[0159] 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。

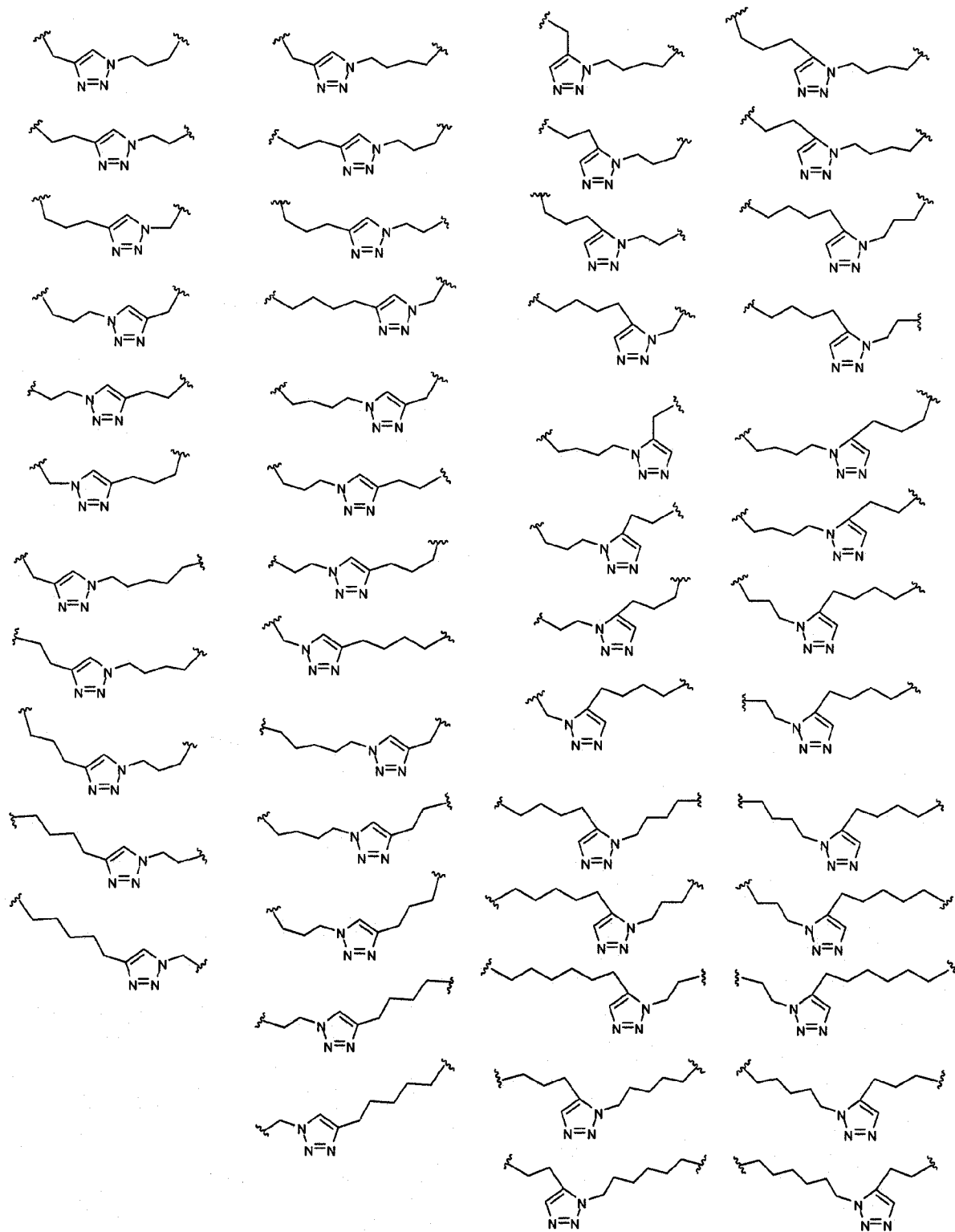
[0160] 在某些实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构, 且 R_8 是 -H, 从而允许螺旋内的氢键键合。在某些实施方式中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个例子中, B 是 α , α -二取代的氨基酸。例如, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其他实施方式中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



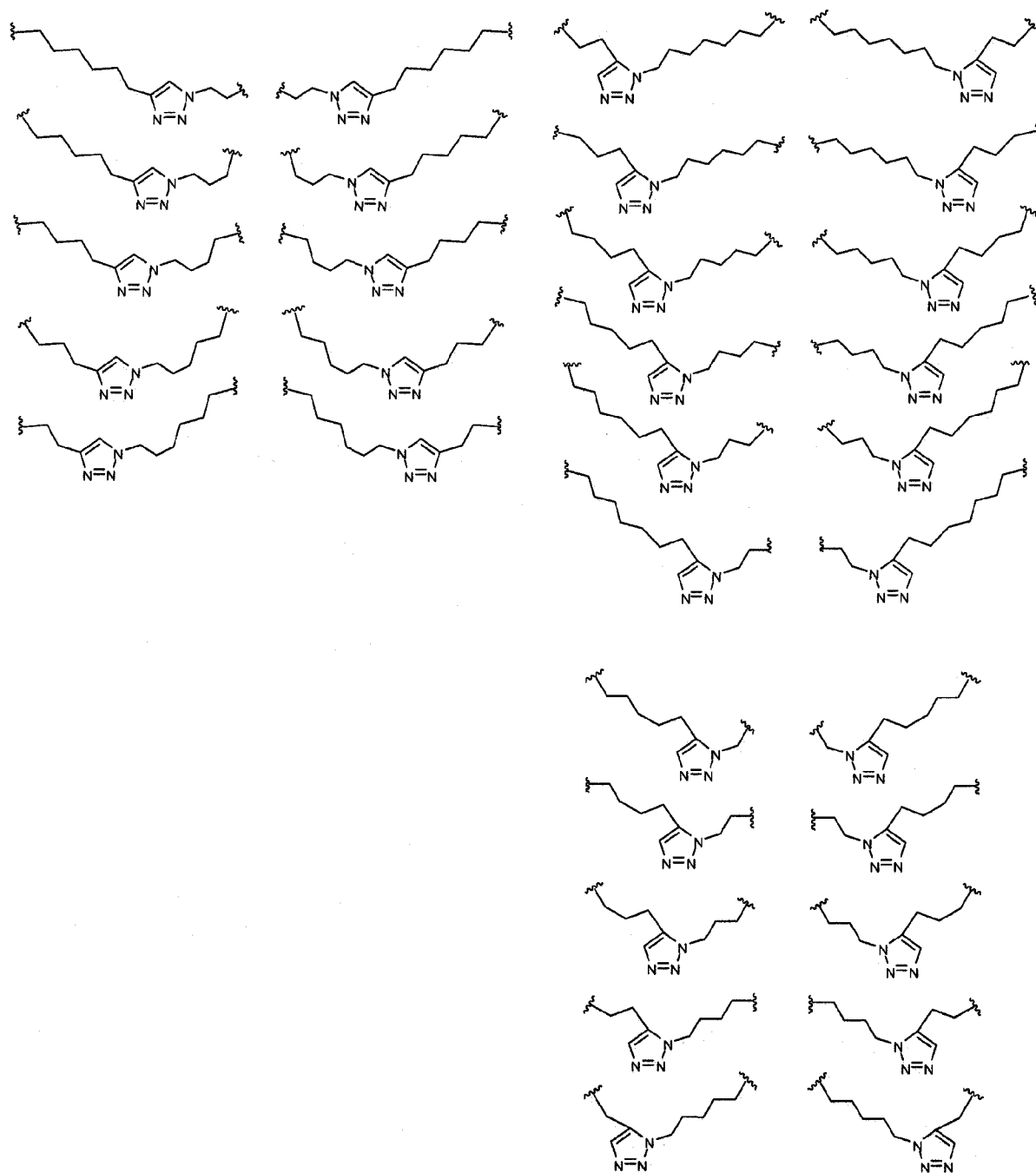
[0161] 在其他实施方式中, 选择如从第一 C α 到第二 C α 测量的形成大环的连接体 L 的长度以稳定希望的二级肽结构, 如由拟肽大环化合物的残基 (包括但不是必须限于第一 C α 和第二 C α 之间的残基) 形成的 α -螺旋。

[0162] 形成大环的连接体 L 的示例性实施方式如下所示。

[0163]

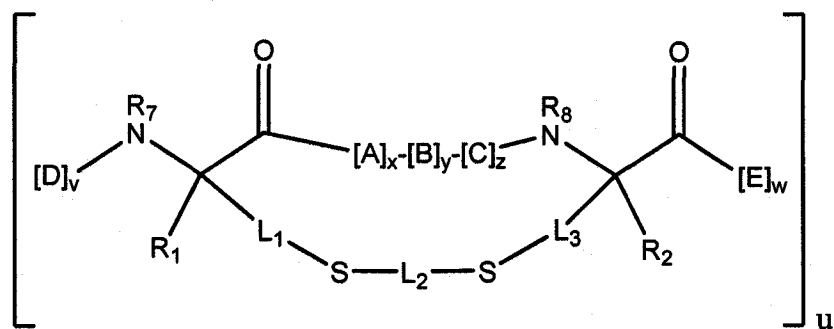


[0164]



[0165] 在其他实施方式中,本发明提供了式(III)的拟肽大环化合物:

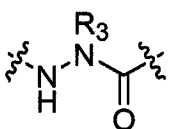
[0166]



[0167] 式(III)

[0168] 其中：

[0169] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸；

[0170] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、 $[-NH-L_4-CO-]$ 、
 $[-NH-L_4-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_4-]$ ；

[0171] 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；

[0172] 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 取代的；

[0173] 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 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，各自是未取代的或被 R_5 取代的；

[0174] K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

[0175] 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；

[0176] 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；

[0177] 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；

[0178] 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；

[0179] 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；

[0180] v 和 w 独立地是 1-1000 的整数；

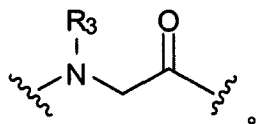
[0181] u、x、y 和 z 独立地是 0-10 的整数；和

[0182] n 是 1-5 的整数。

[0183] 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。在其他实施方式中， R_1 和 R_2 是甲基。

[0184] 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。

[0185] 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。在其他实施方式中，A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



[0186] 在其他实施方式中,选择如从第一 C α 到第二 C α 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(包括但不限于第一 C α 和第二 C α 之间的残基)形成的 α -螺旋。

[0187] 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 是卤素如 I、Br 或 Cl。

[0188] 在其他实施方式中,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,使拟肽大环化合物脂质化 (lipidating) 或 PEG 化 (PEGylating) 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。

[0189] 在其他实施方式中,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。

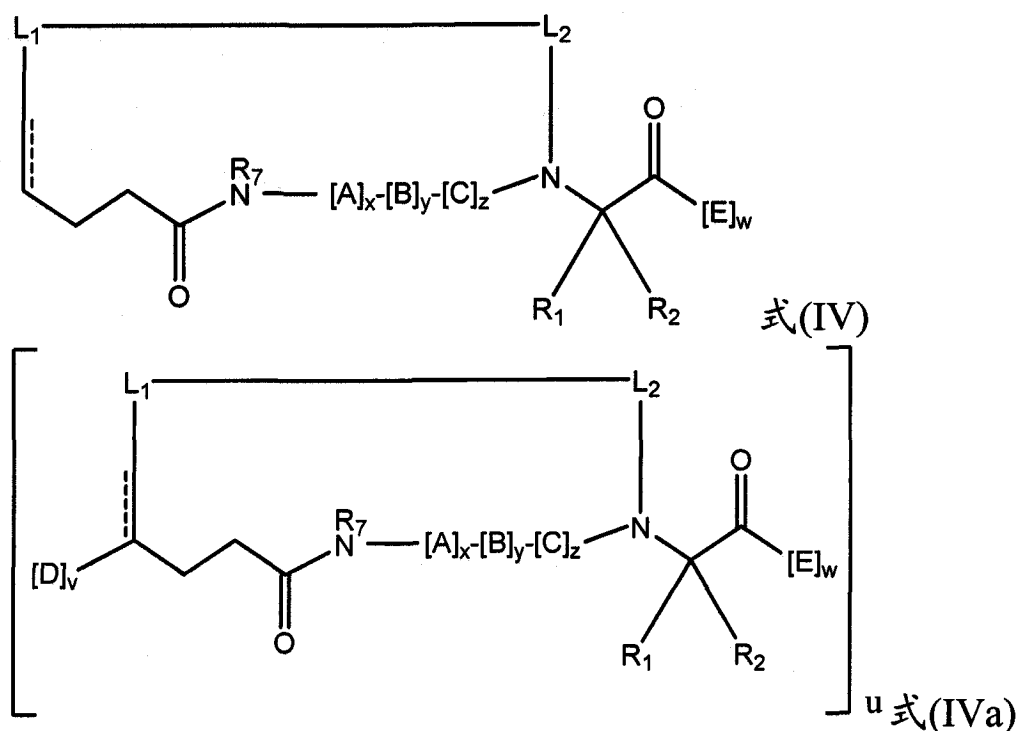
[0190] 在本发明的拟肽大环化合物中,本文所述的任何形成大环的连接体可以与表 1-4 所示的任何序列任意组合使用,也可以与本文所述的任何 R- 取代基任意组合使用。

[0191] 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 包含一个或多个 α -螺旋。一般地说, α -螺旋包含 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。在特定的实施方式中, α -螺旋包括 1 个圈、2 个圈、3 个圈、4 个圈或 5 个圈。在某些实施方式中,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 α 到第二 C α 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 α -螺旋的每圈大约 **5 Å-9 Å**,或 α -螺旋每圈大约 **6 Å-8 Å**。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。

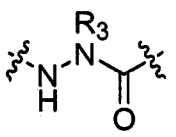
[0192] 在其他实施方式中, 本发明提供了式 (IV) 或 (IVa) 的拟肽大环化合物:

[0193]



[0194] 其中:

[0195] A、C、D 和 E 各自独立地是天然或非天然的氨基酸;

[0196] B 是天然或非天然的氨基酸、氨基酸类似物、、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

[0197] 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;

[0198] 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;

[0199] L 是式 $-L_1-L_2-$ 的形成大环的连接体;

[0200] 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 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 各自任选地被 R_5 取代;

[0201] 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;

[0202] 各个 K 是 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

[0203] 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;

[0204] 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;

[0205] 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;

[0206] v 和 w 独立地是 1-1000 的整数;

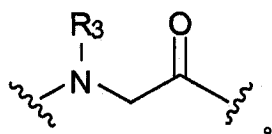
[0207] u、x、y 和 z 独立地是 0-10 的整数; 和

[0208] n 是 1-5 的整数。

[0209] 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。在其他实施方式中, R_1 和 R_2 是甲基。

[0210] 在本发明的某些实施方式中, $x+y+z$ 至少是 1。在本发明的某些实施方式中, $x+y+z$ 至少是 2。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。

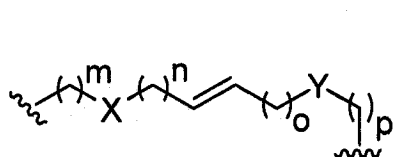
[0211] 在某些实施方式中, 本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构, 且 R_8 是 -H, 从而允许螺旋内的氢键键合。在某些实施方式中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个例子中, B 是 α , α -二取代的氨基酸。例如, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其他的实施方式中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



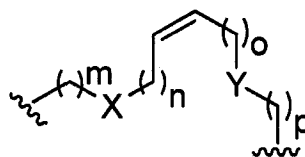
[0212] 在其他实施方式中, 选择如从第一 C α 到第二 C α 测量的形成大环的连接体 L 的长度以稳定希望的二级肽结构, 如由拟肽大环化合物的残基 (包括但不是必须限于第一 C α 和第二 C α 之间的残基) 形成的 α -螺旋。

[0213] 形成大环的连接体 $-L_1-L_2-$ 的示例性的实施方式如下所示。

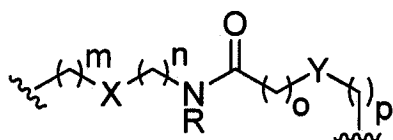
[0214]



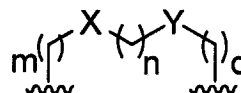
其中 X, Y = -CH₂-, O, S, 或 NH
m, n, o, p = 0-10



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

[0215] 拟肽大环化合物的制备

[0216] 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连接体的残基置换。

[0217] 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) ;美国专利 7, 192, 713 和 PCT 申请 WO 2008/121767 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。例如, “S5- 烯氨基酸”是 (S)-α - (2' - 戊烯基) 丙氨酸, 和 “S8- 烯氨基酸”是 (S)-α - (2' - 辛烯基) 丙氨酸。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。

[0218] 在其他实施方式中, 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。

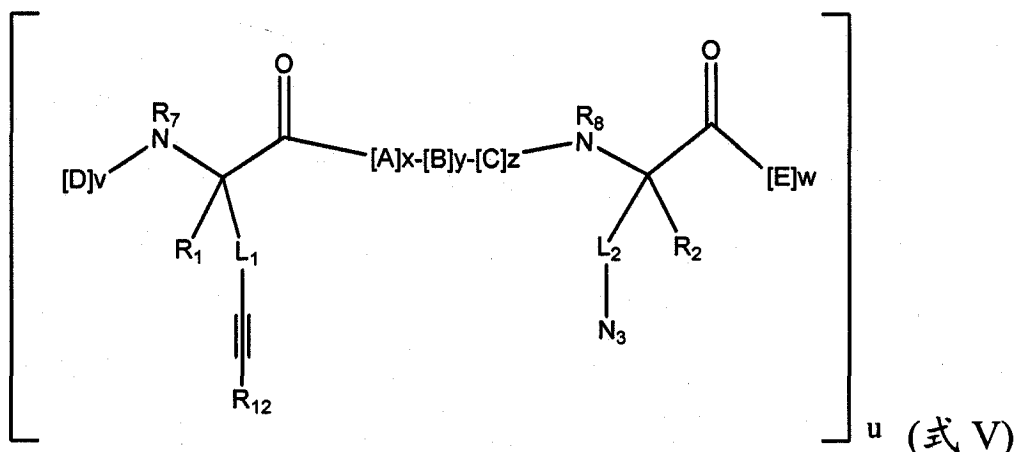
[0219] 在某些实施方式中, 这些拟肽大环化合物的合成包括多步骤的过程, 其特征在于: 合成含有叠氮部分和炔部分的拟肽前体; 接着将拟肽前体与大环化试剂接触以产生三唑连接的拟肽大环化合物。这类方法例如在 2008 年 2 月 25 日提交的美国申请 12/037, 041 中有描述。例如, 大环化合物或大环化合物前体通过溶液相或固相方法合成, 且可以包含天然存在的和非天然存在的氨基酸。参见, 例如, Hunt, Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids 中的 “The Non-Protein Amino Acids”, 由 G. C. Barrett 编著, Chapman and Hall, 1985。

[0220] 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

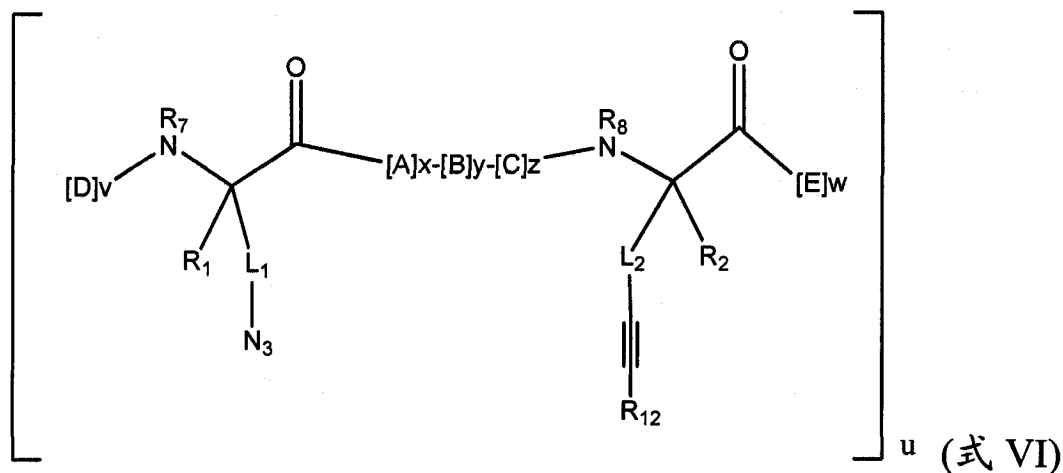
类似物。在另一种实施方式中,炔部分是L-炔丙基甘氨酸。在再其他的实施方式中,炔部分是选自以下的氨基酸:L-炔丙基甘氨酸、D-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸和(R)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸。

[0221] 在某些实施方式中,本发明提供~~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:

[0222]



[0223]



[0224] 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 如上文对于式 (II) 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。

[0225] 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。

[0226] 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。在其他实施方式中, R_1 和 R_2 是甲基。大环化试剂可以是 Cu 试剂或 Ru 试剂。

[0227] 在某些实施方式中,在接触步骤之前纯化拟肽前体。在其他实施方式中,在接触步骤之后纯化拟肽大环化合物。在再其他的实施方式中,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。

[0228] 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。

[0229] 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。

[0230] 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。

[0231] 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 、 $ClCH_2CH_2Cl$ 或其混合物。溶剂可以是有利于螺旋形成的溶剂。

[0232] 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。用于合成本文所述的化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和去保护)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。

[0233] 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 化学保护作用的胺的自动化 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。

[0234] 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)。经由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。

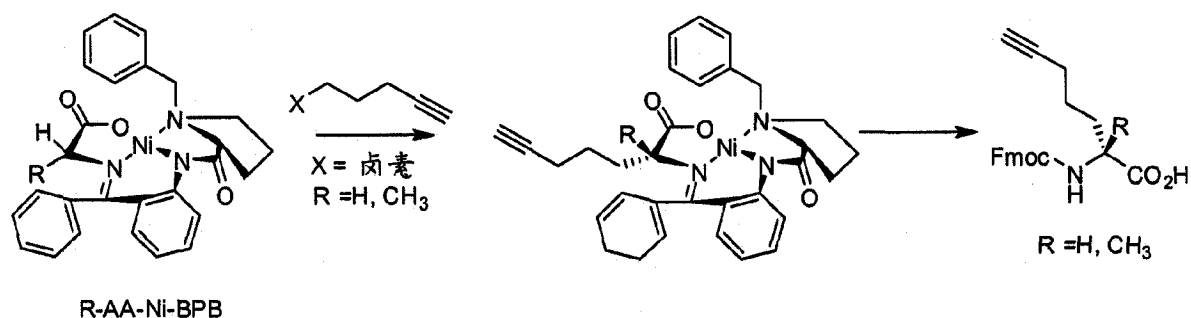
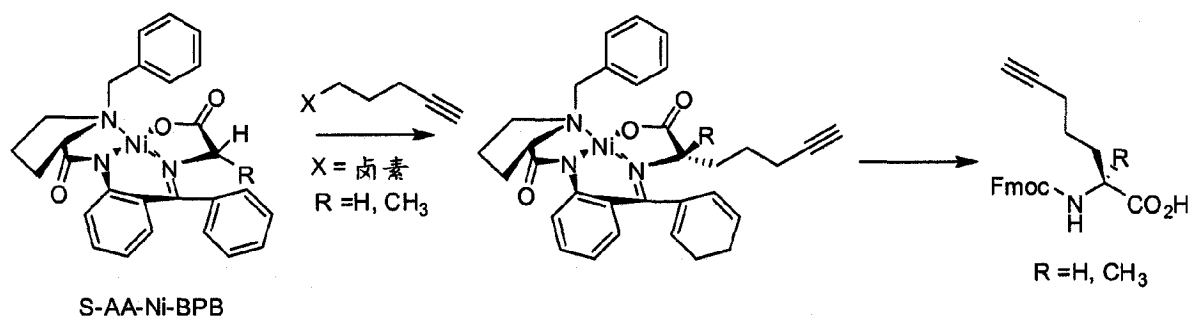
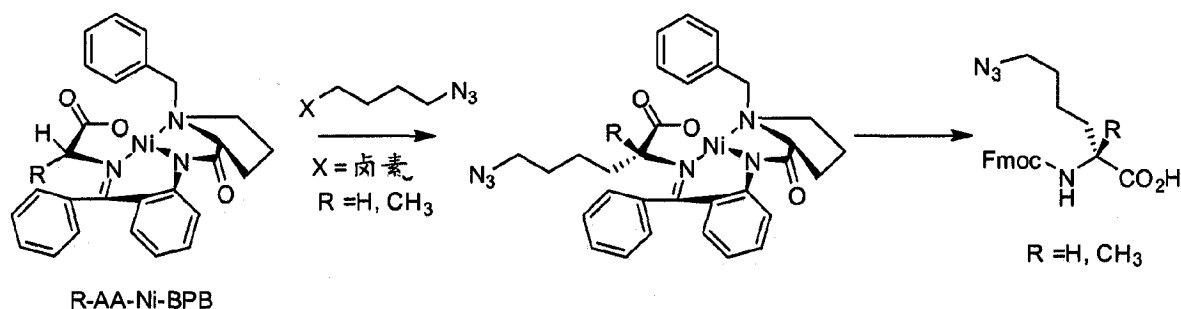
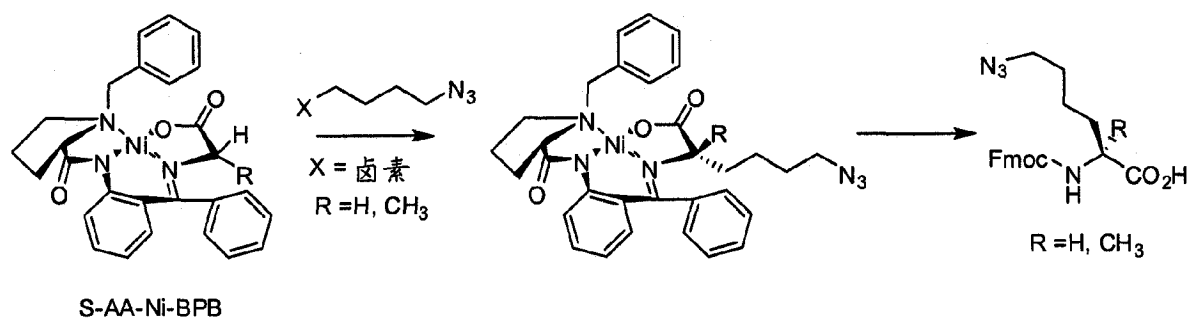
[0235] 例如,通过使用天然的化学连接结合单个的合成肽产生较长的拟肽前体。或者,通过公知的重组 DNA 和蛋白质表达技术生物合成较长的合成肽。公知的标准手册中提供了这些技术的详细方案。为了构建编码本发明的拟肽前体的基因,逆向翻译氨基酸序列以获得编码该氨基酸序列的核酸序列,优选使用对于将表达该基因的生物体优化的密码子。接下来,通常通过合成编码肽的寡核苷酸和任何调节元件(如果必要的话)制备合成的基因。将合成的基因插入合适的克隆载体,并转染到宿主细胞中。然后在适用于选择的表达系统和宿主的合适条件下表达该肽。通过标准方法纯化并表征该肽。

[0236] 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。

[0237] 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。

[0238] 合成方案 1:

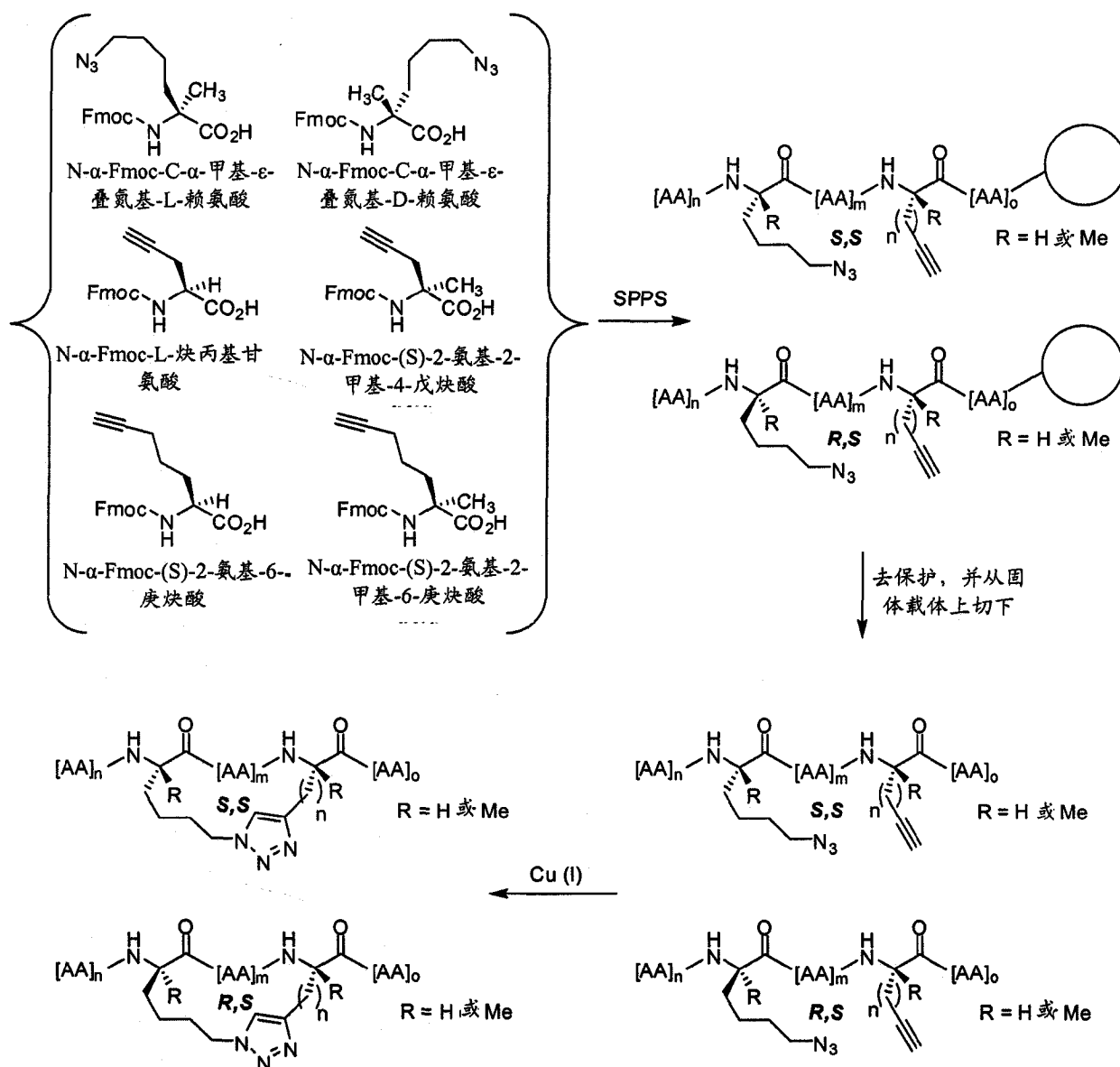
[0239]



[0240] 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'-苄基脯氨酸基)氨基]苯甲酮(BPB)衍生的席夫碱和氨基酸(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光学异构富集的(enantiomerically enriched)本发明的化合物。如需要,产生的化合物可以进行保护以用于肽合成。

[0241] 合成方案2:

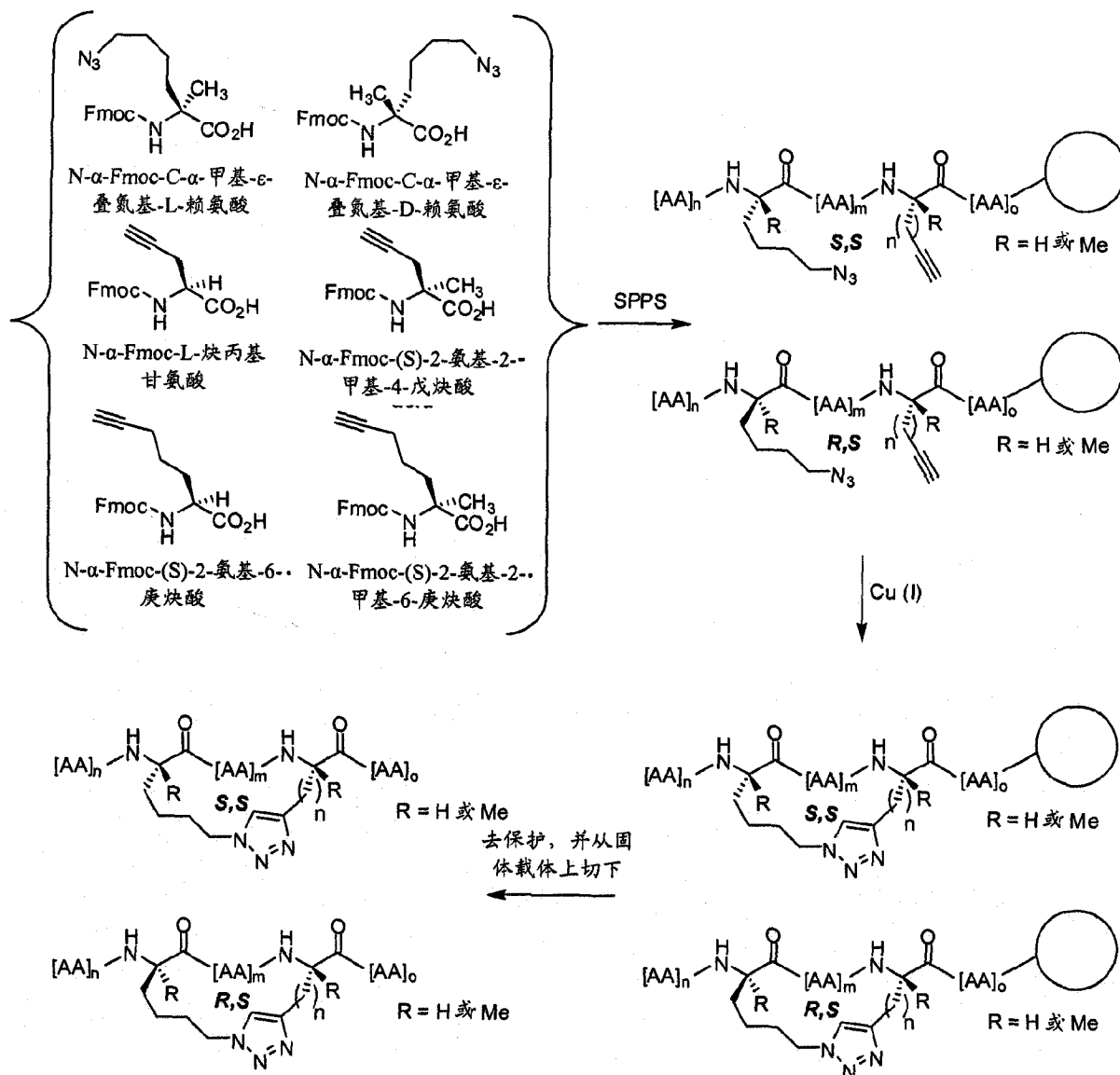
[0242]



[0243] 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 ;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)。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 H₂O、THF、CH₃CN、DMF、DIPEA、tBuOH 或其混合物的溶剂中进行大环化步骤。在另一种实施方式中，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。

[0244] 合成方案 3:

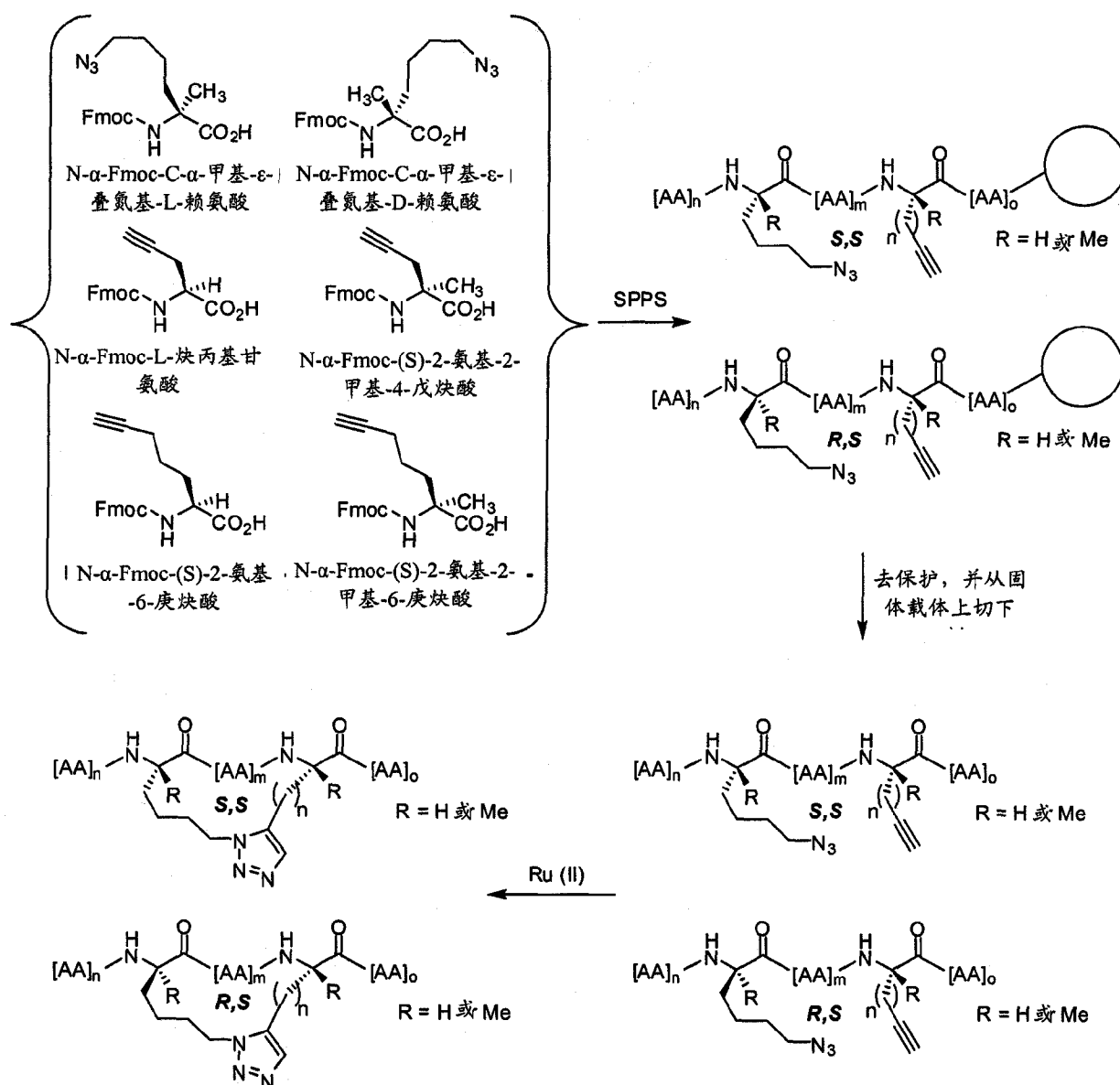
[0245]



[0246] 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 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-L-炔丙基甘氨酸}$ 及氨基酸 $(S)\text{-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸}$ 、 $(S)\text{-2-氨基-6-庚炔酸}$ 、 $(S)\text{-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸}$ 、 $N\text{-甲基-}\epsilon\text{-叠氮基-L-赖氨酸}$ 和 $N\text{-甲基-}\epsilon\text{-叠氮基-D-赖氨酸}$ 的 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc}$ 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; Tornøe 等人 (2002), J. Org. Chem. 67:3057-3064; Deiters 等人 (2003), J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783; Punna 等人 (2005), Angew. Chem. Int. Ed. 44:2215-2220)。然后通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 将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 、 $ClCH_2CH_2Cl$ 、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。

[0247] 合成方案 4:

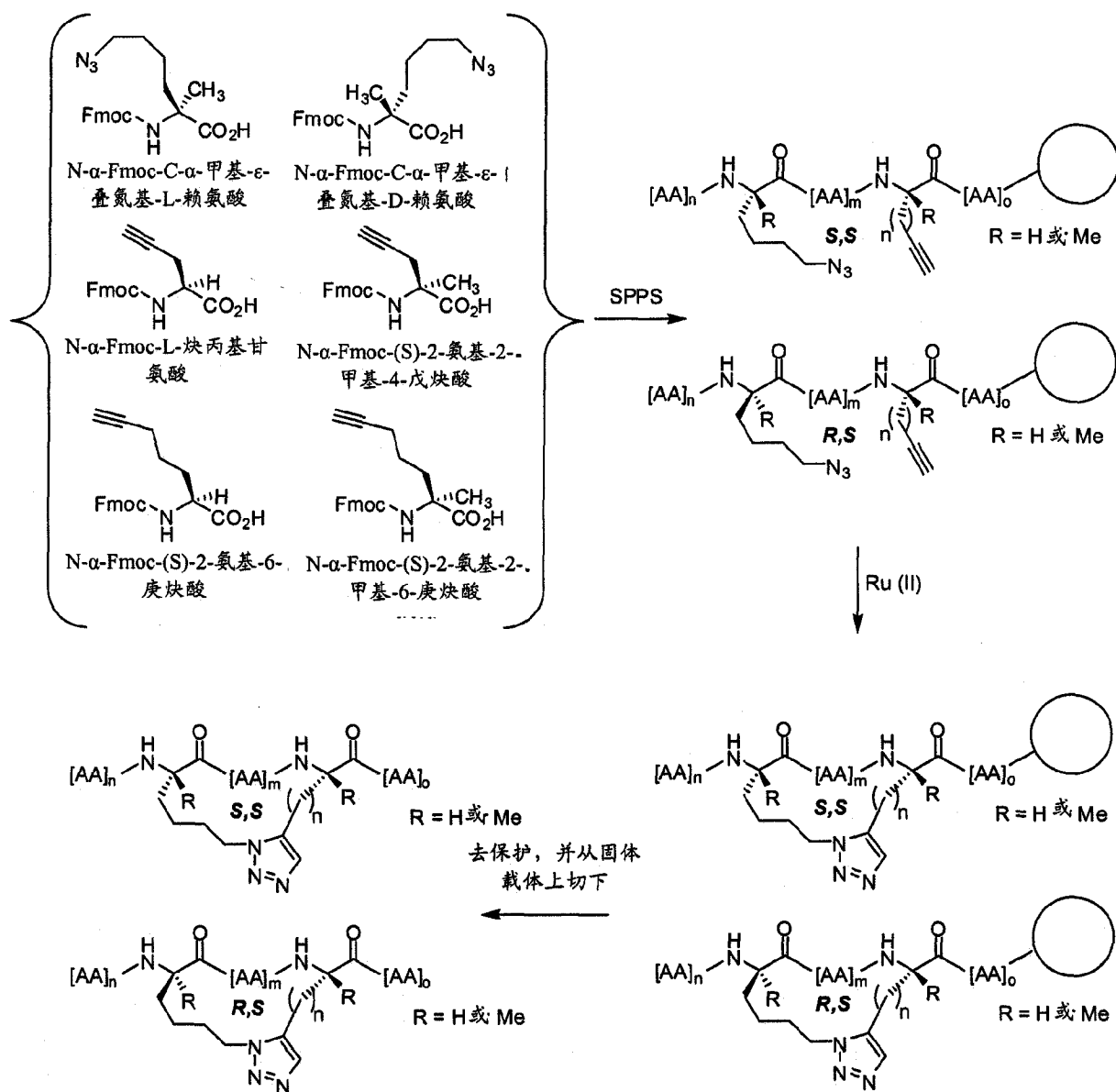
[0248]



[0249] 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。

[0250] 合成方案 5:

[0251]



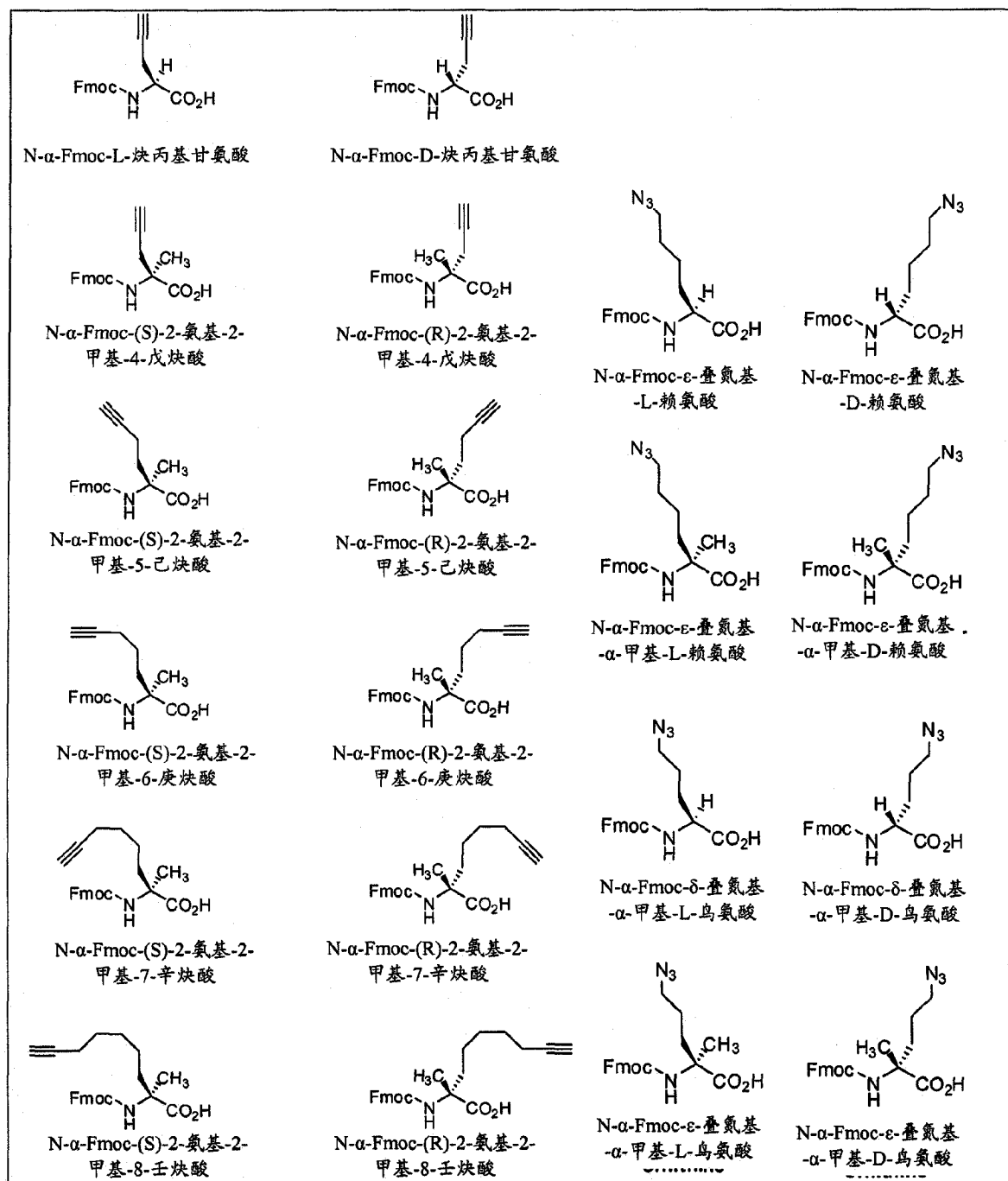
[0252] 在如合成方案 5 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中, 拟肽前体包含叠氮部分和炔部分, 且使用可商购的氨基酸 N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的 N- α -Fmoc 保护的形式通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成。拟肽前体作为粗制混合物与在树脂上的大环化试剂 (如 Ru(II) 试剂) 反应。例如, 该试剂可以是 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 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。

[0253] 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, 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 2 显示一些可用于制备本发明的拟肽大环化合物的氨基酸。

[0254] 表 2

[0255]



[0256] 表 2 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。

[0257] 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

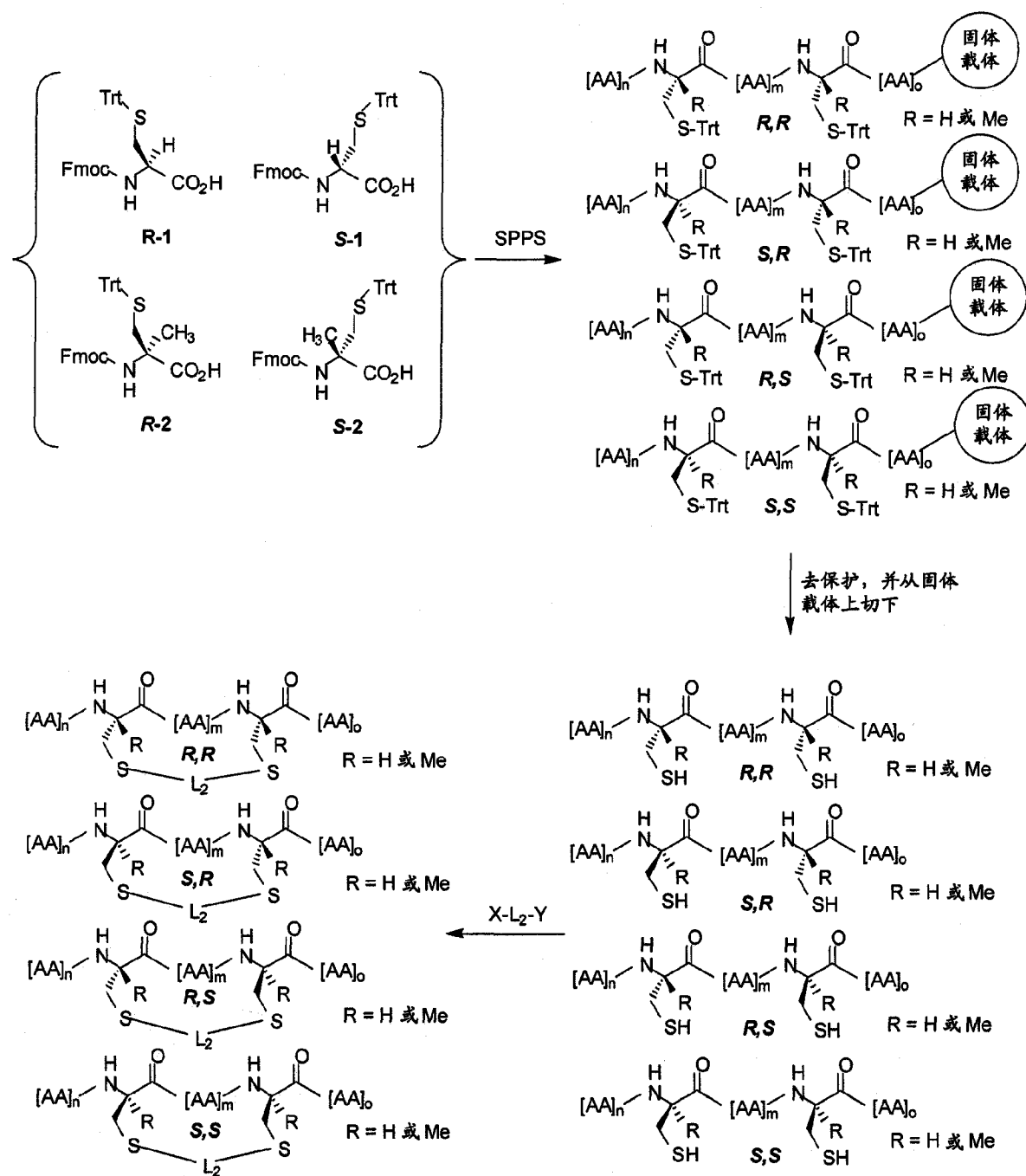
是 L- 构型。在某些实施方式中,拟肽中包含的某些氨基酸和氨基酸类似物是 D- 构型,而某些氨基酸和氨基酸类似物是 L- 构型。在某些实施方式中,氨基酸类似物是 α , α -二取代的,如 α -甲基-L-炔丙基甘氨酸、 α -甲基-D-炔丙基甘氨酸、 ϵ -叠氨基- α -甲基-L-赖氨酸和 ϵ -叠氨基- α -甲基-D-赖氨酸。在某些实施方式中,氨基酸类似物是 N-烷基化的,例如,N-甲基-L-炔丙基甘氨酸、N-甲基-D-炔丙基甘氨酸、N-甲基- ϵ -叠氨基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氨基-D-赖氨酸。

[0258] 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。

[0259] 在其他实施方式中,合成式 III 的拟肽大环化合物。这类方法例如在 2007 年 12 月 17 日提交的美国申请 11/957,325 中有描述。下面的合成方案描述这类化合物的制备。为了简化图表,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。

[0260] 合成方案 6:

[0261]

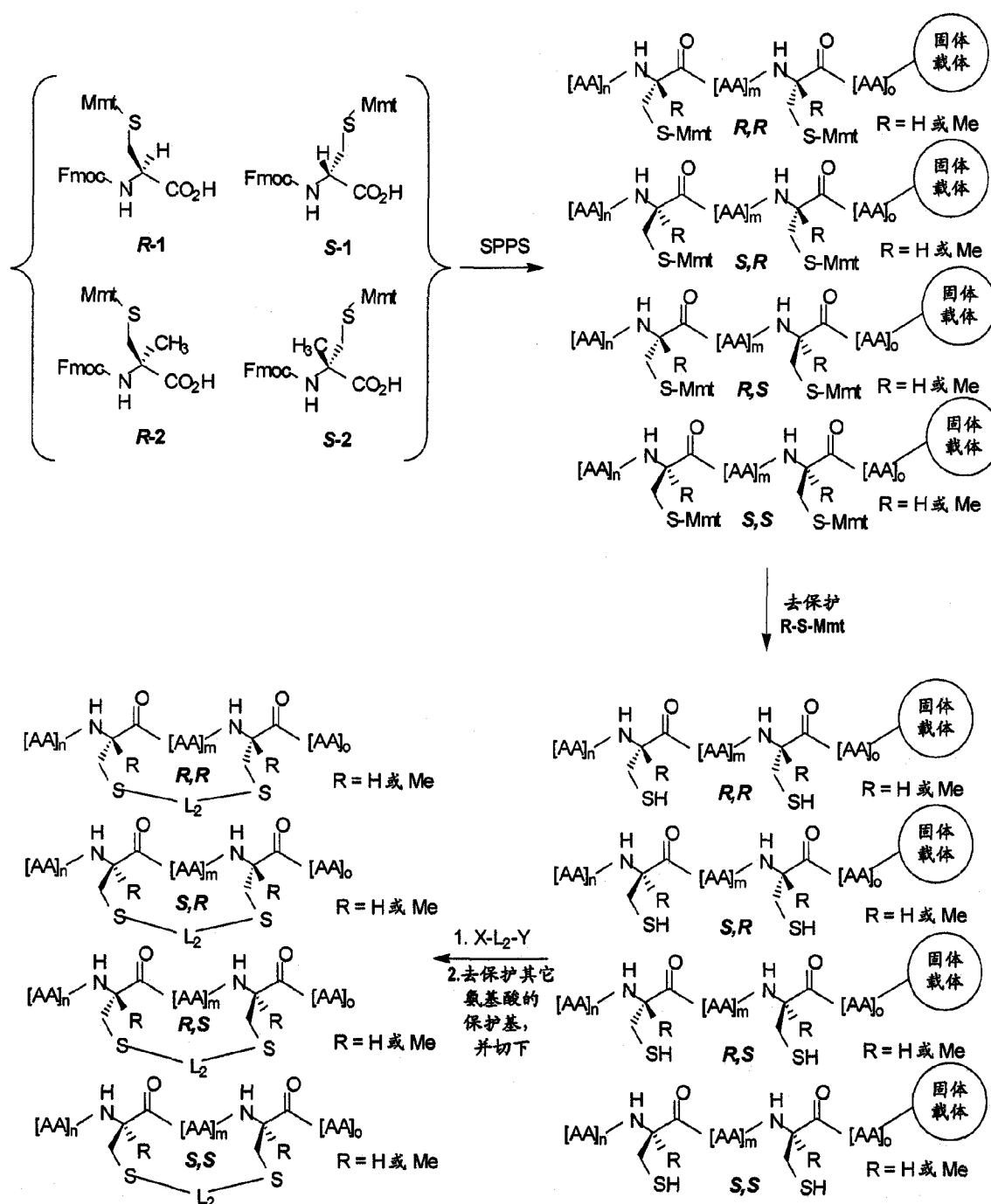


[0262] 在合成方案 6 中, 拟肽前体含有 2 个 -SH 部分, 而且使用可商购的 N- α -Fmoc 氨基酸如 N- α -Fmoc-S-三苯甲基-L-半胱氨酸或 N- α -Fmoc-S-三苯甲基-D-半胱氨酸通过固相肽合成法 (SPPS) 来合成。通过已知方法 (Seebach 等人 (1996), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:2708-2748 以及其中的参考文献) 产生 D-半胱氨酸或 L-半胱氨酸的 α -甲基化形式, 然后通过已知方法 ("Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins", Oxford 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。前体拟肽作为粗制混合物进行反应, 或者在有机溶液或水性溶液在与 X-L₂-Y 反应前进行纯化。在某些实施方式中, 在稀释条件 (即, 0.15 mmol/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 NH₃

中 (Mosberg 等人 (1985), J. Am. Chem. Soc. 107 :2986-2987 ;Szewczuk 等人 (1992), Int. J. Peptide Protein Res. 40 :233-242)、 NH_3/MeOH 中或 NH_3/DMF 中 (Or 等人 (1991), J. Org. Chem. 56 :3146-3149) 进行烷基化反应。在其他实施方式中,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。

[0263] 合成方案 7:

[0264]

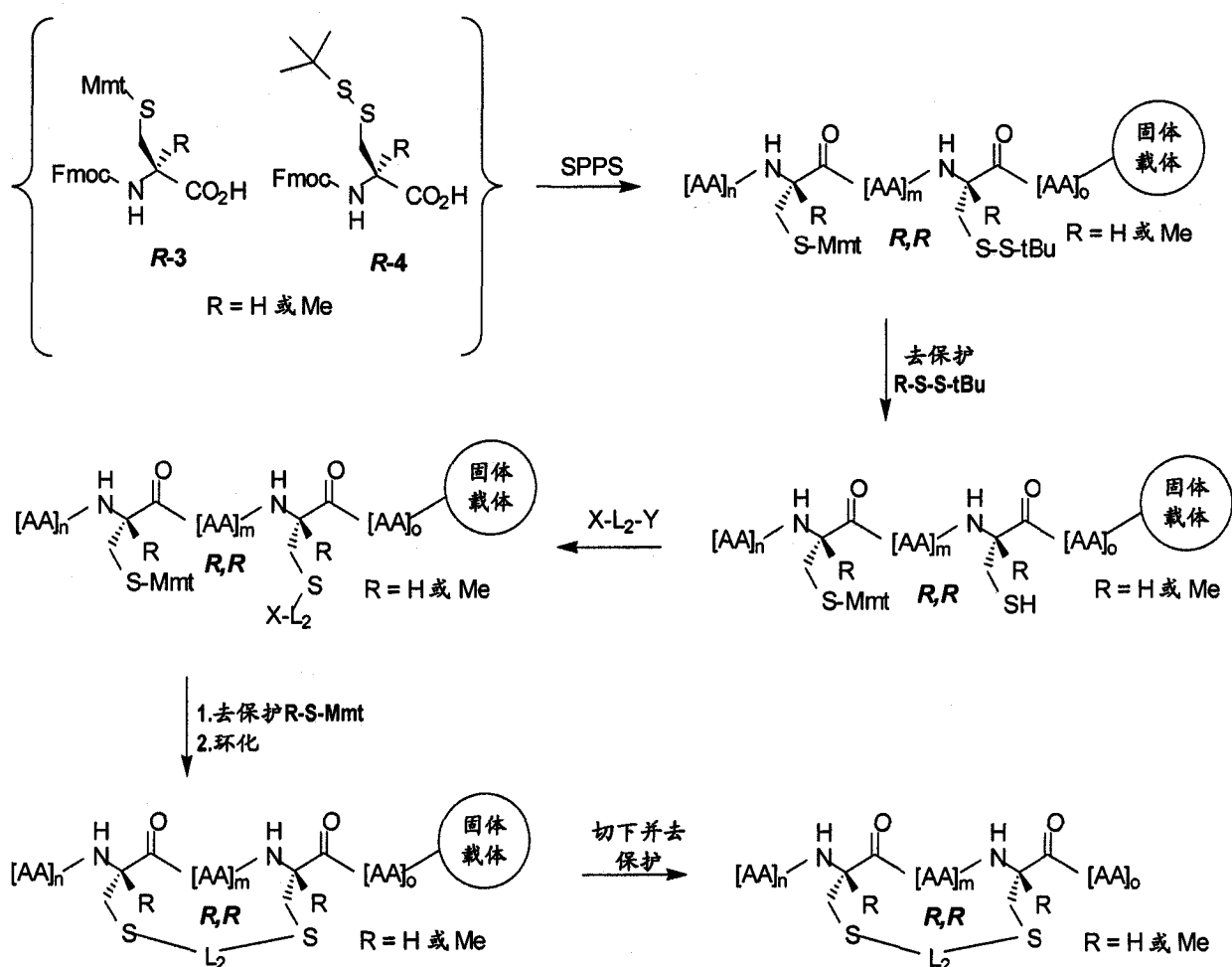


[0265] 在合成方案 7 中,前体拟肽含有 2 个或多个 -SH 部分,其中的 2 个特别地进行保护以允许其选择性地保护并随后烷基化以形成大环。使用可商购的 N- α -Fmoc 氨基酸如

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DCM中的1% TFA)选择性地切下拟肽前体的Mmt保护基团。然后前体拟肽在树脂上与有机溶液中的X-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(Mosberg等人(1985), *J. Am. Chem. Soc.* 107:2986-2987; Szewczuk等人(1992), *Int. J. Peptide Protein Res.* 40:233-242)、NH₃/MeOH中或NH₃/DMF(Or等人(1991), *J. Org. Chem.* 56:3146-3149)中进行烷基化反应。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。

[0266] 合成方案 8:

[0267]

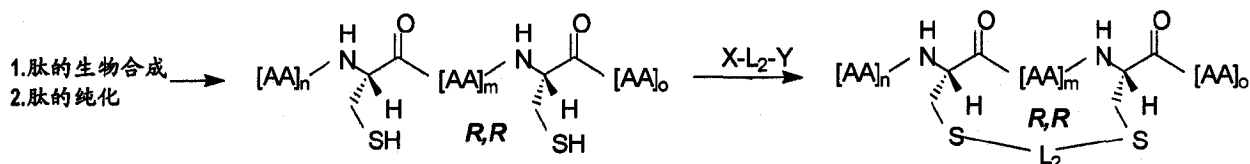


[0268] 在合成方案 8 中,拟肽前体含有 2 个或多个-SH 部分,其中的 2 个进行特别保护以允许其选择性地保护和随后烷基化以形成大环。使用可商购的 N- α -Fmoc 氨基酸如 N- α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基-L-半胱氨酸、N- α -Fmoc-S-对甲氧基三苯甲基-D-半

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。

[0269] 合成方案 9:

[0270]



[0271] 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。前体拟肽作为粗制混合物进行反应, 或者在有机溶液或水性溶液在与 X-L₂-Y 反应前进行纯化。在某些实施方式中, 在稀释条件 (即, 0.15 mmol/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 (Mosberg 等人 (1985), *J. Am. Chem. Soc.* 107 :2986-2987; Szewczuk 等人 (1992), *Int. J. Peptide Protein Res.* 40 :233-242)、NH₃/MeOH 中或 NH₃/DMF 中 (Or 等人 (1991), *J. Org. Chem.* 56 :3146-3149) 进行烷基化反应。在其他实施方式中, 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。

[0272] 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。

[0273] 表 3: 能够与巯基反应的反应性基团和产生的连接的例子

[0274]

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

[0275] 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应用于式 (III) 的拟肽大环化合物的合成中。任何适合用来合成稳定的含双巯基的拟肽大环化合物的合成方法的氨基酸或氨基酸类似物都可以用于本发明中。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是有用的。例如，半胱氨酸在氨基酸的 α -碳和氨基酸侧链的末端-SH 之间含有一个亚甲基单元。本发明也包括使用在 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。

[0276] 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、提高的代谢稳定性和 / 或提高的细胞渗透性。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 $-L_2-$ 使含有双巯基的拟肽前体双烷基化的化学特性。如上定义，连接体 $-L_2-$ 包括亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基或亚杂环芳基或 $-R_4-K-R_4-$ ，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 的杂原子替代。

[0277] 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

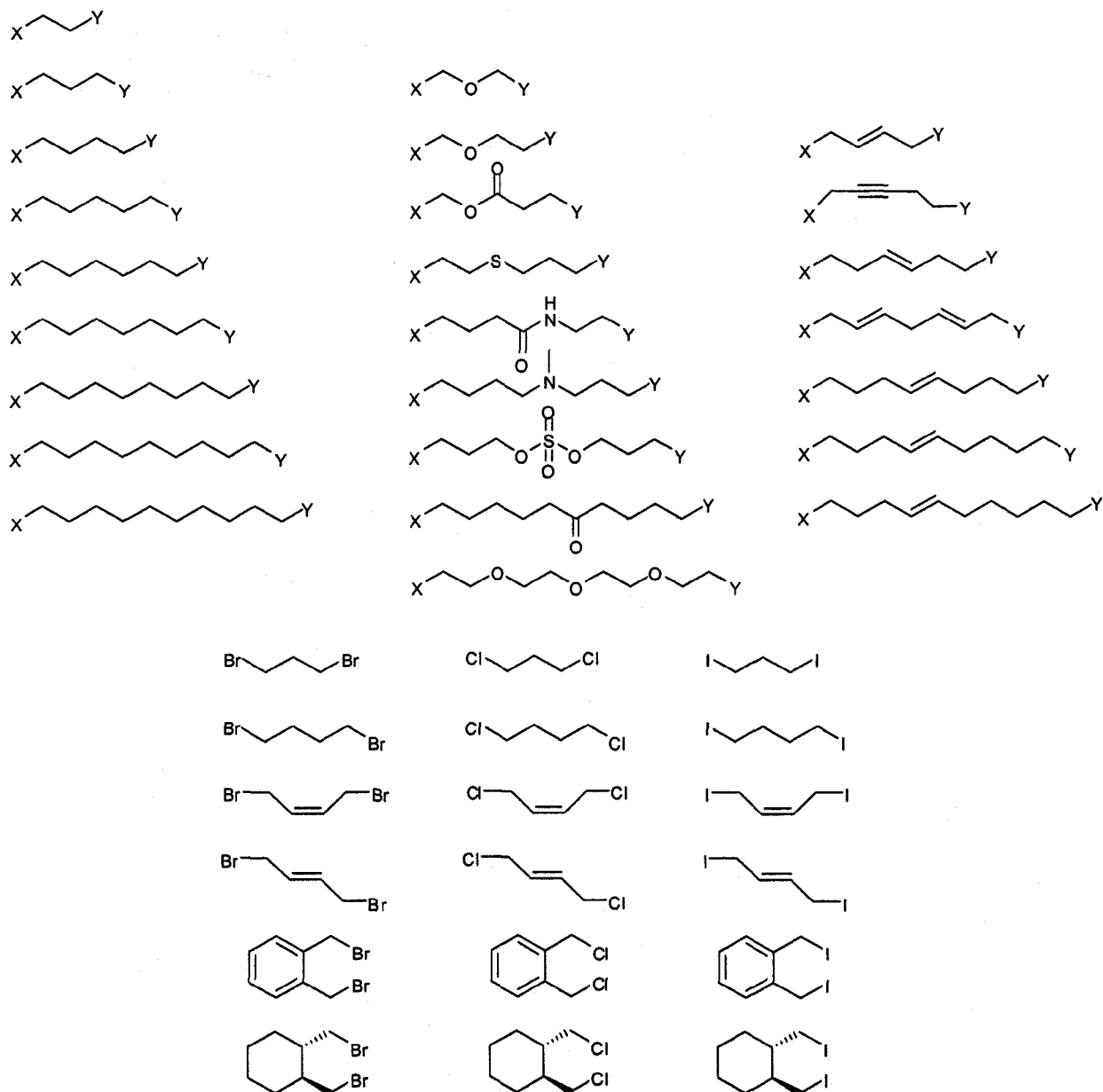
使用的氨基酸类似物,那么 L_2 在长度上减少等同于大约两个亚甲基单元的长度,以抵消 L_1 和 L_3 的长度增加。

[0278] 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。

[0279] 表 4 显示 $X-L_2-Y$ 基团的另外的实施方式。

[0280] 表 4. 本发明的示例性的 $X-L_2-Y$ 基团

[0281]



[0282] 例如,该表中的 X 和 Y 各自独立地是 $Cl-$ 、 $Br-$ 或 $I-$ 。

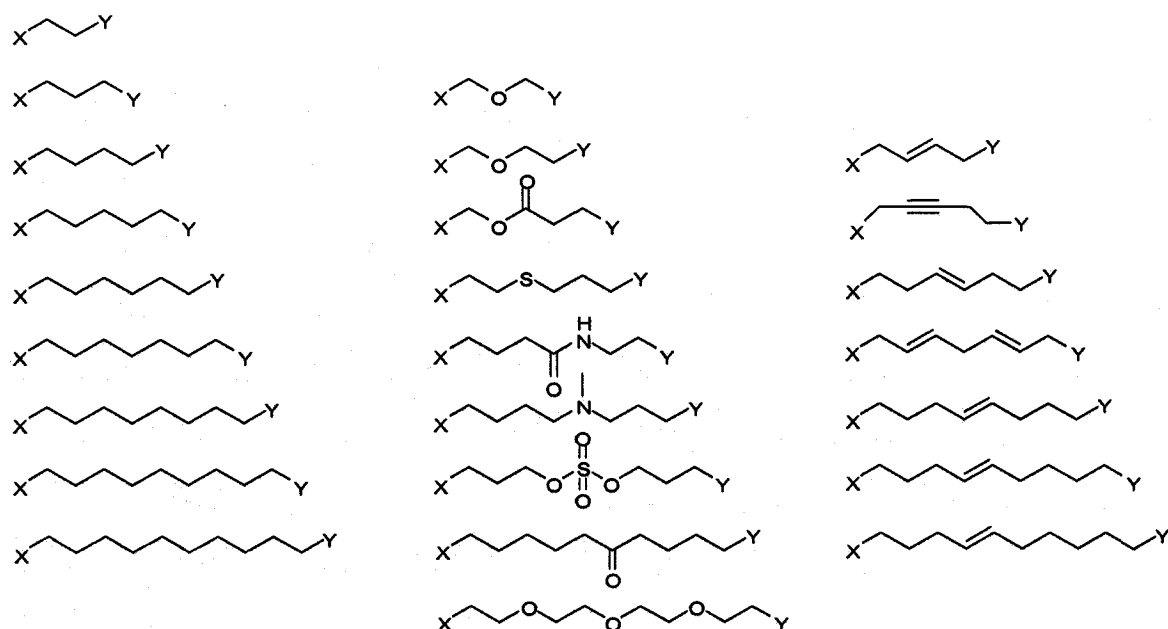
[0283] 预计适用于进行本发明的形成拟肽大环化合物的另外的方法包括以下文献中公开的方法:Mustapa, M. Firouz Mohd 等人, J. Org. Chem(2003), 68, 第 8193-8198 页;Yang, Bin 等人 Bioorg Med. Chem. Lett. (2004), 14, 第 1403-1406 页;美国专利 5,364,851;美国专利 5,446,128;美国专利 5,824,483;美国专利 6,713,280 和美国专利 7,202,332。在这

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,其可以在交联连接体被取代的位置,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。

[0284] 在本发明的拟肽大环化合物的一些实施方式中,拟肽大环化合物包括通过非螺旋连接体连接的两个 α -螺旋拟肽大环化合物。有用的连接体包括但不限于包含肽连接体的聚合序列、聚亚烷基二醇或任何如下所示的连接体。在一个实施方式中,非螺旋连接体是聚乙二醇基团,例如,包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个单体单元的聚乙二醇。在另一实施方式中,连接体是包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个天然或非天然氨基酸的短肽序列。

[0285] 用于制备非螺旋连接体的示例性的前体化合物如下所示,其中,X 和 Y 是分别具有与待通过所述连接体连接第二拟肽大环化合物的第一拟肽大环化合物的末端羧酸或末端胺的反应性的部分。前体化合物与第一拟肽大环化合物的反应产生包含第二反应性部分的偶联物,其然后可以进一步与第二拟肽大环化合物反应以产生包含通过非螺旋连接体连接的两个 α -螺旋的拟肽大环化合物。

[0286]



[0287] 分析

[0288] 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。在一些实施方式中,本发明的拟肽大环化合物具有相对于缺乏本文所述的取代基的相应的多肽改善的生物学特性。

[0289] 测定 α -螺旋度的分析

[0290] 在溶液中,具有 α -螺旋结构域的多肽的二级结构在随机卷曲结构和 α -螺旋结构之间达到动态平衡,这通常称为“百分螺旋度”。因此,例如,未修饰的 α -螺旋结构域在溶液中主要是随机卷曲, α -螺旋含量通常低于 25%。另一方面,具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如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 μM 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。

[0291] 测定熔解温度(T_m)的分析

[0292] 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。通常, 本发明的拟肽大环化合物显示 $> 60^\circ\text{C}$ 的 T_m , 表明在水溶液中高度稳定的结构。为了分析大环形成对熔解温度的效应, 将拟肽大环化合物或未修饰的肽溶于蒸馏水中(例如, 到 50 μM 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, $1^\circ\text{C}/\text{分钟}$; 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, $4\text{--}95^\circ\text{C}$)内的变化来测定 T_m 。

[0293] 蛋白酶抗性分析

[0294] 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经受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和随后进行 HPLC 注射以根据 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($k = -1X$ 斜率)。

[0295] 体外稳定性分析

[0296] 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相应的非交联多肽(2mcg)与新鲜的小鼠、大鼠和/或人血清(2mL)一起在 37°C 下温育 0、1、2、4、8 和 24 小时。为了测定完整化合物的含量, 可以使用下面的程序: 通过将 100 μL 的血清转移到 2mL 离心管中, 接着加入 10 μL 的 50% 甲酸和 500 μL 乙腈并在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 下以 14,000RPM 离心 10 分钟来提取样品。然后将上清液转移到新的 2mL 管中, 并在 $N_2 < 10\text{psi}$ 、 37°C 下在 Turbovap 上蒸发。样品在 100 μL 的 50 : 50 乙腈 : 水中重构, 并进行 LC-MS/MS 分析。

[0297] 体外结合分析

[0298] 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。

[0299] 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来确定 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。

[0300] 鉴定肽-蛋白质相互作用的拮抗剂的体外置换分析

[0301] 为了评价拮抗肽与受体蛋白之间的相互作用的化合物的结合和亲和力,例如,使用利用源自拟肽前体序列的荧光标记的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。

[0302] 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来确定 Kd 值。

[0303] 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。

[0304] 完整细胞中的结合分析

[0305] 有可能通过免疫沉淀实验测量肽或拟肽大环化合物与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) 化合物在无血清的情况下温育 4 小时,接着进行血清置换和进一步温育 4-18 小时。然后使细胞沉淀,并在 4℃ 下、在裂解缓冲液 (50mM Tris[pH 7.6]、150mM NaCl、1% 的 CHAPS 和蛋白酶抑制剂混合物) 中温育 10 分钟。以 14,000rpm 离心提取物 15 分钟,收集上清液,并与 10 μl 山羊抗-FITC 抗体一起温育 2 小时,在 4℃ 下旋转,接着在 4℃ 下进一步与蛋白 A/G Sepharose (50 μl 的 50% 微球浆 (bead slurry)) 温育 2 小时。快速离心之后,在含有增加的盐浓度 (例如,150、300、500mM) 的裂解缓冲液中洗涤沉淀物。随后在加入含有 SDS 的样品缓冲液和煮沸之前,以 150mM NaCl 再平衡微球。离心之后,使用 4% -12% 梯度的 Bis-Tris 凝胶任选地对上清液进行电泳,接着转移到 Immobilon-P 膜上。封闭之后,任选地将印迹与检测 FITC 的抗体一起温育,也与一种或多种检测与拟肽大环化合物结合的蛋白质的抗体一起温育。

[0306] 细胞渗透性分析

[0307] 相比于相应的非交联的大环化合物,拟肽大环化合物例如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的大环化合物至少 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的大环化合物的细胞渗透性,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的大环化合物 ($10\ \mu\text{M}$) 一起温育 4 小时,用培养基洗涤 2 次,并在 37°C 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。

[0308] 细胞效力分析

[0309] 例如,在基于细胞的杀伤分析中,使用多种致癌和非致癌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 ($0.5\text{--}50\ \mu\text{M}$) 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 $\text{EC}_{50} < 10\ \mu\text{M}$ 杀死细胞的化合物。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是否通过激活凋亡机制杀死细胞。例如,使用 Cell Titer-glo 分析来确定随细胞内 ATP 浓度变化的细胞活力。

[0310] 体内稳定性分析

[0311] 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、PO 或吸入途径以 $0.1\text{--}50\text{mg/kg}$ 的浓度施用化合物,并在注射后 $0'$ 、 $5'$ 、 $15'$ 、 $30'$ 、1 小时、4 小时、8 小时和 24 小时抽取血样。然后如上通过 LC-MS/MS 测量 $25\ \mu\text{L}$ 新鲜血清中的完整化合物的含量。

[0312] 动物模型中的体内效力

[0313] 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、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 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 RS4 ;11 细胞 (从急性淋巴细胞性白血病患者的骨髓建立)。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 $0.1\text{mg/kg}\text{--}50\text{mg/kg}$ 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 10 天, 14–16 的生物发光范围)。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。

[0314] 临床试验

[0315] 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或已知的抗癌药物。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。

[0316] 药物组合物和给药途径

[0317] 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。当向哺乳动物施用时，尤其有利的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。

[0318] 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。

[0319] 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衍生的盐。合适的酸式盐的例子包括乙酸盐、己二酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、棕榈酸盐（palmoate）、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和十一酸盐（undecanoate）。由合适的碱衍生的盐包括碱金属盐（例如，钠盐）、碱土金属盐（例如，镁盐）、铵盐和 N-(烷基)₄⁺ 盐。

[0320] 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，最新版本的 Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA。

[0321] 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。

[0322] 合适的固体赋形剂是碳水化合物或蛋白质填料，包括但不限于：糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；来自玉米、小麦、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）。

[0323] 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。

[0324] 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。

[0325] 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,在单一组合中与本发明的化合物混合在一起。

[0326] 使用方法

[0327] 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 HIF-1 α /CBP/p300 系统中,基于 HIF-1 α 的标记的拟肽大环化合物与竞争结合 CBP/p300 的小分子一起用于 CBP/p300 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 HIF-1 α /CBP/p300 系统特异性的药物候选物。可以使用本文公开的任何拟肽大环化合物及其结合伴侣进行这种结合研究。

[0328] 本发明进一步提供了对于拟肽大环化合物的抗体的生成。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拟肽大环化合物相关的前体肽诸如 HIF-1 α 。例如,这样的抗体破坏天然的蛋白质-蛋白质相互作用,例如 HIF-1 α 和 CBP/p300 之间的结合。

[0329] 在其他方面,本发明提供了治疗处于患与分子(包括 HIF 家族蛋白质,如 HIF-1 α) 的异常(例如,不足或过量)表达或活性有关的疾病的危险中(或对所述疾病敏感)或患有所述疾病的受试者的预防方法和治疗方法。

[0330] 在另一实施方式中,疾病是由(至少部分地)HIF1- α 的异常水平(例如,过度表达或不足表达)引起,或由显示异常活性的 HIF1- α 的存在引起。这样,由源自 HIF1- α 的拟肽大环化合物导致的 HIF1- α 的水平和/或活性的降低或者 HIF1- α 的水平和/或活性的提高用来例如缓解或减轻疾病的负面症状。

[0331] 另一方面,本发明提供了通过干扰结合伴侣之间(例如, HIF-1 α 和 CBP/p300 之间)的相互作用或结合来治疗或预防疾病(包括过度增殖性疾病和炎症病症)的方法。这些方法包括向包括人类的温血动物施用有效量的本发明的化合物。在某些实施方式中,本发明的化合物的施用诱导细胞生长停止或凋亡。

[0332] 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。

[0333] 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/或诊断癌症和肿瘤性病症。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类为病理性的,即,表现或构成疾病状态;或者可以分类为非病理性的,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。

[0334] 癌症或肿瘤病症的例子包括但不限于：纤维肉瘤、肌肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、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、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、淋巴瘤或卡波西肉瘤。

[0335] 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。

[0336] 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，侵袭性导管癌、侵袭性小叶癌、髓样癌、胶样（粘液）癌、管状癌和侵袭性乳头状癌）；和混杂性的恶性肿瘤。男性乳房疾病包括但不限于男性乳房发育症和癌。

[0337] 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）。

[0338] 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。

[0339] 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。

[0340] 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（sex cord-stromal tumors），例如，粒层 - 卵泡膜细胞瘤、泡膜细胞纤维瘤（thecoma fibromas）、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。

[0341] 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跃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(thalassemia)、先天性中性白细胞减少和脊髓发育不良。

[0342] 在其他或进一步的实施方式中,起到减少细胞凋亡的作用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,本发明的抗凋亡的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。一个例子是阿尔茨海默氏症(AD)。阿尔茨海默氏症的特征在于大脑皮层和某些皮层下区域中的神经元和突触损失。这种损失导致受影响区域的全部萎缩。淀粉样蛋白斑和神经纤维缠结在患有AD的患者的大脑中可见。阿尔茨海默氏症已被确定为蛋白质错误折叠的疾病,由于异常折叠的A- β 和 τ 蛋白质在大脑中的积累。斑块由 β -淀粉样蛋白组成。 β -淀粉样蛋白是来自称为淀粉样前体蛋白(APP)的更大的蛋白质的片段。APP对于神经生长、生存和伤后修复是关键的。在AD中,未知的过程导致APP被通过酶的蛋白质水解裂解成较小的碎片。这些片段中的一个 β -淀粉样蛋白的纤维,其形成在神经元之外质密形成而沉积的团块(称为老年斑)。在神经细胞内斑块继续生长成不溶性扭曲纤维,通常被称为缠结。因此, β -淀粉样蛋白和其原始受体之间的相互作用的破坏在治疗AD中是重要的。在一些实施方式中,在AD以及与细胞凋亡相关的其他神经疾病的治疗中,使用本发明的抗凋亡的拟肽大环化合物。这些神经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。

[0343] 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。血细胞产生的病症(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。这些病症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病症是心肌梗塞和中风。在这两种病症中,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。在其他或进一步的实施方式中,本发明的抗凋亡的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。

[0344] 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。

[0345] 在另一实施方式中,本文所述的拟肽大环化合物用于治疗、预防或诊断炎性病症。存在多种类型的炎性病症。某些炎症性疾病与免疫系统有关例如自身免疫疾病相关。自身免疫疾病源自身体对于通常在体内存在的物质和组织(即,自身抗原)的过度活跃的免疫反应。换句话说,免疫系统攻击其自身的细胞。自身免疫性疾病是免疫介导的疾病的主要原因。类风湿关节炎是自身免疫疾病,其中免疫系统攻击关节,在这种情况下它导致炎症(如关节炎)和破坏。它还可以损害如肺和皮肤的一些器官。类风湿关节炎可能导致机能和活动性很大的损失。类风湿关节炎经血液检查尤其是类风湿因子检验来诊断。采用本文所述的拟肽大环化合物治疗的自身免疫疾病的一些例子包括但不限于:急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、阿狄森氏病、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、白塞病、大疱性类天疱疮、乳糜泄、查加斯氏病、Churg-Strauss 综合征、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、克罗恩病、皮炎、1型糖尿病、子宫内膜异位症、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯病、格林巴利综合征(GBS)、桥本氏病、化脓性汗腺炎、特发性血小板减少性紫癜、炎症肠病(IBD)、间质性膀胱炎、红斑性狼疮、硬斑病、多发性硬化症、重症肌无力、嗜睡、神经性肌强直、寻常性天疱疮、恶性贫血、多发性肌炎、多肌痛风湿性、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、类风湿性关节炎、精神分裂症、硬皮病、干燥综合征、颞动脉炎(也称为“巨细胞动脉炎”)、高安氏动脉炎、血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿。

[0346] 采用本文所述的拟肽大环化合物治疗的其他类型炎性病症的一些例子包括但不限于:过敏,包括过敏性鼻炎/鼻窦炎、皮肤过敏(风疹/荨麻疹、血管性水肿、过敏性皮炎)、食物过敏、药物过敏、昆虫过敏;和罕见的过敏性病症,如肥大细胞增多症、哮喘、关节炎包括骨关节炎、类风湿性关节炎和脊柱关节病,中枢神经系统的原发性脉管炎、结节病、器官移植排斥反应、纤维肌痛、纤维化、胰腺炎和盆腔炎性疾病。

[0347] 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主动脉瓣狭窄、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”)相关的心血管病症,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。

[0348] 可以治疗或预防的其他病症包括,例如,视网膜缺血、肺动脉高压、胎儿宫内发育迟缓、糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性和糖尿病性黄斑水肿。本发明的这方面的再另外的实施方式涉及减少或防止组织中血管生成的方法。

[0349] 在另一方面,本发明的组合物可用于减少细胞中的基因转录,其中,基因转录由HIF-1 α 的相互作用(如HIF-1 α 与CBP和/或p300的相互作用)介导。其转录是由HIF-1 α 与CBP和/或p300的相互作用介导的基因包括腺苷酸激酶3、醛缩酶A、醛缩酶C、烯醇酶1、葡萄糖转运蛋白1、葡萄糖转运蛋白3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶1、己糖激酶2、胰岛素样生长因子2、IGF结合蛋白1、IGF结合蛋白3、乳酸脱氢酶A、磷酸甘油酸激

酶 1、丙酮酸激酶 M、p21、转化生长因子 β 3、血浆铜蓝蛋白、促红细胞生成素、转铁蛋白、转铁蛋白受体、a1B- 肾上腺素受体、肾上腺髓质素、内皮素 -1、血红素氧合酶 1、一氧化氮合酶 2、血纤维蛋白溶酶原激活物抑制物 1、血管内皮生长因子、血管内皮生长因子受体 FLT-1、血管内皮生长因子受体 KDR/F1k-1 和 p35srg。

[0350] 实施例 1. 式 (I) 的拟肽大环化合物的设计

[0351] 图 1 至图 3 说明野生型序列片段肽 TSYDCEVNAP (其代表 HIF-1 α 螺旋 A 的残基 796 至 805) 的 CBP/p300 的结合模式; 和野生型序列片段肽 QGEELLRALD (其代表 HIF-1 α 螺旋 B 的残基 814 至 823) 的 CBP/p300 的结合模式。用序列 TSYDCEVNAP 和 QGEELLRALD 开始通过用 α , α -二取代的氨基酸 (例如, S5 烯氨基酸) 取代各个序列的第 3 和第 7 个氨基酸来制备本发明的拟肽大环化合物。进行烯转位反应, 从而产生包含 i 和 i+4 的交联的拟肽大环化合物。

[0352] 实施例 2. 式 (I) 的拟肽大环化合物的合成

[0353] 如前所述 (Schafmeister 等人 (2000), J. Am. Chem. Soc. 122 :5891-5892; 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 -螺旋交联的多肽。下面的源自人 HIF-1 α -螺旋 A 或螺旋 B 肽序列的大环化合物用于这一研究中:

[0354]

化合物编号	序列	计算 m/z (M+H)	计算 m/z (M+2H)	计算 m/z (M+3H)	实测 m/z ^z
1	Ac-TSYDAbuEVNAR-NH2	1180.55	590.78	394.19	591.00
2	Ac-TSYDAbu\$VNAR-NH2	1214.65	607.83	405.55	607.67
3	Ac-\$YNABu\$VNAR-NH2	1112.61	556.81	371.54	556.68
4	Ac-TS\$DABuQ\$NAR-NH2	1167.6	584.31	389.87	584.19
5	Ac-TSY\$ABuQV\$AR-NH2	1200.67	600.84	400.89	600.73
6	Ac-QAEELLRALD-NH2	1198.64	599.83	400.21	599.67
7	Ac-QAE\$LLR\$LD-NH2	1248.72	624.87	416.91	624.73
8	Ac-QAQ\$LLR\$LD-NH2	1247.74	624.38	416.58	624.21
9	Ac-QAQ\$LLR\$LN-NH2	1246.76	623.89	416.25	623.74
10	Ac-QA\$ELL\$ALD-NH2	1163.66	582.34	388.55	1163.20
11	Ac-QA\$QLL\$ALD-NH2	1162.68	581.85	388.23	1162.21
12	Ac-QA\$QLL\$ALN-NH2	1161.69	581.35	387.90	1161.35
13	Ac-QA\$ALL\$ALN-NH2	1104.67	552.84	368.89	1104.39
14	Ac-RQA\$ALL\$ALN-NH2	1260.77	630.89	420.92	630.80
15	Ac-TSYDAbuEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALD-NH2	3127.6	1564.31	1043.20	1043.64
16	Ac-TSYDA\$VNAP-PEG5-QG\$QLL\$ALR-NH2	2605.47	1303.24	869.16	869.81
17	Ac-TSYDAbuEVNAP-PEG3-QGQELLRALN-NH2	2534.28	1267.65	845.43	1268.35
18	Ac-TSYDAbuEVNAP-PEG4-QGQELLRALN-NH2	2490.25	1245.63	830.75	1246.32

[0355] 在上述序列中, N1e 代表正亮氨酸, Aib 代表 2-氨基异丁酸, Abu 代表 (S)-2-氨基丁酸, Ac 代表 N-末端乙酰基, NH2 代表 C-末端氨基, PEG3 代表 NH-(PEG)₃-COOH (16 个原子) 连接体 (Novabiochem cat#01-63-0199), PEG4 代表 NH-(PEG)₄-COOH (19 个原子) 连接体 (Novabiochem cat#01-63-0200) 和 PEG5 代表 NH-(PEG)₅-COOH (22 个原子) 连接体 (Novabiochem cat#01-63-0204)。\$ 表示的氨基酸是 (S)- α -(2'-戊烯基) 丙氨酸 (“S5-烯氨基酸”) 和 \$r8 表示的氨基酸是 (R)- α -(2'-辛烯基) 丙氨酸 (“R8 烯氨基酸”)。在这类氨基酸掺入前体多肽之后, 末端烯部分与转位催化剂反应, 导致拟肽大环化合物的形成。连接两个 \$ 氨基酸的大环具有全碳交联连接体, 其在各个氨基酸的 α 碳原子之间包含 8 个碳原子, 在第四和第五碳原子之间具有 1 个双键, 且其中, 交联连接体连接的各个 α -碳原子另外地被甲基取代。连接一个 \$r8 氨基酸和一个 \$ 氨基酸的大环具有全碳交联连接体, 其在各个氨基酸的 α 碳原子之间包含 11 个碳原子, 在第七和第八碳原子之间

具有 1 个双键,且其中,交联连接体连接的各个 α -碳原子另外地被甲基取代。如果没有进行转位反应,那么在产生的多肽中的烯氨基酸标记为 $\$/$ 和 $\$r8/$,以表明分别包含未修饰的 (S)- α -(2'-戊烯基)丙氨酸 (“S5-烯氨基酸”)或未修饰的 (R)- α -(2'-辛烯基)丙氨酸的未修饰的多肽。提供了预测和实测的 m/z 谱。

[0356] 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。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 (见上文) 来设计交联的多肽。在 i 和 $i+4$ 位及在 i 和 $i+7$ 位进行置换。

[0357] 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 amide AM 树脂 (Novabiochem) 和 Fmoc 主链保护基化学作用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) (Materia) 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 1100 HPLC 系统连接) 和氨基酸分析 (Applied Biosystems, 420A 型) 确认纯产物的化学组成。

[0358] 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。

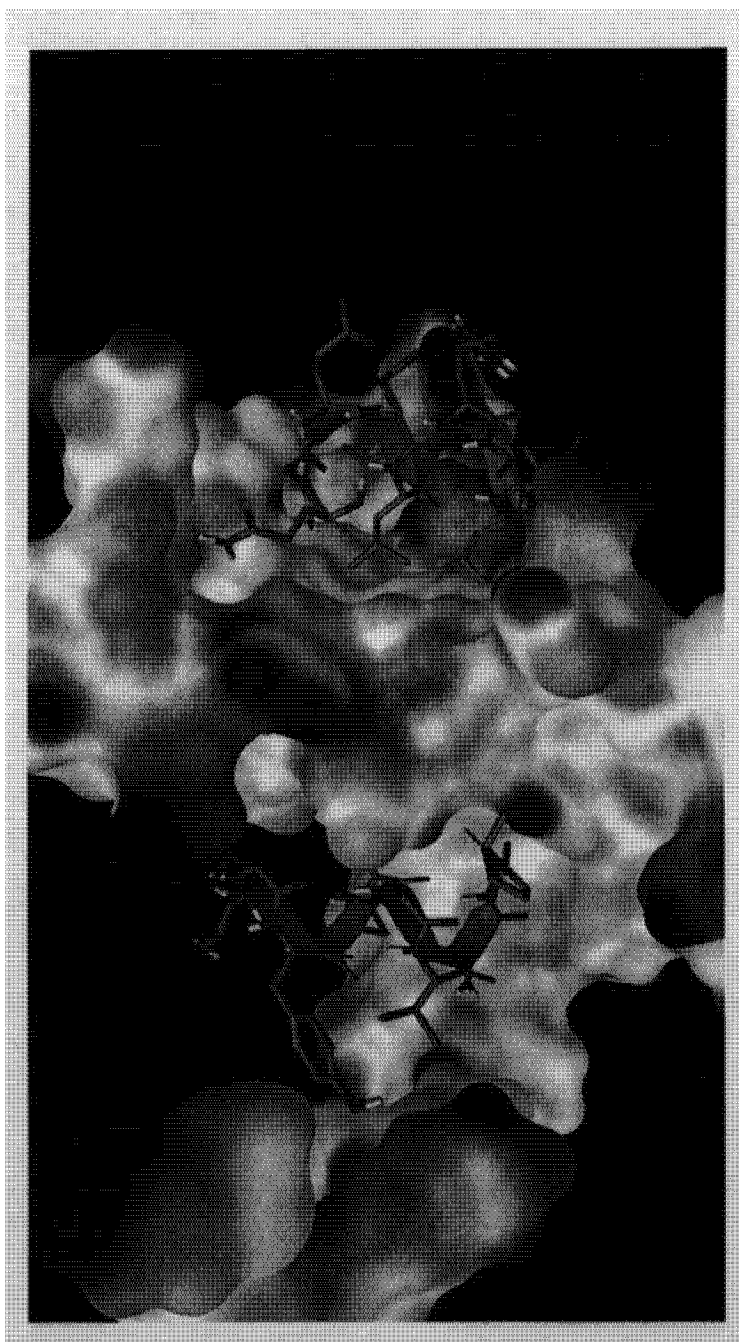


图 1

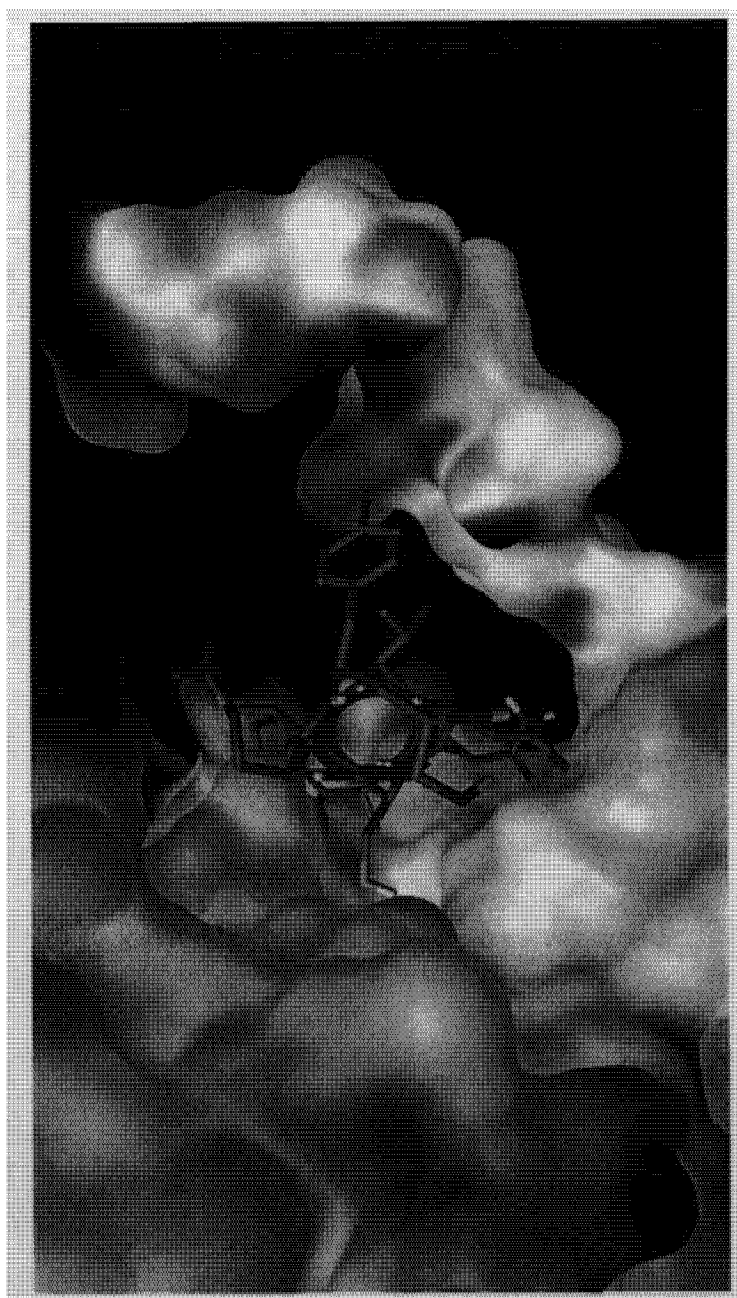


图 2

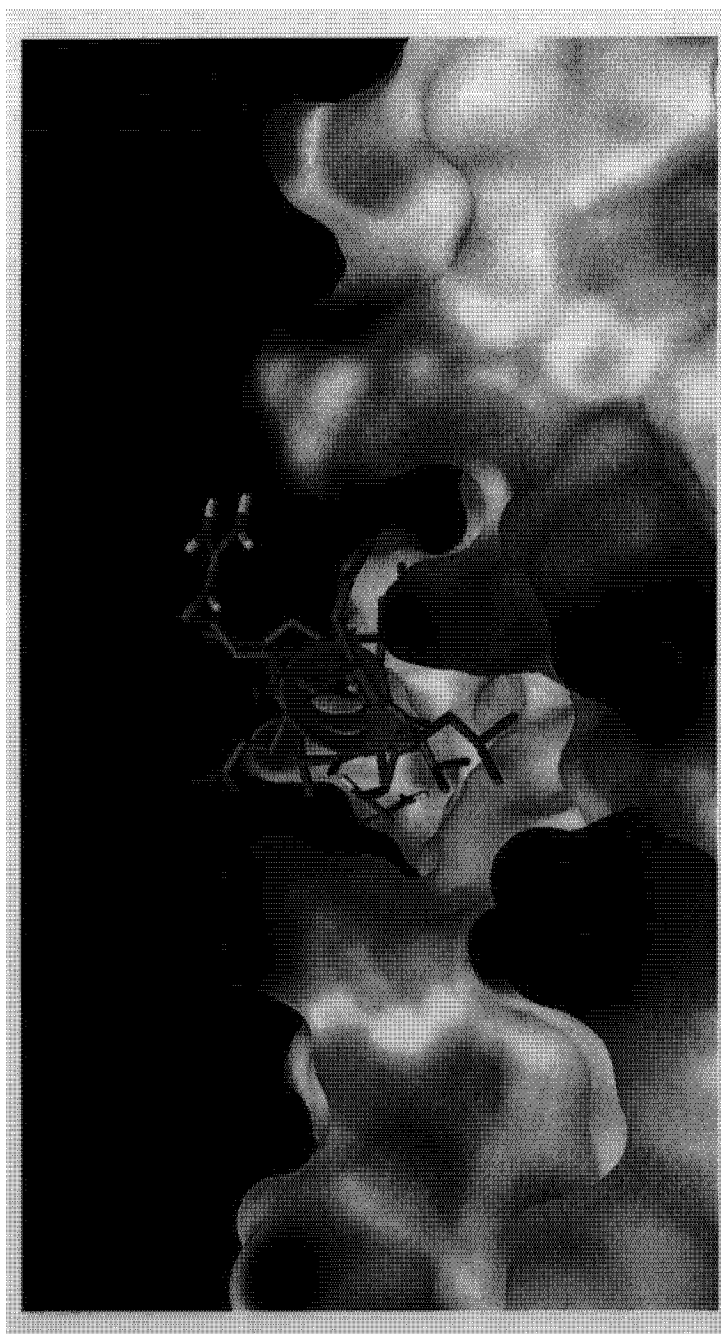


图 3

