



Title	シクロプロパン型アミノ酸を用いた配座制御による膜透過性環状ペプチドの創製と三次元構造-膜透過性相関の解明
Author(s)	山崎, 祐季
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第16792号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16792
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99637
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Yamazaki.pdf, 全文



博士学位論文

シクロプロパン型アミノ酸を用いた配座制御による 膜透過性環状ペプチドの創製と 三次元構造-膜透過性相関の解明

山崎 祐季

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
天然物合成化学研究室

2026 年 3 月

謝辞

本研究を行うに際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 渡邊 瑞貴 准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益なる御指導、御助言を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 周東 智 名誉教授、藤原 広一 博士に心より感謝申し上げます。

本論文の審査をして頂き、有益なるご助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 市川 聡 教授、長友 優典 教授、勝山 彬 講師に心より感謝申し上げます。

本研究において NMR を用いた三次元構造解析を行うにあたり、測定および解析の指導を行って頂いた北海道大学先端生命科学研究院 久米田 博之 博士に心より感謝申し上げます。

本研究において GROMACS を用いた MD シミュレーションを行うにあたり、計算の指導を行って頂いた北海道大学大学院薬学研究院 勝山 彬 講師に心より感謝申し上げます。

本研究において MD シミュレーションを行うにあたり、ご協力いただいた東京科学大学情報理工学院 杉田 昌岳 博士に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益なる御助言、御討論をして頂きました北海道大学薬学部創薬有機化学研究室の皆様、に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、経済的なご支援を賜りました日本薬学会長井記念薬学研究奨励金事業に心より感謝申し上げます。

最後に、著者の学生生活を経済的、精神的に支えてくださいました家族に心より感謝申し上げます。

2026 年 3 月 山崎 祐季

略語表

本論文中、以下の略語を使用した。

Ac	acetyl
Ala	alanine
aq	aqueous
Arg	arginene
Asn	asparagine
5-AVA	5-aminovaleric acid
9-BBN	9-borabicyclo[3.3.1]nonane
Bn	benzyl
Bu	butyl
°C	degree celsius
calcd	calculated
Cbz	benzyloxycarbonyl
CD	circular dichroism
COSY	correlation spectroscopy
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -dimethyl formamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
eq.	equivalent
ESI	electron impact ionization
Et	ethyl
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
FmocOSu	<i>N</i> -[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyloxy]succinimide
Gln	glutamine
HBA	hydrogen bond acceptors
HBD	hydrogen bond donors
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
HBTU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry

HSQC	heteronuclear single quantum correlation
K	kelvin
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
Leu	leucine
LRMS	low-resolution mass spectrometry
Lys	lysine
MD	molecular dynamics
Me	methyl
Ms	methanesulfonyl
MS	mass spectrometry
MW	molecular weight
<i>n</i> -	normaly
NaHMDS	sodium hexamethyldisilazane
NMR	nuclear magnetic resornance
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
Pe	permeability coefficient
Ph	phenyl
Phe	phenylalanine
Piv	pivaloyl
PPI	protein-protein interaction
ppb	parts per billion
Pro	proline
quant.	quantitative yield
REST	replica exchange with solute tempering
REUS	replica exchange umbrella sampling
Ro5	rule of five
ROE	rotating frame nuclear overhauser effect
ROESY	rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy
rt	room temperature
Ser	serine
<i>t</i> -	tertialy
TBAF	tetrabutylammonium acetate
TBDPS	tert-butyldiphenylsilyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine

TIS	triisopropylsilane
TMP	2,2,6,6-tetramethylpiperidine
TOCSY	total correlation spectroscopy
tPSA	topological polar surface area
Trt(2-Cl)-resin	2-chlorotrityl chloride resin
Tyr	tyrosine
Val	valine
VT-NMR	various temperature NMR

目次

序論		1
本論		
第 1 章	シクロプロパンアミノ酸含有環状ペプチドのフォーカスト ライブラリーの設計・合成と評価	
第 1 節	設計	6
第 2 節	Cp δ AA および環状ペプチドの合成	11
第 3 節	膜透過性の評価	14
第 4 節	NMR による三次元構造解析	16
第 5 節	CD による三次元構造解析	24
第 6 節	MD シミュレーションによる三次元構造解析	25
第 7 節	まとめ	32
第 2 章	膜透過性に対するアミノ酸側鎖の影響の調査	
第 1 節	設計	33
第 2 節	環状ペプチドの合成	35
第 3 節	膜透過性の評価	36
第 4 節	NMR による三次元構造解析	39
第 5 節	MD シミュレーションによる三次元構造解析	45
第 6 節	まとめ	50
第 3 章	環状ペプチドの膜透過性と三次元構造との関係性の考察	51
結語		58
補足資料		59
実験の部		69
参考文献		101

序論

Lipinski のルールオブファイブ (Ro5) は、分子量 (MW) が 500 以下、水素結合ドナー数 (HBD) が 5 個以下、水素結合アクセプター数 (HBA) が 10 個以下、CLogP が 5 以下を満たす化合物が、細胞膜透過性および経口バイオアベイラビリティに優れていることを示す経験則である¹。Ro5 を満たす低分子医薬品は多数開発されており、生体内リガンドや基質の小さな結合ポケットを持つ受容体や酵素など“ドラッグブル”なタンパク質を標的とする。一方、タンパク質間相互作用 (PPI) を代表とする、小さな結合ポケットを持たない“アンドラッグブル”なタンパク質をターゲットとした医薬品開発も盛んである。例えば、広く扁平な相互作用面を持つ PPI を標的とする場合、抗体のようなバイオ医薬品が顕著な有効性を示すことがある。しかし、分子量が大きい抗体医薬品は経口投与に適さず、また、細胞膜を透過しないため細胞内の PPI を狙うことは難しい。そこで、低分子医薬品と抗体医薬品の欠点を補完する、ペプチドや核酸などの中分子が注目されている。とくに、構造多様性に富む環状ペプチドは細胞内 PPI を阻害できる新たな創薬モダリティとして期待されている (Figure 0-1)²。

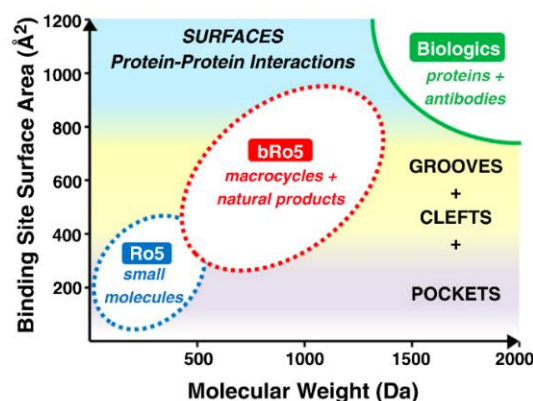


Figure 0-1. 各モダリティが対応可能なタンパク質の結合表面積の比較²

環状ペプチドは、鎖状ペプチドと比較して、環化に伴う主鎖配座の制限によって標的タンパク質との選択性や親和性が向上する。また、プロテアーゼによる分解を受けにくくなることで、生体内における安定性の向上も見込まれる。実際、40 を超える環状ペプチドが臨床応用されている³。一方で、中分子環状ペプチドの体内動態や細胞膜透過性の予測・制御は一般的に難しく、現在臨床応用されている環状ペプチドの多くは天然物由来であるか、内因性ペプチドにヒントを得て開発されている。さらに、優れた受動膜透過性を有する環状ペプチド医薬品は非常に限られており、Cyclosporin A、Romidepsin、Voclosporin のみである (Figure 0-2)⁴。環状ペプチドのさらなる医薬応用には膜透過性が依然として大きな課題となっている。ごく最近では、膜透過性と代謝安定性を兼ね備えた (=“薬らしさ”) 中分子環状ペプチドの構造的要件を新たに定義した報告例があり、実際にそれを利用した膜透過・経口吸収可能な RAS 阻害剤の創出に成功している⁵。

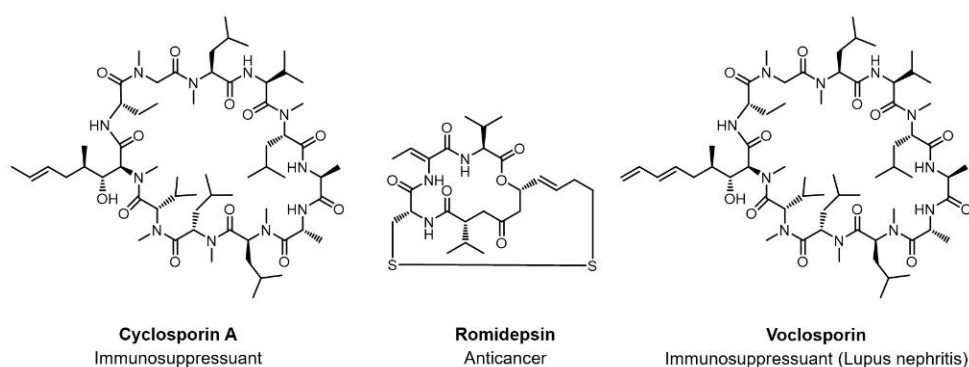


Figure 0-2. 優れた受動膜透過性を有する環状ペプチド医薬品

環状ペプチドの生物活性やバイオアベイラビリティ、膜透過性を決定づける要素として、その三次元構造は非常に重要な役割を果たしている⁶。鎖状ペプチドと比較すると環化によって配座の自由度は制限されているものの、環状ペプチドの三次元構造は非常にフレキシブルである。例えば、免疫抑制剤として臨床応用され、優れた受動膜透過性と薬理活性を示す Cyclosporin A は、その存在する環境の極性に応じて構造をダイナミックに変換する”chameleonic”な性質（＝構造カメレオン性）を有する⁷。水中では水分子と溶媒和し開いた構造をとっている一方、脂質二重膜内では疎水性側鎖が外側を向き、分子内で水素結合を形成した閉じた構造をとっている（Figure 0-3）。この特性により、Cyclosporin A は脂質二重膜を効率的に通過できるだけでなく、標的タンパク質との十分な結合活性も有している。

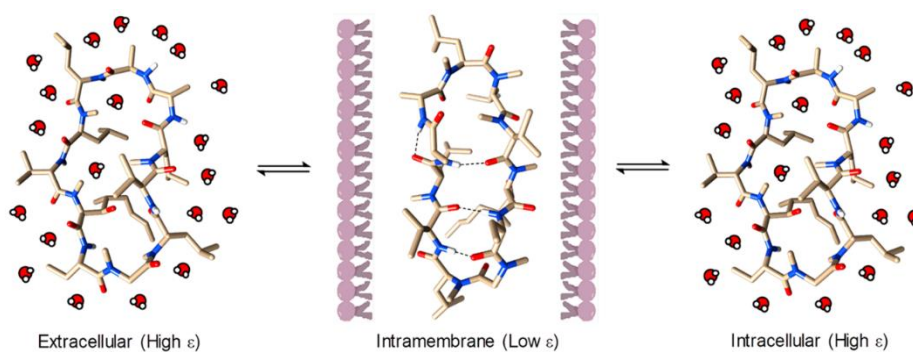


Figure 0-3. Cyclosporin A のダイナミックな構造変化⁷

環状ペプチドの受動的膜透過性を改善するため、様々な構造修飾が報告されており（Figure 0-4）、その一つにペプチド主鎖の配座制御がある。具体的には、D-アミノ酸の導入⁸、プロリン⁹やヘテロ環性骨格（thiazole¹⁰, oxadiazole¹¹, 3-heterocycle¹² など）を主鎖に組み込む手法、環外アミド構造の導入¹³ などがある。これらの手法はいずれも、環状ペプチドが溶液中で取り得る配座の自由度を低下させ、膜透過に有利な配座へと制御することを目的としている。

配座制御アプローチとは別に、膜透過過程における脱溶媒和の促進を目的とした化学修飾も広く検討されている。代表例として、主鎖アミドの N-メチル化^{14, 15}、ペプチド結合を含む主鎖構造の置換（ペプチド^{16, 17}、デブシペプチド¹⁸、チオアミド¹⁹）、極性側鎖の保護^{20, 21}や疎水性アミノ酸残基の導入²²が挙げられる。これらの修飾は、水素結合ドナー数を減少させるとともに分子全体の疎水性を高めることで、受動的膜透過性の向上に寄与している。

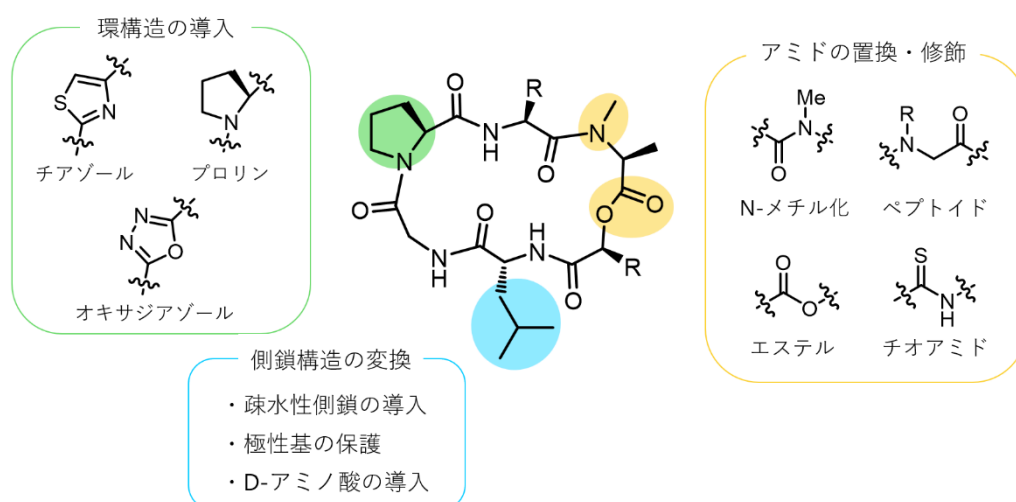


Figure 0-4. 受動的膜透過性向上のための構造修飾

しかし、このような化学修飾や配列設計は、意図せず環状ペプチドの三次元構造そのものを大きく変化させてしまう²³。

Kessler らはモデル環状ペプチド cyclo[D-Ala-Ala₅]の N-メチル化パターンが異なる多数の環状ペプチドを合成し、Caco-2 細胞での膜透過性を評価した¹⁴。その結果、N-メチル化の位置により環状ペプチドの膜透過性は大きく異なった。N-メチル化の位置が異なる環状ペプチドの三次元構造を比較したところ、高い膜透過性を示したペプチド **1** は Ala⁶ と D-Ala¹ および Ala³ と Ala⁴ で β ターンを形成し、2つの分子内水素結合を形成していた。一方、膜透過性が低かったペプチド **2** は異なる主鎖配座をとっており、分子内水素結合は形成していなかった (Figure 0-5)。

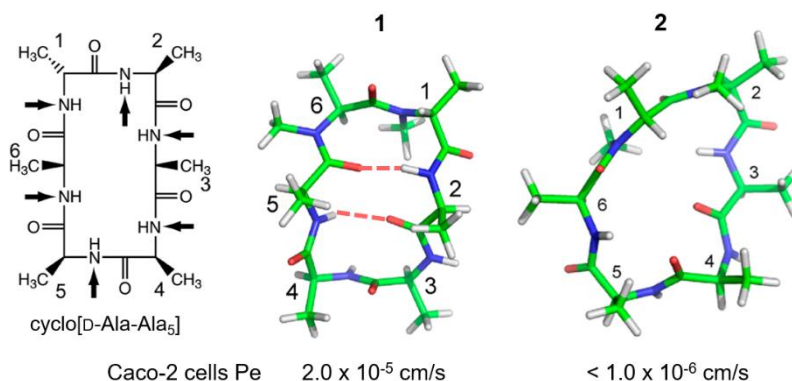


Figure 0-5. cyclo[D-Ala-Ala₅]の基本骨格と N-メチル化位置が異なる環状ペプチドの三次元構造¹⁴

また、N-メチル化の数と位置が異なる7種の環状ペプチド（3-9）の三次元構造を比較したところ、いずれも Ala⁴ と Ala⁵ で *cis* 型のペプチド結合を有する類似の主鎖配座をとっており（Figure 0-6）、溶媒に露出しているアミド NH のパターンも同一だった¹⁴。Caco-2 細胞における膜透過性に関しては、7種のうちペプチド 4 と 9 のみが高い膜透過性を示した一方、他5種の膜透過性は低かった。これらの主鎖配座は類似していたにもかかわらず、膜透過性に大きな差が見られた原因については論文中で考察されていなかった。

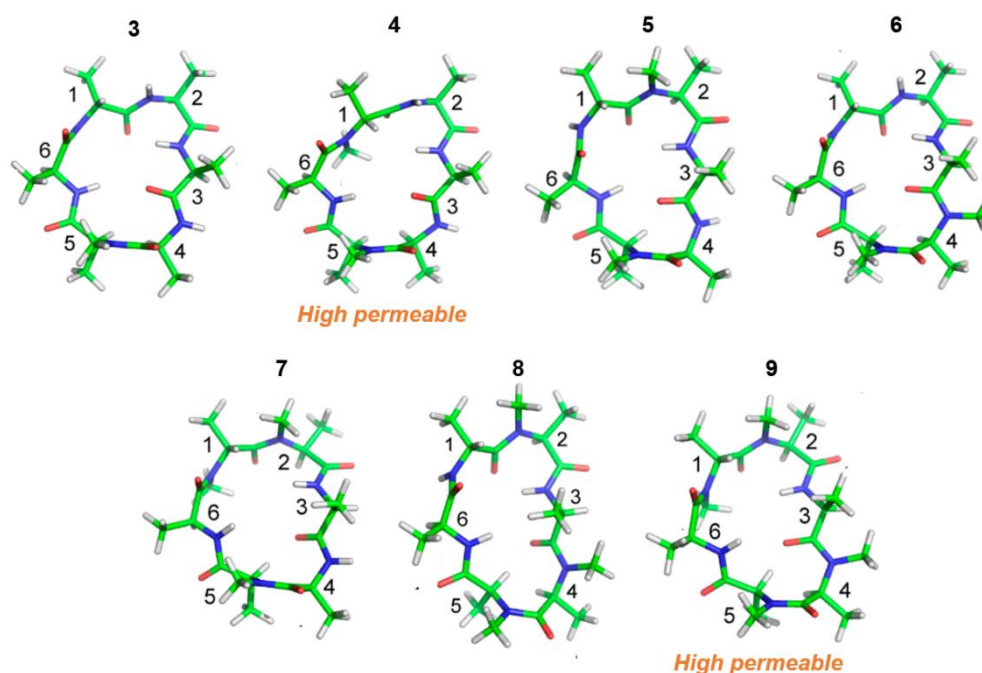


Figure 0-6. N-メチル化パターンが異なる環状ペプチドの三次元構造比較¹⁴

このように、わずかな化学修飾は局所的な水素結合能や立体配置を変化させるだけでなく、ペプチド分子全体の主鎖配座を大きく変化させる可能性がある。その結果、主鎖配座の変化が膜透過性の向上に直接寄与する場合がある一方で、主鎖配座が互いに類似しているにもかかわらず、膜透過性に明確な差が見られる例もある。すなわち、主鎖配座や分子内水素結合の形成、分子全体の疎水性といった、環状ペプチドが有する複数の構造的・物性的要因のうち、どの要因が膜透過性の向上に対して最も大きな影響を与えているのかについては、依然として明確な結論が得られていない。環状ペプチドの化学構造と三次元構造の双方が膜透過性に重要であることは明らかであるものの、ある一つの構造的・物性的要因の効果を他の要因から切り離し、膜透過性との純粋な関係性を体系的に理解することは、現時点では極めて困難である。

そこで本研究では、環状ペプチドの主鎖にシクロプロパン型アミノ酸を導入して配座自由度を制限することにより、環状ペプチドの三次元構造と膜透過性との直接的な関係性を、体系的かつ実験的に検証することを目的とした。具体的には、 α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸 (Cp δ AA) の立体異性体の一つである($\alpha S,\beta R,\gamma S,\delta R$)-Cp δ AA を組み込んだ環状ヘキサペプチドライブラリーを設計した。後述するが、このシクロプロパン型アミノ酸は、シクロプロパン環特有の構造特性により、その立体化学に依存した特定の主鎖配座へ制限されることが知られている^{24, 25, 26}。環状ペプチドに Cp δ AA を導入することで、主鎖配座の自由度は大きく低下し、取り得る配座パターンはある程度制限される。一方で、アミノ酸配列や側鎖の違いによって、膜透過性や三次元構造に差異が生じることが予想される。合成した環状ペプチドの受動的膜透過性を PAMPA により評価し、また、水中および膜内環境を模倣した条件下における三次元構造を、NMR 測定と MD シミュレーションを用いて詳細に解析した。これらの解析を通じて、膜透過性と三次元構造との関係を包括的に検証することで、膜を“通る形”と“通らない形”それぞれの構造的特徴を明確にし、環状ペプチドの配座と膜透過性の関係性に対する新たな理解を得ることを目指した。

本論

第1章 シクロプロパンアミノ酸含有環状ペプチドのフォーカスライブラリー の設計・合成と評価

第1節 設計

筆者が所属していた創薬有機化学研究室では、シクロプロパンを用いて配座をコントロールした生物活性小分子やペプチドを開発してきた。最小の環構造であるシクロプロパンは、化合物の主鎖をシスもしくはトランスに制御できる (Figure 1-1a)。また、四員環以上の環構造と異なり配座の自由度が全く無いため、シクロプロパン上のシス位置換基はエクリプス配座に固定され、置換基どうしで強力な立体反発 (シクロプロパン歪み; Figure 1-1b) が生じる。シクロプロパン歪み効果により、シクロプロパン隣接位炭素上の最も小さい置換基が内側に配向するよう、シクロプロパンと隣接位炭素間の二面角が制限される²⁴。このようなシクロプロパン特有の配座制御効果によって、光学活性 α,δ -二置換シクロプロパン δ -アミノ酸 (Figure 1-2a) の各立体異性体は、その立体化学に依存して異なる配座をとる (Figure 1-2b)^{24,25}。

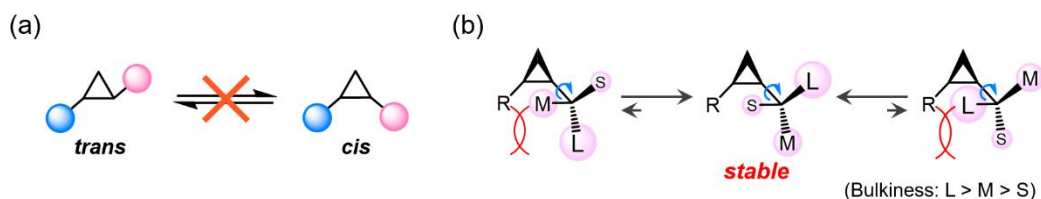


Figure 1-1. シクロプロパンの構造的特性 (a) シス/トランス制御、(b) シクロプロパン歪み

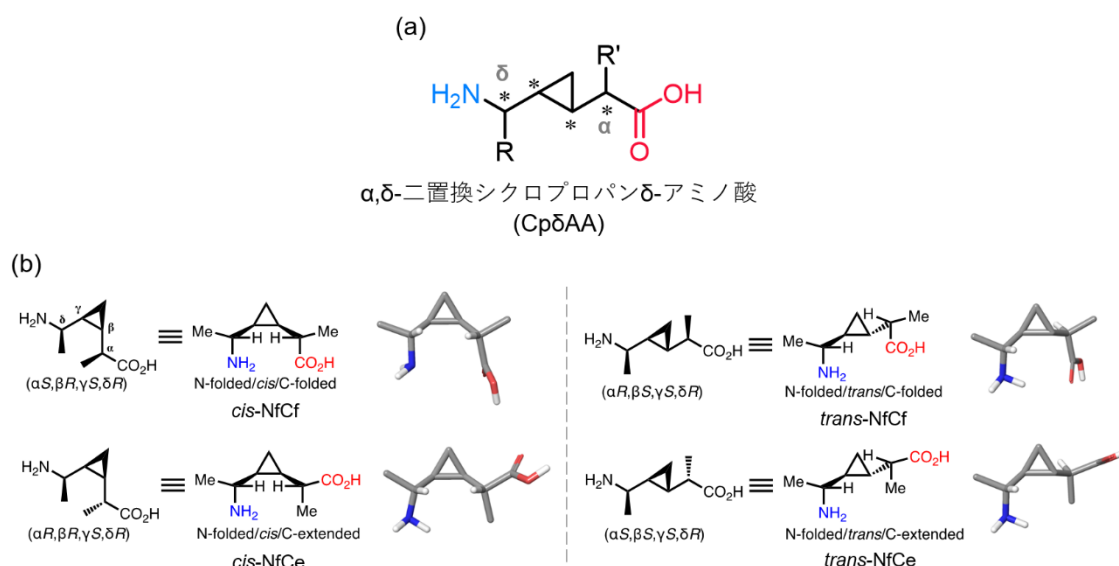


Figure 1-2. (a) α,δ -二置換シクロプロパン δ -アミノ酸 (Cp δ AA) の構造、(b) Cp δ AA 立体異性体の構造と最安定配座 (calculated using MacroModel 10.9; Force field, MMFFs; Solvent, H₂O.)

前任者の松井は、ペプチド主鎖配座の制御を目的に、 α -Me- δ -iBu-シクロプロパン δ -アミノ酸の4種の立体異性体を導入した環状ヘキサペプチド (**11–14**) を合成した²⁶。その結果、導入した δ -アミノ酸異性体の立体化学に応じて膜透過性が大きく異なり、特にペプチド **11** の細胞膜透過性が大幅に向上した (Figure 1-3a)。ペプチド **12–14** の3種の主鎖配座は開いた形だった一方で、シス形で N-C δ および C α -C(O)結合が“folded”配座をとる($\alpha S, \beta R, \gamma S, \delta R$)-異性体 (*cis*-NfCf) を組み込んだ環状ペプチド **11** は、主鎖配座が屈曲した“閉じた”形へと制御されていた (Figure 1-3b–e)。すなわち、Cp δ AA の導入が環状ペプチドの主鎖配座制御と膜透過性の向上に寄与することを見出した。

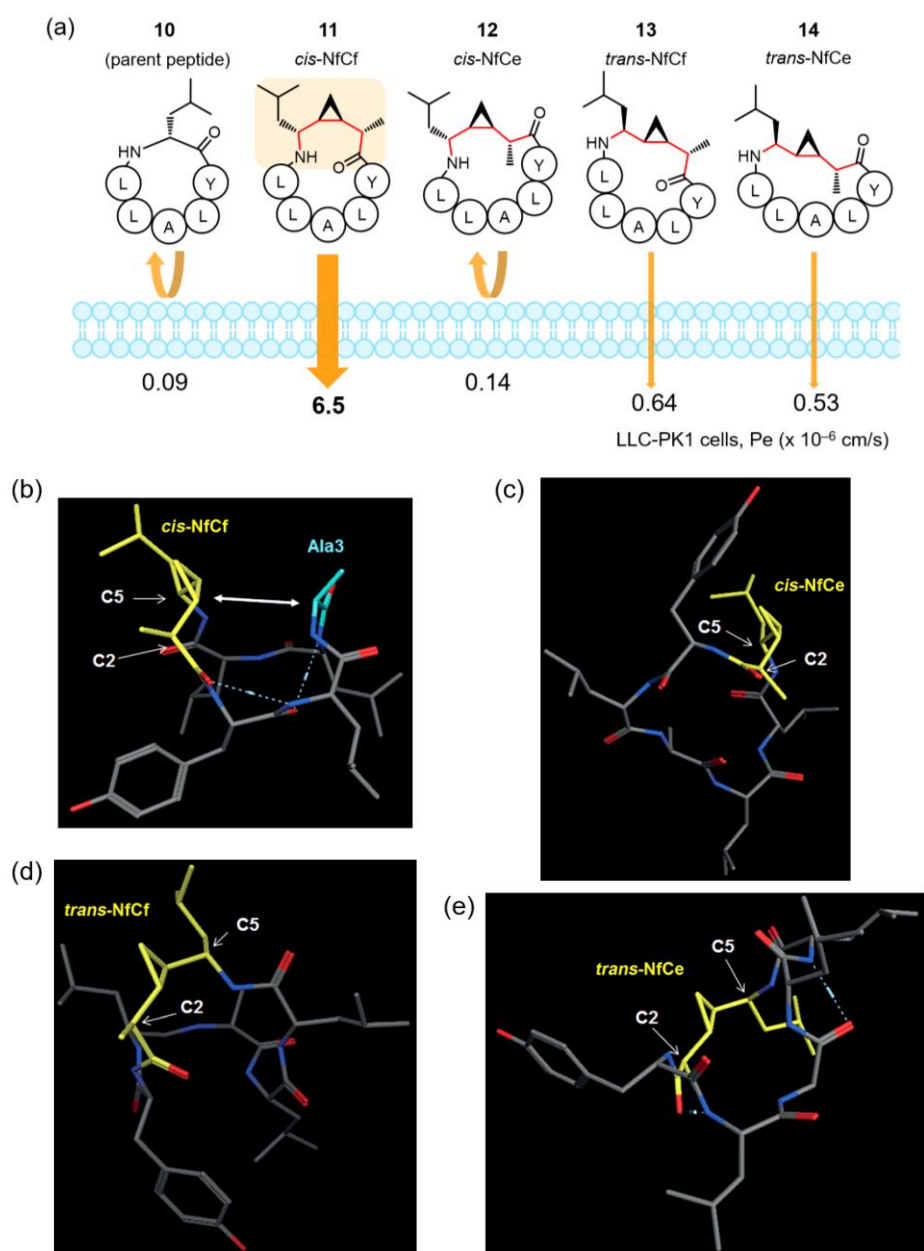


Figure 1-3. (a) Cp δ AA の立体異性体を組み込んだ環状ペプチドの構造と LLC-PK1 細胞における膜透過性評価の結果、DMSO- d_6 中の NMR 解析結果を基にした環状ペプチドの最安定配座 (b) ペプチド **11**、(c) ペプチド **12**、(d) ペプチド **13**、(e) ペプチド **14**

シクロプロパン δ -アミノ酸を三次元構造コントロールのための単純なユニットとするため、前任者の植村は α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸を新たに設計した²⁷。 δ 位を最も小さいアルキル置換基のメチル基に変更することで、シクロプロパン δ -アミノ酸のアルキル側鎖が膜透過性へ及ぼす影響をできるだけ小さくすることを狙った。具体的には、 α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸の立体異性体 3 種を合成し、これらシクロプロパン δ -アミノ酸を組み込んだ環状ペプチドの膜透過性評価と三次元構造解析を実施した。これにより、メチル基への置換基変更が、環状ペプチドの膜透過性と三次元構造にどれほど影響を与えるのかを評価した。

Caco-2 細胞を用いた膜透過性評価の結果を Figure 1-4 に示す。先行研究で高い膜透過性を示した **11** に対応する、 $(\alpha S, \beta R, \gamma S, \delta R)$ - α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸を含む環状ペプチド **15** は **11** と同程度の高い膜透過性を示した。一方で、 α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸の他の立体異性体を含む環状ペプチド **16** と **17** は、**12** および **13** と同様にほとんど膜透過性を示さなかった。さらに、**11** と **15** の溶液中の三次元構造を NMR により解析した結果、これら主鎖配座はよく一致し (Figure 1-5)、シクロプロパンユニットの δ 位の側鎖構造 (イソブチル基またはメチル基) は配座に影響しなかった。すなわち、シクロプロパン δ -アミノ酸の δ 位側鎖をメチル基に変更しても、環状ペプチドの主鎖配座制御効果および膜透過性は変わらないことが確認された。

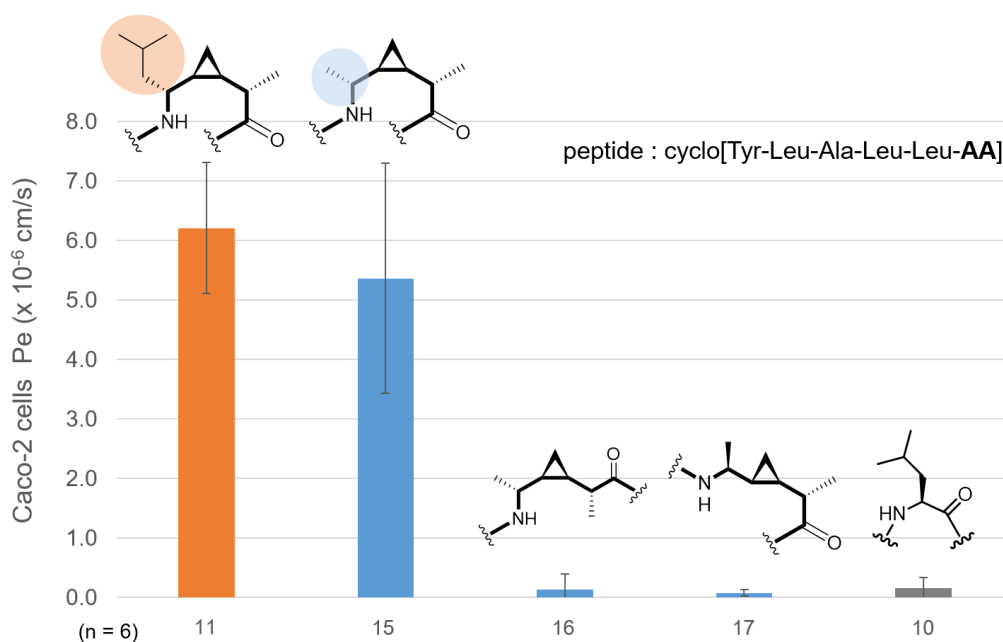


Figure 1-4. α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸の立体異性体を組み込んだ環状ペプチドの膜透過性評価結果

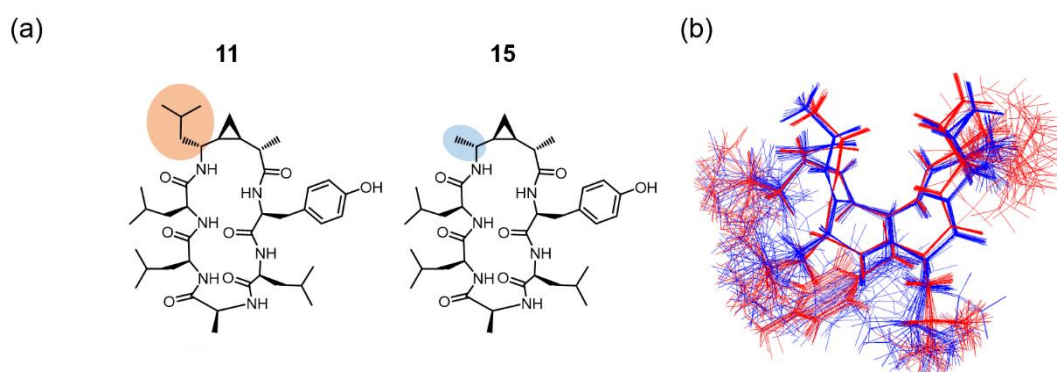


Figure 1-5. (a) ペプチド **11** および **15** の構造、(b) NMR 解析に基づいた溶液中の三次元構造の比較 (**11**: red, **15**: blue, calculated using Xplor-NIH ver 2.44, ATB ver 2.2)

これらの先行研究をふまえ、本章では α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸の ($\alpha S, \beta R, \gamma S, \delta R$)-異性体を組み込んだ環状ヘキサペプチド 24 種 (**CP1–CP24**) からなるフォーカスライブラリーを設計した (Table 1-1)。ライブラリーの将来的な機能化を見据え、すべての環状ペプチドに Lys 側鎖末端のアミノ基をアジド基とした Lys(N_3)残基を導入した。アジド基は、蛍光基やビオチン基などの機能性標識構造を目的に応じて後から導入するための足掛かりとなる。Lys(N_3)側鎖が膜透過性や三次元構造に影響を与える可能性は十分考えられるが、Lys(N_3)残基をもつペプチド間で相対的に比較するため、主鎖配座と膜透過性の検証には影響がないと考えている。先行研究の環状ペプチド **11** のアミノ酸配列を基本として、親水性アミノ酸の種類を変更した配列や、疎水性アミノ酸のみの配列を設計した。親水性アミノ酸は Tyr, Ser, Thr, Asn, Gln, Arg の 6 種を選択し、導入位置は AA¹, AA³, AA⁵ 位のいずれかに限定した。このように構成アミノ酸を適宜変更することで、疎水性 (CLogP) に幅を持たせた。さらに、膜透過性に対する Cp δ AA ユニットの効果を検証するため、鎖状 δ -アミノ酸である 5-アミノ吉草酸 (5-Ava) や、配座固定によって膜透過性を向上させることが広く知られている L/D-Pro に置換したペプチド (δ CP1– δ CP2, ProCP1–ProCP4) も設計した (Table 1-2)。膜透過性評価のポジティブコントロールとして用いるため、Lokey らが報告している高透過性ペプチドも合成することとした⁸。

CP	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵
CP1	Tyr	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Leu
CP2	Tyr	Leu	Ala	Leu	Lys(N ₃)
CP3	Tyr	Leu	Ala	Lys(N ₃)	Leu
CP4	Tyr	Lys(N ₃)	Ala	Leu	Leu
CP5	Lys(N ₃)	Leu	Ala	Leu	Leu
CP6	Asn	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Leu
CP7	Ser	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Leu
CP8	Arg	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Leu
CP9	Tyr	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Asn
CP10	Tyr	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Ser
CP11	Tyr	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Arg
CP12	Leu	Leu	Ala	Leu	Lys(N ₃)
CP13	Leu	Leu	Ala	Lys(N ₃)	Leu
CP14	Ala	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Leu
CP15	Leu	Lys(N ₃)	Ala	Leu	Leu
CP16	Lys(N ₃)	Leu	Tyr	Leu	Leu
CP17	Lys(N ₃)	Leu	Asn	Leu	Leu
CP18	Lys(N ₃)	Leu	Ser	Leu	Leu
CP19	Gln	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Leu
CP20	Lys(N ₃)	Leu	Gln	Leu	Leu
CP21	Thr	Leu	Lys(N ₃)	Leu	Leu
CP22	Lys(N ₃)	Leu	Thr	Leu	Leu
CP23	Lys(N ₃)	Ala	Ala	Leu	Leu
CP24	Lys(N ₃)	Ala	Ala	Leu	Leu

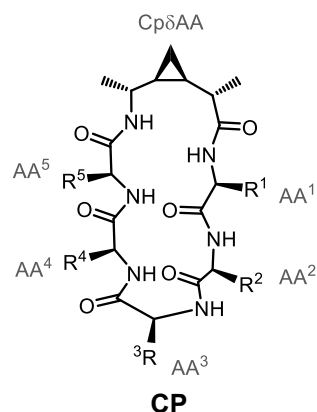
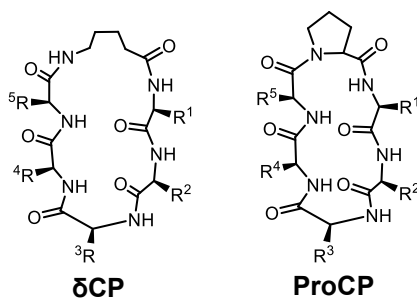


Table 1-1. 環状ペプチド **CP1–CP24** のアミノ酸配列



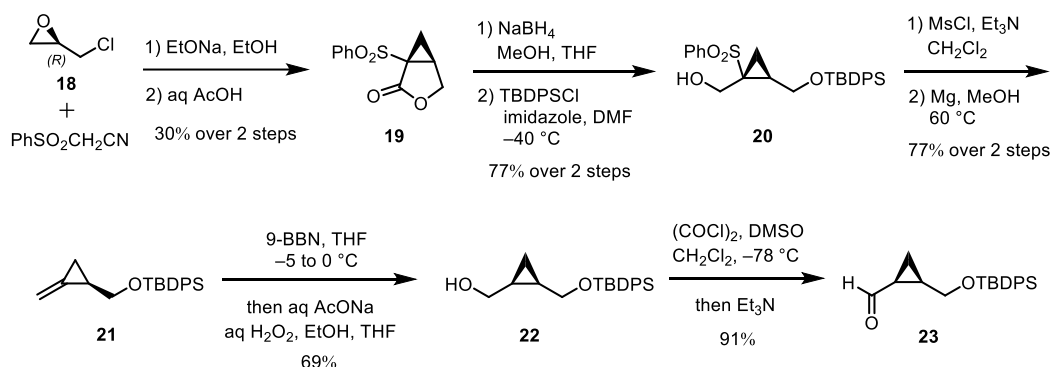
CP	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	AA ⁶
δCP1	Lys(N ₃)	Leu	Ala	Leu	Leu	5-Ava
δCP2	Lys(N ₃)	Leu	Ser	Leu	Leu	
ProCP1	Lys(N ₃)	Ala	Ala	Leu	Leu	Pro
ProCP2	Lys(N ₃)	Ala	Ala	Leu	Leu	D-Pro
ProCP3	Lys(N ₃)	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro
ProCP4	Lys(N ₃)	Leu	Ser	Leu	Leu	D-Pro
Lokey	D-Leu	Pro	Tyr	D-Leu	D-Leu	Leu

Table 1-2. 環状ペプチド **δCP1–δCP2, ProCP1–ProCP4, Lokey's peptide** のアミノ酸配列

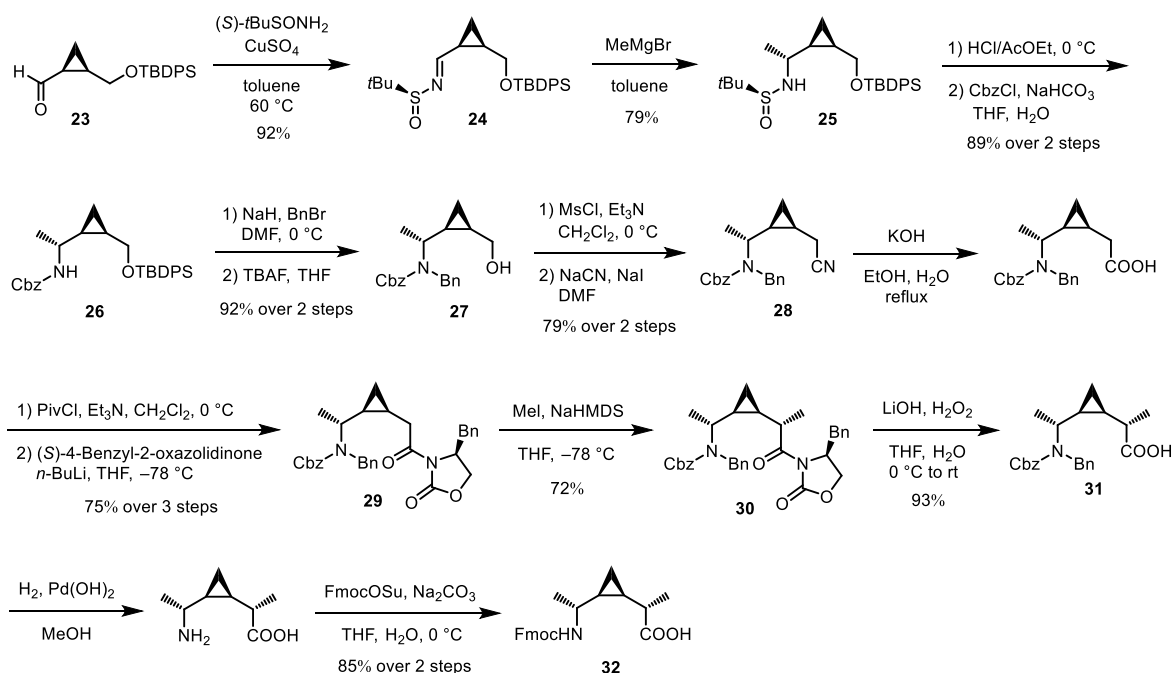
第2節 CpδAA および環状ペプチドの合成

α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸モノマー (Cp δ AA) の *N*-Fmoc 体 **32** を立体選択的に合成した。まず、(*R*)-epichlorohydrin (**18**) から *cis*-シクロプロパンアルデヒド **23** を 8 工程で立体特異的に合成した (Scheme 1)。文献既知の方法に従い²⁸、**18** に塩基性条件下、Phenylsulfonylacetonitrile を作用させることでラクトン体 **19** を得た。ラクトンを還元し、2つのヒドロキシ基の一方を選択的に TBDPS 基で保護することで、モノアルコール体 **20** を合成した。ヒドロキシ基をメシル化し、フェニルスルホニル基を還元的に除去することでオレフィン体 **21** を得た²⁹。オレフィン体 **21** から、ヒドロホウ素化と続く酸化によって立体選択的にアルコール体 **22** を合成した³⁰。得られたアルコール体 **22** を、Swern 酸化によってアルデヒド体 **23** に変換した。

Scheme 1. (*R*)-epichlorohydrin (**18**) から *cis*-シクロプロパンアルデヒド (**23**) の合成



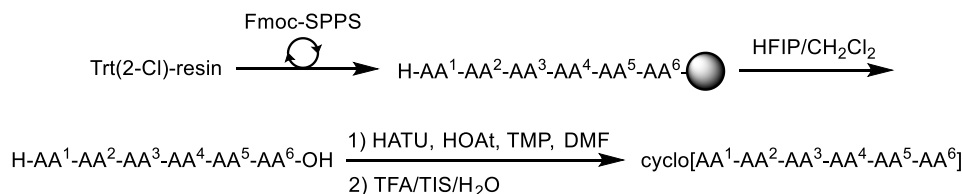
Scheme 2. *cis*-シクロプロパンアルデヒド (**23**) から *N*-Fmoc Cp δ AA (**32**) の合成



このアルデヒド体 **23** から、過去の報告例^{25,26}を参考にして、Cp δ AA ユニットを立体選択的に合成した (Scheme 2)。すなわち、アルデヒドをエルマンイミン **24** に誘導し、メチル基を立体選択的に導入して **25** とした。スルフィニル基を除去し、アミノ基を Cbz 基で保護して **26** とした。アミノ基をさらにベンジル基で保護した後、TBAF で処理することでアルコール **27** を得た。メシル化を経由してシアノ体 **28** とした。塩基性条件下で加水分解してカルボン酸にした後、混合酸無水物法にて不斉補助基オキサゾリジノンを縮合して **29** を合成した。カルボニル α 位に立体選択的にメチル基を導入して **30** とし、続く LiOH と H₂O₂ 処理によりカルボン酸 **31** を得た。接触水素化反応によって Cbz 基と Bn 基を除去して N 末端未保護の Cp δ AA とした。最後に、ペプチド固相合成法に適用するため N 末端を Fmoc 基で保護した **32** を合成した。また、 α 位と δ 位のメチル基の絶対立体配置は、改良モッシャー法³¹ および PGME 法³² にて確認した (Scheme S1, S2)。

2-Chlorotriptyl chloride 樹脂を用いた Fmoc 固相合成法により、Cp δ AA ユニットを含む鎖状ペプチドを伸長した。樹脂から切り出した後、縮合剤 HATU および HOAt を用いて液相で環化した。TFA/TIS/H₂O 処理によって側鎖の保護基を除去し、HPLC で精製して目的の環状ペプチドを得た (Scheme 3, Table 1-3)。鎖状 δ -アミノ酸 (5-Ava) や L/D-Pro に置換した環状ペプチドも同様に合成した (Table 1-4)。

Scheme 3. 環状ペプチドの合成



CP	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	AA ⁶	Total yield (%)
CP1	Lys(N ₃)	Leu	Leu	CpδAA	Tyr	Leu	38
CP2	Lys(N ₃)	CpδAA	Tyr	Leu	Ala	Leu	57
CP3	Lys(N ₃)	Leu	CpδAA	Tyr	Leu	Ala	57
CP4	Leu	Leu	CpδAA	Tyr	Lys(N ₃)	Ala	48
CP5	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Leu	Ala	50
CP6	Lys(N ₃)	Leu	Leu	CpδAA	Asn	Leu	66
CP7	Lys(N ₃)	Leu	Leu	CpδAA	Ser	Leu	59
CP8	Lys(N ₃)	Leu	Leu	CpδAA	Arg	Leu	71
CP9	Lys(N ₃)	Leu	Asn	CpδAA	Tyr	Leu	54
CP10	Lys(N ₃)	Leu	Ser	CpδAA	Tyr	Leu	35
CP11	Lys(N ₃)	Leu	Arg	CpδAA	Tyr	Leu	51
CP12	Leu	Lys(N ₃)	CpδAA	Leu	Leu	Ala	58
CP13	Lys(N ₃)	Leu	CpδAA	Leu	Leu	Ala	51
CP14	Lys(N ₃)	Leu	Leu	CpδAA	Ala	Leu	28
CP15	Leu	Leu	CpδAA	Leu	Lys(N ₃)	Ala	52
CP16	Tyr	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Leu	33
CP17	Asn	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Leu	41
CP18	Ser	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Leu	39
CP19	Lys(N ₃)	Leu	Leu	CpδAA	Gln	Leu	34
CP20	Gln	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Leu	46
CP21	Lys(N ₃)	Leu	Leu	CpδAA	Thr	Leu	44
CP22	Thr	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Leu	48
CP23	Ala	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Ala	49
CP24	Ser	Leu	Leu	CpδAA	Lys(N ₃)	Ala	51

Table 1-3. 環状ペプチド **CP1–CP24** の合成

CP	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	AA ⁶	Total yield (%)
δCP1	Leu	Leu	5-Ava	Lys(N ₃)	Leu	Ala	32
δCP2	Ser	Leu	Leu	5-Ava	Lys(N ₃)	Leu	8
ProCP1	Ala	Leu	Leu	Pro	Lys(N ₃)	Ala	13
ProCP2	Ala	Leu	Leu	D-Pro	Lys(N ₃)	Ala	20
ProCP3	Ser	Leu	Leu	Pro	Lys(N ₃)	Ala	11
ProCP4	Ser	Leu	Leu	D-Pro	Lys(N ₃)	Ala	21
Lokey	D-Leu	Pro	Tyr	D-Leu	D-Leu	Leu	45

Table 1-4. 環状ペプチド **δCP1–δCP2, ProCP1–ProCP4, Lokey's peptide** の合成

第3節 膜透過性の評価

合成した環状ペプチドの膜透過性を、並行人工膜透過性試験（PAMPA）により評価した。PAMPA では生体膜の代替として人工脂質膜を用いており、化合物の単純な受動拡散性をスクリーニング的に評価できる^{33,34}（Figure 1-6）。一般的に、透過係数 P_e の自然対数（ $\text{Log}P_e$ ）が -6.0 以上であれば、高い膜透過性を有する化合物であると判断される。

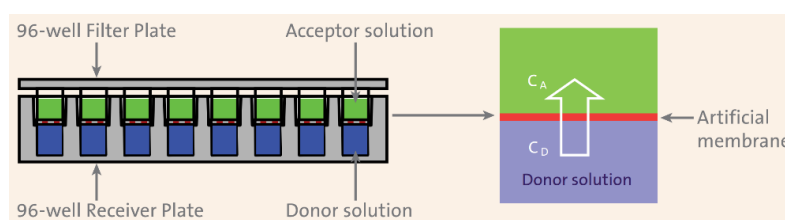


Figure 1-6. PAMPA の模式図³⁴

評価の結果、**CP5, CP12–CP15, CP21–CP23** の 8 種の環状ペプチドが、高い膜透過性（ $-6.0 \leq \text{Log}P_e$ ）を示した（Figure 1-7）。これらは、先行研究^{26, 27}において高い膜透過性を示したペプチド **11** および **15** を凌駕するものだった。また、10 種のペプチドが中程度の膜透過性（ $-7.0 \leq \text{Log}P_e < -6.0$ ）を示した。このように、シクロプロパン含有ペプチドの多くが膜透過性を有していた。

本ライブラリーにおいて、疎水性が高い環状ペプチドほど膜透過性が高い傾向が見られた（Figure 1-8, Table S1）。一方で、最も疎水性が高いペプチド（**CP1, CP16**, $\text{CLog}P = 7.69$ ）は、アッセイ溶液である 10% MeOH 水溶液に対する溶解性が乏しく膜透過性を示さなかった（ $\text{Log}P_e < -7.0$ ）。また、最も高い膜透過性を示したペプチド群（**CP5, CP12–CP15**）の $\text{CLog}P$ 値が 6.94 であった一方で、これらペプチドよりも高い $\text{CLog}P$ を有する **11**（ $\text{CLog}P = 7.29$ ）は、その膜透過性がおよそ 10 倍低下した。すなわち、疎水性が高すぎると膜透過性が低下する傾向が見られた。これらの結果は、疎水性と膜透過性との間に放物線のような相関があるという複数の報告例^{35, 36, 37}と一致していた。さらに、Arg を含む **CP8** と **CP11** は膜透過性を全く示さなかった。グアニジノ基は生理的条件下で常に +1 の電荷を帯び非常に強く水和されるため、受動拡散による膜透過性が大きく低下したと考えられる³⁸。

$\text{Cp}\delta\text{AA}$ ユニットを鎖状アミノ酸や L/D-Pro に置き換えた環状ペプチドは、いずれも膜透過性を示さなかった。このうち **δCP1 , ProCP3, ProCP4** の $\text{CLog}P$ 値は約 6.1 であり、中程度の膜透過性を示したシクロプロパン含有ペプチドよりも十分な疎水性を有する。特に、プロリン導入ペプチドの $\text{CLog}P$ 値は、対応する元のシクロプロパンペプチドよりも大きい。これらの結果は、環状ペプチドの受動的膜透過性には、単純な疎水性だけではなく主鎖配座の適切な制御が不可欠であることを示している。

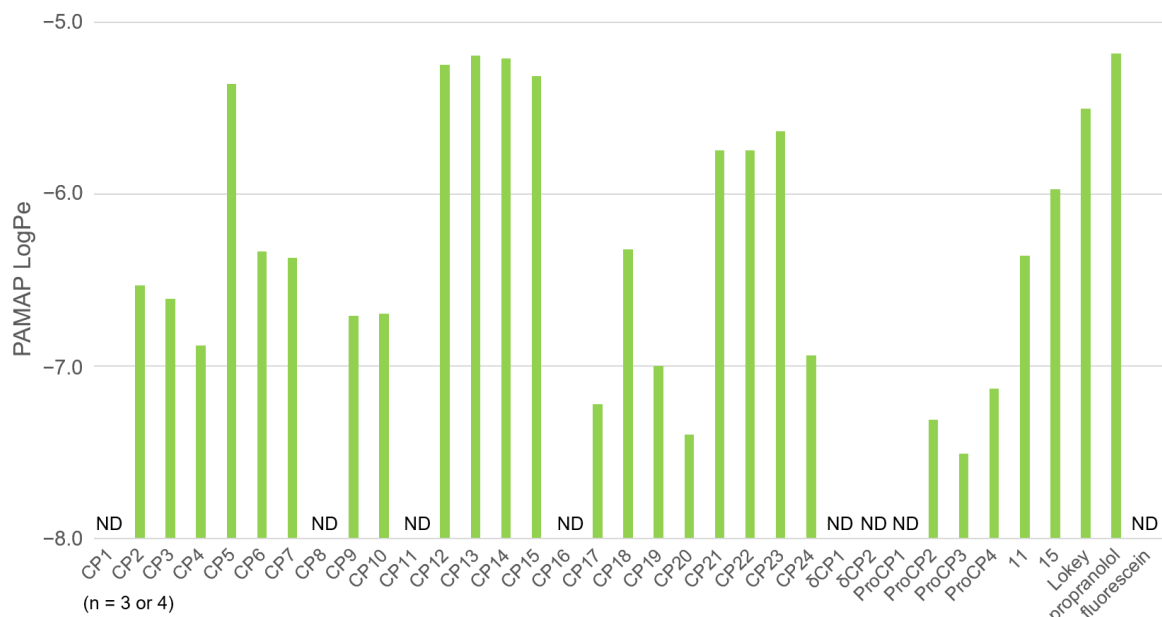


Figure 1-7. PAMPA による膜透過性評価の結果 (ND means below the detection limit.)

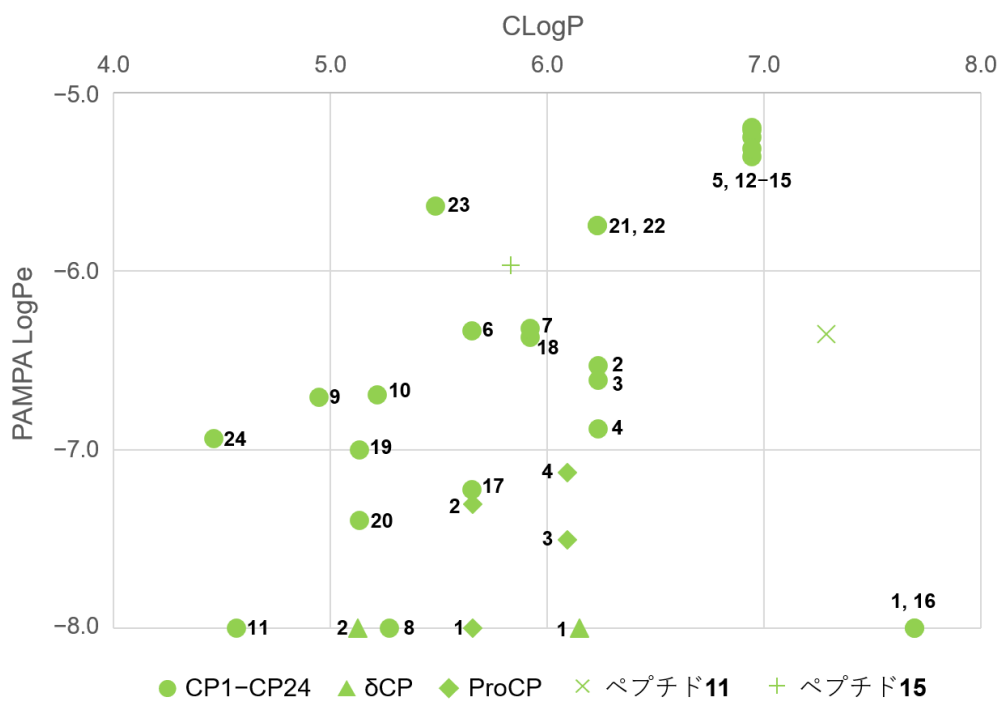


Figure 1-8. PAMPA LogPe と CLogP との散布図

第4節 NMRによる三次元構造解析

膜透過性の結果をふまえ、膜透過性の違いに伴って主鎖配座はどのような形をとっているのかを検証するため、NMRによる詳細な三次元構造解析を実施した。対象としたのは、膜透過性が非常に高いペプチド4種（CP5, CP13, CP14, CP22）、中程度のペプチド4種（CP3, CP18, CP6, CP7）、ほとんど膜透過性を示さなかったペプチド2種（CP17, CP20）の計10種である（Figure 1-9）。測定溶媒は、細胞内／外環境を模倣する DMSO- d_6 と脂質二重膜内環境を模倣する $CDCl_3$ を選択した。これらは、環状ペプチドの溶液中の三次元構造を理解するために汎用される溶媒である²⁶。すべてのペプチドにおいて、 ^1H , H-H COSY, HSQC, H-H TOCSY, ROESY を測定して全プロトンを帰属し、ROE 相関、VT-NMR 測定、H-D 交換実験、 J 値について解析した。

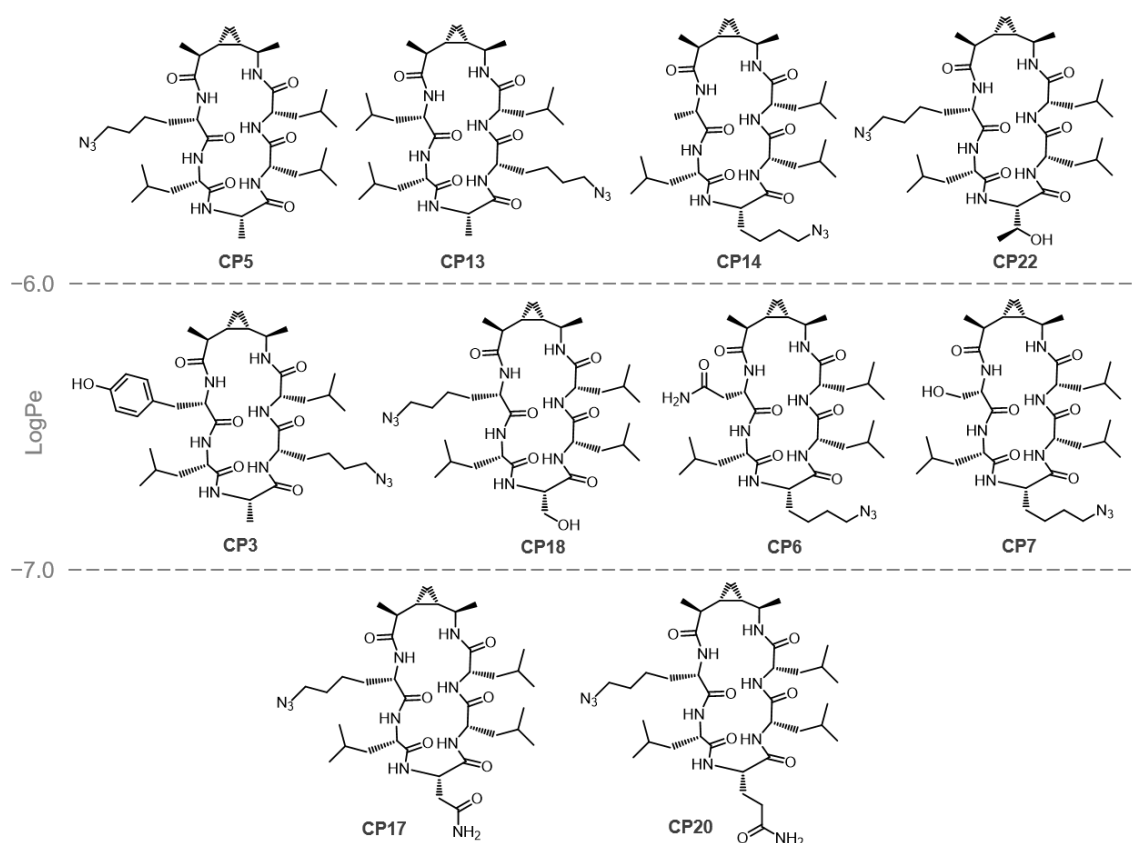


Figure 1-9. NMR 解析を行った環状ペプチドの化学構造

1. ROE 相関

ROESY は空間的に近いプロトンどうしを検出する測定手法であり、ピークが観測されたプロトンどうしは約 5 Å 以内に存在していると判断できる。本研究では、2 アミノ酸残基以上離れたプロトン間の相関を遠距離 ROE 相関と定義した。

DMSO- d_6 中の解析結果を Figure 1-10 に示す。すべてのペプチドで、Cp δ AA ユニット上の α 位炭素のプロトン H α 、 δ 位炭素のプロトン H δ 、シクロプロパン環上のプロトン H β' 間での ROE 相関を確認できた。これらは、シクロプロパン歪み効果によって、環状ペプチド内でも Cp δ AA が期待した folded 配座をとっていることを示していた。また、Cp δ AA ユニットの H β , H γ と向かいに位置するアミノ酸残基 (AA³) の H α 間の遠距離 ROE 相関も、多くのペプチドで共通して観測された。以上の相関シグナルは先行研究²⁶の結果とも一致しており、環状ペプチドが“閉じた”主鎖配座をとっていることを示唆するものだった。さらに、高い膜透過性を示した **CP5**, **CP13**, **CP14** の3種と、ほとんど膜透過性を示さなかった **CP20** は、NH-H α 間やアミノ酸側鎖間の ROE 相関を数多く観測できた。一方、**CP6** と **CP7** は ROE シグナルが全体的に弱く、遠距離 ROE 相関をほとんど観測できなかった。

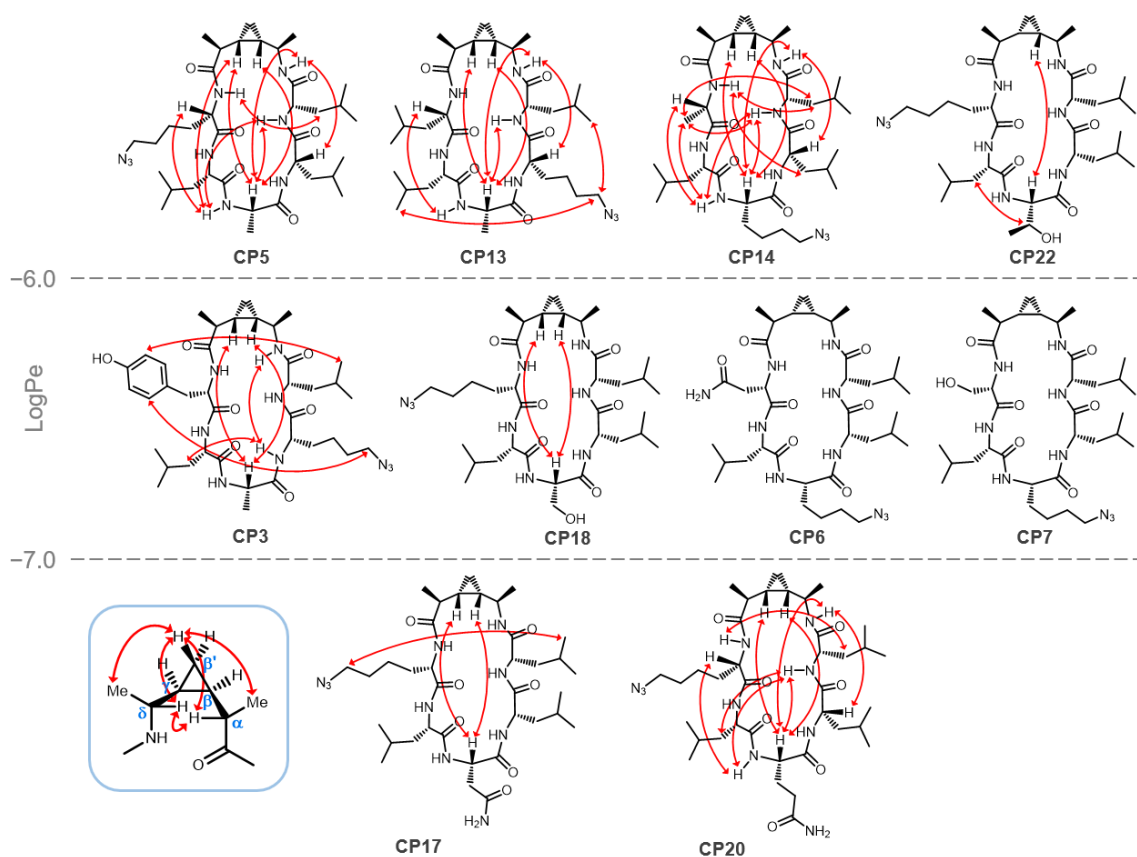


Figure 1-10. DMSO- d_6 中で観測された ROE 相関 (600 MHz)

CDCl₃ 中の解析結果を Figure 1-11 に示す。DMSO-*d*₆ 中と同様に、すべてのペプチドで CpδAA が期待した配座をとっていることを示す ROE 相関を観測できた。高い膜透過性および中程度の膜透過性を示した 6 種のペプチドでは、CpδAA の H β , H γ と向かいのアミノ酸残基 H α 間の ROE 相関、NH-H α 間やアミノ酸側鎖どうしの相関も観測できた。一方、**CP6**, **CP7**, **CP20** は ROE シグナルが全体的に弱く、観測できた遠距離 ROE 相関数は少なかった。**CP17** は ¹D スペクトルが非常にブロードし、ROE シグナルが全体的に弱かったため、すべてのプロトンに帰属することはできなかった。¹D スペクトルがブロードしていたことから、**CP17** は CDCl₃ 中で凝集していることが示唆された。

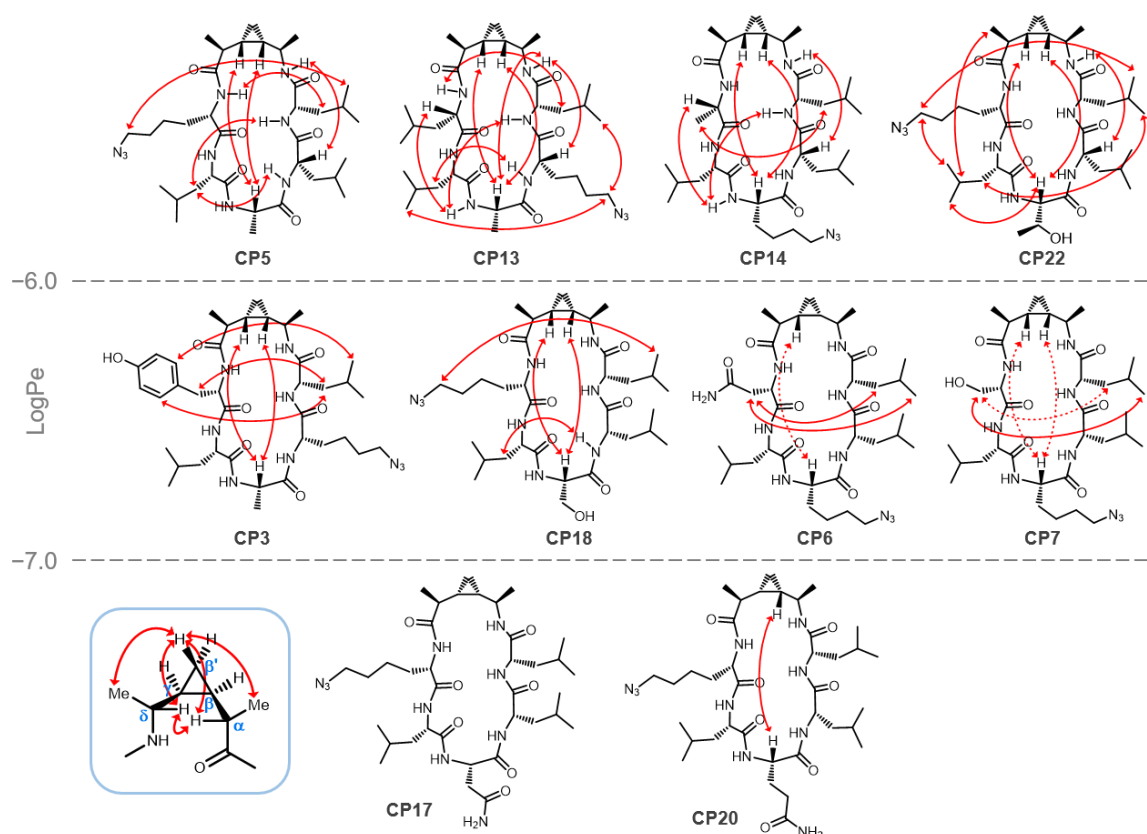


Figure 1-11. CDCl₃ 中で観測された ROE 相関 (600 MHz)

2. VT-NMR 測定

環状ペプチドのアミド NH が溶媒和しているかを確認するため、温度可変 NMR (VT-NMR) 測定を実施した。DMSO- d_6 では 25 °C から 60 °C まで、CDCl₃ では 10 °C から 35 °C まで、それぞれ 5 °C 刻みで ¹D NMR を測定し、温度依存的なケミカルシフト変化量 ($\Delta\text{ppb}/\Delta K$) を算出した。極性溶媒中において、測定温度の上昇に伴ってケミカルシフトが大きく移動するプロトンは溶媒に露出し、移動が小さいプロトンは分子内水素結合を形成しているか分子内部に埋もれているかがこの測定から判断できる。DMSO- d_6 中において、アミド NH の $\Delta\text{ppb}/\Delta K$ が -4.0 より小さい場合、該当のアミド NH は溶媒に露出していると判断される³⁹。

DMSO- d_6 中の解析の結果、**CP6**, **CP7** 以外のすべてのペプチドにおいて、AA¹ 位のアミド NH のみが溶媒に露出していることが示され (Figure 1-12, Table S2)、膜透過性の高低に伴う $\Delta\text{ppb}/\Delta K$ の違いは見られなかった。一方、**CP6** と **CP7** は AA¹, AA⁵, Cp δ AA 位の 3 つのアミド NH が溶媒に露出していることが示された。ROE 相関と VT-NMR の結果から、**CP6** と **CP7** は DMSO- d_6 中で他 8 種のペプチドと異なる主鎖配座をとっていることが示唆された。この 2 つのペプチドは AA¹ 位に親水性アミノ酸残基を有しており、配列が主鎖配座に影響を与えた可能性が考えられる。

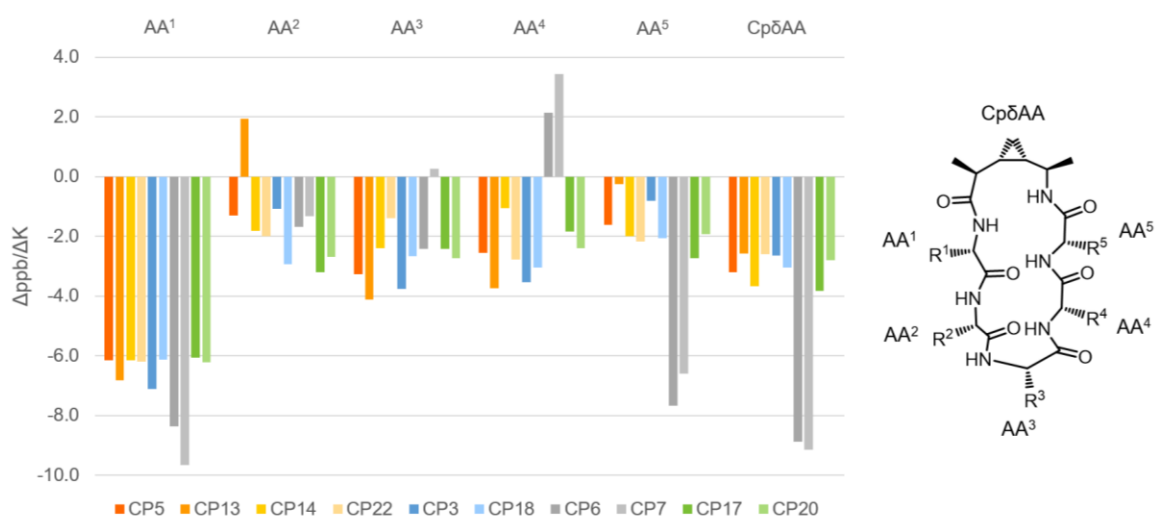


Figure 1-12. DMSO- d_6 中の VT-NMR 測定の解析結果 (600 MHz)

CDCl₃ のような非極性溶媒では、 $\Delta\text{ppb}/\Delta K$ の具体的な数値は文献データで明示されておらず解析結果の解釈が難しい。CDCl₃ 中でケミカルシフトが大きく変化する NH は、弱い水素結合を形成していると考えられる。測定温度が高くなると水素結合が解消されるため、ケミカルシフトの変化が大きく見られる。一方、ケミカルシフトがあまり変化しない NH は、強い水素結合を形成している場合と、溶媒にさらされて安定な構造をとっている場合が考えられる⁴⁰。このように CDCl₃ 中では $\Delta\text{ppb}/\Delta K$ の数値のみで分子内水素結合の有無を議論できないため、アミノ酸残基ごとの値を相対的に比較した (Figure 1-13, Table S3)。その結果、 $\Delta\text{ppb}/\Delta K$ は類似した傾向を示し、膜透過性の違いとの相関は見られなかった。

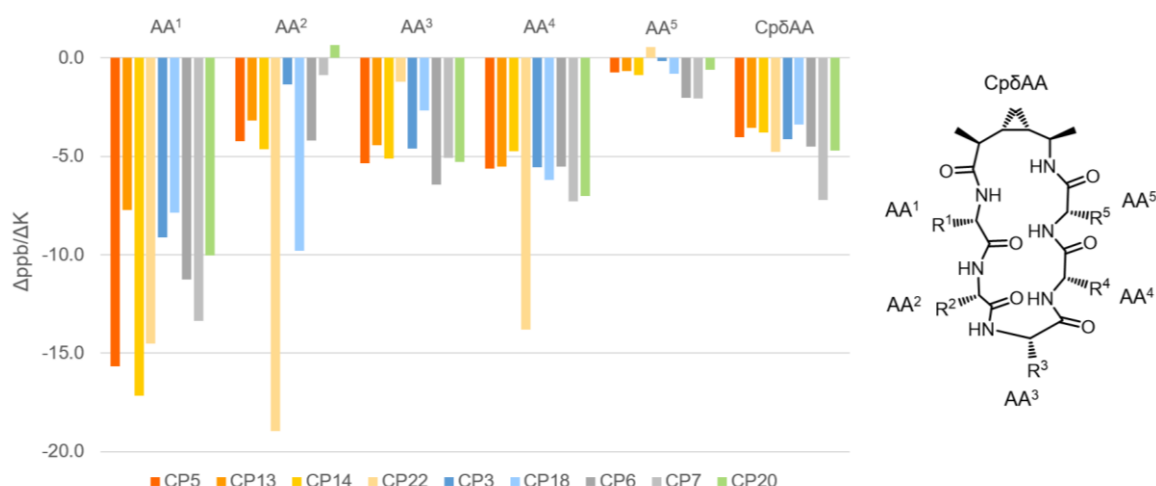


Figure 1-13. CDCl_3 中の VT-NMR 測定の結果 (600 MHz)

3. H-D 交換実験

H-D 交換実験は、タンパク質やペプチドの溶媒和を確認する一般的な測定手法の一つである⁴¹。DMSO- d_6 /D $_2$ O = 95/5 の混合溶媒に溶かしたペプチドの ^1D NMR を一定時間ごとに測定し、アミド NH の積分値変化を比較した。溶媒に露出しているアミド NH は重水素との交換が速く、露出していないアミド NH は交換が遅い。

CP5, CP14, CP18, CP17 の 4 種の測定結果を Figure 1-14 に示す。CP5 と CP18 は 36 時間経過後の溶媒に露出しているアミド NH は 1 つのみであったが、CP14 と CP17 は 5 つもしくは 6 つのアミド NH が溶媒に露出していた。これらの結果に規則性はなく、VT-NMR の結果とも一致しなかった。H-D 交換実験と VT-NMR で結果が異なった原因として、ペプチドの存在環境の違いが大きく影響したと考えられる。H-D 交換実験では、溶媒に 5% の D $_2$ O を混ぜた状態で長時間（最大 36 時間）サンプルを保存していた。一方、VT-NMR は DMSO- d_6 に溶解させ 25 °C から 60 °C まで昇温して 1D NMR を測定している。両実験で測定サンプル・条件ともに異なっていることから、この違いに伴って溶液中で環状ペプチドの配座変化が引き起こされ、溶媒に露出しているアミド NH が一致しなかったのではないかと考えた。

また、 CDCl_3 中での H-D 交換実験も試みた。非極性溶媒における H-D 交換率は、VT-NMR 実験から求められる $\Delta\text{ppb}/\Delta K$ と大まかな相関が見られる⁴²。 CDCl_3 と CD_3OD の割合が異なる混合溶媒に CP5 を溶かし ^1D NMR を測定した。その結果、混合溶媒のスペクトルは CDCl_3 のみのスペクトルと比較してアミド NH のケミカルシフトが大きく変化してしまった (Figure S1)。交換率を解析するには混合溶媒中のアミド NH を再帰属しなければならないことから、 CDCl_3 中での H-D 交換実験は断念した。

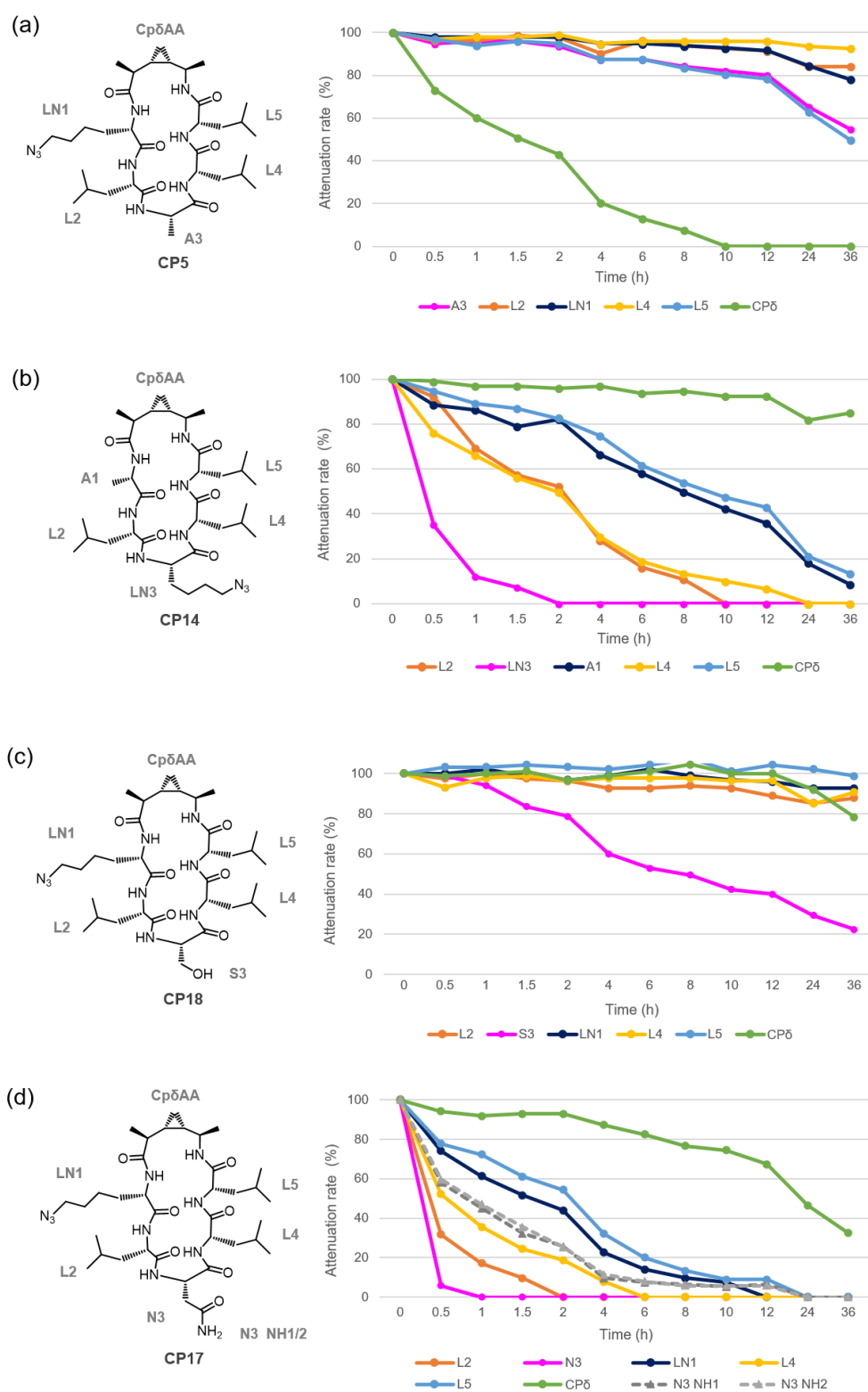


Figure 1-14. DMSO- d_6 中の H-D 交換実験結果 (400 MHz)
(a) CP5、(b) CP14、(c) CP18、(d) CP17

4. J 値

ペプチド主鎖二面角に違いがあるかを確認するため、アミノ酸残基の位置ごとでアミド NH のカップリング定数 ($^3J_{\text{NH-H}\alpha}$) を比較した。DMSO- d_6 の結果を Figure 1-15 に、CDCl $_3$ の結果を Figure 1-16 に示す。帰属ができなかった **CP17** や、singlet や broad として観測されたアミド NH はグラフから除外している (Table S4, S5)。両溶媒においてアミノ酸残基の位置ごとで大きな違いはなく、膜透過性との相関は見られなかった。ただし **CP6** と **CP7** は、DMSO- d_6 中の傾向が他のペプチドとは異なっていた。すなわち、AA ^{1} 位は他よりもカップリング定数が大きく、AA ^{5} 位はカップリング定数が小さかった。この結果からも、**CP6** と **CP7** が異なる配座をとる可能性を示唆していた。

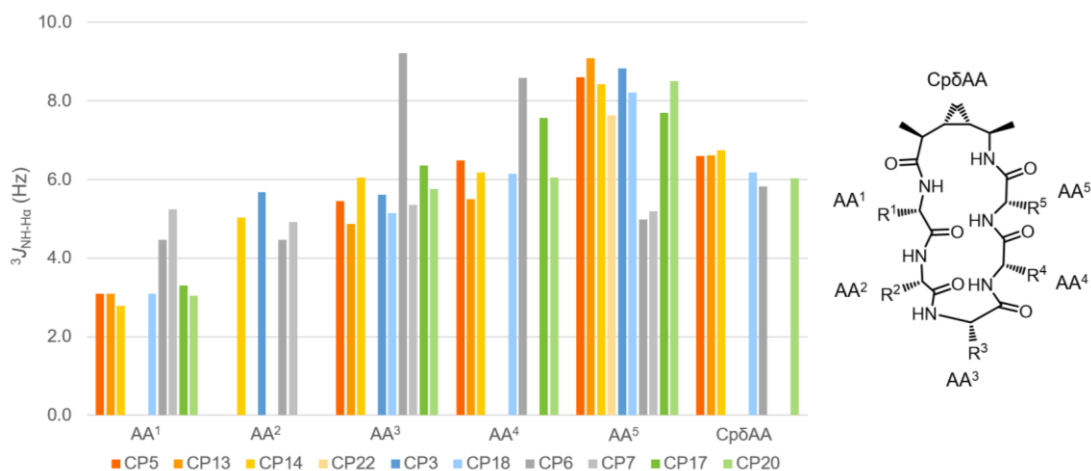


Figure 1-15. DMSO- d_6 中の $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ 解析結果
(600 MHz, Bars with no data are either singlet peak or overlapped.)

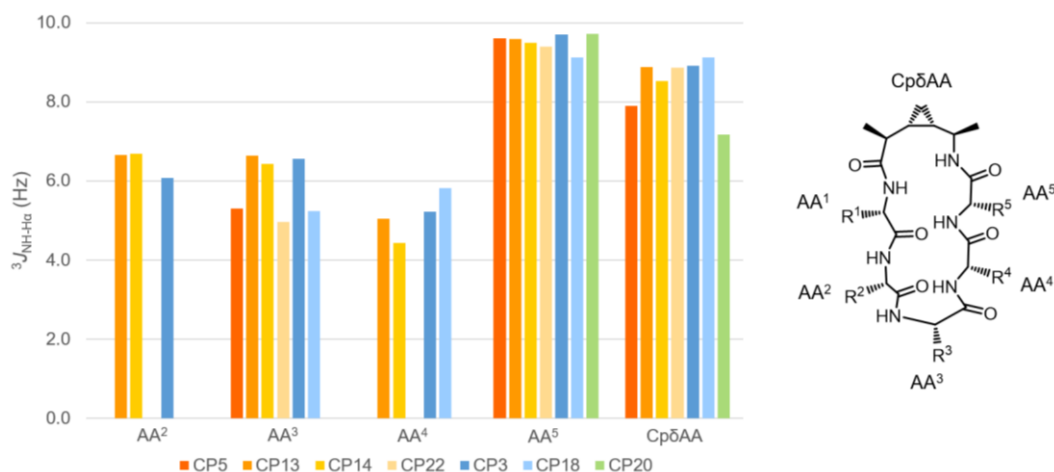


Figure 1-16. CDCl $_3$ 中の $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ 解析結果
(600 MHz, Bars with no data are either singlet peak or overlapped.)

以上 NMR による解析結果を総合すると、**CP6**, **CP7** のような例外はあるものの、 α,δ -diMe-シクロプロパン δ -アミノ酸を導入した環状ペプチドは、アミノ酸配列や膜透過性、溶媒環境に関係なく、共通した“閉じた”主鎖配座をとっていることが示された。

第5節 CD による三次元構造解析

CD スペクトルを測定することで、環状ペプチドの主鎖配座が共通しているのかを確認した。Fairlie らは、異なる濃度の MeCN や SDS を添加したリン酸バッファー中の CD スペクトルを測定することで、異なる溶媒中でも環状ペプチドの主鎖配座が変化しないことを示している⁴³。

MeCN 中の CD スペクトル測定結果を Figure 1-17 に示す。環状ペプチドによって縦軸（分子橢円率）の大きさは異なるものの、200 nm 付近で負の極大、220 nm 付近で正の極大をもつ特徴的なスペクトルを示した。このスペクトルは、一般的な α ヘリックスや β シートを示すスペクトルとは大きく異なり、環状ペプチドが何らかの二次構造をとっていることが示されるものではなかった。しかし、スペクトルの傾向が概ね一致していることから、環状ペプチドの主鎖配座は共通したものだと考えられる。

CP6 および CP7 は、他のペプチドと比較して負の極大が長波長側にわずかにシフトしている。これは、DMSO- d_6 中の NMR 解析結果において CP6 と CP7 が他のペプチドとは異なる結果を示したことと一致する。すなわち、CD スペクトルからも CP6 と CP7 は“閉じた”配座とは異なっている可能性が示唆された。

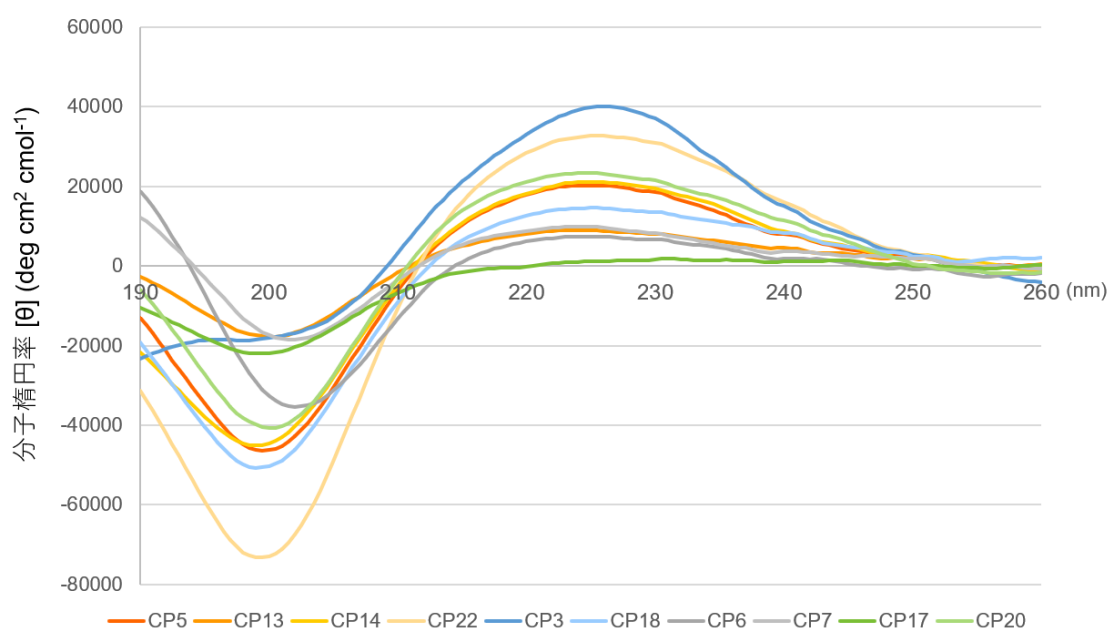


Figure 1-17. CD スペクトル測定の結果 (MeCN, 0.1 mM, 20°C)

第6節 MD シミュレーションによる三次元構造解析

溶液中でのより詳細な三次元構造を明らかにするため、分子動力学 (MD) シミュレーションによる解析を行った。2 種のシミュレーションを行い、一つは GROMACS⁴⁴ を用いて NMR 情報をベースとした三次元構造を算出した。もう一つは REST/REUS 法を用いた MD シミュレーション⁴⁵ により、水中および脂質二重膜中におけるペプチドがとりうる主鎖配座を予測した。

1. GROMACS

NMR 解析で得られた ROE 相関をもとにした三次元構造を、GROMACS により算出した。6 種のペプチド (CP5, CP22, CP3, CP18, CP17, CP20) を対象に、観測された遠距離 ROE 相関および CpδAA ユニット上の ROE 相関を拘束条件として、DMSO 中と CHCl₃ 中での三次元構造を計算した。ただし計算の都合上、アジド基はニトリル基に変更して計算した。クラスター分析により、算出された 1001 個の三次元構造をクラスタリングし、このうち三次元構造数が最も多い主クラスターの中心構造を抽出した⁴⁶。

各ペプチドのクラスター数と主クラスターの三次元構造数を Table 1-5 に示す。ROE 相関に基づいた距離拘束条件が強く作用した結果、ほとんどのペプチドにおいて得られた三次元構造は限られた数のクラスターに分類され、全構造の 99%以上が単一の主クラスターに含まれていた。遠距離 ROE 相関がほぼ観測されなかった CHCl₃ 中の CP17 および CP20 については、他のペプチドと比較してクラスター数がやや多かったものの、それでも両者とも全三次元構造の 3 分の 2 以上が主クラスターに含まれていた。この結果は、溶液中において、これらのペプチドが特定の三次元構造を優先的に形成していることを示している。以上より、各ペプチドにおける主クラスターの中心構造は、NMR 解析に基づいて推定される溶液中での代表的な三次元構造、すなわち最も存在確率の高い構造であるとみなすことができる。

		遠距離 ROE相関数	クラスター数	主クラスター	
				クラスターNo.	三次元構造数
DMSO	CP5	9	1	#1	1001
	CP22	2	5	#2	997
	CP3	6	1	#1	1001
	CP18	2	4	#1	987
	CP17	3	3	#2	999
	CP20	9	1	#1	1001
CHCl ₃	CP5	7	2	#1	1000
	CP22	8	2	#2	1000
	CP3	5	1	#1	1001
	CP18	4	2	#2	1000
	CP17	—	42	#8	954
	CP20	1	19	#10	674

Table 1-5. 各ペプチドの遠距離 ROE 相関数とクラスター数、主クラスターの詳細

ペプチドごとの DMSO 中と CHCl₃ 中の中心構造の重ね合わせを Figure 1-18 に示す。いずれのペプチドも、シクロプロパンと向かいのアミノ酸が近接した“閉じた”主鎖配座をとっていた。とくに、**CP5** の主鎖重原子の RMSD 値は 0.363 Å であり、DMSO 中と CHCl₃ 中の主鎖配座がほぼ同一であることが確認できた (Figure 1-18a)。さらに、膜透過性に約 100 倍の差がある **CP5** と **CP20** の中心構造を、それぞれの溶媒で重ね合わせた (Figure 1-19)。その結果、DMSO 中での RMSD 値は 0.206 Å と非常に小さく、両者の主鎖配座がほぼ同一であることが確認された。CHCl₃ 中においても、両者は類似の主鎖配座であった (RMSD = 1.05 Å)。

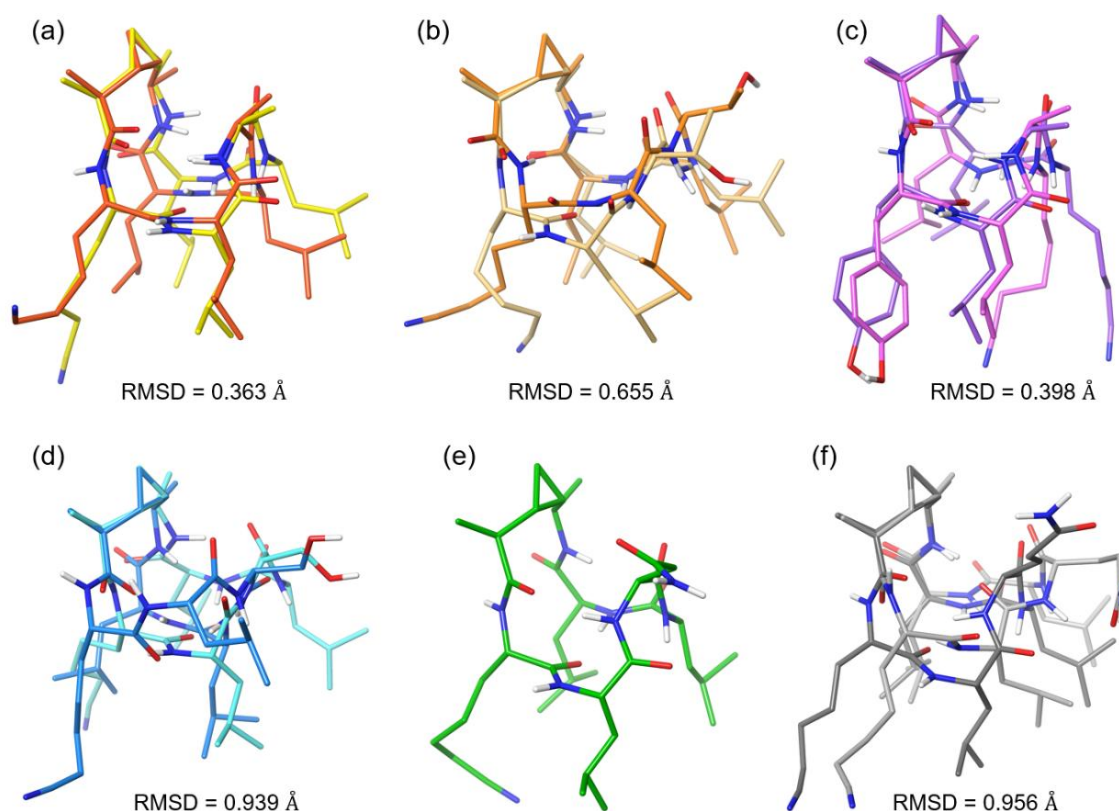


Figure 1-18. 中心構造の重ね合わせ (a) **CP5** (DMSO: orange, CHCl₃: yellow)、(b) **CP22** (DMSO: light orange, CHCl₃: light yellow)、(c) **CP3** (DMSO: pink, CHCl₃: purple)、(d) **CP18** (DMSO: blue, CHCl₃: light blue)、(e) **CP17** (DMSO: green)、(f) **CP20** (DMSO: gray, CHCl₃: light gray) (calculated using GROMACS ver. 2024.3; Force field, CHARMM36; Solvent, DMSO or CHCl₃; ROE correlations, < 5 Å; MD run, 100 ns.)

Ramachandran plot により、これら中心構造の主鎖二面角を比較したところ、**CP18** の DMSO 中や **CP20** の CHCl₃ 中のような例外が一部あるものの、各アミノ酸残基の二面角プロットは同一の傾向を示した (Figure 1-20, Table S6, S7)。さらに、NMR 解析で求めた $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ の値から、以下の Eq 1⁴⁷ を用いて主鎖二面角 φ を導いた (Table S8, S9)。

$$^3J_{\text{NH-H}\alpha} = 7.13 \cos^2(\text{Phi} - 60) - 1.31 \cos(\text{Phi} - 60) + 1.56 \quad (\text{Eq 1})$$

ただし、Cp δ AA ユニットの $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ 値は C γ -C δ -N-C(O)の二面角に対応し、Eq1 から正確な ϕ を導くことはできないため表からは除外した。中心構造の主鎖二面角 ϕ と Eq1 から導いた ϕ を比較した結果、両者に大きな違いはなく、二面角 ϕ の実測値と計算値は類似していた。以上の結果から、シクロプロパン δ -アミノ酸を導入することで、溶媒環境や膜透過性に関係なく、共通する“閉じた”主鎖配座に制御されることが改めて明らかとなった。

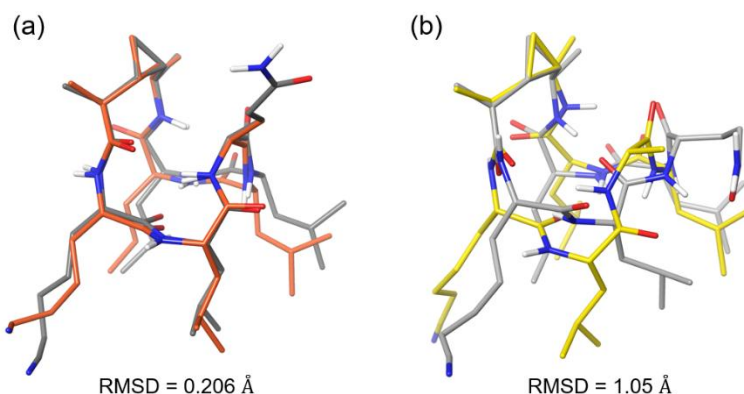


Figure 1-19. **CP5** と **CP20** の中心構造の重ね合わせ (a) in DMSO (**CP5**: orange, **CP20**: gray)、(b) in CHCl₃ (**CP5**: yellow, **CP20**: light gray) (calculated using GROMACS ver. 2024.3; Force field, CHARMM36; Solvent, DMSO or CHCl₃; ROE correlations, < 5 Å; MD run, 100 ns.)

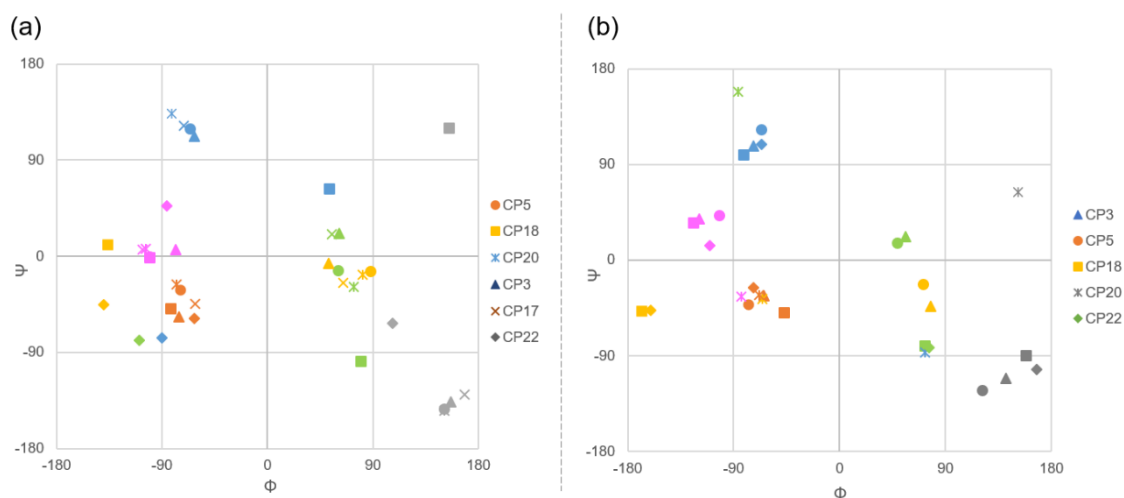


Figure 1-20. Ramachandran plots (a) in DMSO、(b) in CHCl₃
(AA¹: blue, AA²: green, AA³: yellow, AA⁴: orange, AA⁵: pink, Cp δ AA: gray)

NMR 解析や CD 測定で異なる配座をとっていることが示唆された **CP6** と **CP7** に関しても、同様の条件で三次元構造を計算した (Table 1-6, Figure 1-21)。 **CP6** の DMSO 中の条件ではクラスター数が多かったものの、全三次元構造の 3 分の 2 以上が主クラスターに含まれていた。それ以外は、全構造の 99%以上が主クラスターに含まれていた。また、主クラスターの中心構造

を比較すると、CHCl₃ 中では **CP6**, **CP7** とともにシクロプロパンと向かいのアミノ酸が近接した“閉じた”配座をとっていた。一方、DMSO-*d*₆ 中の ROE 相関は観測できなかったため、DMSO 中は距離拘束条件なしで計算した結果、CHCl₃ 中とは異なり、開いたような配座が得られた。対照実験として、高い膜透過性を示した **CP5** についても、DMSO 中と CHCl₃ 中ともに距離拘束がない条件で計算したところ、“閉じた”配座が得られた。これらの配座は計算によって得られた推定配座にすぎないが、**CP5** とは異なる配座が得られたことから、**CP6** と **CP7** は DMSO 中で“閉じた”配座をとっていない可能性が示唆された。

		遠距離 ROE相関数	クラスター数	主クラスター	
				クラスターNo.	三次元構造数
DMSO	CP6	—	29	#20	622
	CP7	—	3	#3	993
CHCl ₃	CP6	3	6	#1	995
	CP7	4	6	#1	993

Table 1-6. **CP6** および **CP7** の遠距離 ROE 相関数とクラスター数、主クラスターの詳細

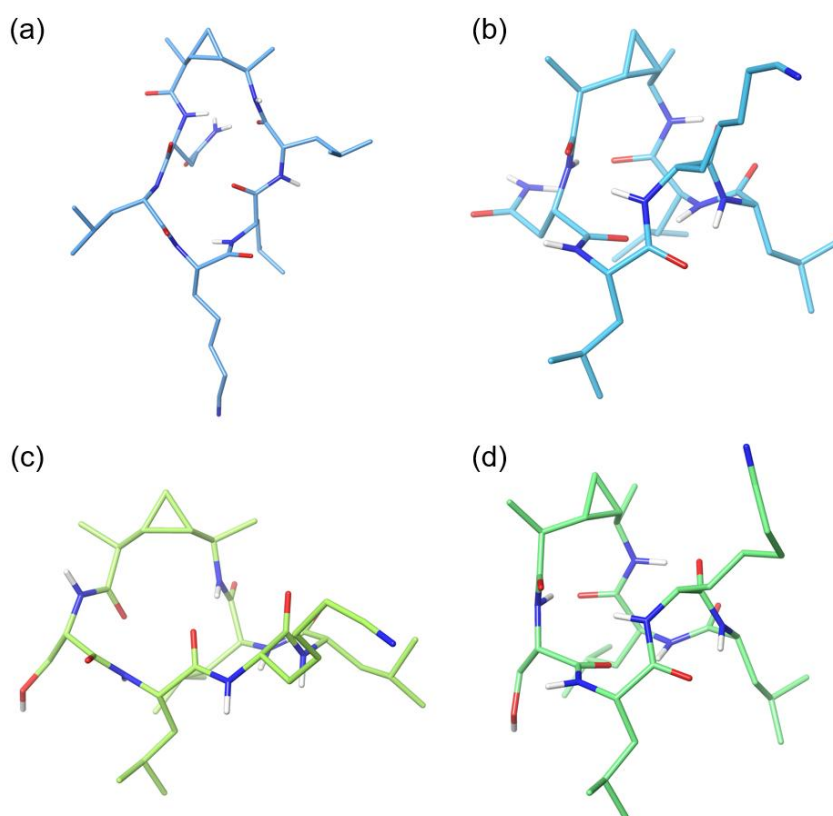


Figure 1-21. **CP6** および **CP7** の推定三次元構造 (a) **CP6** in DMSO、(b) **CP6** in CHCl₃、(c) **CP7** in DMSO、(d) **CP7** in CHCl₃ (calculated using GROMACS ver. 2024.3; Force field, CHARMM36; Solvent, DMSO or CHCl₃; ROE correlations, < 5 Å; MD run, 100 ns.)

2. REST/REUS 法を用いた MD シミュレーション

東京科学大学の杉田先生にご協力いただき、脂質二重膜や溶媒まで精密に再現された系の MD シミュレーションを行い、膜透過過程におけるペプチドの動きを解析した⁴⁸。**CP5**, **CP18**, **CP20** の 3 種を対象に、水中と膜中心での配座アンサンブルを取得し、主鎖二面角の主成分分析 (PCA) を解析した。これら 3 種は、同じ位置のアミノ酸残基が Ala/Ser/Gln という構造の違いがあり、膜透過性には 10 倍もしくは 100 倍もの差が見られるが、主鎖配座はいずれも“閉じた”形をとっていた。

解析結果を Figure 1-22 に示す。水中において、全てのペプチドが多様な主鎖配座をとっており、いずれも 3 つの大きなクラスター (A, B, 5) が存在していた。このうち Cluster 5 はシクロプロパンと向かいのアミノ酸が近接した“閉じた”主鎖配座で、DMSO-*d*₆ 中の NMR 解析結果と矛盾しない配座だった。一方、Cluster A と B はどちらも NMR 結果とは異なる開いた配座をとっていた。このように異なる配座が算出されたのは、水中か DMSO 中かという溶媒の違いが大きな要因だと考えられる。注目すべきは、膜透過性に 10 倍ずつの差のあるこれら 3 つのペプチド間で、主鎖配座分布がほとんど一致していたことである。これは、NMR 解析において DMSO-*d*₆ 中の主鎖配座が同一だった結果とよく一致する。

膜中心では、いずれのペプチドも Cluster 1 と 2 が共通して存在し、これらクラスターの存在比率は過半数を超えていた。このうち Cluster 1 は CDCl₃ 中の NMR 解析結果と矛盾しない“閉じた”主鎖配座をとっていた。高膜透過性の **CP5** は 2 つのクラスター (Cluster 1 と 2) に収束していた一方、**CP18** は Cluster 3 と 4、**CP20** は Cluster 5 と 6 も存在しており、多様な配座分布が見られた。この結果は、第 4 節で示した NMR 解析の結果、すなわち「アミノ酸配列や膜透過性、さらには溶媒環境の違いに依存せず、いずれのペプチドも共通した“閉じた”主鎖配座をとる」という実験結果とは、一見すると矛盾しているように見える。しかし、この両者の違いは、観測している時間スケールの差に起因すると考えられる。NMR 解析によって得られる構造情報は、数十時間という比較的長い時間スケールにわたって存在する多様な構造状態を平均化した結果として観測されるものである。一方、MD シミュレーションでは、ナノ秒という極めて短い時間スケールにおける分子運動を連続的に追跡することができる。そのため、NMR では平均化されて観測されないような非常に速い三次元構造の揺らぎが、MD シミュレーションでは配座分布の多様性として可視化された可能性があると考えられる。

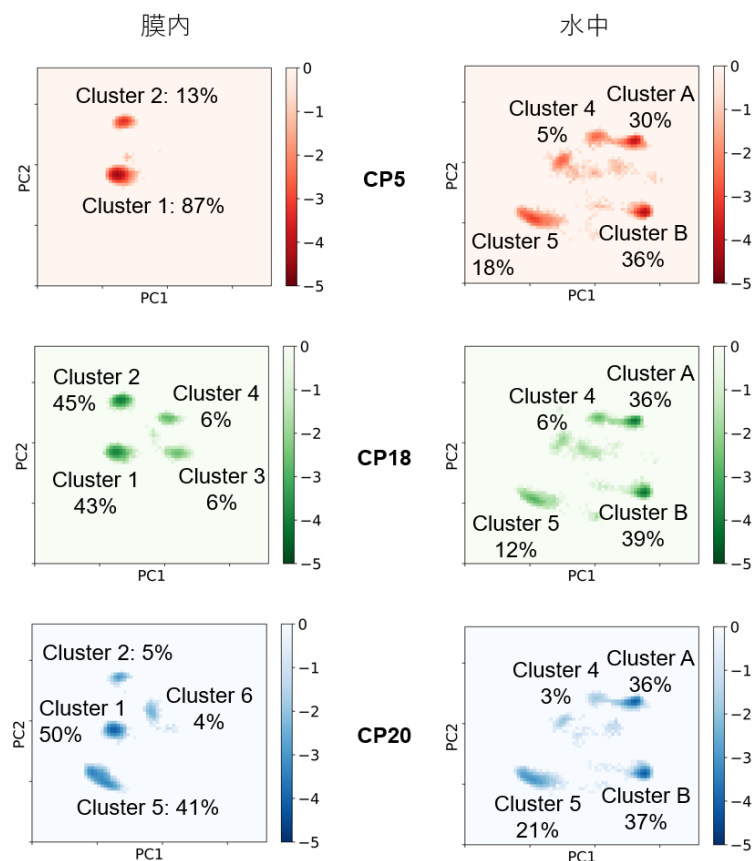


Figure 1-22. 主成分分析による膜内および水中の配座分布 (calculated using AMBER24; Force field, LIPID17, Amber10:EHT, TIP3P; Lipid membrane, POPC with 40% cholesterol; MD protocol, REST/REUS method; MD run, 500 ns (last 300 ns used for analysis).)

さらに、水中・膜内それぞれの環境下における、ペプチドと水分子との水素結合数を解析した (Table 1-7)。水中では 3 つのペプチド間で水素結合数にあまり差はなかったが、膜内では明確な違いが見られた。膜透過性をほとんど示さなかった **CP20** は膜内における水素結合数が他のペプチドより多く、十分に脱水和されていないことが示された。膜内における **CP20** のトラジェクトリから、**CP20** が水分子と相互作用していない状態と、多くの水分子を膜外から引き込むような状態を行き来していることが確認できた (Figure 1-23)。とくに、グルタミン側鎖のアミド基とアジド基が水分子と強く相互作用していることが分かった。このように、**CP20** は膜内でも十分に脱水和できておらず、膜の中心を越えるためのペナルティが非常に高いことが示唆された。また、**CP20** が膜内で多様な配座分布をとるという MD シミュレーション結果と、CDCl₃ 中で“閉じた”配座をとるという NMR 解析結果との不一致は、ペプチド周囲の水分子の有無が関係しているとも考えられる。

	CP5	CP18	CP20
膜内	1.69	1.71	3.19
水中	10.69	11.94	10.69

Table 1-7. ペプチドと水分子との水素結合数

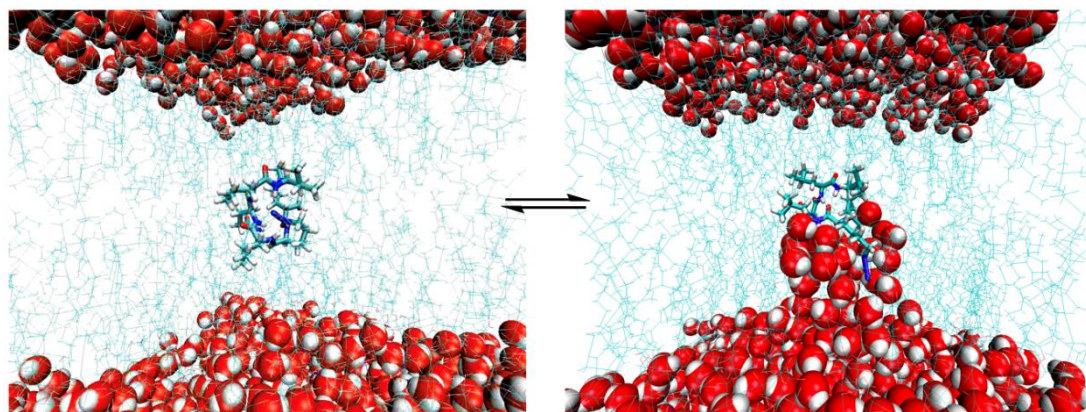


Figure 1-23. 膜内における **CP20** のスナップショット (calculated using AMBER24; Force field, LIPID17, Amber10:EHT, TIP3P; Lipid membrane, POPC with 40% cholesterol; MD protocol, REST/REUS method; MD run, 500 ns (last 300 ns used for analysis).)

以上の結果から、水中・膜内それぞれの環境下において、3つのペプチド間で主鎖配座が共通していることが示された。さらに、膜内における側鎖構造と水分子との相互作用のしやすさが、膜透過性の違いの主要因である可能性が示された。

・ REUS：レプリカ交換アンブレラサンプリング (replica exchange umbrella sampling)

MD シミュレーションにおける自由エネルギー計算手法の一種で、エネルギー障壁を超える困難を克服する目的で複数の傘ポテンシャル（制約条件）を導入し、それぞれの条件で並列にシミュレーションを実行する。隣接する条件間で構造を交換することでサンプリング効率が向上する。

・ REST：溶質温度調整レプリカ交換 (replica exchange with solute tempering)

溶質部分（ペプチド）の温度を人為的に高め、溶媒部分を通常の温度に保つことで溶質の立体配座探索を効率化する。やや起きにくいペプチド主鎖の変化などのサンプリング効率が向上する。

・ REST/REUS

溶質に関する効率的な立体配座探索（REST）と、傘ポテンシャルを用いた自由エネルギー計算（REUS）の両方の利点を得られる。

第7節 まとめ

NMR および MD シミュレーション解析結果から、Cp δ AA を導入した環状ペプチドは、アミノ酸配列や膜透過性、溶媒環境にかかわらず、共通して“閉じた”主鎖配座をとることが明らかとなった。このような適切な主鎖配座制御が、膜透過性の向上に不可欠であることも示された。さらに、膜透過性の違いは、側鎖構造と水分子との相互作用のしやすさに起因することが示唆された。

第2章 膜透過性に対するアミノ酸側鎖の影響の調査

第1節 設計

第1章の結果から、Cp δ AAを導入した環状ペプチドはいずれも共通して“閉じた”主鎖配座をとることが明らかとなり、側鎖構造の性質の違いが膜透過性の差として現れていることが示された。すなわち、Cp δ AA含有環状ペプチドライブラリーを用いることで、主鎖配座の影響を排除した上で、アミノ酸側鎖の化学的性質や位置、さらには分子全体の疎水性が膜透過性に与える影響を、より直接的に評価できるのではないかと考えた。そこで本章では、新たな環状ペプチド群(CP25–CP48)を含むCp δ AA含有環状ペプチドライブラリーを用いて、アミノ酸側鎖と膜透過性との関係性をより詳細に評価することを目指した。第1章で設計したライブラリーのアミノ酸配列をふまえ、新たな環状ペプチド群(CP25–CP48)は、側鎖の位置やCLogPを適宜変更した(Table 2-1)。具体的には、第1章でのCP6, CP7の結果もふまえ、親水性アミノ酸の導入位置による影響を調べるため、アミノ酸はSerに固定し、その導入位置を一つずつずらした配列を用意した。同時に、水分子と相互作用しうるアジド基を無くし、Serの影響をより直接的に評価できるようにした。また、疎水性アミノ酸のみでCLogP値を4.5–6.5の範囲に広げた配列を設計し、親水性側鎖を含まない配列における膜透過性に対する疎水性の影響も調査する。さらに、主鎖配座の影響についても調査するべく、ペプチド主鎖の柔軟性があがると予想されるGlyを含めた配列も設計した。

CP	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵
CP25	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
CP26	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu
CP27	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu
CP28	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu
CP29	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu
CP30	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser
CP31	Phe	Leu	Ala	Leu	Leu
CP32	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu
CP33	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu
CP34	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu
CP35	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu
CP36	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser
CP37	Ser	Leu	Ser	Leu	Ala
CP38	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser
CP39	Leu	Leu	Ala	Val	Leu
CP40	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu
CP41	Leu	Val	Ala	Ala	Leu
CP42	Leu	Leu	Ser	Val	Leu
CP43	Leu	Leu	Gly	Val	Leu
CP44	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu
CP45	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu
CP46	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu
CP47	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu
CP48	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly

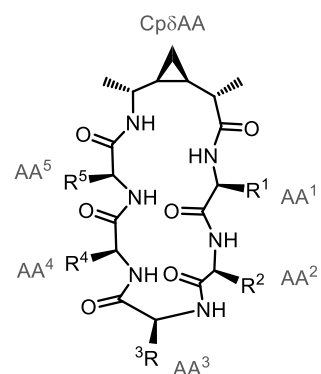
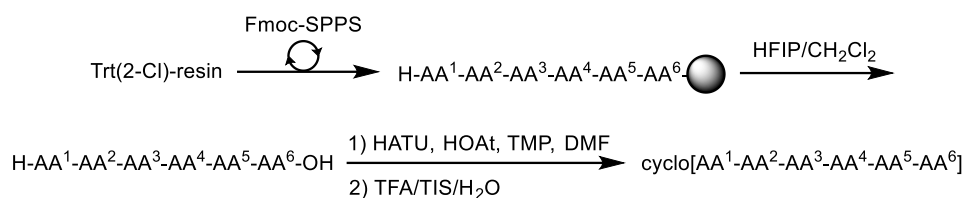


Table 2-1. 環状ペプチド **CP25–CP48** のアミノ酸配列

第2節 環状ペプチドの合成

第1章と同様に、Fmoc 固相合成法により鎖状ペプチドを伸長して樹脂から切り出した後、液相での環化と側鎖保護基の除去を行い、最後に HPLC で精製して目的の環状ペプチドを得た (Scheme 4, Table 2-2)。

Scheme 4. 環状ペプチドの合成



CP	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	AA ⁶	Total yield (%)
CP25	Ala	Leu	Leu	CpδAA	Leu	Leu	45
CP26	Ala	Leu	Leu	CpδAA	Ser	Leu	29
CP27	Leu	Leu	CpδAA	Leu	Ser	Leu	38
CP28	Ser	Leu	Leu	CpδAA	Leu	Leu	55
CP29	Leu	Ser	Leu	CpδAA	Leu	Leu	38
CP30	Leu	Leu	Ser	CpδAA	Leu	Leu	27
CP31	Ala	Leu	Leu	CpδAA	Phe	Leu	37
CP32	Ala	Leu	Leu	CpδAA	Ser	Leu	18
CP33	Leu	Leu	CpδAA	Leu	Ser	Ala	43
CP34	Ser	Ala	Leu	CpδAA	Leu	Leu	42
CP35	Ser	Leu	CpδAA	Leu	Leu	Ala	37
CP36	Leu	Ser	CpδAA	Leu	Leu	Ala	39
CP37	Ser	Leu	Ala	CpδAA	Ser	Leu	33
CP38	Ala	Leu	Ser	CpδAA	Ser	Leu	21
CP39	Val	Leu	CpδAA	Leu	Leu	Ala	51
CP40	Ala	Leu	CpδAA	Leu	Leu	Ala	49
CP41	Ala	Leu	CpδAA	Leu	Val	Ala	43
CP42	Ser	Val	Leu	CpδAA	Leu	Leu	40
CP43	Val	Leu	CpδAA	Leu	Leu	Gly	29
CP44	Leu	Leu	CpδAA	Gly	Leu	Leu	36
CP45	Leu	Leu	CpδAA	Leu	Gly	Leu	48
CP46	Leu	Leu	CpδAA	Leu	Leu	Gly	29
CP47	Gly	Leu	CpδAA	Leu	Leu	Leu	57
CP48	Leu	Gly	CpδAA	Leu	Leu	Leu	26

Table 2-2. 環状ペプチド **CP25–CP48** の合成

第3節 膜透過性の評価

PAMPA による膜透過性評価の結果、14種の環状ペプチドが非常に高い膜透過性 ($-6.0 \leq \text{LogPe}$) を、3種のペプチドが中程度の膜透過性 ($-7.0 \leq \text{LogPe} < -6.0$) を示した (Figure 2-1, Table S10)。新たなペプチド群においても、半数以上のペプチドが膜透過性を有していた。

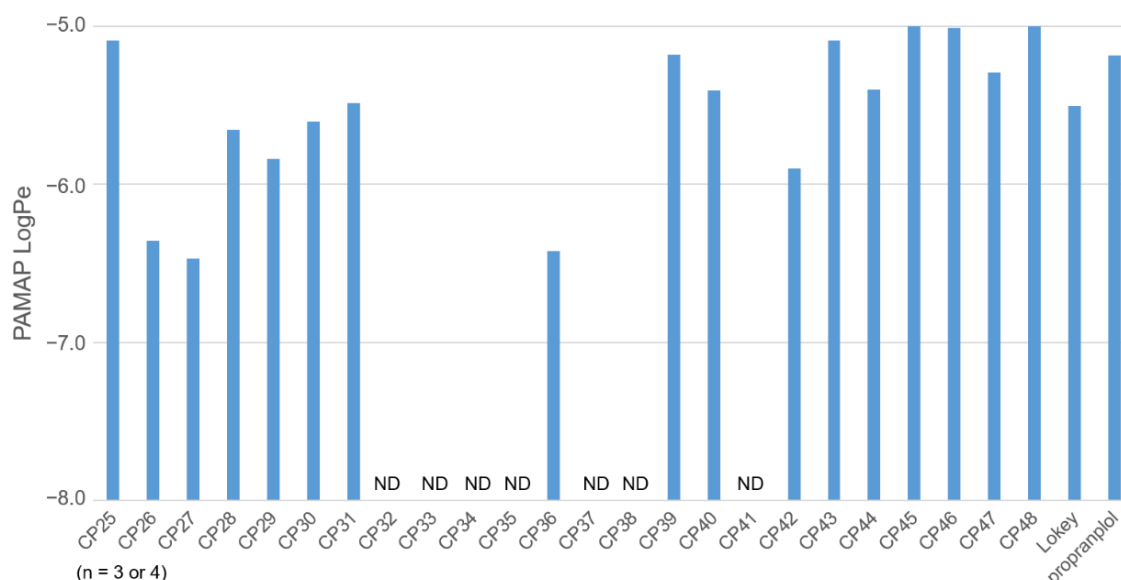


Figure 2-1. PAMPA による膜透過性評価の結果 (ND means below the detection limit.)

LogPe と CLogP との散布図を Figure 2-2 に示す。第1章で合成・評価したペプチド24種も併せてプロットした。全体として、疎水性が高いほど膜透過性が高くなる正の相関の傾向が見られた。疎水性アミノ酸のみからなるペプチド (▲) は、 $\text{CLogP} \geq 5$ だといずれも同程度の高い膜透過性を示したが、 $\text{CLogP}=4.5$ のペプチド (CP41) は膜透過性を示さなかった。この結果は、親水性アミノ酸を含まないペプチドにおいても、膜透過には一定以上の疎水性が必要であることを示唆している。また、第1章と第2章で評価したペプチドを比較すると、 $\text{CLogP}=4.9-6.3$ の領域で違いが見られた。第1章で評価したペプチド (●) のうち、 $\text{CLogP}=4.9-6.3$ かつ $\text{LogPe} < -6.0$ に該当するペプチドはすべて親水性アミノ酸を1つ以上含んでいる。これらは、 CLogP 値が同程度で疎水性アミノ酸のみからなるペプチド (▲) と比較すると、その膜透過性が10分の1以下に低下していた。この結果から、 CLogP だけから膜透過性の差を十分に説明することは難しく、側鎖の性質が膜透過性に大きく影響することが明確になった。

Group A, B, C は構成アミノ酸がそれぞれ同じであるものの、Group A と B は Ser、Group C は Gly の導入位置が異なるペプチド群である。各グループ内で比較すると、Ser/Gly の導入位置の違いによって膜透過性に差が見られた。Group A と C では、Ser/Gly の導入位置が AA¹, AA², AA⁴ 位よりも AA³, AA⁵ 位のペプチドの方がわずかに高い膜透過性を示した。Group B で

は AA⁵ 位に Ser を導入した **CP36** のみが膜透過性を示し、膜透過性の差がより顕著に見られた。すなわち、膜透過性には側鎖の性質だけではなく、その位置も影響することが示された。

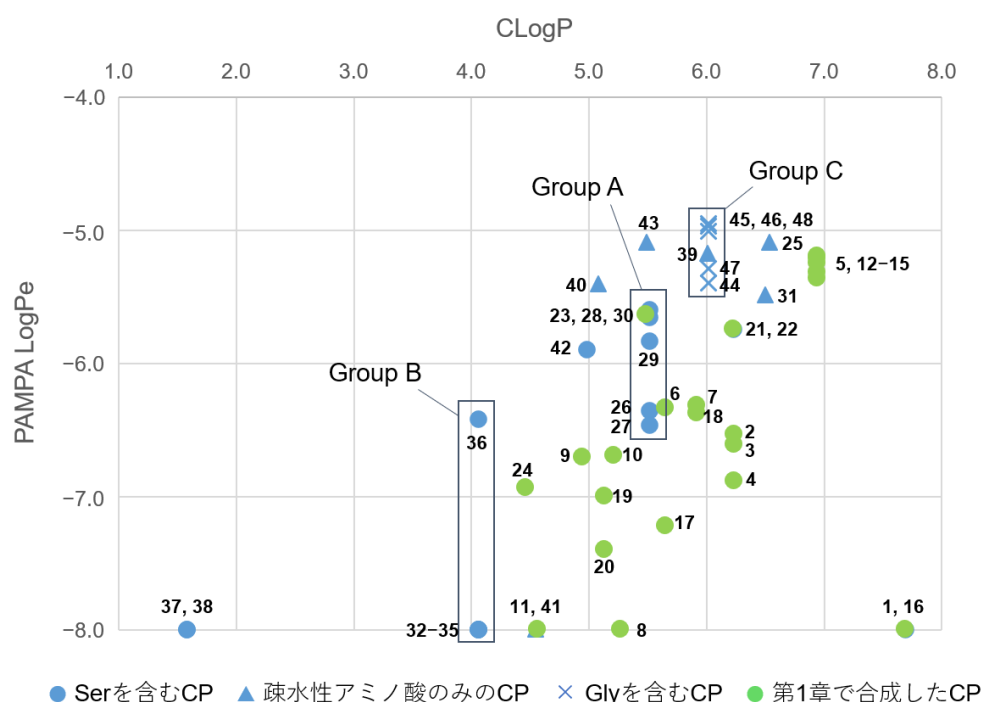


Figure 2-2. PAMPA LogPe と CLogP との散布図 (Group A: [**Ser**, Leu x 4, CpδAA], Group B: [**Ser**, Ala, Leu x 3, CpδAA], Group C: [**Gly**, Leu x 4, CpδAA])

LC-MS における Retention time と LogPe の関係を示した散布図からは、Retention time が長い、すなわち LC 条件下でより疎水性が高いと考えられるペプチドほど、膜透過性が高くなる傾向が確認された (Figure 2-3)。この傾向は、Group A, B, C のように、計算上の CLogP 値が同一であるペプチド群においても認められた。すなわち、同一グループ内であっても Retention time には差が見られ、Retention time が遅いペプチドほど高い LogPe 値を示した。CLogP と LogPe との関係を示した Figure 2-2 と比較すると、Retention time と LogPe との間には、より強い正の相関が存在していた。LC-MS における Retention time は、溶液中での三次元構造やペプチド表面の疎水性部分といった要素を反映する指標であると考えられることから、本研究で評価したペプチドにおいては、Retention time が三次元構造を加味した実質的な疎水性を表すパラメーターとして有効であることが示唆された。

一方で、予測値である CLogP は、ペプチドが実際にとる三次元構造や溶媒との相互作用を十分に反映できておらず、環状ペプチドの実質的な疎水性を完全には表現しきれていないことも示唆された。なお、Retention time と同様に、膜透過性と正の相関を示すパラメーターとして疎水性表面積が報告されている⁴³。本研究における疎水性表面積の比較および考察について

は、本章第 5 節において後述する。

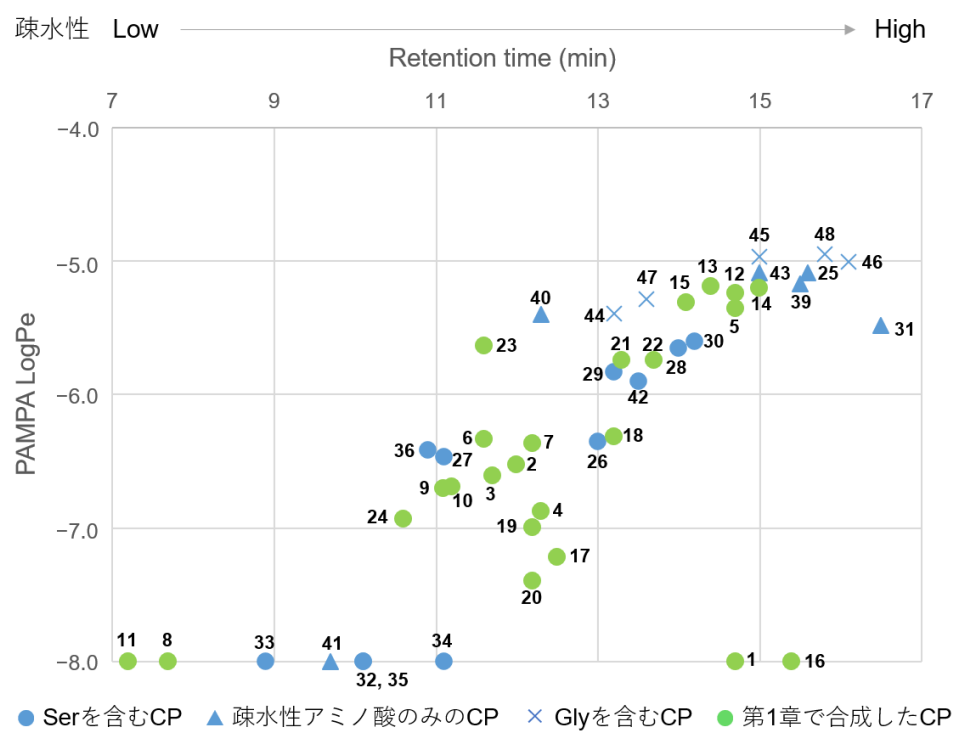


Figure 2-3. PAMPA LogPe と LC-MS retention time との散布図 (LC-MS conditions: 0.1% TFA Distilled water / 0.1% TFA Acetonitrile = 70/30 (0 min) → 5/95 (15 min))

第4節 NMRによる三次元構造解析

Figure 2-4 に示す 10 種のペプチドを対象に、NMR による三次元構造解析を行った。第 1 章第 6 節で明らかにした溶液中の三次元構造に基づく、Cp δ AA 含有環状ペプチドは、側鎖の空間的配置から分子表面を主に三つの面に区別できると考えた。すなわち、(i) AA¹ および AA² 位の側鎖から構成される面、(ii) AA³ 位の側鎖と Cp δ AA から構成される面、ならびに (iii) AA⁴ および AA⁵ 位の側鎖から構成される面である。これら三つの面を形成する側鎖が、ペプチド全体の三次元構造に影響を及ぼすのかを調べるため、Figure 2-2 に示した Group A, B, C の中から、AA¹, AA³, AA⁵ 位に Ser あるいは Gly を導入したペプチド 9 種を選択し、側鎖の性質および配置の違いが三次元構造に与える影響を比較することとした。また比較対象として、疎水性アミノ酸のみからなる **CP25** も選択した。第 1 章と同様に、DMSO-*d*₆ 中と CDCl₃ 中の ROE 相関、VT-NMR 測定、*J* 値について解析した。

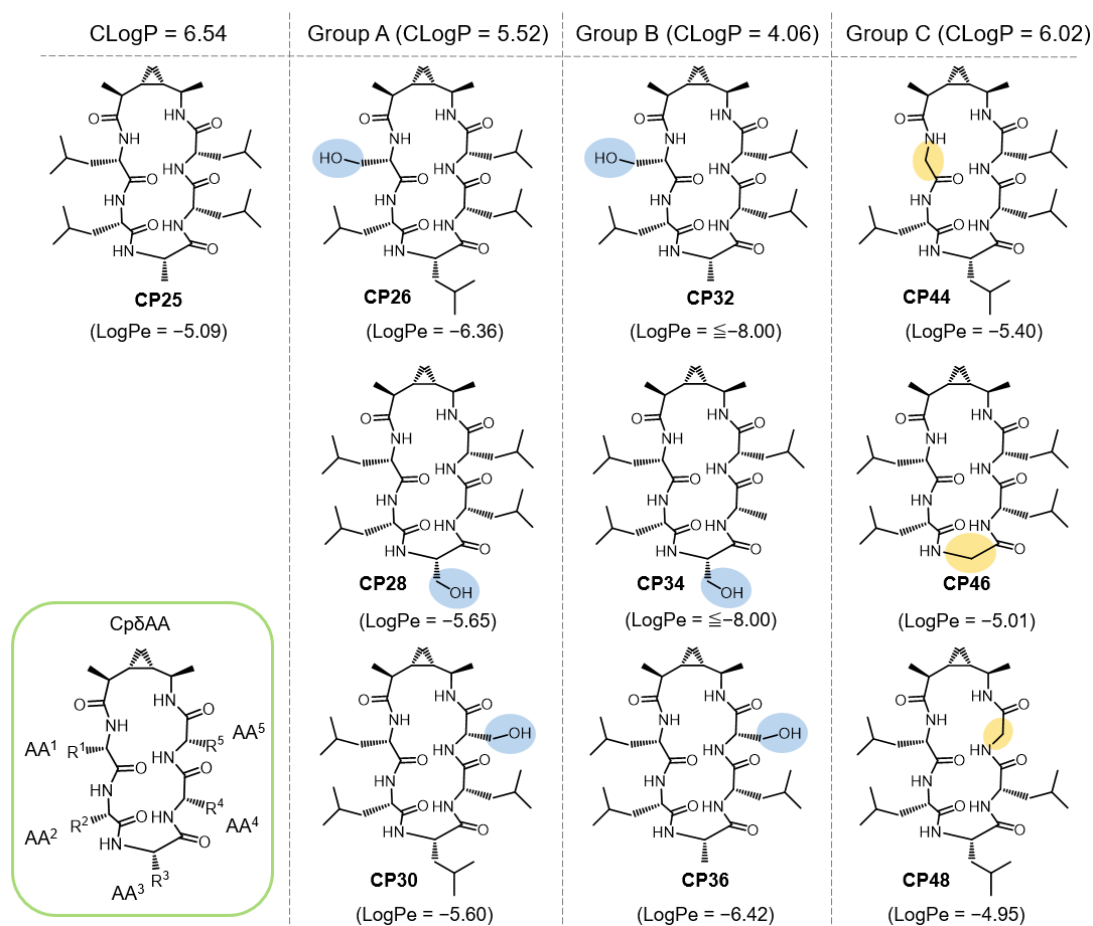


Figure 2-4. NMR 解析を行った環状ペプチドの化学構造

1. ROE 相関

DMSO- d_6 中の解析結果を Figure 2-5 に示す。すべてのペプチドにおいて Cp δ AA ユニット上で複数の ROE 相関を確認でき、Cp δ AA が期待した folded 配座をとっていることが示された。CP25 と Ser を導入した Group A, B の 6 種は、Cp δ AA ユニットの H β , H γ と向かいに位置するアミノ酸残基 (AA³) の H α 間の遠距離 ROE 相関が共通して観測され、側鎖間の相関も見られた。すなわち、これらペプチドの極性環境中の主鎖配座は類似していることが示された。Ser の位置による配座への影響はほとんど見られず、膜透過性の差とも相関はなかった。Gly を導入した Group C において、CP46 は Cp δ AA ユニットと向かいのアミノ酸残基 (AA³) H α 間の遠距離 ROE 相関に加え、複数の ROE 相関が見られた。一方、CP44 と CP48 はそれぞれ 1 つしか遠距離相関が観測できなかった。この結果から、AA¹, AA⁵ 位に Gly を導入することで主鎖配座の柔軟性が増し、極性環境中でコンパクトな配座をとっていない可能性が示唆された。しかし、Group C のペプチドはいずれも非常に高い膜透過性を示しており、極性環境中の主鎖配座は膜透過性に関与していないと考えられる。

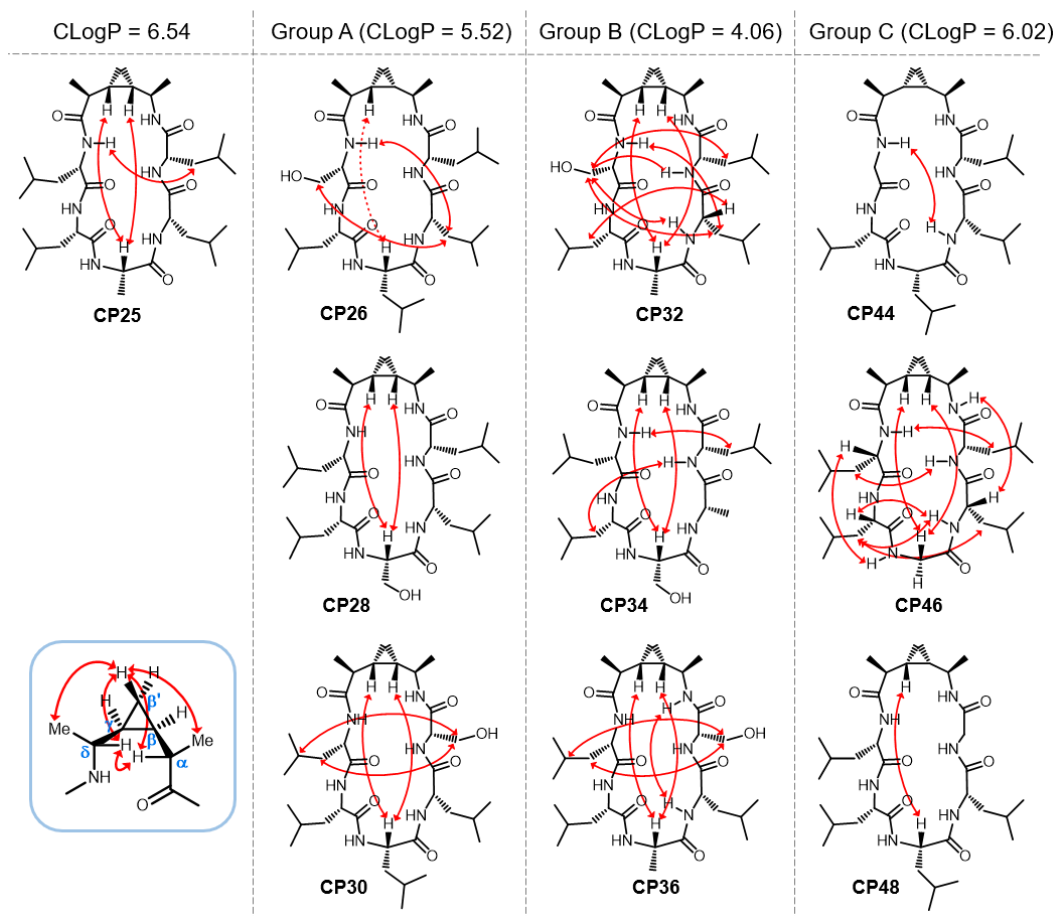


Figure 2-5. DMSO- d_6 中で観測された ROE 相関 (600 MHz)

CDCl₃ 中の解析結果を Figure 2-6 に示す。AA¹ 位に Ser/Gly を入れたペプチド (CP26, CP32, CP44) はいずれも、¹D スペクトルがブロードしており ROE シグナルも全体的に弱かった。そのため、すべてのプロトンの帰属は困難だった。これら 3 種は ¹D スペクトルが全体的にブロードしていたことから、CDCl₃ 中で凝集している可能性が示唆された。第 1 章で NMR 解析したペプチドのうち、AA¹ 位に Asn もしくは Ser が導入された CP6 と CP7 も同様に、CDCl₃ 中の ROE シグナルが弱く、観測できた相関数が少なかった。これらの結果から、AA¹ 位に親水性アミノ酸や Gly を導入すると、NMR による非極性環境中の主鎖配座解析が難しくなることが示された。CP26, CP32, CP44 以外のペプチド 7 種は、いずれも CpδAA と向かいのアミノ酸残基 (AA³) Ha 間の遠距離 ROE 相関に加えて、NH-Hα 間や側鎖間の相関も観測された。ただし、CP28 は ROE シグナルが弱く 1 つの相関しか観測できなかった。また、CpδAA ユニットの ROE 相関から、CpδAA が期待した配座をとっていることが示された。CP34, CP46, CP48 の 3 種は複数の ROE 相関が共通して観測されたが、CP46 と CP48 は高い膜透過性を示した一方、CP34 はほとんど膜透過性を示さなかった。したがって、膜透過性にかかわらず、非極性環境中でも主鎖配座は共通する“閉じた”形をとっていることが示された。

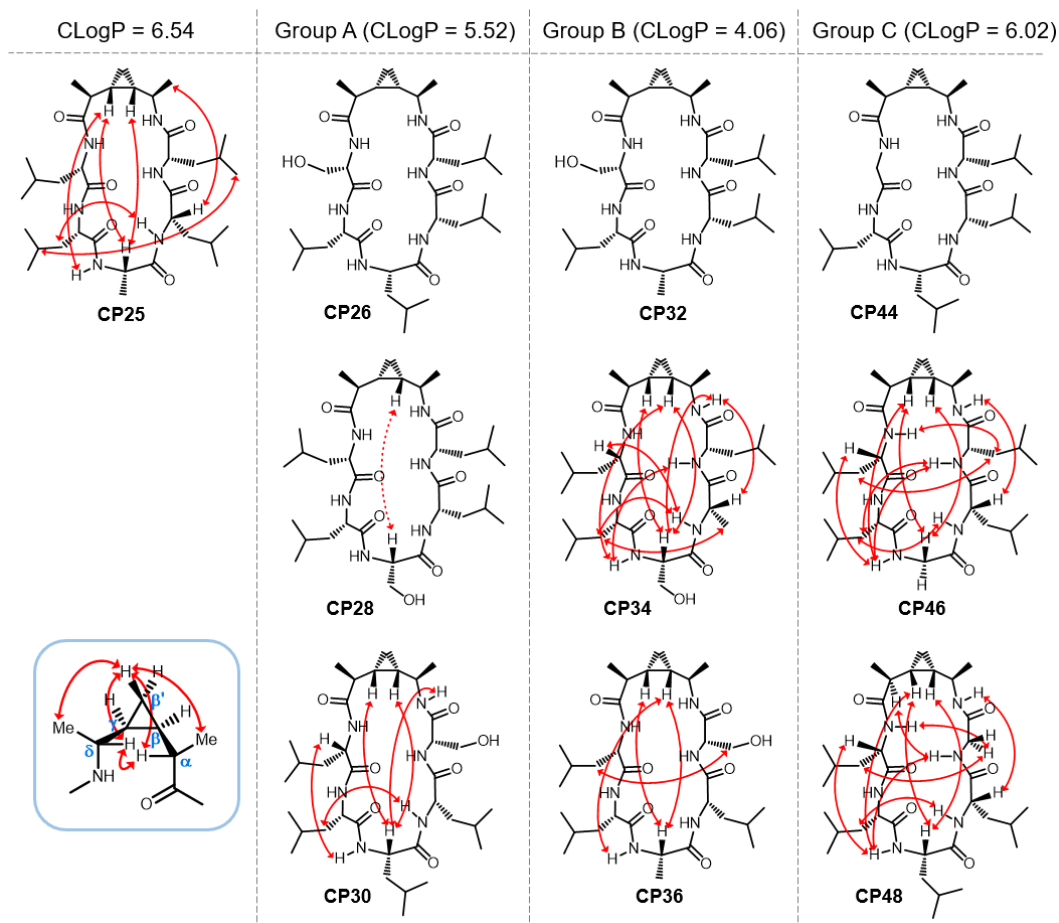


Figure 2-6. CDCl₃ 中で観測された ROE 相関 (600 MHz)

以上、ROE 相関の解析結果から、Ser/Gly の導入位置や膜透過性、溶媒環境にかかわらず、主鎖配座は基本的に“閉じた”形をとっていた。ただし、AA¹ 位に導入されるアミノ酸残基の性質によっては、NMR 測定で主鎖配座を解析できない場合があることが示された。

2. VT-NMR 測定

第 1 章と同様の測定条件で、温度依存的なケミカルシフト変化量 ($\Delta\text{ppb}/\Delta\text{K}$) を解析した。ただし、アミノ酸の帰属ができなかったペプチドは除外した。DMSO-*d*₆ の結果を Figure 2-7 および Table S11 に、CDCl₃ の結果を Figure 2-8 および Table S12 に示す。CDCl₃ 中では、 $\Delta\text{ppb}/\Delta\text{K}$ の傾向がほとんど一致しており、解析できたペプチドの主鎖配座は類似していることが示唆された。一方、DMSO-*d*₆ 中ではバラつきが大きく、すべてのペプチドに共通する傾向は見られなかったものの、**CP26, CP32, CP44** の 3 種、**CP48**、それ以外の 6 種のペプチドの 3 パターンで大まかに分けることができた。**CP26, CP32, CP44** の 3 種は AA¹, AA², AA⁵, CpδAA 位の 4 つのアミド NH が、**CP48** は AA², AA³, CpδAA 位の 3 つのアミド NH が溶媒に露出していた。他 6 種のペプチドにおいては、溶媒に露出しているアミド NH は AA¹, AA³, AA⁵ 位の 3 つであった。第 1 章で解析したペプチドと比較すると、10 種のペプチドすべてで露出しているアミド NH 数は増えていたが、ROE 相関の解析結果から、主鎖は“閉じた”配座をとることが示されている。すなわち、露出しているアミド NH 数の増加は、主鎖配座が異なる形をとっていることを示すものではなく、側鎖の嵩高さが減少したことにより、アミド NH が溶媒和しやすくなったことを示唆している。

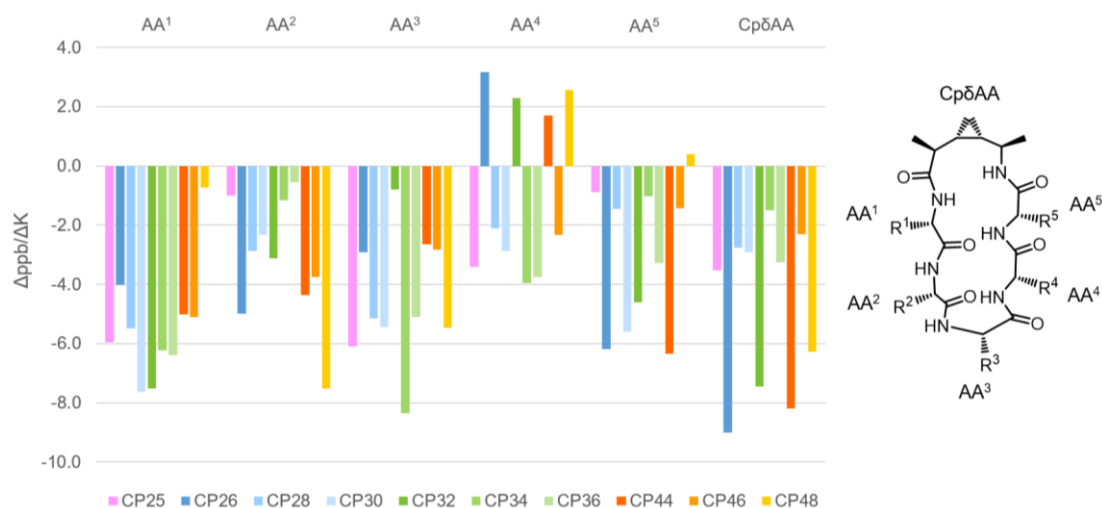


Figure 2-7. DMSO-*d*₆ 中の VT-NMR 測定の解析結果 (600 MHz)

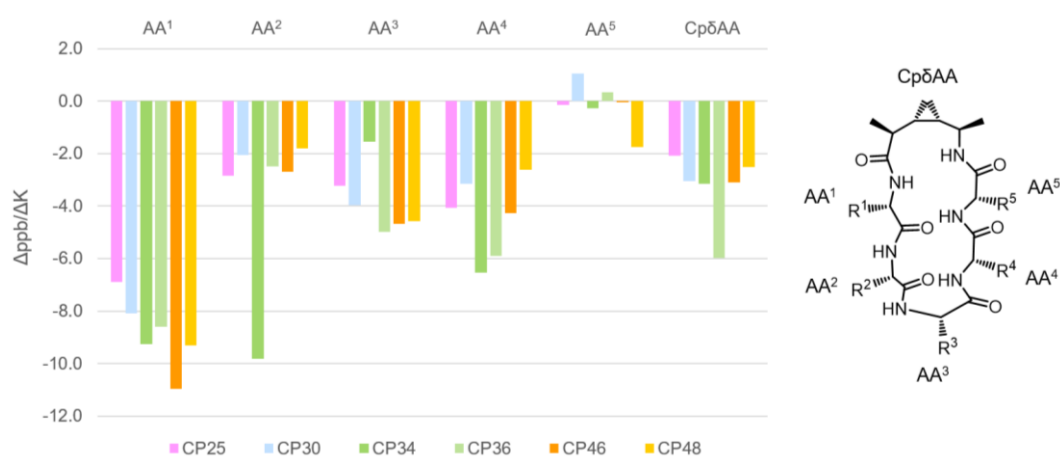


Figure 2-8. CDCl_3 中の VT-NMR 測定の解析結果 (600 MHz)

3. J 値

第1章と同様に、アミノ酸残基の位置ごとでアミド NH のカップリング定数 ($^3J_{\text{NH-H}\alpha}$) を比較した。DMSO- d_6 の結果を Figure 2-9 に、 CDCl_3 の結果を Figure 2-10 に示す。帰属ができなかったペプチドや、singlet や broad として観測されたアミド NH はグラフから除外している (Table S13, S14)。DMSO- d_6 中の傾向は大まかに一致していた一方、 CDCl_3 中では非常に類似した傾向を示した。

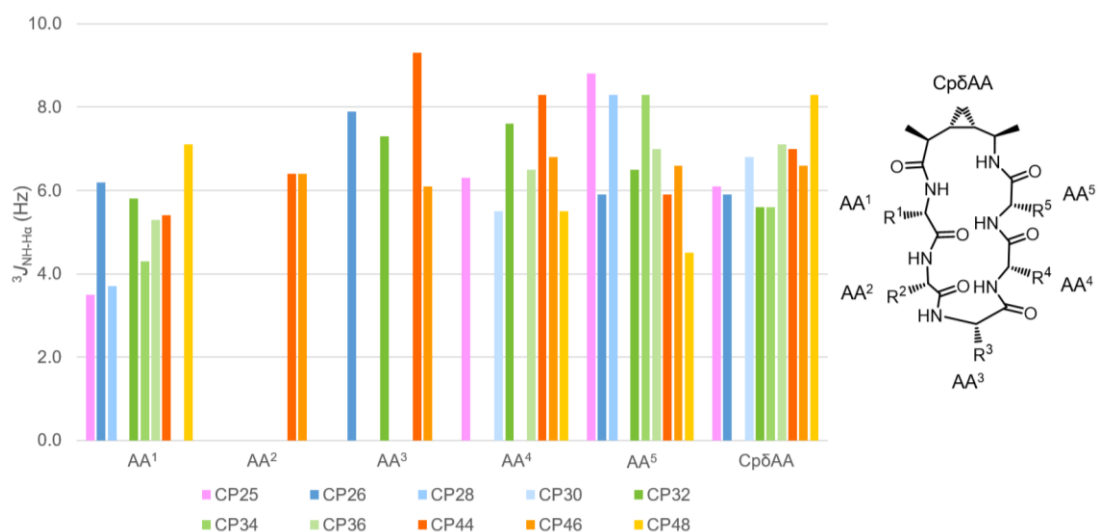


Figure 2-9. DMSO- d_6 中の $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ 解析結果
(600 MHz, Bars with no data are either singlet peak or overlapped.)

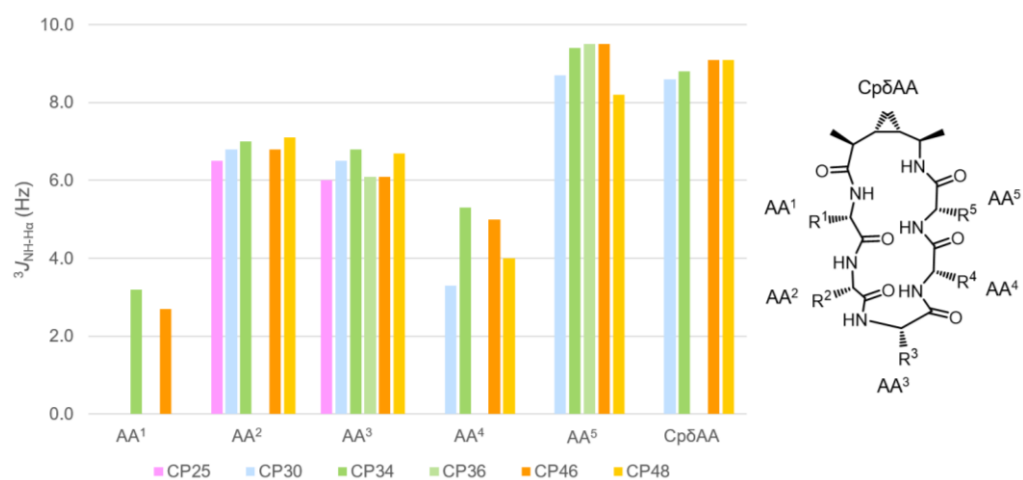


Figure 2-10. DMSO-*d*₆ 中の $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ 解析結果
(600 MHz, Bars with no data are either singlet peak or overlapped.)

以上 NMR による解析結果をまとめると、新たなペプチド群においても、アミノ酸配列や膜透過性、溶媒環境に関係なく、共通した“閉じた”主鎖配座をとっていることが明らかとなった。

第5節 MD シミュレーションによる三次元構造解析

第3節では、LC-MS における Retention time のように、ペプチドの三次元構造を反映した実質的な疎水性を表すパラメーターが、膜透過性と強く相関することが示された。また、そのような指標の一例として、疎水性表面積が報告されていることについても述べた。そこで本節では、CpδAA を含有する環状ペプチドを対象として、疎水性表面積と膜透過性との相関を検証することとした。まず、GROMACS を用いて NMR 情報をベースとした三次元構造を算出し、その三次元構造をもとに疎水性表面積を求めた。

1. NMR 情報に基づいた三次元構造の比較

Ser の位置が異なる **CP26**, **CP28**, **CP30** の3種と、Gly の位置が異なる **CP44**, **CP46**, **CP48** の3種、計6種を対象とした。第1章と同様の計算条件でシミュレーションを実行し、クラスター分析により主クラスターの中心構造を抽出した。ただし、ROE 相関を観測できなかったペプチドは、距離拘束をかけない条件で計算を実行した。

各ペプチドのクラスター数と主クラスターの三次元構造数を Table 2-3 に示す。ほとんどのペプチドで三次元構造は限られた数のクラスターに分類され、全構造の 98%以上が主クラスターに含まれていた。特に、ROE 相関数がほぼ観測されなかった DMSO 中の **CP44**, **CP48** や CHCl₃ 中の **CP26**, **CP28**, **CP44** においても、全構造の 80%以上が主クラスターに含まれており、溶液中で単一の三次元構造をとっていることが示唆された。これらの結果から、第1章と同様に、各ペプチドにおける主クラスターの中心構造は、NMR 解析に基づいて推定される溶液中での代表的な三次元構造であると言える。

		遠距離 ROE相関数	クラスター数	主クラスター	
				クラスターNo.	三次元構造数
DMSO	CP26	3	2	#2	1000
	CP28	2	1	#1	1001
	CP30	4	1	#1	1001
	CP44	1	5	#2	997
	CP46	9	1	#1	1001
	CP48	1	1	#1	1001
CHCl ₃	CP26	—	11	#2	987
	CP28	1	3	#3	993
	CP30	5	1	#1	1001
	CP44	—	27	#17	802
	CP46	10	1	#1	1001
	CP48	10	1	#1	1001

Table 2-3. 各ペプチドの遠距離 ROE 相関数とクラスター数、主クラスターの詳細

中心構造の重ね合わせを Figure 2-11 に示す。高い膜透過性を示した **CP30**, **CP46**, **CP48** の主鎖はいずれも“閉じた”配座をとっていた。DMSO 中と CHCl_3 中の重ね合わせはほぼ同一であり、Ramachandran Plot もよく一致していた (Figure 2-12, Table S15, S16)。また、**CP28** も同様に“閉じた”配座をとっており、DMSO と CHCl_3 の重ね合わせは類似していた (RMSD = 0.85 Å)。しかし、DMSO 中と CHCl_3 中で $\text{Cp}\delta\text{AA}$ のカルボニル $\text{C}=\text{O}$ とアミド NH の向き (Figure 2-11a、ピンクの丸囲み) が大きく異なっており、それに伴って主鎖二面角 φ と ψ の傾向も異なっていた (Table S15, S16)。すなわち、**CP28** は“閉じた”配座をとっているものの、その主鎖は DMSO 中と CHCl_3 中でわずかに異なることが示された。ただし、**CP28** は高い膜透過性を示したことから、このような配座のわずかな違いは膜透過性に影響していないと考えられる。さらに、第 1 章の第 6 節と同様に、NMR 解析で求めた $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ の値から Eq 1 により主鎖二面角 φ を導いたところ、主鎖二面角 φ の実測値と計算値は類似していた (Table S17, S18)。

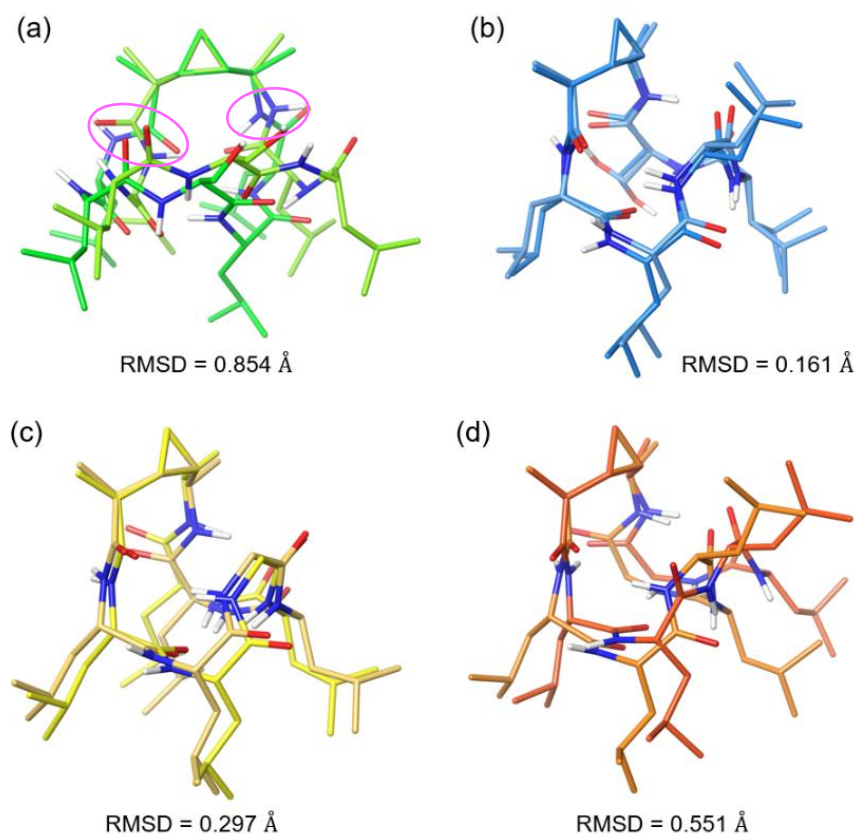


Figure 2-11. 中心構造の重ね合わせ (a) **CP28** (DMSO: green, CHCl_3 : yellow green)、(b) **CP30** (DMSO: blue, CHCl_3 : light blue)、(c) **CP46** (DMSO: yellow, CHCl_3 : beige)、(d) **CP48** (DMSO: orange, CHCl_3 : light orange) (calculated using GROMACS ver. 2024.3; Force field, CHARMM36; Solvent, DMSO or CHCl_3 ; ROE correlations, < 5 Å; MD run, 100 ns.)

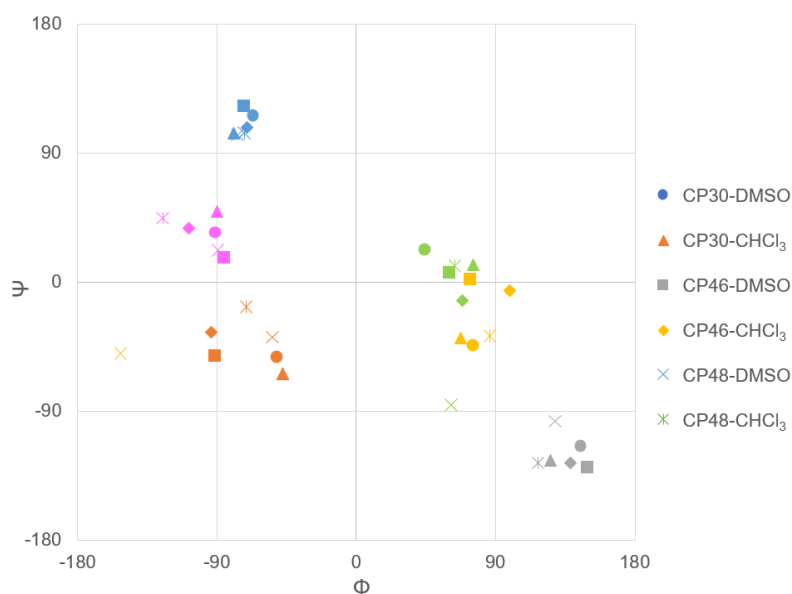


Figure 2-12. Ramachandran plots

(AA¹: blue, AA²: green, AA³: yellow, AA⁴: orange, AA⁵: pink, CpδAA: gray)

観測された ROE 相関数が少ない、もしくは全くなかった **CP26** と **CP44** は様々な配座をとることが推測された (Figure 2-13)。DMSO-*d*₆ 中で **CP26** は 3 つの ROE 相関が観測されたものの、“閉じた”配座とは異なる配座が得られ、とくに AA², AA³, AA⁴ 位の配座に大きな違いが見られた (Table S15)。**CP26** の CHCl₃ 中ではペプチド主鎖がねじれたような配座が得られ、**CP44** は DMSO・CHCl₃ ともに開いた配座が得られた。また、第 1 章で示した **CP6** と **CP7** に関して、DMSO 中では“閉じた”配座をとっていなかった。これらの結果から、AA¹ 位に親水性アミノ酸や Gly を導入したペプチドは、溶媒環境に応じて多様な主鎖配座をとる可能性が示唆された。

以上の結果から、新たなペプチド群においても、溶媒環境にかかわらず主鎖は基本的に“閉じた”配座をとることが示された。AA¹ 位に親水性アミノ酸や Gly を導入すると多様な配座をとる可能性が示されたが、AA³ と AA⁵ 位への Ser や Gly の導入は主鎖配座に大きな違いを与えなかった。

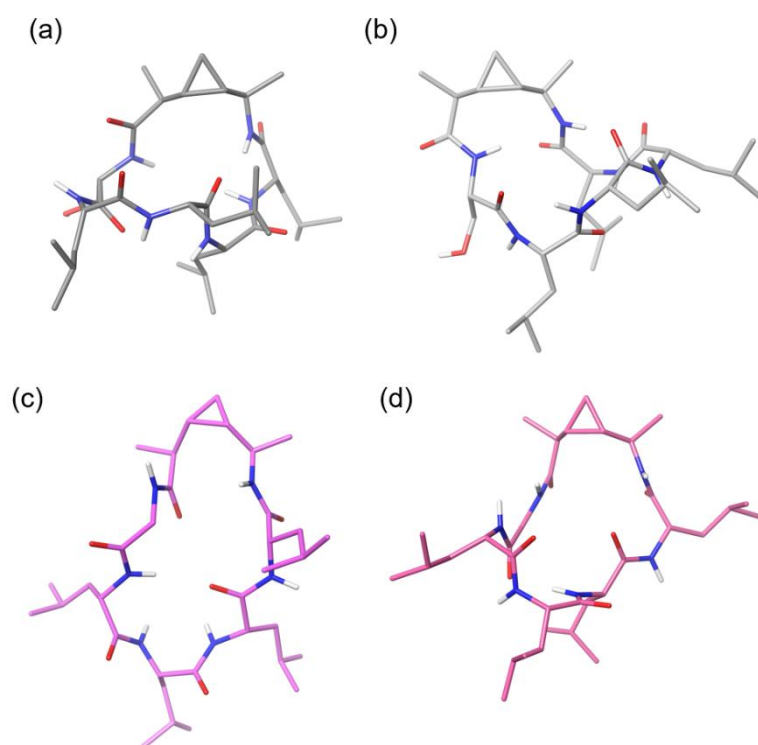


Figure 2-13. **CP26** および **CP44** の推定三次元構造 (a) **CP26** in DMSO、(b) **CP26** in CHCl₃、(c) **CP44** in DMSO、(d) **CP44** in CHCl₃ (calculated using GROMACS ver. 2024.3; Force field, CHARMM36; Solvent, DMSO or CHCl₃; ROE correlations, < 5 Å; MD run, 100 ns.)

2. 疎水性表面積の比較

Fairlie らは、環状ペプチドの膜透過性と疎水性表面積との関係について検討し、最も大きな疎水性表面積 (Largest hydrophobic surface area: Largest HSA) が大きいほど膜透過性が高くなることを報告している⁴³。複数の環状ペプチドシリーズを比較した結果、膜透過性は全体の疎水性 (ALogP) ではなく、Largest HSA と良好な相関を示した。

例えば、N-メチル化位置のみが異なる3種のペプチド (**35–37**) は、ALogP に大きな差がないにもかかわらず、膜透過性には顕著な差が認められた (Figure 2-14)。最も高い膜透過性を示した **37** は、**35** および **36** と比較して Largest HSA が大きかった。また、**35** と **36** は Largest HSA が同程度であるにもかかわらず、膜透過性に約 10 倍の差があり、この差は分子内水素結合の形成の有無に起因すると考察されている。すなわち、疎水性表面積の増大に加えて、分子内水素結合などによってペプチド配座をある程度固定することが、膜透過性の向上に重要であることが示されている。

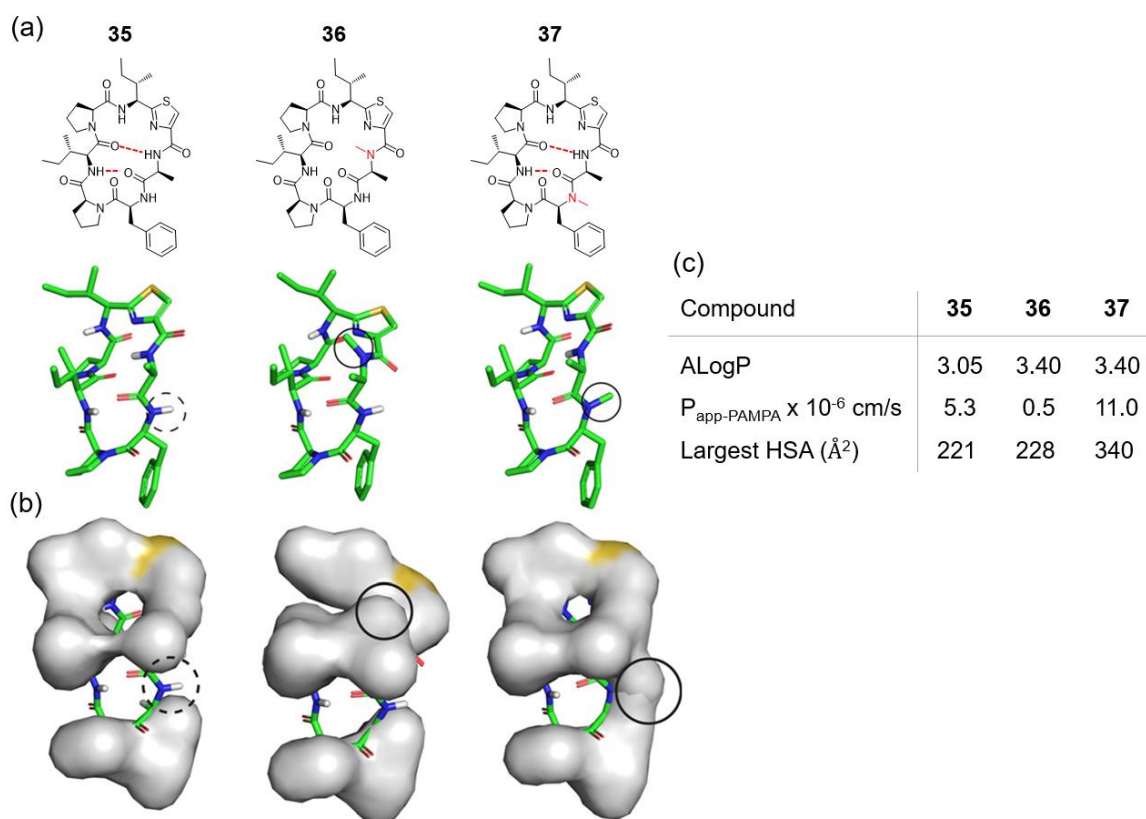


Figure 2-14. 環状ペプチド **35-37** の (a) 構造、(b) 疎水性表面積 (gray)、(c) 物性値

これらの知見を踏まえ、本研究で評価した環状ペプチドについても疎水性表面積の算出を試みた。Fairlie らが用いた計算手法を直接適用することができなかったため、低分子化合物の ADME 物性評価に広く用いられている Macromodel の QikProp プログラムを用いた。GROMACS により得られた DMSO 中および CHCl_3 中の中心構造を用いて疎水性表面積を算出した (Table 2-4)。その結果、第 1 章で評価した **CP5**, **CP18**, **CP20** の 3 種のペプチドについては、疎水性表面積と膜透過性との間に一定の相関が認められた。一方で、第 2 章で評価した 6 種のペプチド間では、疎水性表面積と膜透過性との明確な相関は認められなかった。以上より、疎水性表面積の増大が膜透過性向上に寄与する可能性は示唆されたものの、本研究で用いた計算手法および解析条件においては、疎水性表面積と膜透過性との間に一般的な正の相関を示すには至らなかった。

		CP5	CP18	CP20	CP26	CP28	CP30	CP44	CP46	CP48
CLogP		6.942	5.921	5.134	5.518	5.518	5.518	6.020	6.020	6.020
PAMAP LogPe		-5.36	-6.32	-7.40	-6.36	-5.65	-5.60	-5.40	-5.01	-4.95
疎水性 表面積 ($\text{\AA}^2$)	DMSO	723.1	708.8	661.7	819.9	782.4	845.7	880.3	765.1	844.8
	CHCl_3	739.8	737.8	701.1	833.0	821.8	793.8	877.7	771.5	855.8

Table 2-4. QikProp プログラムにより算出したペプチドの疎水性表面積 (calculated using Maestro 14.0) および物性値

第 6 節 まとめ

第 2 章での実験結果から、AA¹ 位に導入するアミノ酸残基によってはペプチドが多様な配座をとる可能性が示されたものの、溶媒環境にかかわらず、Cp δ AA 含有環状ペプチドは基本的に“閉じた”主鎖配座をとることが明確になった。また、親水性アミノ酸側鎖の性質やその導入位置が膜透過性に大きく影響することが示された。さらに、Cp δ AA 含有環状ペプチドにおいて、三次元構造を加味した実質的な疎水性を表すパラメーターは、CLogP ではなく LC-MS による Retention time であることが示唆された。

第3章 膜透過性と三次元構造との関係性の考察

1. 第1章および第2章のまとめ

($\alpha S, \beta R, \gamma S, \delta R$)-Cp δ AA を環状ペプチドに導入することで、アミノ酸配列や膜透過性、溶媒環境の違いにかかわらず、主鎖配座を同一の“閉じた”形へと制御できることが明確となった。また、アミノ酸側鎖の構造的性質やその導入位置が、膜透過性の違いに影響を与えることが示された。これらの結果をふまえると、膜透過性の獲得には主鎖配座の適切な制御に加え、アミノ酸側鎖の疎水性や位置といった側鎖の最適化が不可欠であることが明らかとなった。

2. Cp δ AA の主鎖配座制御効果

Cp δ AA ユニットの導入により環状ペプチド主鎖を同一の“閉じた”配座へと制御できるという本研究の結果は、環状ペプチドにおける主鎖配座制御の観点から見て、極めて特筆すべきものである。序論で述べたように、膜透過性の向上を目的として、ペプチド主鎖配座の固定化を促すさまざまな構造修飾法がこれまでに報告されている⁹⁻¹³。これらの修飾が有効に機能し、結果として膜透過性が向上した例も知られている^{11,13}。しかし、わずかなアミノ酸配列の変更や溶媒環境の違いに影響されることなく、環状ペプチドの主鎖配座をすべて同一の形に揃えることに成功した報告例は、筆者の知る限り存在しない。これまで、主鎖配座の安定化や固定化を目的とした構造修飾がいくつも検討されてきたものの、その効果は配列や環境条件に大きく依存するのが実情である。

例えば Yudin らは、環状ペプチドの主鎖配座の安定化において分子内水素結合の形成が重要であることを報告している⁴⁹。同論文では、1 残基のみが異なる 3 種の環状ペプチド (**38-40**) の三次元構造が比較されており、わずかなアミノ酸置換にもかかわらず、分子内水素結合の形成パターンおよび主鎖配座が大きく異なることが示されている (Figure 3-1)。さらに、これら 3 種のペプチドはいずれも DMSO 中において複数の配座間で平衡状態にあることが報告されている。また別の例として、主鎖配座の固定化を目的として複数の環構造を導入したペプチド **41** においても、分子内水素結合の形成パターン自体は保持されているものの、溶媒環境の変化に伴ってプロリン残基がフリップし、結果として主鎖配座が変化することが示されている (Figure 3-2)¹²。すなわち、環構造を導入した場合であっても、主鎖配座は必ずしも一義的に固定されるわけではなく、溶媒環境の影響を強く受けることが分かる。これらの先行研究を踏まえると、環状ペプチドの主鎖配座を意図的かつ厳密に制御し、さらに配列や溶媒環境の違いに影響を受けることなく配座を同一に維持させることは、極めて困難であることが明らかである。

このような背景から、本研究の初期段階では、膜を“通る形”と“通らない形”との間に明確な構造的違いが見られるのではないかと想定していた。しかし、Cp δ AA ユニットの導入により、アミノ酸配列や溶媒環境に依存することなく、環状ヘキサペプチドの主鎖骨格が特定の配座へと強く誘導・固定されることが実験的に示された。さらに、MD シミュレーションにおい

ても、水中・膜内環境のいずれの条件下でも共通の主要配座クラスターが観測され、そのクラスターは NMR により決定された配座と矛盾しないものだった。これらの結果は、Cp δ AA が示す主鎖配座制御効果が極めて強固であることを示すものである。

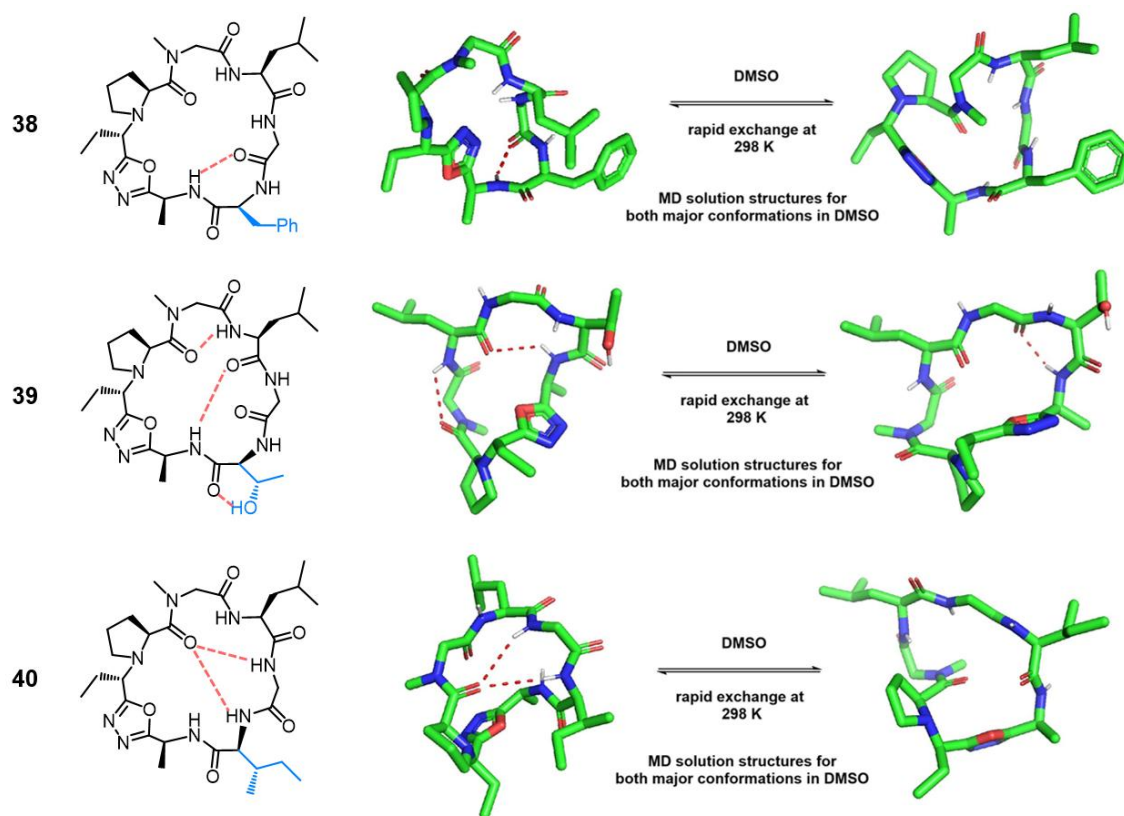


Figure 3-1. 環状ペプチド **38–40** の DMSO- d_6 中の三次元構造

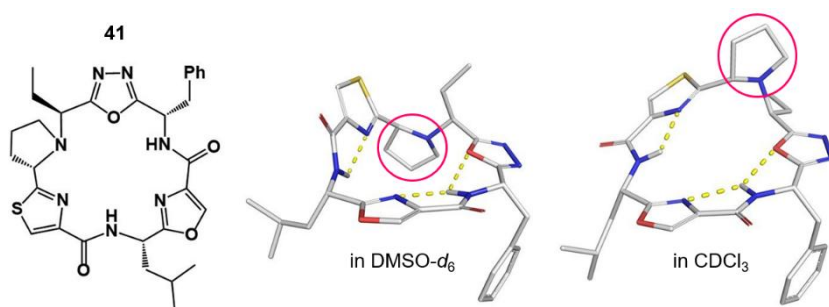


Figure 3-2. 環状ペプチド **41** の DMSO- d_6 中と CDCl₃ 中の三次元構造

3. 極性環境中の主鎖配座と膜透過性との関係

これまで、極性環境中における主鎖配座の違いが、環状ペプチドの膜透過性の差を生み出す主要因であると考えられてきた。例えば Yudin らは、複数のヘテロ環構造を有する環状ペプチドを対象とした研究において、極性溶媒中での主鎖配座および分子内水素結合パターンがペプチドごとに大きく異なり、それらの違いが膜透過性の差として反映されることを報告している¹²。特に、膜透過性が高いペプチド **42** と低いペプチド **43**, **44** との間では、溶媒に露出したアミド NH の数に明確な差が認められており (Figure 3-3)、主鎖配座と水素結合状態が膜透過性を規定する重要な要素であることが示唆されている。

一方で、本研究で評価した CpδAA 含有環状ペプチドでは、極性溶媒中において、すべてのペプチドが類似の主鎖配座をとっていたにもかかわらず、膜透過性には大きな差が見られた。特に、第 1 章で解析したペプチド群では、膜透過性の高低に関係なく、DMSO-*d*₆ 中における溶媒露出アミド NH の数とその位置が完全に一致していた (Figure 1-12)。これらの結果は、主鎖配座や分子内水素結合状態といった主鎖由来の構造的要因のみからは、膜透過性の違いを十分に説明できないことを明確に示している。

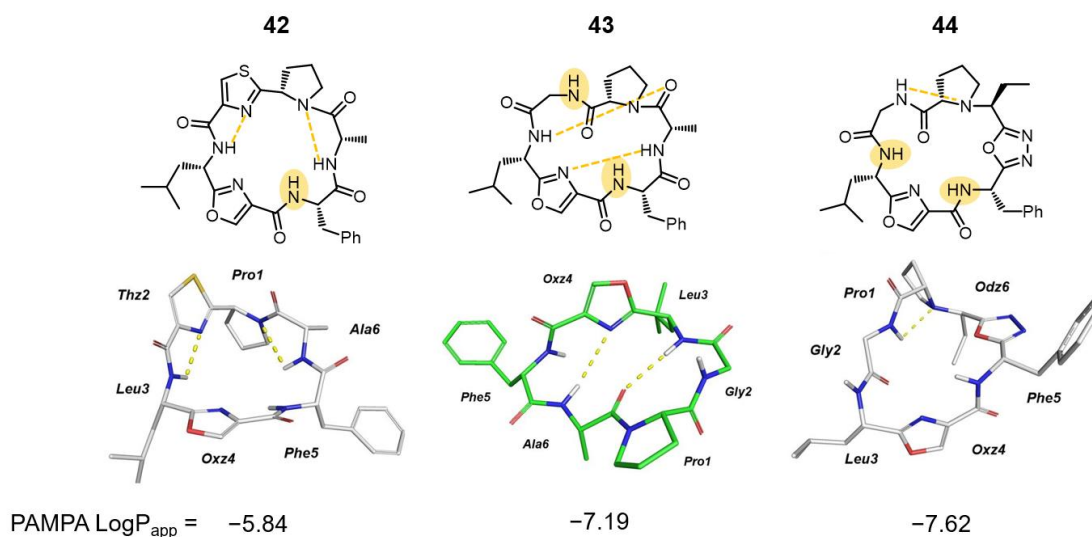


Figure 3-3. 環状ペプチド **42–44** の DMSO-*d*₆ 中の三次元構造

4. 構造カメレオン性以外の膜透過メカニズムの提示

さらに注目すべき点として、第1章および第2章で解析した多くのペプチドで、膜透過性の高低にかかわらず、DMSO 中と CHCl₃ 中の NMR データに基づく主鎖配座が互いに類似していたことが挙げられる (Figure 1-18, 2-11)。特に、膜透過性に約 100 倍の差が認められた **CP5** と **CP20** においても、DMSO および CHCl₃ それぞれの条件下で、ほぼ同一の主鎖配座をとっていることが確認された (Figure 1-19)。

これらの結果は、環状ペプチドの高い膜透過性を実現するために、極性環境と非極性環境とで主鎖配座を大きく変化させる、いわゆる“構造カメレオン性”が必ずしも必要ではないことを明確に示している。一般に、Cyclosporin A に代表されるような構造カメレオン性は、膜透過性の獲得において重要な役割を果たすと考えられており、そのような例は複数報告されている。

例えば、天然物 Sanguiamide A の誘導体である環状ペプチド **45** および **46** は、わずか1つのアミノ酸側鎖が異なるだけで、膜透過性に約 10 倍の差を示すことが知られている (Figure 3-4)¹⁰。Lokey らは、この膜透過性の差が主鎖配座の柔軟性に起因すると考察している。すなわち、膜透過性が高いペプチド **46** では、水中において主鎖が柔軟に変形することで脱溶媒和エネルギーが低下し、その結果、膜内環境で分子内水素結合を形成した安定な配座へと移行できる。一方、ペプチド **45** では、側鎖の立体障害によって主鎖の自由度が制限されているため、膜内で安定な配座を形成しにくいとされている。

これらの“構造カメレオン性”に基づく膜透過メカニズムと対照的に、本研究で得られた結果は別の膜透過メカニズムの存在を示唆している。すなわち、膜透過に適した配座をはじめから保持し、その構造を様々な環境下で安定に維持できることが高い膜透過性につながる、というメカニズムである。本研究の知見は、従来の「主鎖配座の柔軟性」を重視した設計に加え、「膜透過に有利な配座を安定に維持する」という、膜透過性環状ペプチドの合理的設計に対する新たな設計指針を提示するものである。

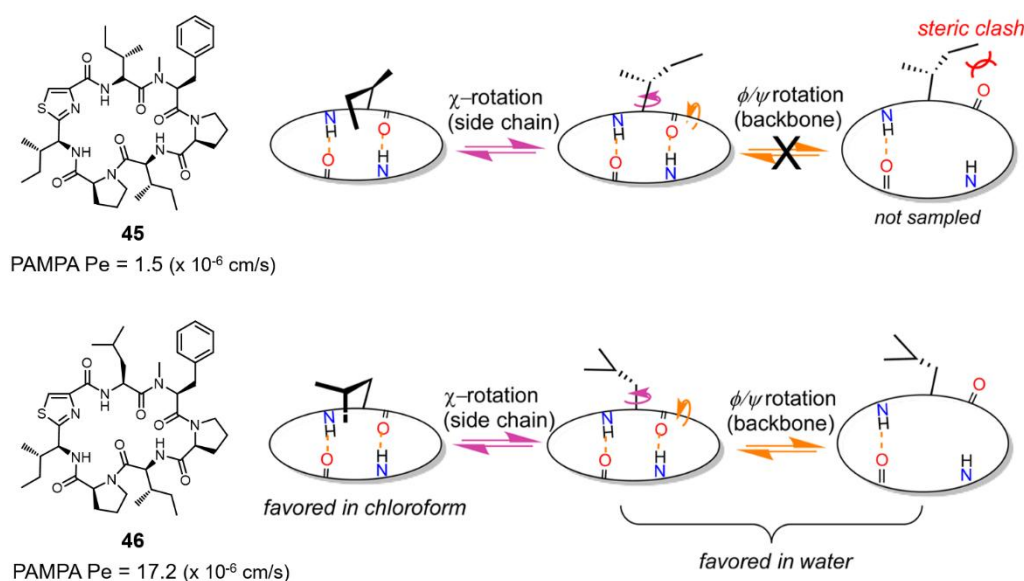


Figure 3-4. 環状ペプチド **45**, **46** の三次元構造変化

5. 膜透過性獲得に必要な環状ペプチドの性質

では、環状ペプチドのどのような性質が膜透過性の向上に寄与しているのだろうか。本研究では、CpδAA による主鎖配座制御が膜透過性の向上に必須であることを実証した。CpδAA ユニットを 5-Ava や L/D-Pro に置換したペプチドは、十分に高い疎水性 (CLogP = 6.1–6.9) を有しているにもかかわらず、膜透過性がほぼ完全に消失した (Figure 1-7)。この結果は、膜透過性に適した“閉じた”主鎖配座へと制御することが、膜透過性向上に不可欠であることを明確に示している。すなわち、CLogP が十分であっても、主鎖配座が適切に制御されていなければ透過性は向上しない。一方で、第 1 章で示したように、CpδAA によって主鎖配座がほぼ同一に制御されている場合であっても、わずか 1 残基の側鎖の性質に伴って膜透過性には 10~100 倍の差が生じた。また、第 2 章の膜透過性結果から、膜透過には一定以上の CLogP が必要であることが示された (Figure 2-2)。これらの結果を総合すると、環状ペプチドが高い膜透過性を獲得するためには、①膜透過に有利な“閉じた”主鎖配座を実現・維持するための主鎖配座制御と、②疎水性も含めた側鎖の最適化という、二つの性質を同時に満たす必要があることを明確にした。

6. 側鎖性質が膜透過性に与える影響

本研究の結果から、環状ペプチドの膜透過性の違いは、アミノ酸側鎖の構造的性質およびその導入位置に大きく影響されることが示唆された。第 1 章で得られた結果より、わずか 1 残基の側鎖構造の違い (CP5 の Ala、CP18 の Ser、CP20 の Gln) が、膜透過性に 10 倍もしくは 100 倍もの顕著な差をもたらすことが明らかとなった。さらに、REST/REUS 法を用いた MD シミュレーションにより、水中・膜内それぞれの環境下におけるペプチドと水分子との水素結合数を解析した結果 (Table 1-5)、側鎖と水分子との相互作用のしやすさが膜透過性の差に強く関与している可能性が示された。これらの結果は、側鎖の構造的性質が、膜透過過程における脱溶媒和のしやすさに影響を与えていることを示唆している。

側鎖構造の性質と膜透過性との関係をより詳細に検討するため、アミノ酸側鎖の種類と膜透過性との相関について考察した。Lokey らは、環状ペプチドの膜透過性における側鎖効果を検証した研究において、1 残基のみの側鎖を変更した環状ペプチドは、その疎水性が高いほど膜透過性が向上する傾向があることを報告している⁵⁰。しかし、この報告では、側鎖変更に伴うペプチド主鎖配座の変化について十分な検証がなされておらず、膜透過性の違いが側鎖の疎水性そのものに起因するのか、あるいは主鎖配座の変化によるものなのかは明確ではなかった。

そこで、第 1 章で合成・評価したペプチドのうち、構成アミノ酸が 3 つの Leu と Lys(N₃)で共通する 13 種に着目し、ペプチド全体の疎水性 CLogP と PAMPA LogPe との散布図を作成した (Figure 3-5)。これらのペプチドは 1 残基のアミノ酸のみが異なるため、CLogP の違いは側鎖の疎水性の違いとみなすことができる。その結果、CLogP が高い、すなわち側鎖の疎水性が高いほど、膜透過性が向上する傾向が認められ、Lokey らの報告と一致する結果が得られた。一方で NMR 解析の結果から、これら CpδAA 含有環状ペプチドはいずれも共通した“閉じた”

主鎖配座をとることが明らかとなっている。したがって、観測された膜透過性の差は、主鎖配座の違いによるものではなく、単一アミノ酸側鎖の疎水性の違いに起因するものであると結論づけられる。この知見は、CpδAA の強固な配座制御効果により、配座変化を伴わない状態で純粋な側鎖効果を初めて実験的に分離・検証できた例である。

さらに第 2 章の結果から、Ser の導入位置の違いによって膜透過性に差が見られたものの、これらペプチドの主鎖配座は、Ser の導入位置にかかわらず類似の“閉じた”形をとることが確認された (Figure 2-2, 2-11)。以上の結果と MD シミュレーションによる解析を総合すると、主鎖配座が同一であっても、Ser 側鎖の位置によって水分子との相互作用のしやすさが変化し、その結果として脱溶媒和エネルギーが異なることで、膜透過性の違いが生じたのではないかと考えられる。

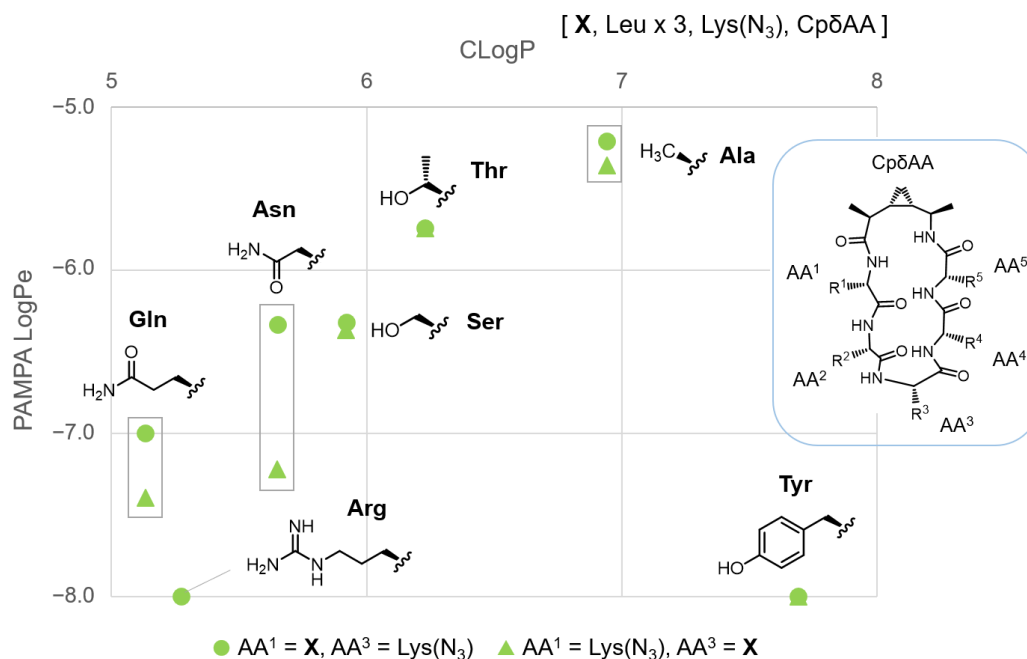


Figure 3-5. 第 1 章で合成した環状ペプチドの PAMPA LogPe と CLogP との散布図

7. 膜透過性と三次元構造との関係性の体系的な理解

第1章および第2章におけるNMR解析では、多くの環状ペプチドについて、複数の遠距離ROE相関が観測された。これらの結果は、対象としたペプチドが溶液中で限定された主鎖配座を安定してとっていることを示している。一般的に、溶液中で配座が固定化された環状ペプチドほど、受動的な膜透過に有利であると考えられている。しかし本研究においては、溶液中で明確な配座を形成していると考えられたペプチドのすべてが、高い膜透過性を示したわけではなかった。すなわち、NMR解析から示される配座の安定性と膜透過性との間に、明確な相関関係は認められなかった。さらに、CLogPや疎水性表面積といった物性値についても、本研究で検討した環状ペプチド群においては、膜透過性との間に明瞭な相関は見いだされなかった。これらの結果は、単一の物性指標や溶液中の主鎖配座のみから、環状ペプチドの膜透過性を一義的に予測することが困難であることを示している。

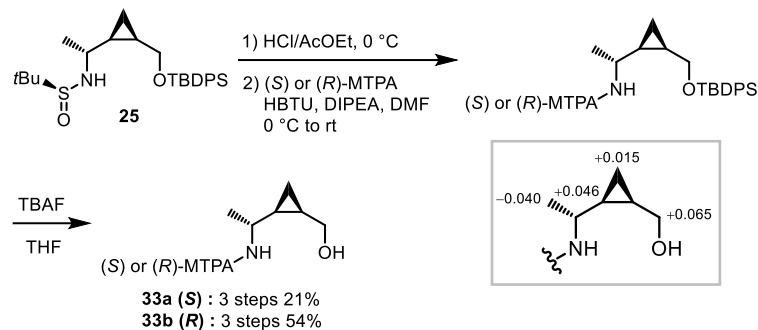
序論でも述べたように、環状ペプチドの膜透過性は、主鎖配座、分子全体の疎水性、側鎖の化学構造や配置など、複数の要因が相互に影響し合うことで決定される複雑な性質である。膜透過性と三次元構造との関係性を理解するためには、特定の要素のみを変化させた環状ペプチドを系統的に設計し、それぞれの構造と膜透過性を個別に検討する、いわゆるケーススタディを数多く積み重ねていくことが不可欠である。環状ペプチドの膜透過性に関する既報の研究成果と、今後報告される知見を総合的に比較・考察することで、三次元構造と膜透過性との関係性について、より深い理解が得られるのではないかと筆者は考えている。

結語

本研究では、環状ペプチドの三次元構造と膜透過性との直接的な関係性の解明を目指し、($\alpha S, \beta R, \gamma S, \delta R$)-Cp δ AA を組み込んだ環状ヘキサペプチドライブラリーを設計・合成し、受動的膜透過性の評価と詳細な三次元構造解析を行った。当初は、膜を“通る形”と“通らない形”の構造的違いが明確になるのではないかと予想していた。しかし、様々な解析の結果、Cp δ AA を含む環状ペプチドの主鎖配座は、膜透過性や溶媒環境にかかわらず、共通した“閉じた”配座をとることが明らかとなった。また膜透過性の違いは、アミノ酸側鎖の構造的性質やその導入位置に強く影響されることが示された。これらの結果から、環状ペプチドが高い膜透過性を獲得するには、主鎖配座の適切な制御に加え、アミノ酸側鎖の疎水性や位置といった側鎖の最適化が不可欠であることが示された。さらに、これまで重要と考えられてきた構造カメレオン性は必ずしも必要ではないこと、また、単一の物性指標や溶液中の主鎖配座のみから、環状ペプチドの膜透過性を一義的に予測することが困難であることを示した。本研究で得られた知見は、今後の膜透過性環状ペプチド創薬における合理的な分子設計指針の構築に資するのみならず、膜透過性予測シミュレーションの精緻化に向けたデータセットとしても貢献する。

補足資料

Scheme S1. 改良モッシャー法による絶対立体配置の確認



Scheme S2. PGME 法による絶対立体配置の確認

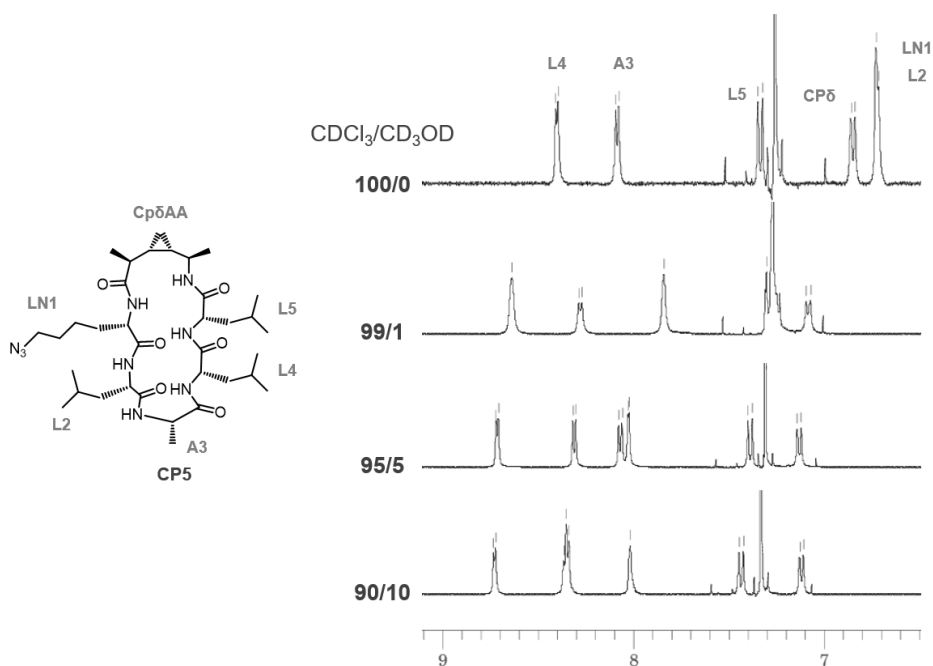
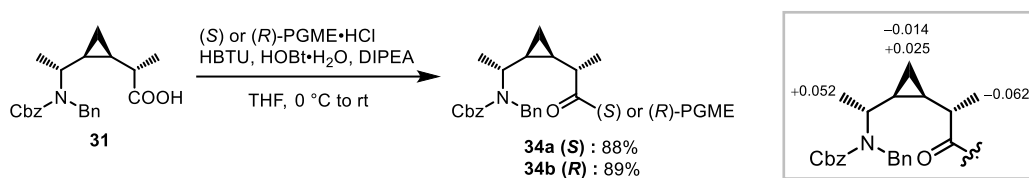


Figure S1. CDCl₃ と CD₃OD の混合溶媒における **CP5** の ¹D スペクトル

CP	Pe ($\times 10^{-6}$ cm/s)	SD ($\times 10^{-6}$ cm/s)	LogPe	CLogP	AlogP	MW	LogS	tPSA	LC-MS RT (min)
CP1	ND	—	-8.00	7.693	2.49	796.027	-8.734	243.59	14.7
CP2	0.30	0.231	-6.53	6.236	2.24	753.946	-7.658	243.59	12.0
CP3	0.25	0.062	-6.61	6.236	2.23	753.946	-7.658	243.59	11.7
CP4	0.13	0.050	-6.88	6.236	2.23	753.946	-7.658	243.59	12.3
CP5	4.37	0.905	-5.36	6.942	2.08	703.930	-7.236	223.36	14.7
CP6	0.46	0.028	-6.33	5.652	1.36	746.955	-6.646	266.45	11.6
CP7	0.43	0.102	-6.37	5.921	1.43	719.929	-6.769	243.59	12.2
CP8	ND	—	-8.00	5.273	1.29	789.040	-8.092	285.26	7.7
CP9	0.20	0.160	-6.71	4.946	1.53	796.971	-7.07	286.68	11.1
CP10	0.20	0.099	-6.69	5.215	1.62	769.945	-7.264	263.82	11.2
CP11	ND	—	-8.00	4.567	1.48	839.056	-8.567	305.49	7.2
CP12	5.65	0.088	-5.25	6.942	2.08	703.930	-7.236	223.36	14.7
CP13	6.40	0.170	-5.19	6.942	2.07	703.930	-7.236	223.36	14.4
CP14	6.17	0.263	-5.21	6.942	2.04	703.930	-7.236	223.36	15.0
CP15	4.86	0.243	-5.31	6.942	2.07	703.930	-7.236	223.36	14.1
CP16	ND	—	-8.00	7.693	2.50	796.027	-8.734	243.59	15.4
CP17	0.06	0.004	-7.22	5.652	1.38	746.955	-6.646	266.45	12.5
CP18	0.48	0.058	-6.32	5.921	1.47	719.929	-6.768	243.59	13.2
CP19	0.10	0.010	-7.00	5.134	1.48	760.982	-6.927	266.45	12.2
CP20	0.04	0.023	-7.40	5.134	1.49	760.982	-6.927	266.45	12.2
CP21	1.80	0.217	-5.74	6.230	1.67	733.956	-7.133	243.59	13.3
CP22	1.80	0.321	-5.75	6.230	1.70	733.956	-7.133	243.59	13.7
CP23	2.31	0.097	-5.64	5.485	1.73	661.849	-6.162	223.36	11.6
CP24	0.12	0.013	-6.94	4.464	0.96	677.848	-5.694	243.59	10.6
δ CP1	ND	—	-8.00	6.149	1.86	663.865	-6.721	223.36	10.7
δ CP2	ND	—	-8.00	5.128	1.11	679.864	-6.253	243.59	9.8
ProCP1	ND	—	-8.00	5.657	1.24	619.768	-5.400	214.57	9.0
ProCP2	0.049	0.025	-7.31	5.657	1.24	619.768	-5.400	214.57	9.5
ProCP3	0.031	0.009	-7.51	6.093	0.93	677.848	-6.007	234.80	9.9
ProCP4	0.074	0.006	-7.13	6.093	0.93	677.848	-6.007	234.80	10.6
11	0.44	0.021	-6.36	7.290	3.01	755.014	-8.761	194.83	14.9
15	1.07	0.218	-5.97	5.833	2.40	712.933	-7.685	194.83	12.0

Table S1. 第 1 章で合成した環状ペプチドの物性値 (CLogP, AlogP, MW, LogS and tPSA were calculated using Chemdraw 25.0. LC-MS analysis was performed on a LCMS-2020 (Shimadzu) equipped with XSelect™ CSH™ 130 C18 Column (130Å, 3.5 μ m, 4.6 mm $\times$ 100 mm, Waters Corporation; column for determination of purity). The LC-MS mobile phase consisted of 0.1% TFA in distilled water and 0.1% TFA in acetonitrile, with a gradient from 70:30 (v/v) at 0 min to 5:95 at 15 min.)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cpδ
CP5	-6.16	-1.31	-3.26	-2.56	-1.61	-3.20
CP13	-6.82	1.93	-4.12	-3.74	-0.24	-2.57
CP14	-6.14	-1.81	-2.40	-1.07	-1.99	-3.67
CP22	-6.20	-2.00	-1.40	-2.77	-2.17	-2.60
CP3	-7.12	-1.08	-3.76	-3.53	-0.81	-2.64
CP18	-6.12	-2.94	-2.68	-3.04	-2.07	-3.04
CP6	-8.35	-1.69	-2.42	2.15	-7.68	-8.86
CP7	-9.66	-1.32	0.26	3.44	-6.61	-9.14
CP17	-6.07	-3.21	-2.42	-1.85	-2.73	-3.83
CP20	-6.21	-2.68	-2.73	-2.39	-1.93	-2.80

Table S2. VT-NMR 測定による DMSO-*d*₆ 中の Δppb/ΔK (600 MHz)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cpδ
CP5	-15.67	-4.22	-5.34	-5.61	-0.73	-4.03
CP13	-7.73	-3.19	-4.44	-5.51	-0.66	-3.54
CP14	-17.18	-4.64	-5.10	-4.75	-0.88	-3.78
CP22	-14.50	-18.96	-1.22	-13.79	0.55	-4.77
CP3	-9.10	-1.34	-4.62	-5.57	-0.16	-4.15
CP18	-7.86	-9.81	-2.69	-6.19	-0.80	-3.38
CP6	-11.26	-4.19	-6.42	-5.53	-2.02	-4.50
CP7	-13.37	-0.86	-5.08	-7.30	-2.07	-7.21
CP20	-10.05	0.67	-5.27	-7.02	-0.61	-4.72

Table S3. VT-NMR 測定による CDCl₃ 中の Δppb/ΔK (600 MHz)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cpδ
CP5	3.08	singlet	5.45	6.49	8.60	6.60
CP13	3.09	singlet	4.87	5.49	9.08	6.61
CP14	2.79	5.03	6.04	6.18	8.43	6.74
CP22	overlapped	broad	overlapped	broad	7.63	broad
CP3	overlapped	5.68	5.61	overlapped	8.84	overlapped
CP18	3.09	singlet	5.14	6.14	8.22	6.17
CP6	4.46	4.46	9.22	8.59	4.98	5.82
CP7	5.25	4.91	5.35	singlet	5.19	singlet
CP17	3.30	singlet	6.36	7.57	7.70	singlet
CP20	3.04	singlet	5.76	6.04	8.51	6.03

Table S4. DMSO-*d*₆ 中の ³J_{NH-Hα} 値(Hz) (600 MHz)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cpδ
CP5	singlet	singlet	5.30	singlet	9.60	7.91
CP13	singlet	6.66	6.63	5.04	9.59	8.88
CP14	singlet	6.68	6.44	4.44	9.50	8.53
CP22	singlet	broad	4.96	singlet	9.40	8.87
CP3	singlet	6.07	6.57	5.23	9.70	8.92
CP18	singlet	singlet	5.23	5.83	9.13	9.12
CP6	broad	broad	broad	broad	broad	broad
CP7	singlet	broad	broad	singlet	overlapped	overlapped
CP20	singlet	broad	singlet	singlet	9.72	7.17

Table S5. CDCl₃ 中の ³J_{NH-Hα} 値(Hz) (600 MHz)

CP5	LN1	Leu2	Ala3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-65.3	60.8	88.2	-74.4	-99.9	151.5
Ψ	118.9	-13.9	-14.6	-31.9	-0.9	-143.3
CP22	LN1	Leu2	Thr3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-90	-108.8	-139.7	-62.1	-85.6	106.8
Ψ	-77.2	-78.9	-45.7	-58.4	46.4	-63
CP3	Tyr1	Leu2	Ala3	LN4	Leu5	Cpδ
Φ	-61.9	61.8	52.6	-75.2	-77.8	156.8
Ψ	111.6	21	-6.8	-57	5.5	-136.9
CP18	LN1	Leu2	Ser3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	53.5	79.9	-136	-81.8	-99.8	155.3
Ψ	62.5	-98.6	10.8	-49.7	-1.6	119.8
CP17	LN1	Leu2	Asn3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-71.2	55.2	64.7	-61.2	-106.3	168.4
Ψ	121.9	20.5	-25.1	-44.9	5.9	-130.2
CP20	LN1	Leu2	Gln3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-81.8	74.2	81.2	-77	-103.5	151
Ψ	133.5	-28.8	-17.5	-26.5	6.5	-145.1

Table S6. DMSO 中の中心構造の主鎖二面角 φ および ψ

CP5	LN1	Leu2	Ala3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-66.2	49.6	71.3	-77.4	-101.6	122.1
Ψ	122.2	15.5	-23.4	-41.7	41.8	-122.8
CP22	LN1	Leu2	Thr3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-66	76.6	-159.8	-72.8	-110.2	167.7
Ψ	108.4	-83	-47.5	-26.2	13.4	-102.9
CP3	Tyr1	Leu2	Ala3	LN4	Leu5	Cpδ
Φ	-72.9	56.6	77.9	-63.8	-118.7	141.8
Ψ	107	22.1	-43.8	-34.2	38.6	-111.9
CP18	LN1	Leu2	Ser3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-81.4	72.6	-168.3	-46.6	-123.7	158.9
Ψ	98.6	-81.2	-47.8	-49.7	34.8	-90.1
CP20	LN1	Leu2	Gln3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	72.7	-85.9	-65.1	-68	-82.9	151.7
Ψ	-87.6	158.1	-36.6	-33.3	-34.4	63.9

Table S7. CHCl₃ 中の中心構造の主鎖二面角 φ および ψ

CP		AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵
CP5	³ J _{NH-Ha}	3.0841	singlet	5.4486	6.4922	8.5963
	Karplus	-52	—	93	-78	-95
	GROMACS	-65.3	60.8	88.2	-74.4	-99.9
CP22	³ J _{NH-Ha}	overlapped	broad	overlapped	broad	7.6343
	Karplus	—	—	—	—	-87
	GROMACS	-90	-108.8	-139.7	-62.1	-85.6
CP3	³ J _{NH-Ha}	overlapped	5.6832	5.6142	overlapped	8.8357
	Karplus	—	29	92	—	-98
	GROMACS	-61.9	61.8	52.6	-75.2	-77.8
CP18	³ J _{NH-Ha}	3.09	singlet	5.1431	6.1411	8.2217
	Karplus	116	—	-69	-76	-92
	GROMACS	53.5	79.9	-136	-81.8	-99.8
CP17	³ J _{NH-Ha}	3.3001	singlet	6.3608	7.5652	7.7015
	Karplus	-54	—	83	-86	-87
	GROMACS	-71.2	55.2	64.7	-61.2	-106.3
CP20	³ J _{NH-Ha}	3.0403	singlet	5.7637	6.0409	8.5116
	Karplus	-52	—	90	-75	-94
	GROMACS	-81.8	74.2	81.2	-77	-103.5

Table S8. DMSO 中の主鎖二面角 φ の実測値と計算値

CP		AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵
CP5	³ J _{NH-Ha}	singlet	singlet	5.2961	singlet	9.6044
	Karplus	—	—	95	—	-107
	GROMACS	-66.2	49.6	71.3	-77.4	-101.6
CP22	³ J _{NH-Ha}	singlet	broad	4.9593	singlet	9.4034
	Karplus	—	—	-173	—	-104
	GROMACS	-66	76.6	-159.8	-72.8	-110.2
CP3	³ J _{NH-Ha}	singlet	6.0739	6.5678	5.2259	9.7018
	Karplus	—	87	81	-69	-109
	GROMACS	-72.9	56.6	77.9	-63.8	-118.7
CP18	³ J _{NH-Ha}	singlet	singlet	5.2337	5.8255	9.128
	Karplus	—	—	-171	-73	-140
	GROMACS	-81.4	72.6	-168.3	-46.6	-123.7
CP20	³ J _{NH-Ha}	singlet	broad	singlet	singlet	9.7185
	Karplus	—	—	—	—	-94
	GROMACS	72.7	-85.9	-65.1	-68	-82.9

Table S9. CHCl₃ 中の主鎖二面角 φ の実測値と計算値

CP	Pe ($\times 10^{-6}$ cm/s)	SD ($\times 10^{-6}$ cm/s)	LogPe	CLogP	AlogP	MW	LogS	tPSA	LC-MS RT (min)
CP25	8.10	0.441	-5.09	6.539	2.39	662.917	-7.265	174.60	15.6
CP26	0.44	0.302	-6.36	5.518	1.84	678.916	-6.797	194.83	13.0
CP27	0.34	0.117	-6.47	5.518	1.85	678.916	-6.797	194.83	11.1
CP28	2.22	0.196	-5.65	5.518	1.87	678.916	-6.797	194.83	14.0
CP29	1.46	0.193	-5.84	5.518	1.84	678.916	-6.797	194.83	13.2
CP30	2.50	0.191	-5.60	5.518	1.83	678.916	-6.797	194.83	14.2
CP31	3.26	1.111	-5.49	6.500	2.67	696.934	-7.850	174.60	16.5
CP32	ND	—	-8.00	4.061	1.03	636.835	-5.723	194.83	10.1
CP33	ND	—	-8.00	4.061	1.02	636.835	-5.723	194.83	8.9
CP34	ND	—	-8.00	4.061	1.02	636.835	-5.723	194.83	11.1
CP35	ND	—	-8.00	4.061	1.02	636.835	-5.723	194.83	10.1
CP36	0.38	0.058	-6.42	4.061	1.03	636.835	-5.723	194.83	10.9
CP37	ND	—	-8.00	1.583	-0.54	610.753	-4.254	215.06	—
CP38	ND	—	-8.00	1.583	-0.49	610.753	-4.254	215.06	—
CP39	6.66	0.171	-5.18	6.010	2.16	648.890	-6.700	174.60	15.5
CP40	3.94	0.132	-5.40	5.082	1.63	620.836	-6.191	174.60	12.3
CP41	ND	—	-8.00	4.553	1.40	606.809	-5.625	174.60	9.7
CP42	1.26	0.062	-5.90	4.989	1.62	664.889	-6.232	194.83	13.5
CP43	8.11	0.519	-5.09	5.491	2.04	634.863	-6.300	174.60	15.0
CP44	3.95	0.260	-5.40	6.020	2.23	648.890	-6.865	174.60	13.2
CP45	10.83	1.335	-4.97	6.020	2.30	648.890	-6.865	174.60	15.0
CP46	9.82	0.438	-5.01	6.020	2.31	648.890	-6.865	174.60	16.1
CP47	5.14	0.427	-5.29	6.020	2.29	648.890	-6.865	174.60	13.6
CP48	11.29	0.753	-4.95	6.020	2.23	648.890	-6.865	174.60	15.8

Table S10. 第2章で合成した環状ペプチドの物性値 (CLogP, AlogP, MW, LogS and tPSA were calculated using Chemdraw 25.0. LC-MS analysis was performed on a LCMS-2020 (Shimadzu) equipped with XSelect™ CSH™ 130 C18 Column (130Å, 3.5 μ m, 4.6 mm $\times$ 100 mm, Waters Corporation; column for determination of purity). The LC-MS mobile phase consisted of 0.1% TFA in distilled water and 0.1% TFA in acetonitrile, with a gradient from 70:30 (v/v) at 0 min to 5:95 at 15 min.)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cp δ
CP25	-5.96	-1.00	-6.08	-3.40	-0.89	-3.53
CP26	-4.03	-4.99	-2.93	3.16	-6.19	-8.99
CP28	-5.49	-2.88	-5.15	-2.10	-1.45	-2.75
CP30	-7.62	-2.34	-5.44	-2.88	-5.61	-2.91
CP32	-7.52	-3.13	-0.79	2.30	-4.61	-7.45
CP34	-6.22	-1.15	-8.34	-3.95	-1.01	-1.51
CP36	-6.39	-0.55	-5.09	-3.74	-3.27	-3.26
CP44	-5.01	-4.36	-2.65	1.69	-6.34	-8.18
CP46	-5.09	-3.75	-2.83	-2.32	-1.43	-2.32
CP48	-0.74	-7.52	-5.46	2.56	0.39	-6.28

Table S11. VT-NMR 測定による DMSO-*d*₆ 中の Δ ppb/ Δ K (600 MHz)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cpδ
CP25	-6.89	-2.86	-3.24	-4.07	-0.15	-2.08
CP30	-8.08	-2.06	-3.97	-3.15	1.04	-3.05
CP34	-9.26	-9.83	-1.56	-6.52	-0.29	-3.16
CP36	-8.60	-2.49	-4.97	-5.91	0.34	-5.98
CP46	-10.96	-2.69	-4.68	-4.28	-0.04	-3.10
CP48	-9.31	-1.79	-4.57	-2.63	-1.76	-2.51

Table S12. VT-NMR 測定による CDCl₃ 中の Δppb/ΔK (600 MHz)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cpδ
CP25	3.5	broad	broad	6.3	8.8	6.1
CP26	6.2	broad	7.9	broad	5.9	5.9
CP28	3.7	broad	broad	broad	8.3	broad
CP30	broad	broad	broad	5.5	broad	6.8
CP32	5.8	broad	7.3	7.6	6.5	5.6
CP34	4.3	broad	broad	singlet	8.3	5.6
CP36	5.3	broad	broad	6.5	7	7.1
CP44	5.4	6.4	9.3	8.3	5.9	7
CP46	singlet	6.4	6.1	6.8	6.6	6.6
CP48	7.1	broad	broad	5.5	4.5	8.3

Table S13. DMSO-*d*₆ 中の ³J_{NH-Hα} 値(Hz) (600 MHz)

	AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵	Cpδ
CP25	singlet	6.5	6.0	singlet	broad	broad
CP30	singlet	6.8	6.5	3.3	8.7	8.6
CP34	3.2	7.0	6.8	5.3	9.4	8.8
CP36	singlet	broad	6.1	singlet	9.5	broad
CP46	2.7	6.8	6.1	5.0	9.5	9.1
CP48	singlet	7.1	6.7	4.0	8.2	9.1

Table S14. CDCl₃ 中の ³J_{NH-Hα} 値(Hz) (600 MHz)

CP26	Ser1	Leu2	Leu3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-84.8	58.8	-127.9	20.4	-126	167.9
Ψ	103.7	-75.8	-60	-96.8	48.1	-122.5
CP28	Leu1	Leu2	Ser3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	41	69.9	-139	-84.5	-92.3	-173.6
Ψ	71.3	-101.6	31	-63.9	-23.9	141.7
CP30	Leu1	Leu2	Leu3	Leu4	Ser5	Cpδ
Φ	-67.1	44.2	75.4	-51.4	-91.1	144.6
Ψ	116.1	22.3	-44.5	-52.7	34.9	-114.8
CP44	Gly1	Leu2	Leu3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-176.6	73.4	-72.8	-81.7	-55.4	140.2
Ψ	32.3	-87.3	-30.2	171.3	92.7	22.6
CP46	Leu1	Leu2	Gly3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-72.7	60	73.6	-91.8	-85.5	148.9
Ψ	123	6.8	2.3	-51.3	17.3	-128.9
CP48	Leu1	Leu2	Leu3	Leu4	Gly5	Cpδ
Φ	-76.3	61.3	-152.4	-54.2	-89.6	128.8
Ψ	102.4	-86.3	-50.2	-38.4	21.8	-97.4

Table S15. DMSO 中の中心構造の主鎖二面角 φ および ψ

CP26	Ser1	Leu2	Leu3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-154.5	-77.5	41.3	-62.1	-79.2	126.1
Ψ	-126.7	100.7	-91.6	-23	7.4	-33.1
CP28	Leu1	Leu2	Ser3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-82	77	-157.5	64.1	-82.6	79.1
Ψ	67.3	-55.7	-172.8	-71.3	72.5	-83.4
CP30	Leu1	Leu2	Leu3	Leu4	Ser5	Cpδ
Φ	-79.2	75.6	67.4	-47.7	-89.9	125.2
Ψ	103.9	12.2	-39.3	-63.8	49.2	-124.3
CP44	Gly1	Leu2	Leu3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-79.6	-132.6	-91.3	-111.2	-87	172.5
Ψ	94.1	-76.7	-50.3	-171.3	152.5	43.6
CP46	Leu1	Leu2	Gly3	Leu4	Leu5	Cpδ
Φ	-70.7	68.7	99	-93.6	-108.1	138.2
Ψ	108	-13.1	-6	-34.9	37.4	-126.3
CP48	Leu1	Leu2	Leu3	Leu4	Gly5	Cpδ
Φ	-72.3	63.7	86.3	-71.3	-124.8	117.3
Ψ	103.8	10.8	-37.7	-17.6	44.5	-126.3

Table S16. CHCl₃ 中の中心構造の主鎖二面角 φ および ψ

CP		AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵
CP26	³ J _{NH-Ha}	6.2	broad	7.9	broad	5.9
	Karplus	-75	—	-152	—	-167
	GROMACS	-84.8	58.8	-127.9	20.4	-126
CP28	³ J _{NH-Ha}	3.7	broad	broad	broad	8.3
	Karplus	10	—	—	—	-91
	GROMACS	41	69.9	-139	-84.5	-92.3
CP30	³ J _{NH-Ha}	broad	broad	broad	5.5	broad
	Karplus	—	—	—	-70	—
	GROMACS	-67.1	44.2	75.4	-51.4	-91.1
CP44	³ J _{NH-Ha}	5.4	6.4	9.3	8.3	5.9
	Karplus	-171	82	-101	-91	-73
	GROMACS	-176.6	73.4	-72.8	-81.7	-55.4
CP46	³ J _{NH-Ha}	singlet	6.4	6.1	6.8	6.6
	Karplus	—	82	86	-80	-78
	GROMACS	-72.7	60	73.6	-91.8	-85.5
CP48	³ J _{NH-Ha}	7.1	broad	broad	5.5	4.5
	Karplus	-82	—	—	-70	-63
	GROMACS	-76.3	61.3	-152.4	-54.2	-89.6

Table S17. DMSO 中の主鎖二面角 φ の実測値と計算値

CP		AA ¹	AA ²	AA ³	AA ⁴	AA ⁵
CP30	³ J _{NH-Ha}	singlet	6.8	6.5	3.3	8.7
	Karplus	—	77	81	-53	-95
	GROMACS	-79.2	75.6	67.4	-47.7	-89.9
CP46	³ J _{NH-Ha}	2.7	6.8	6.1	5	9.5
	Karplus	-47	77	86	-74	-66
	GROMACS	-70.7	68.7	99	-93.6	-108.1
CP48	³ J _{NH-Ha}	singlet	7.1	6.7	4	8.2
	Karplus	—	71	78	-59	-150
	GROMACS	-72.3	63.7	86.3	-71.3	-124.8

Table S18. CHCl₃ 中の主鎖二面角 φ の実測値と計算値

実験の部

General Information

All commercially available materials were used as received unless otherwise noted. All non-aqueous reactions were carried out under an argon atmosphere in anhydrous grade solvents. TLC was performed using glass-backed silica gel 60F254. Silica gel column chromatography was performed using silica gel 60N (spherical, natural, 63–210 μm). All compounds were characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and mass spectra. NMR spectra were recorded on a JEOL 400 or 500 MHz instruments. All ^1H NMR spectra are reported in δ units, parts per million (ppm), and were measured relative to a signal for tetramethylsilane (0.00 ppm) when CDCl_3 was used as the solvent, a solvent residual peak ($\text{CD}_3\text{SOCD}_2\text{H}$: 2.50 ppm) when $\text{DMSO}-d_6$ was used as the solvent, or a solvent residual peak ($\text{CD}_2\text{H}-\text{OD}$: 3.31 ppm) when CD_3OD was used as the solvent. Coupling constants (J) are reported in Hz, and multiplicity is indicated as follows: s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), br (broad), m (multiplet). All ^{13}C NMR spectra are reported in ppm relative to deuterated solvents (CDCl_3 : 77.0 ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: 39.5 ppm or CD_3OD : 49.0 ppm). High-resolution mass analysis was performed on a Waters ACQUITY UPLC/Xevo G2 QToF spectrometer. Optical rotations were measured with a JASCO P-1030 digital polarimeter. Preparative HPLC was performed on JASCO PU-2089 Plus (pump), JASCO MD-2018 Plus (detector), JASCO LC-Net II/ADC (system controller) and JASCO CO-2065 Plus (column oven) with a XSelect Peptide CSH C18 OBDTM Prep Column (130Å, 5 μm , 10 mm $\times$ 150 mm, Waters Corporation; column for determination of purity). LC-MS analysis was performed on a LCMS-2020 (Shimadzu) using XSelectTM CSHTM 130 C18 Column (130Å, 3.5 μm , 4.6 mm $\times$ 100 mm, Waters Corporation; column for determination of purity).

Synthesis of ($\alpha S, \beta R, \gamma S, \delta R$)-Cp δ AA

(S)-N-(((1S,2R)-2-(((Tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)methyl)cyclopropyl)methylene)-2-methylpropane-2-sulfinamide (24)

Compound **24** (5.9 g, 13 mmol, 92%) was synthesized from aldehyde **23** (4.9 g, 14 mmol) according to the previous report.²⁶ The NMR spectra agree with the report.

(S)-N-((R)-1-((1S,2R)-2-(((Tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)methyl)cyclopropyl)ethyl)-2-methylpropane-2-sulfinamide (25)

Compound **25** (3.9 g, 8.6 mmol, 79%, light-yellow oil) was synthesized from **24** (4.8 g, 11 mmol) according to the previous report.²⁵

TLC R_f = 0.3 (AcOEt/hexane = 1/1); $[\alpha]^{20}_D$ = -4.4 (c 1.00, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.70–7.66 (4 H, m), 7.44–7.36 (6 H, m), 3.85 (1 H, dd, J = 11.2, 6.6 Hz), 3.65 (1 H, dd, J = 11.2, 7.2 Hz), 3.32 (1 H, d, J = 5.4 Hz), 2.92–2.87 (1 H, m), 1.39 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 1.22–1.18 (1 H, m), 1.09–0.99 (19 H, m), 0.74–0.70 (1 H, m), 0.06 (1 H, dd, J = 8.6, 4.6 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 135.6, 135.5,

133.8, 133.7, 129.6, 129.6, 127.6, 64.2, 55.3, 53.3, 27.0, 24.3, 22.6, 22.5, 19.2, 18.6, 8.4; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{26}H_{40}NO_2SSi$, 458.2549; found, 458.2549.

Benzyl ((R)-1-((1S,2R)-2-(((tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)methyl)cyclopropyl)ethyl)carbamate (26)

Compound **26** (0.13 g, 0.26 mmol, 2 steps 89%, colorless oil) was synthesized from **25** (0.14 g, 0.30 mmol) according to the previous report.²⁵ TLC R_f = 0.4 (AcOEt/hexane = 1/4); $[\alpha]^{16}_D$ = -7.8 (c 1.11, $CHCl_3$); ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.69–7.64 (4 H, m), 7.43–7.24 (11 H, m), 5.17–5.09 (2 H, br m), 4.91 (1 H, d, J = 11.8 Hz), 3.81 (1 H, dd, J = 11.2, 5.7 Hz), 3.58 (1 H, t, J = 9.9 Hz), 3.19 (1 H, ddd), 1.37 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 1.17–1.04 (1 H, m), 1.01 (9 H, s), 0.97–0.89 (1 H, m), 0.73–0.68 (1 H, m), 0.05 (1 H, dd, J = 11.0, 5.4 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 155.6, 136.6, 135.6, 135.5, 133.8, 133.7, 129.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.6, 127.6, 66.3, 63.8, 48.4, 26.8, 22.7, 21.6, 19.1, 18.6, 8.1; HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calcd for $C_{30}H_{37}NNaO_3Si$, 510.2440; found, 510.2446.

Benzyl benzyl((R)-1-((1S,2R)-2-(hydroxymethyl)cyclopropyl)ethyl)carbamate (27)

Compound **27** (2.7 g, 8.0 mmol, 2 steps 92%, light-yellow oil) was synthesized from **26** (4.2 g, 8.6 mmol) according to the previous report.²⁵ TLC R_f = 0.4 (AcOEt/hexane = 1/1); $[\alpha]^{22}_D$ = +24.0 (c 0.93, $CHCl_3$); ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, 80 °C) δ 7.34–7.20 (10 H, m), 5.10 (2 H, dd, J = 20.5, 12.7 Hz), 4.59 (1 H, d, J = 16.2 Hz), 4.49 (1 H, d, J = 16.2 Hz), 4.08 (1 H, br s), 3.73–3.65 (1 H, m), 3.49 (1 H, dd, J = 11.0, 5.8 Hz), 3.31–3.26 (1 H, br m), 1.14–1.06 (4 H, m), 0.94–0.85 (1 H, m), 0.72–0.67 (1 H, m), 0.13 (1 H, dd, J = 10.4, 5.6 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$, 80 °C) δ 155.0, 139.5, 126.7, 127.8, 127.6, 127.2, 127.0, 126.8, 126.2, 65.9, 60.4, 52.9, 46.2, 19.9, 19.5, 19.2, 8.9; HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calcd for $C_{21}H_{25}NNaO_3$, 362.1732; found, 362.1734.

Benzyl benzyl((R)-1-((1S,2S)-2-(cyanomethyl)cyclopropyl)ethyl)carbamate (28)

Compound **28** (2.2 g, 6.3 mmol, 2 steps 79%, light-yellow oil) was synthesized from **27** (2.7 g, 8.0 mmol) according to the previous report.²⁵ TLC R_f = 0.5 (AcOEt/hexane = 1/1); $[\alpha]^{22}_D$ = -22.1 (c 0.95, $CHCl_3$); ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, 80 °C) δ 7.33–7.20 (10 H, m), 5.12 (2 H, s), 4.54 (2 H, dd, J = 27.3, 16.3 Hz), 3.76–3.71 (1 H, m), 2.39 (2 H, d, J = 6.7 Hz), 1.24–1.15 (4 H, m), 0.95 (1 H, dd, J = 13.9, 7.4 Hz), 0.84–0.78 (1 H, m), 0.26 (1 H, dd, J = 10.4, 5.2 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$, 80 °C) δ 155.0, 139.3, 136.5, 127.8, 127.7, 127.3, 127.2, 126.8, 126.2, 119.4, 66.1, 52.3, 45.9, 40.4, 20.2, 19.1, 16.0, 12.7, 9.8; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{22}H_{25}N_2O_2$, 349.1916; found, 349.1917.

Benzyl benzyl((R)-1-((1S,2S)-2-(2-((S)-4-benzyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-2-oxoethyl)cyclopropyl)ethyl)carbamate (29)

Compound **29** (2.5 g, 4.8 mmol, 3 steps 75%, yellow oil) was synthesized from **28** (2.2 g, 6.3 mmol) according to the previous report.²⁵ (S)-4-benzyl-2-oxazolidinone was used instead of (R)-4-benzyl-2-oxazolidinone. TLC R_f = 0.5 (AcOEt/hexane = 1/2); $[\alpha]^{20}_D$ = +16.8 (c 0.66, $CHCl_3$); ^1H NMR (400 MHz,

DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 7.33–7.19 (15 H, m), 5.12 (1 H, d, *J* = 12.2 Hz), 5.01 (1 H, d, *J* = 12.7 Hz), 4.64–4.60 (1 H, m), 4.53 (2 H, s), 4.31 (1 H, t, *J* = 8.5 Hz), 4.18 (1 H, dd, *J* = 8.9, 3.0 Hz), 3.73–3.66 (1 H, m), 3.04 (1 H, d, *J* = 3.3 Hz), 2.98–2.92 (2 H, m), 2.83 (1 H, dd, *J* = 17.2, 7.0 Hz), 1.22–1.10 (4 H, m), 0.92–0.78 (2 H, m), 0.18 (1 H, dd, *J* = 10.8, 5.6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 171.8, 155.0, 152.8, 139.4, 136.6, 135.4, 129.0, 128.1, 127.8, 127.7, 127.2, 127.0, 126.8, 126.4, 126.2, 65.9, 65.8, 54.0, 53.0, 46.0, 36.6, 34.1, 19.5, 19.3, 12.0, 9.7; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₂H₃₅N₂O₅, 527.2546; found, 527.2549.

Benzyl benzyl((*R*)-1-((1*S*,2*R*)-2-((*S*)-1-((*S*)-4-benzyl-2-oxooxazolidin-3-yl)-1-oxopropan-2-yl)cyclopropyl)ethyl)carbamate (30)

Compound **30** (1.8 g, 3.4 mmol, 72%, white solid) was synthesized from **29** (2.5 g, 4.8 mmol) according to the previous report.²⁵

TLC *R_f* = 0.5 (AcOEt/hexane = 1/3); [α]_D²¹ = +30.6 (*c* 0.88, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 7.33–7.18 (15 H, m), 5.22–5.06 (1 H, m), 4.89 (1 H, br s), 4.63–4.60 (2 H, br m), 4.31–4.22 (3 H, br m), 3.60 (1H, br s), 3.00 (3 H, d, *J* = 3.7 Hz), 1.42 (1 H, br s), 1.31–1.26 (4 H, m), 1.18–1.10 (1 H, m), 0.93 (3 H, br s), 0.88–0.82 (1 H, m), 0.14–0.13 (1 H, br m); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 175.1, 155.0, 152.2, 139.3, 136.3, 135.1, 129.1, 128.0, 127.8, 127.7, 127.3, 126.9, 126.4, 126.3, 66.0, 65.9, 53.9, 53.2, 45.6, 37.4, 36.5, 20.1, 19.8, 19.8, 19.2, 18.4, 9.1; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₃H₃₇N₂O₅, 541.2702; found, 541.2704.

(*S*)-2-((1*R*,2*S*)-2-((*R*)-1-(Benzyl((benzyloxy)carbonyl)amino)ethyl)cyclopropyl)propanoic acid (31)

Compound **31** (1.2 g, 3.2 mmol, 93%, colorless oil) was synthesized from **30** (1.8 g, 3.4 mmol) according to the previous report.²⁵

TLC *R_f* = 0.3 (AcOEt/hexane = 1/2); [α]_D²³ = +30.9 (*c* 1.03, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 7.51–7.31 (10 H, m), 5.29 (1 H, d, *J* = 12.6 Hz), 5.23 (1 H, br s), 4.77 (1 H, d, *J* = 16.4 Hz), 4.63 (1 H, d, *J* = 16.2 Hz), 3.90–3.87 (1 H, br m), 2.25–2.17 (1 H, m), 1.40 (3 H, d, *J* = 7.2 Hz), 1.36–1.28 (2 H, m), 1.21 (3 H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.97–0.91 (1 H, m), 0.24 (1 H, dd, *J* = 10.4, 5.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 176.5, 154.8, 139.6, 136.7, 127.8, 127.7, 127.1, 127.0, 126.8, 126.2, 65.9, 53.2, 46.2, 37.9, 20.5, 20.1, 18.4, 8.5; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₃H₂₈NO₄, 382.2018; found, 381.2021.

(*S*)-2-((1*R*,2*S*)-2-((*R*)-1-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)cyclopropyl)propanoic acid (32)

Compound **32** (1.0 g, 2.7 mmol, 2 steps 85%, white solid) was synthesized from **31** (1.2 g, 3.2 mmol) according to the previous report.²⁶ TLC *R_f* = 0.3 (AcOEt/hexane = 1/1); [α]_D²² = +0.5 (*c* 1.19, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.92 (1 H, br s), 7.89 (2 H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.70 (2 H, dd, *J* = 26.3, 6.9 Hz), 7.41 (2 H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.33 (2 H, dd, *J* = 12.5, 7.0 Hz), 7.19 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.17 (3 H, d, *J*

= 7.7 Hz), 3.10–3.09 (1 H, br m), 2.02–1.99 (1 H, br m), 1.18–1.15 (6 H, br m), 1.03–1.02 (2 H, br m), 0.68–0.67 (1 H, br m), –0.01––0.02 (1 H, br m); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.3, 155.0, 144.4, 143.8, 140.7, 140.6, 127.6, 127.6, 127.1, 125.6, 125.3, 120.1, 65.3, 47.3, 46.8, 38.0, 22.8, 22.0, 20.0, 18.9, 8.0; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₃H₂₆NO₄, 380.1862; found, 380.1865.

(S)-3,3,3-Trifluoro-N-((R)-1-((1S,2R)-2-(hydroxymethyl)cyclopropyl)ethyl)-2-methoxy-2-phenylpropanamide (33a)

To a solution of **25** (25 mg, 0.054 mmol) in AcOEt (0.90 mL) was added a solution of HCl in AcOEt (4 M, 0.45 mL, 0.24 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 30 min. After careful removal of HCl and solvents under reduced pressure while diluting with AcOEt, the residue was dissolved in DMF (1.1 mL). To the solution were added DIPEA (0.043 mL, 0.25 mmol) and (*R*)-(–)-α-methoxy-α-(trifluoromethyl)phenylacetic acid (MTPA, 0.026 mL, 0.15 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 30 min. To the solution were added HBTU (57 mg, 0.15 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 5 h. After addition of aq. HCl (1 M), the resulting mixture was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt/hexane) to give a colorless oil product (23 mg). To a solution of the product in THF (0.41 mL) was added a solution of TBAF in THF (1.0 M, 0.062 mL, 0.062 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. After removal of solvents under reduced pressure, the residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt/hexane) to give **33a** (3.5 mg, 0.011 mmol, 3 steps 21%) as a colorless oil. TLC *R_f* = 0.3 (AcOEt/hexane = 1/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (2 H, d, *J* = 3.7 Hz), 7.41 (3 H, t, *J* = 3.3 Hz), 6.98 (1 H, d, *J* = 7.2 Hz), 3.91–3.86 (1 H, m), 3.76–3.68 (1 H, m), 3.49–3.44 (1 H, m), 3.42 (3 H, d, *J* = 1.1 Hz), 3.30 (1 H, dd, *J* = 8.3, 4.6 Hz), 1.32 (3 H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.29–1.26 (2 H, m), 0.97–0.90 (1 H, m), 0.79–0.74 (1 H, m), 0.07–0.03 (2 H, m); HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₁₆H₂₁F₃NO₃, 332.1474; found, 332.1483.

(S)-3,3,3-Trifluoro-N-((R)-1-((1S,2R)-2-(hydroxymethyl)cyclopropyl)ethyl)-2-methoxy-2-phenylpropanamide (33b)

Compound **33b** (18 mg, 0.021 mmol, 3 steps 54%, colorless oil) was prepared from **25** (18 mg, 0.040 mmol) by the same procedure as described for **31a** using (*S*)-(+)-MTPA instead of (*R*)-(–)-MTPA. TLC *R_f* = 0.4 (AcOEt/hexane = 1/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.55–7.53 (2 H, m), 7.44–7.41 (3 H, m), 6.96 (1 H, d, *J* = 6.0 Hz), 3.82 (1 H, dd, *J* = 12.5, 4.7 Hz), 3.74–3.66 (1 H, m), 3.41 (3 H, d, *J* = 1.4 Hz), 3.34 (1 H, dd, *J* = 12.3, 9.7 Hz), 1.36 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.25–1.21 (2 H, m), 0.92–0.86 (2 H, m), 0.77–0.73 (1 H, m), 0.02 (1 H, dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz); LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ 332; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₁₆H₂₁F₃NO₃, 332.1474; found, 332.1482.

Methyl (S)-2-((S)-2-((1R,2S)-2-((R)-1-

(benzyl((benzyloxy)carbonyl)amino)ethyl)cyclopropyl)propanamido)-2-phenylacetate (34a)

Compound **34a** (111 mg, 0.21 mmol, 88%, pale yellow solid) was synthesized from **31** (92 mg, 0.24 mmol) according to the previous report.²⁵ TLC R_f = 0.7 (AcOEt/hexane = 1/1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 7.98 (1 H, d, J = 7.0 Hz), 7.39–7.20 (15 H, m), 5.46 (1 H, d, J = 7.2 Hz), 5.08 (2 H, s), 4.46 (1 H, d, J = 16.4 Hz), 4.41 (1 H, d, J = 16.4 Hz), 3.58 (3 H, s), 2.19–2.11 (1 H, m), 1.32–1.22 (1 H, m), 1.18 (4 H, d, J = 7.0 Hz), 1.03 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 0.75 (1 H, td, J = 7.3, 4.5 Hz), 0.01 (1 H, dd, J = 10.5, 5.5 Hz).

Methyl (R)-2-((S)-2-((1R,2S)-2-((R)-1-

(benzyl((benzyloxy)carbonyl)amino)ethyl)cyclopropyl)propanamido)-2-phenylacetate (34b)

Compound **34b** (119 mg, 0.23 mmol, 89%, pale yellow solid) was synthesized from **31** (97 mg, 0.25 mmol) according to the previous report.²⁵ TLC R_f = 0.6 (AcOEt/hexane = 1/1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 80 °C) δ 7.95 (1 H, d, J = 6.6 Hz), 7.38–7.16 (15 H, m), 5.35 (1 H, d, J = 6.8 Hz), 4.83 (1 H, d, J = 10.4 Hz), 4.72 (1 H, br s), 4.40 (2 H, dd, J = 24.2, 16.3 Hz), 3.63 (3 H, s), 3.53 (1 H, dt, J = 16.5, 6.6 Hz), 2.14 (1 H, dt, J = 16.5, 6.8 Hz), 1.32–1.27 (1 H, m), 1.24 (3 H, d, J = 7.0 Hz), 1.21–1.15 (1 H, m), 1.01 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 0.76 (1 H, td, J = 7.2, 4.5 Hz), –0.01 (1 H, dd, J = 10.5, 5.5 Hz).

Synthesis of cyclic peptides

General procedure for solid-phase peptide synthesis and peptide cleavage from resin (20 μ mol scale)

2-Chlorotriaryl chloride resin (1.5 mmol/g, 33mg) was swelled in CH₂Cl₂ for 20 min. The resin was drained and treated with a solution of Fmoc-protected amino acid (20 μ mol) dissolved in CH₂Cl₂ (200 μ L, 0.1 M) and DIPEA (14 μ L, 80 μ mol, 4 eq). The resin was shaken 1 h at room temperature. After the reaction, the resin was washed with CH₂Cl₂ four times. To protect unreacted point, the resin was washed with 17:2:1 CH₂Cl₂:MeOH:DIPEA (2.0 mL) three times. Fmoc deprotection was performed by shaking the resin with 20% piperidine in DMF (2.0 ml) for 10 min, and the resin was washed with DMF four times. The coupling reaction was performed by shaking the resin with Fmoc-protected amino acid (60 μ mol, 3 eq), DIPEA (20 μ L, 120 μ mol, 6 eq), HBTU (23 mg, 60 μ mol, 3 eq) and HOBt · H₂O (9.2 mg, 60 μ mol, 3 eq) in DMF for 1–1.5 h. After the reaction, the resin was washed with DMF four times. Above deprotection and coupling reactions were repeated, six-residues of amino acids were condensed. Coupling of *cis*-NfCf was performed by shaking the resin with Fmoc-*cis*-NfCf (9.1 mg, 24 μ mol, 1.2 eq), DIPEA (8.2 μ L, 48 μ mol, 2.4 eq), HBTU (9.1 mg, 24 μ mol, 1.2 eq) and HOBt · H₂O (3.7 mg, 24 μ mol, 1.2 eq) in DMF for overnight. Upon coupling after *cis*-NfCf in a sequence, Fmoc-protected amino acid (100 μ mol, 5 eq), DIPEA (34 μ L, 200 μ mol, 10 eq), HBTU (38 mg, 100 μ mol, 5 eq) and HOBt · H₂O (15 mg, 100 μ mol, 5 eq) were dissolved in DMF, the solution was added to the resin.

The protected resin-bound peptide was washed with CH₂Cl₂ four times, and subjected to 3 rounds of

20% HFIP in CH₂Cl₂ (1.0 mL) treatment at room temperature for 20 min. After filtering the residual resin, the filtrate was evaporated to give a protected linear peptide cleaved from resin.

General procedure for peptide cyclization, deprotection and purification (20 μmol scale)

To a solution of the protected linear peptide in DMF (20 mL, 1.0 mmol/L) was added HOAt (4.1 mg, 30 μmol, 1.5 eq), HATU (11 mg, 30 μmol, 1.5 eq), and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (5.1 μL, 30 μmol, 1.5 eq) at room temperature. After stirring for 30 min, the reaction mixture was evaporated and partitioned between AcOEt and sat. NaHCO₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated to give a protected cyclic peptide.

The protected cyclic peptide was treated with TFA/triisopropylsilane/H₂O (95/2.5/2.5, 1.0 mL, 20 mmol/L). After stirring for 1 h at room temperature, the reaction mixture was evaporated, purified by preparative HPLC and freeze-dried to yield the desired cyclic peptide.

CPI

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N₃)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Tyr(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CPI** (6.0 mg, 7.5 μmol, 38%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 17.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.21 (1 H, s), 8.68 (2 H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.26 (1 H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.22 (1 H, d, *J* = 6.4 Hz), 7.46 (1 H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.96 (2 H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.92 (1 H, d, *J* = 6.6 Hz), 6.64 (2 H, d, *J* = 8.5 Hz), 4.29–4.24 (1 H, m), 4.14–4.10 (1 H, m), 4.08–4.04 (1 H, m), 3.30 (2 H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.17–3.09 (1 H, m), 2.90–2.85 (1 H, m), 2.71 (1 H, dd, *J* = 13.6, 9.9 Hz), 2.09–1.98 (2 H, m), 1.93–1.85 (2 H, m), 1.81–1.75 (1 H, m), 1.71–1.46 (9 H, m), 1.40–1.16 (3 H, m), 1.12 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.04 (3 H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.93–0.84 (12 H, m), 0.67–0.64 (8 H, m), –0.10 (1 H, dd, *J* = 10.4, 5.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.4, 173.1, 172.8, 172.3, 171.8, 170.3, 156.1, 129.7, 126.2, 115.0, 57.4, 56.4, 52.8, 52.7, 50.9, 50.5, 45.9, 40.7, 38.7, 37.8, 36.8, 35.9, 28.6, 27.7, 24.7, 24.1, 23.5, 23.3, 23.2, 23.1, 22.9, 22.0, 21.4, 21.2, 21.1, 20.7, 20.0, 18.9, 7.4; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₄₁H₆₆N₉O₇, 796.5085; found, 796.5081.

CP2

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N₃)-(cis-NfCf)-Tyr(*t*Bu)-Leu-Ala-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP2** (8.6 mg, 11 μmol, 57%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 13.7 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.65 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 8.56 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 8.17 (1 H, d, *J* = 3.0 Hz), 8.06 (1 H, d, *J* = 7.1 Hz), 7.53 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.05 (1 H, d, *J* = 7.1 Hz), 6.96 (2 H, d, *J* =

8.7 Hz), 6.64 (2 H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.18–4.10 (3 H, m), 3.72–3.62 (2 H, m), 3.34–3.28 (2 H, m), 3.18–3.07 (1 H, m), 2.86 (1 H, dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz), 2.75–2.69 (1 H, m), 2.07–1.94 (2 H, m), 1.88–1.79 (1 H, m), 1.70–1.62 (1 H, m), 1.60–1.46 (7 H, m), 1.44–1.30 (1 H, m), 1.42 (3 H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.18 (1 H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.12 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.04–0.93 (1 H, m), 1.00 (3 H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.91–0.81 (1 H, m), 0.89 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.85 (3 H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.75–0.62 (1 H, m), 0.71 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.68 (3 H, d, $J = 6.8$ Hz), –0.08 (1 H, dd, $J = 10.4, 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.4, 173.1, 172.8, 172.3, 171.8, 170.3, 156.1, 129.7, 126.2, 115.0, 57.4, 56.4, 52.8, 52.7, 50.9, 50.5, 45.9, 40.7, 38.7, 37.8, 36.8, 35.9, 28.6, 27.7, 24.7, 24.1, 23.5, 23.3, 23.2, 23.1, 22.9, 22.0, 21.4, 21.2, 21.1, 20.7, 20.0, 18.9, 7.4; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_9\text{O}_7$, 754.4616; found, 754.4596.

CP3

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N_3)-Leu(*cis*-NfCf)-Tyr(*t*Bu)-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP3** (8.6 mg, 11 μmol , 57%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 13.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.77 (1 H, d, $J = 5.7$ Hz), 8.43 (1 H, d, $J = 7.1$ Hz), 8.25 (2 H, t, $J = 3.0$ Hz), 7.42 (1 H, d, $J = 8.9$ Hz), 6.96 (2 H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.95 (1 H, d, $J = 3.2$ Hz), 6.63 (2 H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.31–4.25 (1 H, m), 4.08–4.01 (2 H, m), 3.73–3.62 (2 H, m), 3.35–3.23 (2 H, m), 3.16–3.07 (1 H, m), 2.86 (1 H, dd, $J = 13.3, 5.9$ Hz), 2.74–2.68 (1 H, m), 2.06–1.99 (1 H, m), 1.91–1.83 (1 H, m), 1.79–1.72 (1 H, m), 1.69–1.49 (7 H, m), 1.44 (3 H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.38–1.30 (2 H, m), 1.26–1.16 (1 H, m), 1.12 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.03–0.97 (1 H, m), 1.02 (3 H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.93 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.88–0.80 (1 H, m), 0.84 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.71 (3 H, d, $J = 10.6$ Hz), 0.70 (3 H, d, $J = 10.6$ Hz), 0.67–0.63 (1 H, m), –0.09 (1 H, dd, $J = 7.4, 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.4, 173.1, 172.8, 172.3, 171.8, 170.3, 156.1, 129.7, 126.2, 115.0, 57.4, 56.4, 52.8, 52.7, 50.9, 50.5, 45.9, 40.7, 38.7, 37.8, 36.8, 35.9, 28.6, 27.7, 24.7, 24.1, 23.5, 23.3, 23.2, 23.1, 22.7, 22.0, 21.4, 21.2, 21.1, 20.7, 20.0, 18.9, 7.4; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_9\text{O}_7$, 754.4616; found, 754.4631.

CP4

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu(*cis*-NfCf)-Tyr(*t*Bu)-Lys(N_3)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP4** (7.3 mg, 9.7 μmol , 48%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 14.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.26 (1 H, br s), 8.67 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 8.59 (1 H, d, $J = 6.2$ Hz), 8.26 (1 H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.15 (1 H, d, $J = 6.9$ Hz), 7.46 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.98 (3 H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.65 (2 H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.27–4.21 (1 H, m), 4.13–4.07 (3 H, m), 3.68–3.57 (3 H, m), 3.29–3.09 (2 H,

m), 2.88 (1 H, dd, $J = 13.4, 6.1$ Hz), 2.73 (1 H, dd, $J = 13.5, 9.4$ Hz), 2.08–2.01 (1 H, m), 1.86–1.78 (4 H, m), 1.70–1.53 (2 H, m), 1.50 (3 H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.43 (4 H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.41–1.35 (1 H, m), 1.24–1.15 (1 H, m), 1.12 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.02 (3 H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.03–0.97 (1 H, m), 0.91 (6 H, t, $J = 7.0$ Hz), 0.85 (6 H, t, $J = 6.3$ Hz), 0.68–0.63 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, $J = 10.8, 5.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.4, 173.1, 172.4, 172.2, 171.8, 170.3, 156.0, 129.9, 126.5, 115.0, 56.6, 54.3, 52.6, 52.4, 51.0, 50.4, 46.0, 40.7, 40.7, 36.5, 29.1, 28.0, 24.6, 24.1, 23.1, 22.9, 22.9, 21.9, 21.5, 21.2, 21.2, 20.0, 18.8, 18.7, 16.2, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_9\text{O}_7$, 754.4616; found, 754.4630.

CP5

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N₃)-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP5** (7.0 mg, 9.9 μmol , 50%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 17.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.71 (1 H, d, $J = 5.5$ Hz), 8.59 (1 H, d, $J = 6.2$ Hz), 8.22 (1 H, d, $J = 3.2$ Hz), 8.08 (1 H, d, $J = 6.6$ Hz), 7.45 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.96 (1 H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.20–4.15 (1 H, m), 4.07 (1 H, dd, $J = 15.2, 7.2$ Hz), 3.89 (1 H, dd, $J = 14.8, 6.5$ Hz), 3.83–3.79 (1 H, m), 3.71–3.64 (1 H, m), 3.33–3.26 (2 H, m), 3.13–3.03 (1 H, m), 2.08–2.00 (1 H, m), 1.75–1.52 (8 H, m), 1.48 (3 H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.44 (4 H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.40–1.14 (4 H, m), 1.12 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.05 (3 H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.02–0.94 (1 H, m), 0.91 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.90 (3 H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.88 (3 H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.85 (3 H, d, $J = 5.2$ Hz), 0.83 (3 H, d, $J = 5.2$ Hz), 0.79 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.67–0.64 (1 H, m), –0.09 (1 H, dd, $J = 10.8, 5.6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.8, 177.7, 173.8, 173.7, 172.1, 170.8, 63.0, 55.3, 53.0, 51.3, 50.9, 48.4, 46.4, 46.3, 41.0, 36.7, 30.7, 28.3, 24.9, 24.8, 24.5, 23.6, 23.2, 23.2, 22.9, 22.2, 21.8, 21.4, 21.4, 21.3, 20.5, 18.9, 16.5, 7.5; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_9\text{O}_6$, 704.4823; found, 704.4820.

CP6

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N₃)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Asn(Trt)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP6** (9.8 mg, 13 μmol , 66%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 13.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.59 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 8.25 (1 H, d, $J = 9.4$ Hz), 8.12 (1 H, d, $J = 5.3$ Hz), 8.08 (1 H, d, $J = 6.9$ Hz), 8.03 (1 H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.80 (1 H, br s), 7.28 (1 H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.09 (1 H, br s), 4.42 (1 H, dd, $J = 14.9, 8.7$ Hz), 4.35 (1 H, dd, $J = 10.0, 4.6$ Hz), 4.17–4.11 (1 H, m), 4.04–3.99 (1 H, m), 3.97–3.92 (1 H, m), 3.30 (2 H, td, $J = 5.4, 2.8$ Hz), 3.12–3.01 (2 H, m), 2.83 (1 H, dd, $J = 16.4, 5.1$ Hz), 1.84–1.67 (1 H, m), 1.66–1.56 (3 H, m), 1.54–1.45 (3 H, m), 1.42–1.24 (4 H, m),

1.11 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.08–1.03 (1 H, m), 0.92–0.82 (27 H, m), 0.65–0.60 (1 H, m), 0.10 (1 H, dd, $J = 10.4, 5.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 176.6, 173.0, 172.1, 171.7, 170.9, 170.9, 170.8, 53.8, 53.8, 53.3, 52.4, 50.6, 50.3, 49.8, 45.9, 42.3, 35.3, 34.1, 33.7, 31.3, 29.0, 27.7, 24.2, 24.2, 23.7, 23.6, 23.1, 23.1, 23.0, 23.0, 22.4, 21.8, 21.8, 21.1, 20.6, 19.3, 18.8, 7.6; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{N}_{10}\text{O}_7$, 747.4881; found, 747.4885.

CP7

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N_3)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Ser(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP7** (8.4 mg, 12 μmol , 59%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 14.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.49 (1 H, d, $J = 5.0$ Hz), 8.39 (1 H, d, $J = 5.3$ Hz), 8.09 (1 H, d, $J = 6.4$ Hz), 7.87 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 7.70 (1 H, br s), 7.33 (1 H, br s), 5.51 (1 H, br s), 4.31–4.25 (2 H, m), 4.08–4.03 (1 H, m), 3.96–3.86 (3 H, m), 3.59–3.51 (1 H, m), 3.30 (2 H, t, $J = 7.9$ Hz), 3.13–3.08 (1 H, m), 2.37–2.33 (1 H, m), 1.84–1.75 (1 H, m), 1.68–1.61 (3 H, m), 1.58–1.23 (10 H, m), 1.10 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.08–1.04 (1 H, m), 0.94 (3 H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.89–0.82 (21 H, m), 0.65–0.60 (1 H, m), 0.04 (1 H, dd, $J = 10.6, 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.1, 172.9, 171.9, 171.2, 170.8, 162.9, 58.3, 53.6, 52.7, 52.3, 50.8, 45.9, 41.8, 30.6, 28.0, 24.5, 24.5, 24.5, 24.2, 23.3, 23.3, 23.2, 22.3, 22.2, 22.2, 21.9, 21.9, 21.8, 21.7, 21.4, 21.4, 19.6, 19.6, 18.9, 7.7; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_9\text{O}_7$, 720.4772; found, 720.4756.

CP8

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N_3)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Arg(Pbf)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP8** (11 mg, 14 μmol , 71%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 10.7 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.62 (1 H, d, $J = 5.3$ Hz), 8.41 (1 H, br s), 8.28 (1 H, d, $J = 3.4$ Hz), 8.16 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 7.59 (1 H, t, $J = 5.5$ Hz), 7.40 (1 H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.11 (1 H, d, $J = 6.6$ Hz), 4.22–4.16 (1 H, m), 4.06–3.97 (2 H, m), 3.88–3.83 (1 H, m), 3.61–3.55 (1 H, m), 3.32 (2 H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.15–3.04 (4 H, m), 2.12–2.05 (1 H, m), 2.00–1.93 (1 H, m), 1.89–1.81 (1 H, m), 1.76–1.59 (8 H, m), 1.57–1.46 (6 H, m), 1.46–1.36 (1 H, m), 1.34–1.19 (2 H, m), 1.12 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.05 (3 H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.02–0.98 (1 H, m), 0.93–0.83 (18 H, m), 0.80 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.68–0.63 (1 H, m), –0.07 (1 H, dd, $J = 10.6, 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.4, 173.3, 172.8, 172.6, 171.7, 170.4, 158.4, 158.1, 157.7, 156.7, 59.8, 57.4, 54.7, 52.7, 52.1, 51.1, 50.5, 45.8, 36.1, 29.0, 27.9, 27.8, 25.1, 24.6, 24.5, 24.3, 23.3, 23.1, 23.0, 22.9, 21.9, 21.4, 21.3, 21.2, 21.1, 20.2, 18.6, 7.2; HRMS (ESI)

m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{38}H_{69}N_{12}O_6$, 789.5463; found, 789.5468.

CP9

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N_3)-Leu-Asn(Trt)-(cis-NfCf)-Tyr(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP9** (8.6 mg, 10 μ mol, 54%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 270 nm, Retention time: 12.5 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.19 (1 H, s), 8.79 (1 H, d, J = 6.2 Hz), 8.57 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 8.17 (1 H, d, J = 3.7 Hz), 8.14 (1 H, d, J = 6.2 Hz), 7.43 (1 H, d, J = 7.8 Hz), 7.11 (1 H, d, J = 7.3 Hz), 7.01 (4 H, d, J = 8.2 Hz), 6.64 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 4.47 (1 H, dd, J = 14.0, 8.0 Hz), 4.24–4.19 (1 H, m), 4.05 (1 H, dd, J = 14.6, 6.4 Hz), 3.68–3.63 (1 H, m), 3.58–3.52 (1 H, m), 3.29 (2 H, t, J = 6.7 Hz), 3.17–3.11 (1 H, m), 2.88–2.66 (4 H, m), 2.04–1.94 (2 H, m), 1.90–1.81 (1 H, m), 1.68–1.59 (1 H, m), 1.56–1.45 (6 H, m), 1.39–1.23 (2 H, m), 1.16–1.10 (1 H, m), 1.13 (3 H, d, J = 3.2 Hz), 1.05–0.95 (1 H, m), 1.02 (3 H, d, J = 3.6 Hz), 0.89 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.84 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 0.82–0.77 (1 H, m), 0.72 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 0.68–0.63 (1 H, m), 0.66 (3 H, d, J = 6.4 Hz), –0.09 (1 H, dd, J = 10.4, 5.2 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 173.3, 173.1, 172.8, 171.9, 171.5, 169.3, 156.1, 129.9, 126.4, 115.0, 57.1, 56.1, 53.1, 52.7, 50.5, 50.4, 46.0, 40.4, 37.1, 36.9, 36.0, 28.7, 28.7, 27.7, 24.2, 23.5, 23.4, 23.2, 23.0, 22.1, 21.4, 21.1, 21.0, 20.0, 19.0, 7.5; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{39}H_{61}N_{10}O_8$, 797.4674; found, 797.4666.

CP10

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N_3)-Leu-Ser(*t*Bu)-(cis-NfCf)-Tyr(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP10** (5.3 mg, 6.9 μ mol, 35%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 13.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.19 (1 H, br s), 8.50 (1 H, d, J = 5.7 Hz), 8.40 (1 H, d, J = 5.0 Hz), 8.07 (1 H, d, J = 7.1 Hz), 8.00 (1 H, d, J = 5.0 Hz), 7.53 (1 H, d, J = 7.5 Hz), 7.20 (1 H, d, J = 7.1 Hz), 6.99 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.65 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 4.25–4.20 (2 H, m), 4.14 (1 H, dd, J = 14.8, 7.2 Hz), 3.84–3.73 (3 H, m), 3.65–3.60 (1 H, m), 3.30 (2 H, t, J = 6.7 Hz), 3.19–3.09 (1 H, m), 2.86 (1 H, dd, J = 13.7, 7.5 Hz), 2.77 (1 H, dd, J = 13.7, 8.0 Hz), 2.07–2.00 (1 H, m), 1.93–1.76 (1 H, m), 1.69–1.62 (1 H, m), 1.59–1.46 (7 H, m), 1.41–1.33 (1 H, m), 1.30–1.24 (2 H, m), 1.18 (1 H, t, J = 7.3 Hz), 1.13 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 1.10–1.05 (1 H, m), 0.93 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 0.89 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.85 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.78 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.76 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.66–0.59 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, J = 10.4, 4.8 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 176.8, 172.7, 172.4, 172.2, 172.0, 168.6, 156.0, 129.9, 126.9, 115.0, 57.4, 55.9, 52.4, 52.4, 50.5, 45.8, 36.3, 36.2, 36.2, 30.9, 28.9, 27.8, 24.1, 23.8, 23.3, 23.1, 23.0,

23.0, 22.1, 22.1, 21.4, 21.3, 21.1, 19.8, 19.0, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{38}H_{60}N_9O_8$, 770.4565; found, 770.4559.

CP11

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N_3)-Leu-Arg(Pbf)-(cis-NfCf)-Tyr(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP11** (8.5 mg, 10 μ mol, 51%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 10.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.20 (1 H, br s), 8.58 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 8.43 (1 H, d, J = 5.7 Hz), 8.07 (1 H, d, J = 4.8 Hz), 7.99 (1 H, d, J = 6.6 Hz), 7.67 (1 H, d, J = 7.3 Hz), 7.52 (1 H, t, J = 5.3 Hz), 7.33 (1 H, d, J = 6.9 Hz), 6.97 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.65 (2 H, d, J = 8.7 Hz), 4.30–4.25 (1 H, m), 4.17–4.11 (2 H, m), 3.68–3.65 (2 H, m), 3.30 (2 H, t, J = 6.7 Hz), 3.19–3.05 (4 H, m), 2.81 (2 H, d, J = 7.5 Hz), 2.06 (1 H, dd, J = 14.6, 7.3 Hz), 1.97–1.73 (3 H, m), 1.66–1.24 (14 H, m), 1.13 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 1.00–0.98 (1 H, m), 0.94 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 0.90 (4 H, d, J = 6.4 Hz), 0.86 (4 H, d, J = 6.4 Hz), 0.75 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 0.72 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 0.68–0.62 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, J = 10.4, 5.4 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 176.9, 172.7, 172.4, 172.1, 171.7, 169.7, 156.6, 156.0, 129.8, 126.7, 115.0, 55.5, 53.2, 52.2, 50.5, 45.7, 45.7, 36.4, 28.9, 27.8, 27.7, 27.2, 27.2, 24.9, 24.9, 24.2, 23.6, 23.2, 23.2, 22.9, 21.8, 21.6, 21.2, 21.0, 20.3, 19.7, 19.2, 19.1, 7.5; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{41}H_{67}N_{12}O_7$, 839.5256; found, 839.5245.

CP12

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Leu-Lys(N_3)-(cis-NfCf)-Leu-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (66 mg) to yield **CP12** (16 mg, 22 μ mol, 58%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 16.7 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.68 (1 H, d, J = 5.7 Hz), 8.63 (1 H, d, J = 5.7 Hz), 8.11 (1 H, d, J = 4.0 Hz), 8.09 (1 H, d, J = 8.0 Hz), 7.45 (1 H, d, J = 8.5 Hz), 7.07 (1 H, d, J = 6.9 Hz), 4.13–4.06 (2 H, m), 3.94–3.85 (2 H, m), 3.71–3.65 (1 H, m), 3.26 (2 H, t, J = 6.9 Hz), 3.15–3.09 (1 H, m), 2.09–2.02 (1 H, m), 1.96–1.89 (1 H, m), 1.77–1.63 (4 H, m), 1.62–1.46 (8 H, m), 1.43 (3 H, d, J = 7.3 Hz), 1.32–1.18 (3 H, m), 1.12 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 1.05 (3 H, d, J = 6.9 Hz), 1.01–0.95 (1 H, m), 0.92–0.84 (18 H, m), 0.68–0.62 (1 H, m), –0.09 (1 H, dd, J = 10.4, 5.6 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 173.3, 173.0, 172.9, 171.8, 169.9, 53.4, 53.3, 52.6, 52.5, 52.4, 50.6, 45.5, 40.6, 38.8, 36.4, 29.8, 27.9, 24.5, 24.2, 24.1, 23.2, 23.0, 22.9, 22.9, 22.3, 22.2, 22.0, 21.4, 21.2, 21.2, 20.2, 18.7, 16.2, 7.2; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{35}H_{62}N_9O_6$, 704.4823; found, 704.4825.

CP13

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Lys(N₃)-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (66 mg) to yield **CP13** (14 mg, 21 μmol, 51%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 16.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.82 (1 H, d, *J* = 5.0 Hz), 8.38 (1 H, d, *J* = 5.9 Hz), 8.26 (1 H, d, *J* = 5.5 Hz), 8.20 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.35 (1 H, d, *J* = 9.1 Hz), 6.96 (1 H, d, *J* = 6.9 Hz), 4.27–4.21 (1 H, m), 4.02–3.95 (2 H, m), 3.83–3.79 (1 H, m), 3.69–3.65 (1 H, m), 3.33–3.24 (2 H, m), 3.12–3.03 (1 H, m), 2.07–2.00 (1 H, m), 1.82–1.65 (5 H, m), 1.61–1.43 (11 H, m), 1.40–1.22 (3 H, m), 1.13 (3 H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.04 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.02–0.97 (1 H, m), 0.93 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.91 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.88–0.83 (9 H, m), 0.80 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.68–0.62 (1 H, m), –0.10 (1 H, dd, *J* = 10.2, 5.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.3, 174.1, 173.7, 173.2, 171.0, 170.4, 54.2, 53.9, 53.4, 51.9, 51.9, 51.0, 50.7, 46.0, 36.2, 30.4, 28.0, 24.6, 24.5, 24.2, 23.3, 23.1, 22.3, 22.2, 22.2, 22.1, 21.9, 21.2, 21.1, 20.8, 20.2, 18.7, 18.6, 16.1, 7.1; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₅H₆₂N₉O₆, 704.4823; found, 704.4810.

CP14

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Lys(N₃)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Ala-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP14** (4.7 mg, 6.7 μmol, 33%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 17.5 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.65 (1 H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.57 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 8.32 (1 H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.04 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 7.54 (1 H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.03 (1 H, d, *J* = 6.9 Hz), 4.20–4.15 (1 H, m), 4.11–4.05 (1 H, m), 3.93–3.83 (2 H, m), 3.60–3.54 (1 H, m), 3.31–3.29 (2 H, m), 3.13–3.05 (1 H, m), 2.07–1.96 (2 H, m), 1.92–1.84 (1 H, m), 1.82–1.73 (1 H, m), 1.71–1.60 (3 H, m), 1.57–1.43 (6 H, m), 1.40–1.34 (1 H, m), 1.32–1.16 (6 H, m), 1.11 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.04 (3 H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.02–0.96 (1 H, m), 0.91–0.82 (15 H, m), 0.79 (3 H, d, *J* = 5.9 Hz), 0.68–0.63 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, *J* = 10.0, 5.6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.2, 173.9, 173.3, 172.7, 171.7, 170.4, 57.3, 52.6, 51.1, 50.5, 50.4, 50.4, 46.0, 38.7, 36.3, 28.8, 28.8, 27.8, 24.5, 24.5, 24.1, 23.2, 23.2, 23.2, 23.0, 22.9, 21.8, 21.4, 21.3, 21.2, 21.0, 20.0, 18.6, 16.7, 7.3; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₅H₆₂N₉O₆, 704.4823; found, 704.4809.

CP15

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Lys(N₃)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (66 mg) to yield **CP15** (15 mg, 21 μmol, 52%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 15.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.74 (1 H, d, *J* = 5.0 Hz), 8.60 (1 H, d, *J* = 6.4 Hz), 8.16 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 8.13 (1 H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.38 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.94 (1 H, d, *J* = 6.9 Hz), 4.22–4.16 (1 H, m), 4.04 (1 H, dd, *J* = 13.6, 7.2 Hz), 3.87–3.84 (2 H, m), 3.07–3.63 (1 H, m), 3.35–3.24 (2 H, m), 3.13–3.04 (1 H, m), 2.07–1.93 (2 H, m), 1.77–1.55 (6 H, m), 1.50–1.43 (9 H, m), 1.37–1.30 (2 H, m), 1.24–1.16 (1 H, m), 1.12 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.05 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.01–0.95 (1 H, m), 0.92 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.90 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.86–0.83 (9 H, m), 0.79 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.68–0.62 (1 H, m), –0.10 (1 H, d, *J* = 10.4, 5.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.4, 173.4, 173.3, 172.8, 171.7, 170.4, 53.7, 52.9, 52.7, 51.0, 50.6, 45.9, 40.5, 36.4, 29.6, 28.0, 24.6, 24.2, 24.2, 23.1, 22.9, 22.9, 22.4, 22.1, 22.0, 21.4, 21.1, 21.0, 20.1, 18.8, 16.2, 7.2; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₅H₆₂N₉O₆, 704.4823; found, 704.4851.

CP16

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Tyr(*t*Bu)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N₃)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (66 mg) to yield **CP16** (11 mg, 13 μmol, 33%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 16.8 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.19 (1 H, s), 8.82 (1 H, d, *J* = 6.4 Hz), 8.50 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 8.28 (1 H, d, *J* = 5.9 Hz), 8.17 (1 H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.49 (1 H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.95 (3 H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.65 (2 H, d, *J* = 8.5 Hz), 4.22–4.16 (1 H, m), 4.04 (1 H, dd, *J* = 13.6, 7.0 Hz), 3.78–3.65 (3 H, m), 3.31–3.25 (3 H, m), 3.11–3.01 (2 H, m), 2.05–1.97 (1 H, m), 1.86–1.76 (1 H, m), 1.74–1.63 (3 H, m), 1.61–1.41 (9 H, m), 1.35–1.23 (2 H, m), 1.19–1.13 (1 H, m), 1.10 (3 H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.02 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 0.99–0.96 (1 H, m), 0.92 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.86 (9 H, t, *J* = 5.7 Hz), 0.82 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.78 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.70–0.64 (1 H, m), –0.11 (1 H, dd, *J* = 10.4, 5.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.3, 173.1, 172.8, 172.4, 171.7, 170.3, 155.8, 129.7, 128.1, 115.1, 54.8, 52.9, 52.8, 51.0, 50.6, 46.0, 40.8, 36.5, 34.6, 34.2, 34.2, 30.4, 28.0, 24.5, 24.5, 24.2, 23.2, 22.9, 22.9, 22.5, 21.9, 21.5, 21.1, 21.0, 20.2, 18.7; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₄₁H₆₆N₉O₇, 796.5085; found, 796.5079.

CP17

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Asn(Trt)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N₃)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (66 mg) to yield **CP17** (12 mg, 16 μmol, 41%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 13.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (1 H, d, *J* = 5.0 Hz), 8.60 (1 H, d, *J* = 6.6 Hz), 8.19 (1 H, d, *J* =

3.2 Hz), 7.94 (1 H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.60 (1 H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.35 (1 H, br s), 7.04 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 6.83 (1 H, br s), 4.23–4.14 (2 H, m), 4.10–4.05 (1 H, m), 3.92–3.88 (1 H, m), 3.76–3.70 (1 H, m), 3.31–3.27 (2 H, m), 3.11–3.05 (1 H, m), 2.87 (1 H, dd, $J = 15.6, 8.7$ Hz), 2.64 (1 H, dd, $J = 15.4, 4.5$ Hz), 2.14–2.07 (1 H, m), 1.79–1.48 (11 H, m), 1.46–1.39 (2 H, m), 1.37–1.18 (3 H, m), 1.12 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.05 (3 H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.97–0.92 (1 H, m), 0.88–0.79 (18 H, m), 0.69–0.63 (1 H, m), –0.05 (1 H, dd, $J = 11.2, 6.0$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.4, 173.4, 172.1, 171.7, 171.6, 171.3, 170.3, 53.2, 53.0, 52.5, 51.2, 51.2, 50.6, 46.1, 41.5, 38.1, 36.2, 36.2, 35.5, 30.7, 28.0, 24.5, 23.7, 23.2, 22.8, 22.5, 21.9, 21.9, 21.7, 21.2, 21.1, 20.1, 18.5, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{N}_{10}\text{O}_7$, 747.4881; found, 747.4900.

CP18

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N_3)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (66 mg) to yield **CP18** (11 mg, 16 μmol , 39%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 14.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.76 (1 H, d, $J = 4.6$ Hz), 8.50 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 8.21 (1 H, d, $J = 3.4$ Hz), 8.06 (1 H, d, $J = 6.6$ Hz), 7.49 (1 H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.03 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 4.96 (1 H, t, $J = 5.9$ Hz), 4.18–4.12 (1 H, m), 4.09–4.04 (1 H, m), 3.97–3.90 (1 H, m), 3.87–3.75 (3 H, m), 3.71–3.66 (1 H, m), 3.31–3.24 (2 H, m), 3.11–3.05 (1 H, m), 2.09–2.02 (1 H, m), 1.82–1.41 (12 H, m), 1.40–1.18 (3 H, m), 1.15–1.08 (4 H, m), 1.05 (3 H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.02–0.96 (1 H, m), 0.93–0.87 (9 H, m), 0.84 (6 H, dd, $J = 6.6, 2.7$ Hz), 0.79 (3 H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.69–0.63 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, $J = 10.7, 5.7$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 173.2, 173.0, 171.6, 171.1, 170.4, 59.9, 54.8, 52.8, 52.6, 51.2, 50.6, 46.0, 40.7, 36.5, 30.5, 28.1, 24.5, 24.2, 23.3, 22.9, 22.8, 22.5, 22.5, 21.8, 21.6, 21.1, 21.1, 21.0, 20.2, 18.7, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_9\text{O}_7$, 720.4772; found, 720.4764.

CP19

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N_3)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Gln(Trt)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **CP19** (7.8 mg, 10 μmol , 34%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 14.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.57 (1 H, d, $J = 5.5$ Hz), 8.42 (1 H, d, $J = 5.5$ Hz), 8.30 (1 H, d, $J = 3.7$ Hz), 8.06 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 7.43 (1 H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.27 (1 H, s), 7.08 (1 H, d, $J = 6.4$ Hz), 6.79 (1 H, s), 4.19–4.14 (1 H, m), 4.04 (1 H, dd, $J = 13.6, 7.4$ Hz), 3.97–3.92 (1 H, m), 3.85–3.80 (1 H, m), 3.62–3.57 (1 H, m), 3.31 (2 H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.13–3.05 (1 H, m), 2.24–2.16 (1 H, m), 2.11–2.02 (2 H, m), 2.01–1.93 (1 H, m), 1.89–1.78 (3 H, m), 1.76–1.58 (6 H, m), 1.57–1.46 (6 H, m), 1.43–1.35 (1 H, m),

1.32–1.19 (1 H, m), 1.12 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.05 (3 H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.03–0.98 (1 H, m), 0.91 (3 H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.90 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.88 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.84 (3 H, d, $J = 6.0$ Hz), 0.83 (3 H, d, $J = 6.0$ Hz), 0.78 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.68–0.62 (1 H, m), –0.07 (1 H, dd, $J = 10.8, 5.6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 173.4, 173.3, 172.8, 171.6, 170.4, 57.2, 55.1, 52.7, 52.3, 51.2, 50.5, 45.9, 40.4, 36.2, 36.2, 31.5, 29.0, 27.8, 26.7, 26.7, 24.5, 24.5, 24.2, 23.3, 23.1, 23.0, 22.9, 21.8, 21.4, 21.3, 21.2, 21.0, 20.2, 18.7, 7.2; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{65}\text{N}_{10}\text{O}_7$, 761.5038; found, 761.5059.

CP20

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Gln(Trt)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N₃)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **CP20** (11 mg, 14 μmol , 46%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 14.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.78 (1 H, d, $J = 7.1$ Hz), 8.70 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 8.23 (1 H, d, $J = 3.0$ Hz), 8.19 (1 H, d, $J = 5.9$ Hz), 7.50 (1 H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.29 (1 H, s), 7.02 (1 H, d, $J = 6.6$ Hz), 6.81 (1 H, s), 4.23–4.17 (1 H, m), 4.11–4.05 (1 H, m), 3.91–3.83 (2 H, m), 3.64–3.59 (1 H, m), 3.34–3.31 (2 H, m), 3.15–3.06 (1 H, m), 2.22–2.02 (5 H, m), 1.87–1.46 (12 H, m), 1.42–1.30 (1 H, m), 1.27–1.20 (1 H, m), 1.15 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.09 (3 H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.05–1.02 (1 H, m), 0.95–0.82 (18 H, m), 0.72–0.66 (1 H, m), –0.07 (1 H, dd, $J = 11.2, 5.9$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 173.5, 172.9, 172.9, 170.4, 170.4, 57.4, 55.0, 52.7, 50.6, 50.6, 46.0, 30.4, 28.1, 28.0, 25.5, 24.6, 24.6, 24.3, 24.2, 23.4, 23.3, 22.9, 22.9, 22.6, 21.4, 21.1, 21.1, 21.1, 21.0, 21.0, 20.2, 18.7, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{65}\text{N}_{10}\text{O}_7$, 761.5038; found, 761.5034.

CP21

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Lys(N₃)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Thr(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **CP21** (9.6 mg, 13 μmol , 44%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 15.6 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (1 H, d, $J = 3.4$ Hz), 8.34 (1 H, d, $J = 5.7$ Hz), 8.07 (1 H, d, $J = 7.1$ Hz), 7.85 (1 H, d, $J = 6.4$ Hz), 7.63 (1 H, br s), 7.50 (1 H, br s), 5.37 (1 H, d, $J = 3.7$ Hz), 4.27 (2 H, dd, $J = 13.4, 6.2$ Hz), 4.19 (1 H, d, $J = 4.1$ Hz), 4.08–4.03 (1 H, m), 3.94–3.89 (1 H, m), 3.86–3.83 (1 H, m), 3.31–3.28 (2 H, m), 3.16–3.07 (1 H, m), 1.87–1.67 (2 H, m), 1.65–1.55 (6 H, m), 1.54–1.38 (6 H, m), 1.36–1.20 (3 H, m), 1.16–1.13 (1 H, m), 1.10 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.07 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 0.99 (3 H, d, $J = 7.1$ Hz), 0.90–0.86 (12 H, m), 0.83 (6 H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.66–0.60 (1 H, m), 0.04 (1 H, dd, $J = 10.8, 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.5, 172.5, 171.6, 170.9, 170.4, 67.2, 53.3, 53.3, 51.9, 50.6, 45.6, 43.0, 41.4, 35.1, 30.4, 27.7, 24.3, 24.3, 24.3, 23.9, 23.1, 23.1, 23.0, 22.9, 22.0, 21.6, 21.6,

21.5, 21.1, 21.1, 20.2, 20.2, 19.3, 18.4, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{36}H_{64}N_9O_7$, 734.4929; found, 734.4919.

CP22

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Thr(*t*Bu)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N₃)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **CP22** (11 mg, 14 μ mol, 48%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 16.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.65 (1 H, br s), 8.22 (2 H, d, J = 3.9 Hz), 8.14 (1 H, br s), 7.54 (1 H, d, J = 7.5 Hz), 7.15 (1 H, br s), 4.41–4.35 (1 H, m), 4.18–4.12 (1 H, m), 4.06–4.01 (1 H, m), 3.94–3.89 (2 H, m), 3.34–3.24 (2 H, m), 3.14–3.08 (1 H, m), 2.13–2.06 (1 H, m), 1.83–1.76 (1 H, m), 1.70–1.57 (7 H, m), 1.56–1.42 (5 H, m), 1.35–1.29 (2 H, m), 1.24–1.16 (1 H, m), 1.11 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 1.05–1.02 (7 H, m), 0.92–0.89 (9 H, m), 0.85–0.83 (6 H, m), 0.79 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.70–0.64 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, J = 10.4, 5.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.1, 173.4, 172.6, 171.5, 171.4, 170.5, 64.2, 54.4, 52.8, 52.7, 51.4, 51.4, 50.6, 45.8, 36.4, 30.7, 28.1, 24.5, 24.3, 23.3, 22.9, 22.8, 22.5, 21.7, 21.5, 21.3, 21.1, 21.1, 20.5, 20.0, 18.9, 18.8, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{36}H_{64}N_9O_7$, 734.4929; found, 734.4913.

CP23

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Ala-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N₃)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP23** (6.5 mg, 9.8 μ mol, 49%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 13.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 5/95 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.66 (1 H, d, J = 5.7 Hz), 8.63 (1 H, d, J = 5.5 Hz), 8.20 (1 H, d, J = 3.2 Hz), 8.08 (1 H, d, J = 7.1 Hz), 7.42 (1 H, d, J = 8.5 Hz), 7.03 (1 H, d, J = 6.9 Hz), 4.19–4.08 (2 H, m), 4.00–3.93 (1 H, m), 3.84–3.80 (1 H, m), 3.75–3.68 (1 H, m), 3.30 (2 H, t, J = 6.7 Hz), 3.12–3.06 (1 H, m), 2.09–2.02 (1 H, m), 1.75–1.59 (5 H, m), 1.57–1.45 (5 H, m), 1.42 (3 H, d, J = 7.3 Hz), 1.35 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 1.33–1.15 (3 H, m), 1.12 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 1.05 (3 H, d, J = 6.9 Hz), 1.02–0.93 (1 H, m), 0.90 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 0.84 (6 H, dd, J = 6.4, 4.3 Hz), 0.79 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.68–0.62 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, J = 10.4, 4.8 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.3, 173.2, 173.1, 172.7, 171.7, 170.5, 54.7, 52.4, 52.4, 51.2, 50.5, 49.5, 46.0, 40.5, 36.3, 30.3, 28.0, 24.5, 24.2, 23.0, 22.9, 22.5, 21.9, 21.4, 21.2, 21.0, 20.1, 18.9, 16.6, 16.2, 7.3; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{32}H_{56}N_9O_6$, 662.4353; found, 662.4339.

CP24

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Lys(N₃)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP24** (6.9 mg, 10 μmol, 51%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 12.1 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 5/95 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.83 (1 H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.37 (1 H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.19 (1 H, d, *J* = 3.4 Hz), 8.02 (1 H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.49 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.12 (1 H, d, *J* = 6.9 Hz), 4.15–4.09 (2 H, m), 3.96–3.85 (3 H, m), 3.79–3.70 (2 H, m), 3.30 (2 H, td, *J* = 5.0, 1.4 Hz), 3.12–3.06 (1 H, m), 2.11–2.04 (1 H, m), 1.78–1.71 (1 H, m), 1.68–1.57 (4 H, m), 1.57–1.45 (6 H, m), 1.36 (3 H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.33–1.27 (1 H, m), 1.23–1.15 (2 H, m), 1.12 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.05 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.00–0.92 (1 H, m), 0.89 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.84 (6 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.80 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.68–0.63 (1 H, m), –0.08 (1 H, dd, *J* = 10.8, 5.6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.2, 173.4, 172.9, 171.5, 170.8, 170.5, 60.0, 59.6, 54.4, 52.4, 51.4, 50.5, 49.9, 46.0, 40.7, 36.4, 30.4, 28.0, 24.5, 24.1, 23.0, 22.8, 22.4, 21.8, 21.6, 21.1, 20.0, 18.9, 16.3, 7.3; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₂H₅₆N₉O₇, 678.4302; found, 678.4333.

δCP1

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-(5-Ava)-Lys(N₃)-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **δCP1** (6.4 mg, 9.6 μmol, 32%) as a white solid. In the process of cleavage from the resin, 5% TFA in CH₂Cl₂ (1.5 mL) was used instead of 20% HFIP in CH₂Cl₂.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 12.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.48 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 8.22 (1 H, d, *J* = 6.4 Hz), 8.12 (1 H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.31 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.25 (1 H, t, *J* = 5.7 Hz), 7.11 (1 H, d, *J* = 8.9 Hz), 4.48–4.43 (1 H, br m), 4.17–4.13 (1 H, m), 4.09–4.03 (1 H, m), 3.95–3.90 (1 H, m), 3.88–3.82 (1 H, m), 2.76–2.71 (1 H, br m), 2.22–2.15 (1 H, m), 2.10–2.01 (1 H, m), 1.77–1.64 (3 H, m), 1.61–1.30 (15 H, m), 1.26–1.17 (6 H, m), 1.03 (1 H, d, *J* = 5.3 Hz), 0.91–0.80 (18 H, m); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.7, 172.5, 172.0, 171.5, 171.3, 171.2, 56.0, 53.6, 53.6, 53.3, 50.6, 50.5, 35.1, 31.0, 27.9, 27.8, 27.8, 24.5, 24.4, 24.4, 23.3, 23.1, 22.9, 22.9, 21.3, 21.3, 21.2, 21.2, 21.1, 21.1, 17.1; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₂H₅₈N₉O₆, 664.4510; found, 664.4505.

δCP2

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-Leu-(5-Ava)-Lys(N₃)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **δCP2** (1.6 mg, 2.4 μmol, 8%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 11.5 min,

solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 0/100 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.56 (1 H, d, *J* = 5.5 Hz), 8.07 (1 H, d, *J* = 7.1 Hz), 7.81 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.56 (1 H, d, *J* = 5.0 Hz), 7.51 (1 H, d, *J* = 9.1 Hz), 6.95 (1 H, br s), 6.55 (1 H, s), 5.50 (1 H, s), 4.34–4.30 (1 H, br m), 4.21–4.20 (1 H, br m), 4.12–4.07 (2 H, m), 3.95–3.92 (1 H, br m), 3.68–3.64 (1 H, br m), 2.80–2.79 (1 H, br m), 2.24–2.18 (1 H, m), 2.13–2.10 (1 H, br m), 1.62–1.23 (17 H, m), 1.04–1.01 (1 H, br m), 0.90–0.78 (18 H, m); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.3, 172.0, 171.9, 171.7, 171.5, 171.2, 69.8, 61.8, 53.6, 53.4, 51.3, 51.1, 50.6, 38.6, 34.5, 31.1, 28.0, 27.9, 24.5, 24.3, 24.3, 23.3, 23.1, 23.0, 22.8, 22.8, 22.4, 21.1, 21.0, 21.0; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₂H₅₉N₉O₇, 680.4459; found, 680.4493.

ProCP1

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Ala-Leu-Leu-Pro-Lys(N₃)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **ProCP1** (2.5 mg, 4.0 μmol, 13%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 13.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 5/95 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, a mixture of two conformations) δ 8.56 (1 H, br s), 8.42 (1 H, br s), 8.19 (1 H, d, *J* = 7.3 Hz), 8.08 (2 H, t, *J* = 8.2 Hz), 8.00 (2 H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.75 (1 H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.40 (1 H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.57 (2 H, d, *J* = 5.9 Hz), 4.53 (1 H, t, *J* = 9.4 Hz), 4.35–4.22 (3 H, m), 4.18–4.08 (4 H, m), 4.06–3.99 (3 H, m), 3.80 (1 H, dd, *J* = 7.3, 3.9 Hz), 3.71 (1 H, dd, *J* = 15.2, 7.0 Hz), 3.64 (1 H, t, *J* = 8.2 Hz), 2.14–2.06 (2 H, m), 1.91–1.75 (4 H, m), 1.71–1.61 (3 H, m), 1.58–1.43 (7 H, m), 1.31 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.26–1.23 (12 H, m), 0.95 (3 H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.89 (13 H, t, *J* = 6.3 Hz), 0.86–0.82 (9 H, m); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.5, 171.4, 171.2, 170.8, 170.3, 170.3, 52.3, 51.6, 50.7, 50.6, 49.7, 46.7, 28.8, 27.9, 27.7, 24.5, 24.2, 23.7, 23.5, 23.3, 23.1, 22.4, 21.0, 20.9, 18.0, 17.2, 16.7, 16.6; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₉H₅₀N₉O₆, 620.3704; found, 620.3876.

ProCP2

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Ala-Leu-Leu-(D-Pro)-Lys(N₃)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **ProCP2** (3.7 mg, 6.0 μmol, 20%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 10.8 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) → 5/95 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.53 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.99 (1 H, d, *J* = 3.4 Hz), 7.92 (1 H, d, *J* = 5.3 Hz), 7.90 (1 H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.20 (1 H, d, *J* = 7.3 Hz), 4.55 (1 H, dd, *J* = 12.8, 6.6 Hz), 4.40–4.33 (1 H, m), 4.25 (1 H, dd, *J* = 7.8, 4.1 Hz), 4.12–4.05 (2 H, m), 3.80–3.76 (1 H, m), 3.62–3.56 (1 H, m), 3.52–3.47 (1 H, m), 3.33–3.27 (3 H, m), 2.15–2.06 (1 H, m), 2.04–1.97 (1 H, m), 1.92–1.81 (2 H, m), 1.75–1.65 (1 H, m), 1.54–1.46 (8 H, m), 1.40–1.32 (2 H, m), 1.23 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 0.87 (9 H, dd, *J* = 5.8,

3.3 Hz), 0.82 (3 H, d, $J = 5.7$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.9, 171.8, 171.7, 171.6, 171.4, 169.6, 59.9, 52.5, 51.8, 51.7, 50.6, 49.1, 47.1, 47.0, 41.4, 29.9, 28.6, 27.9, 24.9, 24.4, 24.2, 23.2, 23.1, 23.0, 22.7, 21.0, 18.1, 16.7; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_9\text{O}_6$, 620.3704; found, 620.3876.

ProCP3

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-Leu-Pro-Lys(N_3)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **ProCP3** (2.2 mg, 3.2 μmol , 11%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 9.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 60/40 (0 min) $\rightarrow$ 36/64 (12 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , a mixture of two conformations) δ 8.32 (1 H, d, $J = 3.7$ Hz), 7.94 (3 H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.85 (1 H, d, $J = 7.1$ Hz), 7.70 (1 H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.40 (1 H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.54 (2 H, br s), 5.00 (1 H, br s), 4.48 (1 H, t, $J = 9.1$ Hz), 4.40–4.36 (1 H, m), 4.34–4.30 (4 H, m), 4.18 (4 H, d, $J = 8.0$ Hz), 4.11 (1 H, dd, $J = 13.5, 6.4$ Hz), 4.01 (1 H, t, $J = 8.3$ Hz), 3.96–3.95 (2 H, br m), 3.87 (2 H, br s), 3.71–3.58 (6 H, m), 2.26–2.20 (1 H, m), 2.13–2.03 (4 H, m), 1.89–1.73 (4 H, m), 1.70–1.64 (2 H, m), 1.58–1.42 (13 H, m), 1.40–1.25 (6 H, m), 0.95–0.81 (36 H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 171.7, 171.6, 171.3, 171.3, 170.6, 170.3, 56.8, 54.3, 52.3, 51.2, 50.7, 50.6, 31.2, 29.9, 27.8, 27.7, 24.4, 24.2, 24.1, 23.5, 23.5, 23.4, 23.1, 22.6, 22.4, 21.9, 21.9, 21.0, 21.0, 20.8; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{N}_9\text{O}_7$, 678.4302; found, 678.4333.

ProCP4

Following to the general procedures, the linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-Leu-(D-Pro)-Lys(N_3)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (50 mg) to yield **ProCP4** (4.2 mg, 6.2 μmol , 21%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 190 nm, Retention time: 10.9 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 60/40 (0 min) $\rightarrow$ 36/64 (12 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.47 (1 H, d, $J = 8.5$ Hz), 8.02–7.98 (2 H, m), 7.78 (1 H, d, $J = 9.6$ Hz), 7.49 (1 H, d, $J = 7.3$ Hz), 6.55 (1 H, s), 5.00 (1 H, s), 4.51–4.46 (1 H, m), 4.43–4.37 (1 H, m), 4.30 (1 H, dd, $J = 7.9, 3.8$ Hz), 4.08–3.98 (2 H, m), 3.83 (1 H, dd, $J = 9.9, 6.1$ Hz), 3.59–3.54 (3 H, m), 3.51–3.45 (1 H, m), 3.31 (3 H, t, $J = 6.7$ Hz), 2.14–2.07 (1 H, m), 2.04–1.95 (1 H, m), 1.91–1.81 (4 H, m), 1.72–1.64 (3 H, m), 1.62–1.44 (7 H, m), 1.39–1.30 (3 H, m), 0.93–0.81 (18 H, m); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.4, 171.6, 171.5, 171.5, 170.3, 169.5, 60.5, 59.8, 58.5, 52.9, 52.0, 50.6, 50.0, 49.3, 46.8, 40.8, 30.1, 30.1, 28.5, 27.9, 24.8, 24.5, 24.2, 24.1, 23.6, 23.3, 22.8, 22.7, 21.0, 20.6; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{N}_9\text{O}_7$, 678.4302; found, 678.4333.

Lokey's peptide

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-D-Leu-Pro-Tyr(*t*Bu)-D-Leu-D-Leu-

Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **Lokey's peptide** (6.4 mg, 9.0 μ mol, 45%) as a white solid. The coupling reaction was performed by shaking the resin with Fmoc-protected amino acid (100 μ mol, 5 eq), DIPEA (34 μ L, 200 μ mol, 10 eq), HATU (38 mg, 100 μ mol, 5 eq), HOAt (14 mg, 100 μ mol, 5 eq) in DMF for 1.5 h.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 254 nm, Retention time: 14.3 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (20 min); HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{38}H_{61}N_6O_7$, 713.4602; found, 713.4597.

CP25

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ala-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP25** (5.9 mg, 8.9 μ mol, 45%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 17.9 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 5/95 (20 min); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.13 (1 H, br s), 8.71 (1 H, br s), 8.25 (1 H, d, J = 5.9 Hz), 8.23 (1 H, s), 7.47 (1 H, d, J = 8.9 Hz), 7.05 (1 H, d, J = 5.1 Hz), 4.23 (1 H, br s), 4.12–4.08 (1 H, m), 3.97 (1 H, br s), 3.91 (1 H, br s), 3.76–3.70 (1 H, m), 3.16–3.12 (1 H, br m), 2.13–2.07 (1 H, m), 1.80–1.52 (11 H, m), 1.47 (3 H, d, J = 7.2 Hz), 1.31–1.24 (2 H, br m), 1.17 (3 H, d, J = 6.0 Hz), 1.10 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 1.05–1.01 (1 H, br m), 0.95 (9 H, d, J = 5.6 Hz), 0.90 (12 H, t, J = 7.2 Hz), 0.84 (3 H, d, J = 6.5 Hz), 0.71–0.67 (1 H, br m), –0.05––0.06 (1 H, br m); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 173.5, 173.3, 173.2, 171.7, 170.4, 79.2, 53.6, 52.8, 52.6, 52.3, 51.1, 45.9, 40.5, 36.4, 24.5, 24.2, 24.2, 23.3, 23.0, 22.9, 22.3, 22.2, 21.9, 21.4, 21.1, 21.1, 21.0, 20.1, 18.8, 16.2, 7.2; LRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ 663; HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calcd for $C_{35}H_{62}N_6O_6Na$, 685.4629; found, 685.4619.

CP26

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Ser(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP26** (3.9 mg, 5.7 μ mol, 29%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 9.7 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 50/50 (0 min) $\rightarrow$ 5/95 (20 min); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.14 (1 H, br s), 8.43 (1 H, d, J = 5.9 Hz), 8.29 (1 H, d, J = 7.4 Hz), 7.86 (2 H, d, J = 5.3 Hz), 7.38 (1 H, br s), 4.37–4.33 (2 H, m), 4.10–3.98 (5 H, m), 3.60–3.56 (1 H, m), 3.24–3.19 (1 H, m), 2.41–2.39 (1 H, m), 1.77–1.42 (12 H, m), 1.16 (3 H, d, J = 6.5 Hz), 1.08–1.00 (2 H, m), 0.97 (3 H, d, J = 6.9 Hz), 0.94–0.84 (24 H, m), 0.70–0.65 (1 H, m), 0.07 (1 H, dd, J = 10.9, 5.2 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.4, 172.7, 172.1, 171.8, 171.1, 170.6, 61.4, 53.7, 53.7, 52.7, 52.3, 45.4, 42.7, 41.2, 24.4, 24.3, 23.9, 23.1, 23.0, 23.0, 22.9, 21.8, 21.6, 21.6, 21.5, 21.3, 21.2, 21.0, 19.1, 19.0, 7.5; LRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ 679; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{35}H_{63}N_6O_7$, 679.4758; found,

679.4756.

CP27

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Ser(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP27** (5.1 mg, 7.5 μ mol, 38%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 9.1 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 55/45 (0 min) $\rightarrow$ 23/77 (15 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.72 (1 H, d, J = 4.1 Hz), 8.19 (1 H, d, J = 3.9 Hz), 7.91 (1 H, s), 7.51 (1 H, d, J = 8.0 Hz), 7.32 (1 H, d, J = 6.6 Hz), 7.02 (1 H, d, J = 8.2 Hz), 5.53 (1 H, s), 4.23 (1 H, br s), 4.13–4.07 (3 H, m), 3.87–3.83 (1 H, m), 3.80–3.76 (2 H, m), 3.19–3.10 (1 H, m), 2.11–2.05 (1 H, m), 1.77–1.42 (11 H, m), 1.16 (1 H, t, J = 7.5 Hz), 1.11 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 1.03 (3 H, d, J = 6.6 Hz), 0.96–0.94 (1 H, m), 0.90 (9 H, t, J = 6.6 Hz), 0.85–0.78 (16 H, m), 0.69–0.63 (1 H, m), –0.10 (1 H, dd, J = 10.9, 5.6 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 172.4, 172.2, 171.9, 171.2, 171.1, 55.1, 53.6, 52.3, 52.3, 52.00, 46.2, 36.00, 24.7, 24.5, 24.2, 24.2, 23.2, 22.8, 22.8, 22.7, 22.3, 21.6, 21.4, 21.4, 21.1, 21.0, 19.5, 7.2; LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 679; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_7$, 679.4758; found, 679.4758.

CP28

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP28** (7.4 mg, 11 μ mol, 55%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 16.1 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 5/95 (20 min); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.05 (1 H, br s), 8.99 (1 H, br s), 8.19 (1 H, br s), 8.00 (1 H, br s), 7.52 (1 H, d, J = 7.7 Hz), 7.10 (1 H, br s), 4.19–4.17 (1 H, m), 4.12–4.08 (1 H, m), 3.96–3.92 (3 H, m), 3.80–3.78 (2 H, m), 3.17 (1 H, br s), 2.11–2.08 (1 H, m), 1.83–1.78 (1 H, m), 1.73–1.47 (12 H, m), 1.23–1.20 (1 H, m), 1.18 (3 H, d, J = 6.0 Hz), 1.10 (3 H, d, J = 6.8 Hz), 1.07–1.04 (1 H, m), 0.95–0.88 (21 H, m), 0.85 (3 H, d, J = 6.3 Hz), 0.70–0.69 (1 H, m), –0.06–0.07 (1 H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 177.0, 173.6, 173.2, 171.5, 171.2, 170.5, 92.5, 71.9, 52.6, 52.5, 51.4, 45.8, 40.5, 36.7, 24.5, 24.2, 24.2, 23.3, 23.0, 22.9, 22.3, 22.2, 21.9, 21.5, 21.1, 21.1, 21.0, 20.0, 19.0, 19.0, 7.2; LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 679; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_7\text{Na}$, 701.4578; found, 701.4576.

CP29

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Ser(*t*Bu)-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP29** (5.2 mg, 7.7 μ mol, 38%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 9.6 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 50/50 (0 min) → 5/95 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.74 (1 H, d, *J* = 5.5 Hz), 8.47 (1 H, s), 8.35 (1 H, d, *J* = 4.6 Hz), 8.15 (1 H, d, *J* = 3.0 Hz), 7.30 (1 H, d, *J* = 9.1 Hz), 6.92 (1 H, d, *J* = 6.6 Hz), 5.00 (1 H, s), 4.30–4.24 (1 H, m), 3.94–3.90 (2 H, m), 3.82–3.77 (1 H, m), 3.67–3.62 (1 H, m), 3.13–3.08 (1 H, m), 2.11–1.98 (2 H, m), 1.88–1.81 (1 H, m), 1.72–1.61 (3 H, m), 1.57–1.39 (5 H, m), 1.23–1.15 (2 H, m), 1.11 (3 H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.05 (3 H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.91–0.76 (28 H, m), 0.70–0.64 (1 H, m), –0.13 (1 H, dd, *J* = 10.8, 5.3 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.3, 174.2, 173.9, 172.8, 170.6, 169.8, 60.8, 57.3, 56.7, 53.8, 52.1, 51.0, 45.8, 38.3, 24.6, 24.4, 24.2, 23.4, 23.1, 22.7, 22.5, 21.9, 21.2, 21.1, 21.1, 21.0, 20.1, 19.1, 7.1; LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ 679; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₅H₆₃N₆O₇, 679.4758; found, 679.4763.

CP30

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-Ser(*t*Bu)-(cis-NfCf)-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP30** (3.7 mg, 5.5 μmol, 27%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 9.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 45/55 (0 min) → 5/95 (15 min); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.00 (1 H, br s), 8.54 (1 H, br s), 8.28 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 8.18 (1 H, br s), 7.81 (1 H, br s), 7.30 (1 H, d, *J* = 6.5 Hz), 4.26–4.22 (1 H, m), 4.19–4.11 (2 H, m), 4.07–4.03 (1 H, m), 3.82–3.77 (2 H, m), 3.66 (1 H, dd, *J* = 11.1, 4.4 Hz), 2.20–2.17 (1 H, m), 1.88–1.84 (1 H, m), 1.68–1.51 (12 H, m), 1.16 (4 H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.09 (4 H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.93–0.87 (24 H, m), 0.68–0.64 (1 H, m), –0.03 (1 H, d, *J* = 6.3 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.2, 173.2, 172.8, 172.8, 172.7, 172.7, 61.2, 52.3, 52.3, 51.1, 45.3, 40.5, 31.5, 24.4, 24.4, 24.4, 24.1, 23.1, 23.1, 22.8, 22.8, 22.7, 21.8, 21.4, 21.4, 21.4, 21.3, 21.3, 21.3, 7.2; LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ 679; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₅H₆₃N₆O₇, 679.4758; found, 679.4763.

CP31

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ala-Leu-Leu-(cis-NfCf)-Phe-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP31** (5.1 mg, 7.3 μmol, 37%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 12.6 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 50/50 (0 min) → 5/95 (14 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.71 (1 H, br s), 8.58 (1 H, br s), 8.31 (1 H, br s), 8.10 (1 H, br s), 7.48 (1 H, br s), 7.30–7.25 (2 H, m), 7.22–7.17 (3 H, m), 7.00 (1 H, br s), 4.23 (2 H, br s), 4.12–4.10 (1 H, br m), 3.67 (2 H, br s), 3.13 (1 H, br s), 3.01–2.97 (1 H, br m), 2.87–2.85 (1 H, br m), 2.05–2.04 (1 H, br m), 1.83–1.77 (2 H, m), 1.66 (1 H, br s), 1.54–1.47 (4 H, br m), 1.44–1.41 (3 H, br m), 1.23–1.19 (2 H, br m), 1.12–1.11 (3 H, br m), 1.00–0.98 (4 H, br m), 0.93–0.83 (13 H, m), 0.69–0.64 (7 H, m), –0.07––0.10

(1 H, br m); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.4, 173.1, 172.8, 172.3, 171.9, 170.3, 136.5, 128.9, 128.3, 126.5, 56.1, 52.6, 52.6, 52.3, 51.0, 45.9, 40.7, 36.8, 36.6, 24.7, 24.1, 23.6, 23.5, 23.1, 22.9, 21.9, 21.5, 21.2, 21.2, 20.8, 20.0, 18.7, 16.2, 7.3; LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 697; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_6$, 697.4653; found, 697.4661.

CP32

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ala-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Ser(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP32** (2.2 mg, 3.5 μmol , 18%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 8.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 60/40 (0 min) $\rightarrow$ 25/75 (11 min); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.83 (1 H, br s), 8.48 (1 H, d, J = 5.6 Hz), 8.45 (1 H, d, J = 6.8 Hz), 7.83 (1 H, d, J = 6.2 Hz), 7.75 (1 H, d, J = 6.3 Hz), 7.40 (1 H, d, J = 7.2 Hz), 4.34–4.29 (2 H, m), 4.08–3.95 (3 H, m), 3.60 (1 H, dd, J = 11.2, 5.5 Hz), 3.20–3.15 (1 H, m), 2.37 (1 H, dd, J = 13.1, 5.9 Hz), 1.74–1.46 (12 H, m), 1.32 (3 H, d, J = 7.2 Hz), 1.17 (3 H, d, J = 6.3 Hz), 1.13–1.08 (1 H, m), 1.01 (3 H, d, J = 6.9 Hz), 0.94–0.86 (18 H, m), 0.69–0.65 (1 H, m), 0.05 (1 H, dd, J = 11.0, 6.0 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.5, 172.5, 172.3, 171.6, 171.3, 170.6, 87.1, 61.6, 55.3, 53.2, 52.1, 51.2, 51.2, 50.3, 45.6, 41.2, 35.3, 24.3, 23.9, 23.1, 23.1, 22.9, 21.9, 21.4, 21.3, 21.2, 19.4, 18.9, 17.3, 7.4; LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 637; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_7$, 637.4289; found, 637.4291.

CP33

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Ser(*t*Bu)-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP33** (5.5 mg, 8.6 μmol , 43%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 7.9 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 63/37 (0 min) $\rightarrow$ 25/75 (12 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.99 (1 H, d, J = 3.9 Hz), 8.22 (1 H, d, J = 4.3 Hz), 7.70 (1 H, d, J = 5.0 Hz), 7.42 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 7.37 (1 H, d, J = 8.5 Hz), 6.93 (1 H, d, J = 8.2 Hz), 5.68 (1 H, br s), 4.26 (1 H, br s), 4.14–4.06 (3 H, m), 3.92–3.80 (2 H, m), 3.75–3.73 (1 H, br m), 3.12 (1 H, br s), 2.13–2.06 (1 H, m), 1.76–1.66 (2 H, br m), 1.58–1.49 (4 H, m), 1.47–1.40 (4 H, m), 1.34 (3 H, d, J = 7.3 Hz), 1.18–1.14 (1 H, m), 1.11 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 1.02 (3 H, d, J = 6.9 Hz), 0.89 (6 H, d, J = 6.4 Hz), 0.83–0.79 (12 H, m), 0.66–0.61 (1 H, m), –0.10 (1 H, dd, J = 10.6, 4.9 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 172.4, 172.3, 171.9, 171.3, 170.9, 53.7, 53.6, 52.2, 52.1, 51.9, 46.3, 35.8, 24.8, 24.6, 24.3, 23.3, 22.8, 22.7, 22.3, 21.4, 21.4, 21.3, 21.0, 20.4, 19.4, 16.3, 7.2; LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 637; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_7$, 637.4289; found, 637.4288.

CP34

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Ala-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP34** (5.3 mg, 8.3 μ mol, 42%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 9.7 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 60/40 (0 min) $\rightarrow$ 25/75 (11 min); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.29 (1 H, br s), 8.69 (1 H, br s), 8.25 (1 H, d, J = 4.1 Hz), 8.13 (1 H, s), 7.44 (1 H, d, J = 8.1 Hz), 7.13 (1 H, d, J = 5.1 Hz), 4.19–4.14 (1 H, m), 4.13–4.09 (1 H, m), 4.03 (1 H, dd, J = 7.1, 5.4 Hz), 3.97 (1 H, dd, J = 12.5, 7.1 Hz), 3.90 (1 H, dd, J = 11.1, 7.1 Hz), 3.84–3.81 (1 H, m), 3.75 (1 H, dd, J = 10.7, 4.1 Hz), 3.21–3.17 (1 H, m), 2.10 (1 H, t, J = 7.7 Hz), 1.79–1.47 (10 H, m), 1.27 (3 H, d, J = 7.2 Hz), 1.24–1.23 (1 H, m), 1.18 (3 H, d, J = 6.5 Hz), 1.09 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 1.10–1.02 (1 H, m), 0.96–0.85 (18 H, m), 0.70–0.66 (1 H, m), –0.06 (1 H, dd, J = 10.5, 5.6 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.8, 173.9, 172.9, 171.8, 171.3, 170.7, 79.2, 60.3, 53.5, 51.9, 51.5, 49.9, 45.8, 36.4, 24.5, 24.5, 24.3, 23.3, 23.0, 22.3, 22.1, 21.9, 21.1, 21.1, 21.0, 21.0, 20.0, 19.0, 17.4, 7.1; LRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 637; HRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_7$, 637.4289; found, 637.4304.

CP35

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP35** (4.7 mg, 7.4 μ mol, 37%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 8.3 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 60/40 (0 min) $\rightarrow$ 25/75 (11 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.94 (1 H, d, J = 4.1 Hz), 8.21 (1 H, d, J = 3.4 Hz), 8.01 (1 H, d, J = 5.7 Hz), 7.91 (1 H, d, J = 7.3 Hz), 7.22 (1 H, d, J = 9.4 Hz), 6.99 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 4.93 (1 H, br s), 4.29–4.22 (2 H, m), 4.13–4.08 (1 H, m), 3.97–3.93 (1 H, m), 3.79–3.70 (2 H, m), 3.63–3.61 (1 H, m), 3.10–3.03 (1 H, m), 2.09–2.01 (1 H, m), 1.73–1.59 (4 H, m), 1.53–1.36 (8 H, m), 1.28–1.23 (2 H, m), 1.13 (3 H, d, J = 5.9 Hz), 1.03 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 0.95 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 0.90–0.75 (15 H, m), 0.66–0.61 (1 H, m), –0.10 (1 H, dd, J = 11.1, 4.9 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.1, 174.2, 174.0, 172.9, 170.6, 169.6, 60.7, 56.9, 54.1, 53.3, 51.2, 45.9, 35.9, 24.5, 24.3, 24.2, 23.4, 23.1, 22.3, 22.0, 21.3, 21.3, 21.2, 21.0, 20.2, 18.8, 16.2, 6.9; LRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 637; HRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_7$, 637.4289; found, 637.4292.

CP36

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Ser(*t*Bu)-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP36** (4.9 mg, 7.7 μ mol, 39%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 9.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 60/40 (0 min) $\rightarrow$ 25/75 (11 min); ^1H NMR

(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.85 (1 H, br s), 8.23 (1 H, br s), 8.08 (2 H, d, *J* = 6.2 Hz), 7.64 (1 H, br s), 7.32 (1 H, d, *J* = 7.5 Hz), 4.27–4.23 (1 H, m), 4.20–4.15 (1 H, m), 4.11–4.07 (2 H, m), 3.82–3.75 (2 H, m), 3.65 (1 H, dd, *J* = 11.0, 4.1 Hz), 3.30–3.25 (1 H, m), 2.20–2.15 (1 H, m), 1.69–1.50 (10 H, m), 1.38 (3 H, d, *J* = 7.4 Hz), 1.24–1.21 (1 H, m), 1.17 (3 H, d, *J* = 6.3 Hz), 1.15–1.12 (1 H, m), 1.08 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 0.95–0.92 (12 H, m), 0.90–0.88 (6 H, m), 0.68–0.64 (1 H, m), –0.02 (1 H, dd, *J* = 9.8, 4.7 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.7, 176.7, 173.2, 172.9, 171.9, 168.7, 82.0, 61.3, 56.1, 52.8, 52.2, 51.7, 45.5, 36.0, 24.4, 24.2, 23.2, 23.0, 22.7, 22.0, 21.7, 21.4, 21.4, 21.4, 21.3, 20.1, 18.9, 16.2, 7.1; LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ 637; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₂H₅₇N₆O₇, 637.4289; found, 637.4293.

CP37

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Leu-Ala-(*cis*-NfCf)-Ser(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP37** (4.0 mg, 6.5 μ mol, 33%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 12.9 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 90/10 (0 min) $\rightarrow$ 25/75 (20 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.41 (1 H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.36 (1 H, d, *J* = 6.9 Hz), 7.97 (1 H, d, *J* = 5.3 Hz), 7.88 (1 H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.80 (1 H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.18 (1 H, d, *J* = 7.1 Hz), 4.37 (1 H, t, *J* = 6.2 Hz), 4.28 (1 H, t, *J* = 7.4 Hz), 4.08–4.00 (2 H, m), 3.97–3.89 (1 H, m), 3.62–3.61 (1 H, m), 3.16–3.08 (1 H, m), 2.39–2.33 (1 H, m), 1.76–1.41 (8 H, m), 1.38–1.31 (2 H, m), 1.23 (3 H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.12–1.03 (5 H, m), 0.96 (2 H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.91–0.81 (12 H, m), 0.65–0.58 (1 H, m), 0.04 (1 H, dd, *J* = 10.1, 4.8 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.6, 172.4, 171.2, 170.9, 170.9, 169.5, 57.2, 53.5, 51.2, 49.4, 45.6, 41.5, 35.1, 24.3, 23.8, 23.1, 22.8, 22.4, 21.7, 21.6, 21.6, 21.3, 19.4, 19.4, 19.0, 17.1, 7.6; LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ 611; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₂₉H₅₁N₆O₈, 611.3768; found, 611.3762.

CP38

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ala-Leu-Ser(*t*Bu)-(*cis*-NfCf)-Ser(*t*Bu)-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP38** (2.5 mg, 4.1 μ mol, 21%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 11.4 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 84/16 (0 min) $\rightarrow$ 35/65 (15 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 (1 H, d, *J* = 5.0 Hz), 8.07 (1 H, d, *J* = 5.9 Hz), 8.04 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 7.74 (2 H, d, *J* = 6.4 Hz), 7.26 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.34–4.27 (2 H, m), 4.09–4.05 (1 H, m), 4.02–3.90 (2 H, m), 3.67–3.64 (1 H, m), 3.24–3.18 (1 H, m), 2.31 (1 H, t, *J* = 6.3 Hz), 1.71–1.42 (9 H, m), 1.25 (4 H, d, *J* = 7.5 Hz), 1.13–1.06 (4 H, m), 0.99 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.91–0.82 (12 H, m), 0.65–0.60 (1 H, m), 0.00 (1 H, dd, *J* = 11.1, 6.3 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.4, 172.2, 172.1, 171.8, 171.4, 168.4, 62.2, 61.3, 56.9, 54.8, 51.3, 50.1, 45.4, 41.2, 35.5, 24.3, 24.0, 23.0, 22.9, 22.1, 21.9,

21.8, 21.3, 19.4, 19.3, 19.3, 17.3, 15.1, 7.4; LRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ 611; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{29}H_{51}N_6O_8$, 611.3768; found, 611.3770.

CP39

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Val-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP39** (6.6 mg, 10 μ mol, 51%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 13.0 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 50/50 (0 min) $\rightarrow$ 5/95 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (1 H, br s), 8.80 (1 H, br s), 8.38 (1 H, br s), 8.14 (1 H, br s), 7.36 (1 H, br s), 6.85 (1 H, br s), 4.29 (1 H, br s), 3.89–3.88 (1 H, m), 3.80 (2 H, br s), 3.68–3.63 (1 H, br m), 3.09 (1 H, br s), 2.15–2.12 (1 H, br m), 2.02–1.93 (2 H, m), 1.76–1.72 (2 H, m), 1.67–1.61 (1 H, br m), 1.54–1.40 (6 H, m), 1.27–1.17 (3 H, m), 1.11 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 1.05 (4 H, d, J = 6.6 Hz), 0.96–0.77 (24 H, m), 0.71–0.64 (1 H, m), –0.12––0.15 (1 H, br m); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.5, 174.9, 173.8, 172.9, 170.7, 170.4, 59.9, 54.2, 53.7, 52.6, 50.9, 46.0, 38.4, 36.7, 29.3, 24.6, 24.4, 23.4, 23.1, 22.7, 22.0, 21.8, 21.1, 21.0, 20.6, 20.2, 19.2, 18.9, 17.0, 16.4, 7.2; LRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ 649; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{34}H_{61}N_6O_6$, 649.4653; found, 649.4653.

CP40

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ala-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP40** (6.1 mg, 9.8 μ mol, 49%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 8.5 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 50/50 (0 min) $\rightarrow$ 5/95 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.81 (1 H, d, J = 4.1 Hz), 8.25 (1 H, d, J = 5.0 Hz), 8.20 (1 H, d, J = 3.7 Hz), 8.07 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 7.29 (1 H, d, J = 9.1 Hz), 6.99 (1 H, d, J = 6.4 Hz), 4.22–4.16 (1 H, m), 4.08–4.03 (1 H, m), 3.98–3.91 (1 H, m), 3.82–3.78 (1 H, m), 3.69–3.66 (1 H, m), 3.10–3.04 (1 H, m), 2.08–2.01 (1 H, m), 1.75–1.69 (3 H, m), 1.64–1.40 (10 H, m), 1.23 (4 H, d, J = 7.3 Hz), 1.12 (3 H, d, J = 6.4 Hz), 1.03 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 0.95–0.78 (18 H, m), 0.66–0.60 (1 H, m), –0.10 (1 H, dd, J = 11.1, 5.6 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.2, 173.9, 173.8, 173.1, 172.1, 170.5, 53.9, 53.2, 51.4, 51.0, 50.1, 45.9, 36.0, 24.6, 24.5, 24.3, 23.4, 23.0, 22.3, 22.1, 21.9, 21.3, 21.2, 20.9, 20.2, 18.7, 17.3, 16.1, 7.0; LRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ 621; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calcd for $C_{32}H_{57}N_6O_6$, 621.4340; found, 621.4341.

CP41

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ala-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Val-Ala-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP41** (5.2 mg, 8.6 μ mol, 43%)

as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 8.3 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 60/40 (0 min) → 28/72 (15 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.79 (1 H, s), 8.28 (1 H, d, *J* = 3.4 Hz), 8.21 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 7.32 (1 H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.27 (1 H, d, *J* = 9.6 Hz), 7.08 (1 H, d, *J* = 6.9 Hz), 4.25–4.19 (1 H, m), 4.06 (1 H, dd, *J* = 6.3, 4.2 Hz), 3.87 (1 H, dd, *J* = 7.3, 3.7 Hz), 3.79–3.74 (1 H, m), 3.67 (1 H, dd, *J* = 6.9, 2.7 Hz), 3.07–3.02 (1 H, m), 2.27–2.22 (1 H, m), 2.11 (1 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.80–1.73 (1 H, m), 1.71–1.66 (1 H, m), 1.59–1.41 (5 H, m), 1.35 (3 H, d, *J* = 7.3 Hz), 1.31–1.27 (1 H, m), 1.24 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.13 (3 H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.00 (3 H, d, *J* = 7.1 Hz), 0.90 (6 H, dd, *J* = 6.5, 2.2 Hz), 0.82 (9 H, dd, *J* = 15.2, 6.5 Hz), 0.75 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.62–0.56 (1 H, m), –0.06 (1 H, dd, *J* = 11.1, 6.1 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.1, 174.0, 173.7, 173.1, 172.1, 170.5, 56.6, 54.8, 53.2, 50.9, 50.6, 46.0, 34.9, 31.3, 24.5, 24.4, 23.0, 22.4, 22.0, 21.7, 21.5, 20.8, 20.2, 20.1, 18.4, 17.3, 17.1, 16.0, 6.8; LRMS (ESI) *m/z* [*M* + *H*]⁺ 607; HRMS (ESI) *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₃₁H₅₅N₆O₆, 607.4183; found, 607.4185.

CP42

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Ser(*t*Bu)-Val-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP42** (5.3 mg, 8.0 μmol, 40%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 8.5 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 45/55 (0 min) → 10/90 (15 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.97 (1 H, s), 8.66 (1 H, s), 8.35 (1 H, s), 8.11 (1 H, s), 7.37 (1 H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.87 (1 H, s), 4.91 (1 H, br s), 4.32–4.27 (1 H, br m), 4.08–4.04 (1 H, br m), 3.91–3.87 (1 H, m), 3.85–3.76 (2 H, m), 3.65–3.61 (1 H, br m), 3.09 (1 H, br s), 2.11 (1 H, br s), 2.00–1.91 (2 H, m), 1.75–1.73 (2 H, br m), 1.63 (1 H, br s), 1.52–1.42 (5 H, br m), 1.23–1.18 (1 H, br m), 1.12–1.06 (6 H, m), 0.96–0.78 (26 H, m), 0.69–0.66 (1 H, br m), –0.13– –0.14 (1 H, br m); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.9, 170.6, 170.6, 170.4, 170.4, 59.9, 59.7, 53.6, 52.8, 50.9, 46.0, 36.9, 29.3, 24.6, 24.5, 24.1, 23.4, 23.1, 22.8, 21.8, 21.1, 21.0, 21.0, 20.7, 20.2, 19.2, 19.0, 17.0, 7.2; LRMS (ESI) *m/z* [*M* + *H*]⁺ 665; HRMS (ESI) *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₃₄H₆₁N₆O₇, 665.4602; found, 665.4605.

CP43

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Val-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Gly-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP43** (3.7 mg, 5.8 μmol, 29%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 7.3 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 35/65 (0 min) → 0/100 (15 min); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.20 (1 H, d, *J* = 5.9 Hz), 8.97 (1 H, t, *J* = 5.9 Hz), 8.12 (1 H, s), 7.90 (1 H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.42 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.80 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 4.34–4.22 (2 H, m), 3.94–3.91 (1 H, m),

3.87–3.84 (1 H, m), 3.73–3.70 (1 H, m), 3.21 (1 H, dd, $J = 14.8, 4.9$ Hz), 3.15–3.09 (1 H, m), 2.08–1.86 (4 H, m), 1.78–1.73 (1 H, m), 1.66–1.60 (1 H, m), 1.55–1.47 (4 H, m), 1.44–1.38 (1 H, m), 1.23–1.18 (1 H, m), 1.11 (3 H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.07 (3 H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.04–1.00 (1 H, m), 0.95–0.91 (6 H, m), 0.88–0.78 (18 H, m), 0.71–0.66 (1 H, m), –0.13 (1H, dd, $J = 10.9, 5.6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.7, 173.3, 173.2, 171.4, 170.7, 170.3, 59.9, 53.5, 53.1, 50.9, 46.0, 44.5, 38.0, 37.8, 37.0, 29.7, 24.6, 24.5, 24.0, 23.3, 23.0, 22.9, 22.2, 21.7, 21.1, 21.0, 20.8, 20.2, 19.3, 19.0, 17.1, 7.3; LRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 635; HRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_6$, 635.4496; found, 635.4495.

CP44

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Gly-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP44** (4.6 mg, 7.1 μmol , 36%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 7.2 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 45/55 (0 min) $\rightarrow$ 13/87 (13 min); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.21–8.17 (3 H, m), 8.12 (2 H, d, $J = 6.8$ Hz), 7.25 (1 H, d, $J = 8.1$ Hz), 4.45–4.41 (1 H, m), 4.11–4.06 (1 H, m), 4.02–3.99 (2 H, m), 3.90 (1 H, dd, $J = 16.8, 4.3$ Hz), 3.74 (1 H, dd, $J = 16.4, 5.0$ Hz), 3.11–3.06 (1 H, m), 2.30 (1 H, t, $J = 6.1$ Hz), 1.70–1.50 (10 H, m), 1.46–1.41 (1 H, m), 1.38–1.33 (2 H, m), 1.13 (3 H, d, $J = 6.3$ Hz), 1.09–1.04 (1 H, m), 0.97 (3 H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.97–0.83 (24 H, m), 0.68–0.64 (1 H, m), 0.12 (1 H, dd, $J = 10.3, 4.0$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 176.7, 175.8, 172.1, 172.0, 171.4, 169.3, 53.2, 52.3, 50.3, 46.2, 42.3, 34.8, 24.4, 24.3, 24.1, 23.9, 23.2, 23.1, 22.6, 22.2, 21.7, 21.6, 21.5, 21.2, 21.1, 19.6, 18.7, 7.7; LRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 649; HRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_6$, 649.4653; found, 649.4657.

CP45

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Gly-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (17 mg) to yield **CP45** (3.1 mg, 4.8 μmol , 48%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 11.3 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 50/50 (0 min) $\rightarrow$ 5/95 (20 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.76 (1 H, br s), 8.61 (1 H, d, $J = 5.7$ Hz), 8.18 (1 H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.98 (1 H, br s), 7.37 (1 H, br s), 7.27 (1 H, br s), 4.16–4.11 (2 H, br m), 4.07–4.04 (1 H, br m), 3.82–3.73 (2 H, m), 3.66–3.59 (1 H, br m), 3.51–3.50 (1 H, br m), 2.20–2.14 (1 H, br m), 1.86–1.76 (1 H, m), 1.69–1.52 (10 H, m), 1.24 (1 H, br s), 1.18–1.14 (1 H, br m), 1.10 (3 H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.02 (4 H, d, $J = 7.3$ Hz), 0.93–0.80 (24 H, m), 0.70–0.64 (1 H, m), –0.02– –0.05 (1 H, br m); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 173.4, 173.0, 172.0, 170.7, 170.6, 170.5, 90.9, 90.0, 52.1, 46.0, 43.5, 43.5, 26.9, 24.4, 24.4, 24.3, 24.2, 23.0, 23.0, 22.9, 22.8, 22.8, 22.6, 21.5, 21.5, 21.3, 21.1, 21.1, 7.4, 4.8; LRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 649; HRMS (ESI) m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_6$, 649.4653; found, 649.4659.

CP46

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Gly-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP46** (3.7 mg, 5.7 μ mol, 29%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 7.5 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 35/65 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (15 min); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.24 (1 H, d, J = 6.0 Hz), 8.89 (1 H, d, J = 5.3 Hz), 8.22 (1 H, br s), 7.87 (1 H, d, J = 6.6 Hz), 7.64 (1 H, br s), 6.86 (1 H, d, J = 6.8 Hz), 4.30–4.25 (1 H, m), 4.20–4.13 (2 H, m), 3.99–3.98 (1 H, br m), 3.84–3.80 (1 H, m), 3.30 (2 H, dd, J = 15.6, 5.1 Hz), 2.08 (1 H, dd, J = 15.7, 8.6 Hz), 1.93–1.82 (2 H, m), 1.77–1.47 (8 H, m), 1.28–1.19 (2 H, m), 1.16 (3 H, d, J = 6.5 Hz), 1.12 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 1.08–1.06 (1 H, br m), 1.02–0.98 (1 H, m), 0.97–0.84 (24 H, m), 0.73–0.69 (1 H, m), –0.05– –0.07 (1 H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 177.6, 173.5, 172.8, 171.6, 170.3, 170.1, 79.2, 73.7, 53.1, 52.6, 50.9, 44.0, 41.3, 38.0, 36.9, 24.6, 24.6, 24.1, 24.0, 23.2, 22.9, 22.7, 22.1, 22.0, 21.5, 21.1, 21.0, 21.0, 20.1, 18.9, 7.3; LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 649; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_6$, 649.4653; found, 649.4649.

CP47

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Gly-Leu-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (17 mg) to yield **CP47** (3.7 mg, 5.7 μ mol, 57%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 7.5 min, solvent: A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 45/55 (0 min) $\rightarrow$ 13/87 (13 min); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.50 (1 H, d, J = 4.6 Hz), 8.37 (1 H, s), 8.00 (1 H, d, J = 4.3 Hz), 7.58 (1 H, d, J = 6.9 Hz), 7.52 (1 H, d, J = 9.1 Hz), 7.32 (1 H, d, J = 7.8 Hz), 4.32–4.27 (1 H, m), 4.22–4.19 (1 H, br m), 3.95–3.81 (5 H, m), 2.13–2.06 (1 H, m), 1.68–1.49 (11 H, m), 1.30–1.24 (3 H, br m), 1.13 (3 H, d, J = 6.2 Hz), 1.07 (3 H, d, J = 7.1 Hz), 0.92–0.81 (24 H, m), 0.64 (1 H, br s), –0.06– –0.07 (1 H, br m); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 177.3, 176.8, 176.8, 175.7, 172.8, 172.5, 55.1, 53.9, 53.2, 51.2, 51.1, 45.1, 43.1, 24.3, 24.3, 24.3, 24.2, 23.7, 23.5, 23.2, 22.9, 22.9, 22.8, 22.8, 21.9, 21.6, 21.6, 21.5, 21.5, 21.4, 7.6; LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 649; HRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_6$, 649.4653; found, 649.4656.

CP48

Following to the general procedures, the protected linear peptide [H-Leu-Gly-(*cis*-NfCf)-Leu-Leu-Leu-OH] was synthesized from 2-chlorotrityl chloride resin (33 mg) to yield **CP48** (3.4 mg, 5.2 μ mol, 26%) as a white solid.

Preparative HPLC condition Flow rate: 3.0 mL/min, Detection: 210 nm, Retention time: 7.2 min, solvent:

A-0.1% TFA distilled water, B-0.1% TFA acetonitrile, A/B = 35/65 (0 min) → 0/100 (15 min); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.01 (1 H, br s), 7.93 (1 H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.57 (1 H, br s), 7.47 (1 H, br s), 7.37 (1 H, d, *J* = 8.3 Hz), 4.35–4.31 (1 H, m), 4.20–4.15 (1 H, m), 4.03 (1 H, dd, *J* = 16.3, 8.2 Hz), 3.96–3.91 (1 H, m), 3.90–3.86 (1 H, m), 2.19–2.13 (1 H, m), 1.94–1.88 (1 H, m), 1.82–1.77 (1 H, m), 1.71–1.60 (5 H, m), 1.58–1.46 (5 H, m), 1.20 (3 H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.10 (3 H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.08–0.99 (2 H, m), 0.96–0.85 (24 H, m), 0.71–0.67 (1 H, m), –0.10 (1 H, dd, *J* = 10.7, 5.7 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.8, 174.5, 173.5, 173.0, 171.9, 168.0, 69.9, 52.2, 51.0, 44.4, 43.9, 41.6, 40.7, 38.7, 37.4, 24.6, 24.5, 24.3, 23.1, 23.1, 22.9, 22.8, 22.7, 21.9, 21.8, 21.8, 21.4, 21.0, 20.6, 19.5, 7.3; LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ 649; HRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₃₄H₆₁N₆O₆, 649.4653; found, 649.4676.

Measurement of membrane permeability by PAMPA

The assay was conducted using CORNING BioCoat™ Pre-coated PAMPA Plate System. The plate system consisted of a 96-well microwell plate (donor wells) and a 96-well insert containing a PVDF membrane coated with tri-layers of phospholipids (acceptor wells). Permeability was measured from the bottom plate (donor wells) to the top insert (acceptor wells). Peptide or reference compound solutions were prepared at a concentration of 100 μM in 10% methanol solution containing 0.5% DMSO (**CP1** and **CP16** were prepared at a concentration of 50 μM), and 300 μl of the resulting solutions was placed into the donor wells of the PAMPA plate. Acceptor wells were prepared by adding 200 μl of 10% methanol solution. The insert was stacked onto the donor plate, and the system was covered with a lid to avoid evaporation. After incubating the plates for 5 h at room temperature, the donor and acceptor solutions were analyzed by LC-MS to determine permeable peptide concentrations. Permeability percent was calculated using following formula.

$$\text{Permeability (cm/s): } P_e = \{-\ln[1 - C_A(t)/C_{eq}]\} / [A * (1/V_D + 1/V_A) * t]$$

A = Filter area (0.3 cm²), V_D = Donor well volume (0.3 mL), V_A = Acceptor well volume (0.2 mL), t = Incubation time (seconds), C_A(t) = Compound concentration in acceptor well at time t, C_D(t) = Compound concentration in donor well at time t, C_{eq} = [C_D(t)*V_D+C_A(t)*V_A]/(V_D+V_A)

MD simulation method

1. NMR based solution structures

Topology files for the cyclic peptides were generated using the CHARMM General Force Field (CGenFF) program.^{51, 52, 53} Molecular dynamics (MD) simulations were performed using GROMACS 2024.3 with the CHARMM force field. Each system was placed in a cubic box with a 1.0 nm buffer and solvated with either DMSO or CHCl₃. After energy minimization, the systems underwent a 100 ns NVT

equilibration followed by a 500 ns NPT equilibration at 298 K and 1 atm. Production trajectories were collected for 100 ns with a 1 fs time step.

For NMR-constrained simulations, distance restraints were applied using conservative restraint forces and default force constants. ROE restraints were included in the topology file as 5 Å upper-bound distance restraints. For the analysis of solution-state structures, RMSD values were calculated for all atoms of each cyclic peptide. Clustering was performed using gmx cluster with a 1.0 Å cutoff, and the middle structure of the most populated cluster was selected as the representative structure. Visualization and structural superposition were carried out using Maestro 14.0.

2. REST/REUS method

The MD simulations were performed to investigate the stable conformations of peptides in aqueous solution and membrane environment. The simulation box and parameters were set up based on the previous research reported by Sugita et al.⁴⁸ A membrane model was constructed using 72 molecules of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) and 48 molecules of cholesterol. The number of Na⁺, and Cl⁻, and water molecules was set to 16, 16, and 7200. The simulation box consisting of POPC, cholesterol, NaCl, and water molecules was prepared using the Charmm-GUI server,⁵⁴ without an additional equilibration process. Subsequently, a modeled peptide was placed in the water. The lipid, water, and peptide molecules were parameterized using Lipid 17 force field,⁵⁵ TIP3P model,⁵⁶ and Amber10: Extended Hückel Theory(EHT) parameter set in molecular operating environment (MOE) from Chemical Computing Group,⁵⁷ respectively. Note that the lipid composition used in this study is a well-tuned parameter to ensure that peptides are fully dehydrated at the center of the membrane when using the force field parameter set employed in this research.

Two sets of replica exchange with solute tempering / replica exchange umbrella sampling (REST/REUS) simulations⁴⁵ using 16 (8×2) replicas were performed at both around the membrane center and solution phase to effectively sample peptide conformations in these locations. For the REST simulation,⁵⁸ non-bond interaction and dihedral energies of the peptide were selected as the solute region and effective temperatures of the solute for the eight replicas are set to 300 K, 340 K, 390 K, 455 K, 540 K, 645 K, 785 K, and 980 K when the temperature of the system was set to 300 K. For the REUS simulation, the position of the peptide relative to the membrane was determined based on the reaction coordinate z , defined as the component orthogonal to the membrane plane of the distance between the center of mass of all nitrogen atoms of phosphatidylcholine of the membrane and that comprising the peptide bonds in the peptide main chain. At the membrane center, two restraint positions were set to $z = 0.0$ Å and $z = 1.0$ Å, and the force constants of umbrella potential were set to 1.5 kcal/mol/Å². At the solution phase, two restraint positions were set to $z = 42.0$ Å and $z = 45.0$ Å, and the force constants were set to 0.2 kcal/mol/Å². Exchanges between adjacent replicas were attempted every 10 ps using the Metropolis scheme. Exchange rates were approximately 10–30%. Langevin dynamics simulation was performed at isothermal-isobaric (NPT) ensemble with isotropic pressure scaling. The pressure was controlled using

a Berendsen barostat and was maintained at 1 bar. The REST/REUS simulations were performed for 500 ns, and snapshots were extracted at 40 ps intervals during the final 300 ns of the simulation.

Initial structures of the REST/REUS simulation are prepared according to the following instructions. At first, an arbitrary conformation of the peptide was placed at $z = 45.0 \text{ \AA}$, and the structure was minimized for 10,000 steps. In this process, whole atoms of the peptide and lipid molecules were restrained with a harmonic potential, at a $2 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ force constant. The systems were then heated from 0 to 100 K within 20 ps using constant-volume Langevin dynamics, with the restraint of the peptide and lipid molecules by harmonic potential, the force constant of which was $1 \text{ kcal/mol/\AA}^2$. Thereafter, the temperature was increased to 300 K within 100 ps in the isothermal-isobaric (NPT) ensemble with semi-isotropic pressure scaling. The pressure was controlled using a Berendsen barostat and was maintained at 1 bar. The force constant of the harmonic potential for the restrained peptide and lipid molecules decreased to $0.1 \text{ kcal/mol/\AA}^2$. The systems were equilibrated for 10 ns with positional restraint at $z = 45.0 \text{ \AA}$. Subsequently, peptides were pulled based on steered MD⁵⁹ from $z = 45.0 \text{ \AA}$ to $-5.0 \text{ \AA}$. A pulling rate of $0.28 \text{ \AA/ns}$ and force constant of $3.0 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ were used. This steered MD was combined with the ST method and the temperature of the peptide was set to 2100 K. The snapshots for 8 replicas at certain restraint position are extracted from the trajectory of the steered MD located at $\pm 0.4 \text{ \AA}$ from the restraint center, which was randomly selected from the trajectory. All MD simulations were performed using the GPU-accelerated PMEMD module (pmemd.cuda) of the AMBER 24 software package.⁶⁰

Peptide conformations were analyzed by principal component analysis based on the ϕ, ψ, ω angles of the backbone of five residues other than the cyclopropane-containing residue. The eigenvectors of the 30-dimensional space were obtained by diagonalizing the variance-covariance matrix calculated from all snapshots (90,000 snapshots) derived from simulations of three peptides at 300 K both inside and outside the membrane. Subsequently, trajectories corresponding to the inside and outside the membrane of each peptide were projected onto the eigenvectors corresponding to the first and second principal components.

参考文献

- (1). Lipinski, C. A. “Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability.” *Journal of pharmacological and toxicological methods*, **2000**, 44, 235–249.
- (2). Naylor, M. R.; Bockus, A. T.; Blanco, M. and Lokey, R. S. “Cyclic peptide natural products chart the frontier of oral bioavailability in the pursuit of undruggable targets.” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 38, 141–147.
- (3). Zorzi, A.; Deyle, K. and Heinis, C. “Cyclic peptide therapeutics: past, present and future.” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 38, 24–29.
- (4). Zhang, H. and Chen, S. “Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001–2021).” *RSC Chem. Biol.* **2022**, 3, 18–31.
- (5). Ohta, A.; Tanada, M.; Shinohara, S.; Morita, Y.; Nakano, K.; Yamagishi, Y.; Takano, R.; Kariyuki, S.; Iida, T.; Matsuo, A.; Ozeki, K.; Emura, T.; Sakurai, Y.; Takano, K.; Higashida, A.; Kojima, M.; Muraoka, T.; Takeyama, R.; Kato, T.; Kimura, K.; Ogawa, K.; Ohara, K.; Tanaka, S.; Kikuchi, Y.; Hisada, N.; Hayashi, R.; Nishimura, Y.; Nomura, K.; Tachibana, T.; Irie, M.; Kawada, H.; Torizawa, T.; Murao, N.; Kotake, T.; Tanaka, M.; Ishikawa, S.; Miyake, T.; Tamiya, M.; Arai, M.; Chiyoda, A.; Akai, S.; Sase, H.; Kuramoto, S.; Ito, T.; Shiraishi, T.; Kojima, T. and Iikura, H. “Validation of a New Methodology to Create Oral Drugs beyond the Rule of 5 for Intracellular Tough Targets.” *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 24035–24051.
- (6). Qian, Z.; Dougherty, P. G. and Pei, D. “Targeting intracellular protein–protein interactions with cell-permeable cyclic peptides.” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 38, 80–86.
- (7). Dougherty, P. G.; Sahni, A. and Pei, D. “Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides.” *Chem. Rev.* **2019**, 119, 10241–10287.
- (8). Rezai, T.; Yu, B.; Millhauser, G. L.; Jacobson, M. P. and Lokey, R. S. “Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers.” *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2510–2511.
- (9). Nielsen, D. S.; Lohman, R. J.; Hoang, H. N.; Hill, T. A.; Jones, A.; Lucke, A. J. and Fairlie, D. P. “Flexibility versus Rigidity for Orally Bioavailable Cyclic Hexapeptides.” *ChemBioChem*, **2015**, 16, 2289–2293.
- (10). Bockus, A. T.; Schwochert, J. A.; Pye, C. R.; Townsend, C. E.; Sok, V.; Bednarek, M. A. and Lokey, R. S. “Going out on a Limb: Delineating the Effects of β -Branching, N-Methylation, and Side Chain Size on the Passive Permeability, Solubility, and Flexibility of Sanguinamide A Analogues.” *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 7409–7418.
- (11). Frost, J. R.; Scully, C. C. G. and Yudin, A. K. “Oxadiazole Grafts in Peptide Macrocycles.” *Nat. Chem.* **2016**, 8, 1105–1111.
- (12). Saunders, G. J. and Yudin, A. K. “Property-Driven Development of Passively Permeable

- Macrocyclic Scaffolds Using Heterocycles.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202206866.
- (13). Hickey, J. L.; Zaretsky, S.; Denis, M. St.; Chakka, S. K.; Morshed, M. M.; Scully, C. G.; Roughton, A. L. and Yudin, A. K. “Passive Membrane Permeability of Macrocycles Can Be Controlled by Exocyclic Amide Bonds.” *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5368–5376.
 - (14). Beck, J. G.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kiran, M. U.; Frank, A. O.; Neubauer, S.; Ovadia, O.; Greenberg, S.; Gilon, C.; Hoffman, A. and Kessler, H. “Intestinal permeability of cyclic peptides: common key backbone motifs identified.” *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12125–12133.
 - (15). Ovadia, O.; Greenberg, S.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Opperer, F.; Kessler, H.; Gilon, C. and Hoffman, A. “The Effect of Multiple N-Methylation on Intestinal Permeability of Cyclic Hexapeptides.” *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 479–487.
 - (16). Schwochert, J.; Turner, R.; Thang, M.; Berkeley, R. F.; Ponkey, A. R.; Rodriguez, K. M.; Leung, S. S. F.; Khunte, B.; Goetz, G.; Limberakis, C.; Kalgutkar, A. S.; Eng, H.; Shapiro, M. J.; Mathiowetz, A. M.; Price, D. A.; Liras, S.; Jacobson, M. P. and Lokey, R. S. “Peptide to Peptoid Substitutions Increase Cell-permeability in Cyclic Hexapeptides.” *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2928– 2931.
 - (17). Furukawa, A.; Townsend, C. E.; Schwochert, J.; Pye, C. R.; Bednarek, M. A. and Lokey, R. S. “Passive Membrane Permeability in Cyclic Peptomer Scaffolds Is Robust to Extensive Variation in Side Chain Functionality and Backbone Geometry.” *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9503–9512.
 - (18). Hosono, Y.; Uchida, S.; Shinkai, M.; Townsend, C. E.; Kelly, C. N.; Naylor, M. R.; Lee, H. W.; Kanamitsu, K.; Ishii, M.; Ueki, R.; Ueda, T.; Takeuchi, K.; Sugita, M.; Akiyama, Y.; Morimoto, J.; Lokey, R. S. and Sando, S. “Amide-to-ester substitution as a stable alternative to N-methylation for increasing membrane permeability in cyclic peptides.” *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1416.
 - (19). Ghosh, P.; Raj, N.; Verma, H.; Patel, M.; Chakraborti, S.; Khatri, B.; Doreswamy, C. M.; Anandakumar, S. R.; Seekallu, S.; Dinesh, M. B.; Jadhav, G.; Yadav, P. N. and Chatterjee, J. “An amide to thioamide substitution improves the permeability and bioavailability of macrocyclic peptides” *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 6050.
 - (20). Buckton, L. K. and McAlpine, S. R. “Improving the Cell Permeability of Polar Cyclic Peptides by Replacing Residues with Alkylated Amino Acids, Asparagines, and d-Amino Acids.” *Org. Lett.* **2018**, *20*, 506–509.
 - (21). Schumacher-Klinger, A.; Fanous, J.; Merzbach, S.; Weinmuller, M.; Reichart, F.; Rader, A. F. B.; Gitlin-Domagalska, A.; Gilon, C.; Kessler, H. and Hoffman, A. “Enhancing Oral Bioavailability of Cyclic RGD Hexa-peptides by the Lipophilic Prodrug Charge Masking Approach: Redirection of Peptide Intestinal Permeability from a Paracellular to Transcellular Pathway.” *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 3468–3477.

- (22). Rand, A. C.; Leung, S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, B.; Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P. and Lokey, R. S. "Optimizing PK properties of cyclic peptides: the effect of side chain substitutions on permeability and clearance." *Med. Chem. Commun.* **2012**, 3, 1282–1289.
- (23). Appavoo, S. D.; Huh, S.; Diaz, D. B. and Yudin, A. K. "Conformational Control of Macrocycles by Remote Structural Modification." *Chem. Rev.* **2019**, 119, 9724–9752.
- (24). Mizuno, A.; Matsui, K. and Shuto, S. "From Peptides to Peptidomimetics: A Strategy Based on the Structural Features of Cyclopropane." *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 14394–14409.
- (25). Nagata, M.; Watanabe, M.; Doi, R.; Uemura, M.; Ochiai, N.; Ichinose, W.; Fujiwara, K.; Sato, Y.; Kameda, T.; Takeuchi, K. and Shuto, S. "Helix-forming aliphatic homo- δ -peptide foldamers based on the conformational restriction effects of cyclopropane" *Org. Biomol. Chem.* **2023**, 21, 970–980.
- (26). Matsui, K.; Kido, Y.; Watari, R.; Kashima, Y.; Yoshida, Y. and Shuto, S. "Highly Conformationally Restricted Cyclopropane Tethers with Three-Dimensional Structural Diversity Drastically Enhance the Cell Permeability of Cyclic Peptides." *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 3034–3041.
- (27). 植村真衣. "シクロプロパンの構造特性に基づく膜透過性環状ペプチドの設計と合成." 卒業論文 **2018**.
- (28). Kazuta, Y.; Matsuda, A.; Shuto, S. "Development of Versatile Cis- and Trans-Dicarbon-Substituted Chiral Cyclopropane Units: Synthesis of (1*S*,2*R*)- and (1*R*,2*R*)-2-Aminomethyl-1-(1*H*-Imidazol-4-yl)Cyclopropanes and Their Enantiomers as Conformationally Restricted Analogues of Histamine." *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1669–1677.
- (29). Tanabe, M.; Watanabe, M.; Hoshiya, N.; Mizuno, A.; Fukuda, H.; Arisawa, M. and Shuto, S. "Preparation of Chiral Bromomethylenecyclopropane and Its Use in Suzuki–Miyaura Coupling: Synthesis of the Arylmethyl-(*Z*)-cyclopropane Structure Core." *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 11714–11720.
- (30). Kanada, R.; Tanabe, M.; Muromoto, R.; Sato, Y.; Kuwahara, T.; Fukuda, H.; Arisawa, M.; Matsuda, T.; Watanabe, M. and Shuto, S. "Synthesis of Chiral *cis*-Cyclopropane Bearing Indole and Chromone as Potential TNF α Inhibitors." *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 7672–7682.
- (31). Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y. and Kakisawa, H. "High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids." *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 11, 4092–4096.
- (32). Yabuuchi, T. and Kusumi, T. "Phenylglycine Methyl Ester, a Useful Tool for Absolute Configuration Determination of Various Chiral Carboxylic Acids." *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 397–404.
- (33). Kansy, M.; Senner, F. and Gubernator, K. "Physicochemical high throughput screening:

- parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes.” *Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007–1010.
- (34). Xiaoxi, K. C.; Anthony, M.; Linda, H. and Charles, L. C. “A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model.” CORNING, Application note, **2021**.
 - (35). Furukawa, A.; Townsend, C. E.; Schwochert, J.; Pye, C. R.; Bednarek, M. A. and Lokey, R. S. “Passive Membrane Permeability in Cyclic Peptomer Scaffolds Is Robust to Extensive Variation in Side Chain Functionality and Backbone Geometry.” *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9503–9512.
 - (36). Furukawa, A.; Schwochert, J.; Pye, C. R.; Asano, D.; Edmondson, Q. D.; Turmon, A. C.; Victoria G. Klein, V. G.; Ono, S.; Okada, O. and Lokey, R. S. “Drug-Like Properties in Macrocycles above MW 1000: Backbone Rigidity versus Side-Chain Lipophilicity.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 21571 – 21577.
 - (37). Faris, J. H.; Adaligil, E.; Popovych, N.; Ono, S.; Takahashi, M.; Nguyen, H.; Plise, E.; Taechalertpaisarn, J.; Lee, H. W.; Koehler, M. F. T.; Cunningham, C. N. and Lokey, R. S. “Membrane Permeability in a Large Macrocyclic Peptide Driven by a Saddle-Shaped Conformation.” *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 4582–4591.
 - (38). Weinmüller, M.; Rechenmacher, F.; Marelli, U. K.; Reichart, F.; Kapp, T. G.; Räder, A. F. B.; Leva, F. S. D.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Munoz-Felix, J. M.; Hodivala-Dilke, K.; Schumacher, A.; Fanous, J.; Gilon, C.; Hoffman, A. and Kessler, H. “Overcoming the Lack of Oral Availability of Cyclic Hexapeptides: Design of a Selective and Orally Available Ligand for the Integrin $\alpha v \beta 3$.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 16405 –16409.
 - (39). Kessler, H. “Conformation and Biological Activity of Cyclic Peptides.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512–523.
 - (40). Koehnke, J.; Naismith, J. and Donk, W. A. “Cyclic Peptides From Bioorganic Synthesis to Applications” The Royal Society of Chemistry, **2018**, Chapter 13.
 - (41). Dempsey, C. E. “Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy.” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2001**, *39*, 135–170.
 - (42). Wang, C. K.; Northfield, S. E.; Colless, B.; Chaousis, S.; Hamernig, I.; Lohman, R.; Nielsen, D. S.; Schroeder, C. I.; Liras, S.; Price, D. A.; Fairlie, D. P. and Craik, D. J. “Rational design and synthesis of an orally bioavailable peptide guided by NMR amide temperature coefficients.” *PNAS.* **2014**, *111*, 17504–17509.
 - (43). Hoang, H. N.; Hill, T. A. and Fairlie, D. P. “Connecting Hydrophobic Surfaces in Cyclic Peptides Increases Membrane Permeability.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 8385–8390.
 - (44). Pronk, S.; Pall, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; Spoel, D. V. D.; Hess, B. and Lindahl, E. “GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit.” *Bioinformatics*, **2013**, *29*, 845–854.

- (45). Sugita, Y.; Kitao, A. and Okamoto, Y. "Multidimensional Replica-Exchange Method for Free-Energy Calculations." *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 6042–6051.
- (46). Stephanie, F.; Tambunan, U.S.F.; Kuczera, K. and Siahhaan, T.J. "Structure of a Cyclic Peptide as an Inhibitor of Mycobacterium tuberculosis Transcription: NMR and Molecular Dynamics Simulations." *Pharmaceuticals*, **2024**, *17*, 1545–6051.
- (47). Habeck, M.; Rieping, W. and Nilges, M. "Bayesian estimation of Karplus parameters and torsion angles from three-bond scalar couplings constants." *J. Magn. Reson.* **2005**, *177*, 160–165.
- (48). Sugita, M.; Fujie, T.; Yanagisawa, K.; Ohue, M. and Akiyama, Y. "Lipid Composition Is Critical for Accurate Membrane Permeability Prediction of Cyclic Peptides by Molecular Dynamics Simulations." *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, *62*, 4549–4560.
- (49). Appavoo, S. D.; Heller, N. W.; Campenhout, C. V.; Saunders, G. J. and Yudin, A. K. "Identification of "Structural Pin" Interactions and their Significance for the Conformational Control of Macrocyclic Scaffolds." *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202402372.
- (50). Rand, A. C.; Leung, S. S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, B.; Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P. and Lokey, R. S. "Optimizing PK properties of cyclic peptides: the effect of side chain substitutions on permeability and clearance." *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1282–1289.
- (51). Vanommeslaeghe, K. and MacKerell, A. D. Jr. "Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing." *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3144–3154.
- (52). Vanommeslaeghe, K.; PrabhuRaman, E. and MacKerell, A. D. Jr. "Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges." *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3155–3168.
- (53). The CGenFF program. <https://cgenff.com/> (2025/12/8 accessed)
- (54). Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G. and Im, W. "CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM." *J Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1859–1865.
- (55). Case, D. A.; Belfon, K.; Ben-Shalom, I. Y.; Brozell, S. R.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E. , I.; Cruzeiro, V. W. D.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giambasu, G.; Gilson, M. K.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Harris, R.; Izadi, S.; Izmailov, S. A.; Kasavajhala, K.; Kovalenko, A.; Krasny, R.; Kurtzman, T.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Liu, J.; Luchkov, T.; Luo, R.; Man, V.; Merz, K. M.; Miao, Y.; Mikhailovskii, O.; Monard, G.; Nguyen, H.; Onufriev, A.; Pan, F.; Pantano, S.; Qi, R.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Schott-Verdugo, S.; Shen, J.; Simmerling, C. L.; Skrynnikov, N. R.; Smith, J.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wilson, L.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Xiong, Y.; Xue, Y.; York, D. M. and Kollman, P. A. AMBER 20; University of California: San Francisco, CA, 2020.

- (56). Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W. and Klein, M. L. "Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water." *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- (57). Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01; Chemical Computing Group ULC: Canada, 2019.
- (58). Wang, L.; Friesner, R. A. and Berne, B. J. "Replica Exchange with Solute Scaling: A More Efficient Version of Replica Exchange with Solute Tempering (REST2)." *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115*, 9431–9438.
- (59). Park, S.; Khalili-Araghi, F.; Tajkhorshid, E. and Schulten, K. "Free Energy Calculation from Steered Molecular Dynamics Simulations Using Jarzynski's Equality." *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 3559–3566.
- (60). Case, D. A.; Aktulga, H. M.; Belfon, K.; Ben-Shalom, I. Y.; Berryman, J. T.; Brozell, S. R.; Cerutti, D. S.; Cheatham, I. T. E.; Cisneros, G. A.; Cruzeiro, V. W. D.; Darden, T. A.; Forouzesh, N.; Ghazimirsaeed, M.; Giambasu, G.; Giese, T.; Gilson, M. K.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Harris, J.; Huang, Z.; Izadi, S.; Izmailov, S. A.; Kasavajhala, K.; Kaymak, M. C.; Kolossváry, I.; Kovalenko, A.; Kurtzman, T.; Lee, T. S.; Li, P.; Li, Z.; Lin, C.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Machado, M.; Manathunga, M.; Merz, K. M.; Miao, Y.; Mikhailovskii, O.; Monard, G.; Nguyen, H.; O'Hearn, K. A.; Onufriev, A.; Pan, F.; Pantano, S.; Rahnamoun, A.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Schott-Verdugo, S.; Shajan, A.; Shen, J.; Simmerling, C. L.; Skrynnikov, N. R.; Smith, J.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wang, J.; Wu, X.; Wu, Y.; Xiong, Y.; Xue, Y.; York, D. M.; Zhao, C.; Zhu, Q. and Kollman, P. A. AMBER 24; University of California: San Francisco, CA, 2024.