

含订合钉的多肽及其应用

本发明主张如下的优先权：

CN2021114005918，申请日：2021 年 11 月 19 日；

CN2022106482638，申请日：2022 年 6 月 8 日。

技术领域

本发明涉及一系列含订合钉的多肽及其应用，具体公开了式 (I-1) - (I-5) 所示序列的多肽。

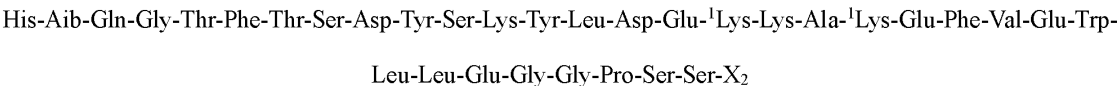
背景技术

超重和肥胖是目前全人类面临的一个严重的健康问题，它通常伴随其他疾病如冠状动脉疾病，高血压，二型糖尿病，非酒精性脂肪肝，肾脏疾病以及某些癌症的发生。世界卫生组织(WHO)将肥胖症定为十大慢性病之一，肥胖症与高血压、高血脂、高血糖并称为“死亡四重奏”，可能成为21世纪的头号杀手。WHO数据显示，2016年中国肥胖症患病率约为6.2%。此外，2016年《柳叶刀》(Lancet)发表了全球成年人体重调查报告。调查发现，全球成人肥胖人口已经超过健康者，而中国超越美国，成为全球肥胖人口最多的国家，并且因超重和肥胖引发的糖尿病、高血压、心血管病等疾病人群逐年增加且呈年轻化趋势。

胰高血糖素(GCG)是由胰腺分泌的，与胰高血糖素受体(GCGR)结合产生生理功能的激素。胰高血糖素通过增加糖异生及糖原分解的方式促进血糖的升高。另外，GCG还可以减少肝脏脂肪组织中的脂肪酸合成，促进脂肪的分解。胰高血糖素样肽1(GLP-1)是由肠道L细胞分泌的激素，它可以通过抑制食欲，减少摄食，并通过增加能量消耗，促进棕色脂肪产热降低体重。在保持GLP-1激动剂疗效的基础上，引入GCG活性，将具备以下药效：有助于进一步促进胰腺β细胞分泌胰岛素；促进棕色脂肪组织代谢；增强肝脏脂肪酸β氧化，降低脂质及胆固醇生成；提高心肌细胞存活率；加速白色脂肪组织脂质代谢，降低脂肪含量。GLP-1/GCG双靶点协同作用相比于单靶点作用而言，在改善血糖和减肥方面很可能会具有更好的效果。因此，对GLP-1/GCG双靶点药物在治疗肥胖及相关疾病方面的研究具有重要意义。

发明内容

本发明提供了下式所示序列的多肽，



(I-1)

His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-¹Lys-Lys-Ala-Lys-¹Lys-Phe-Val-Glu-Trp-
Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-X₂

(I-2)

His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-¹Lys-Ala-Lys-¹Lys-Phe-Val-Glu-Trp-
Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-X₂

(I-3)

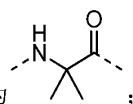
His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-¹Lys-Glu-Phe-Val-¹Lys-Trp-
Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-X₂

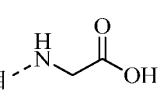
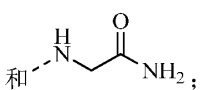
(I-4)

His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-¹Lys-Trp-
Leu-Leu-¹Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-X₂

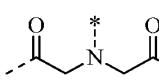
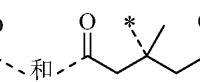
(I-5)

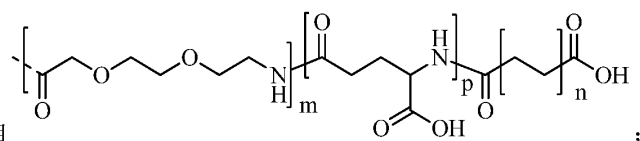
其中,

Aib 的结构为 ;

X₂ 选自  和 ;

¹Lys 表示修饰的赖氨酸, 所述修饰为两个赖氨酸侧链上的氨基与  相连;

X 选自  和 , 其中, “*”表示与 X₀ 相连的位置;

X₀ 选自 ;

m 选自 2 和 3;

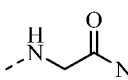
n 选自 8、9 和 10;

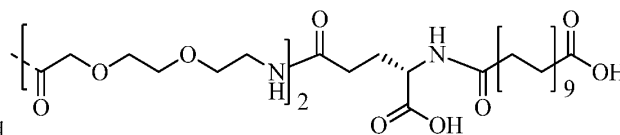
p 选自 1 和 2。

在本发明的一些方案中, 上述 m 选自 2, 其他变量如本发明所定义。

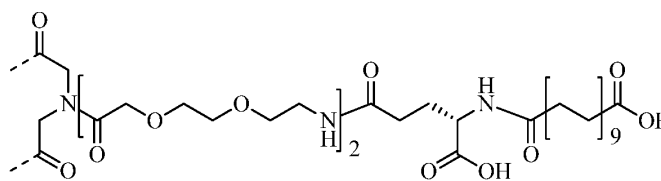
在本发明的一些方案中, 上述 n 选自 9, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 p 选自 1, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 X₂ 选自 ，其他变量如本发明所定义。

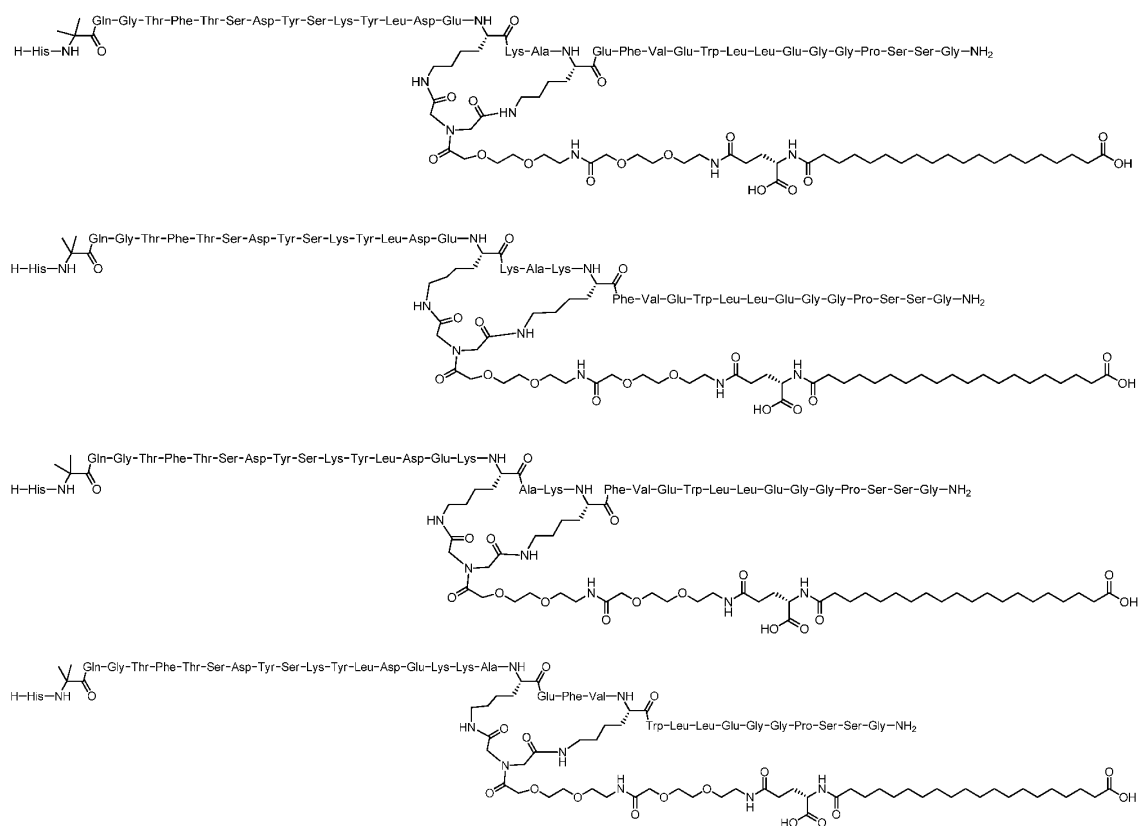
在本发明的一些方案中，上述 X₀ 选自 ，其他变量如本发明所定义。

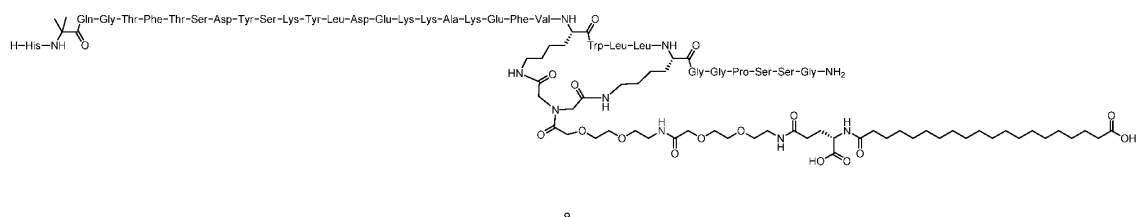
在本发明的一些方案中，上述结构单元  选自

，其他变量如本发明所定义。

本发明还有一些方案由上述变量任意组合而来。

本发明还提供了下式所示多肽，





本发明还提供了上述多肽化合物在制备治疗与 GLP-1R/GCGR 相关疾病的药物中的应用。

本发明的一些方案中，所述与 GLP-1R/GCGR 相关疾病选自肥胖和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

技术效果

本发明化合物对 GLP-1R/GCGR 具有很强的激动活性；本发明化合物在 DIO 小鼠中展现了优异的减重药效；本发明化合物在 STZ-NASH 小鼠中展现了优异的改善 NASH 药效；本发明化合物具有极高的血浆蛋白结合度和优异的血浆稳定性；本发明化合物具有优异的药代动力学性质。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照普通的含义去理解。当本文中出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

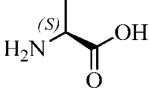
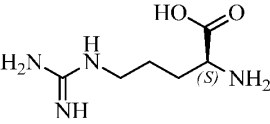
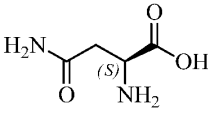
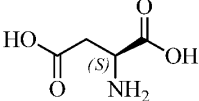
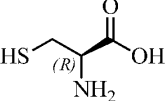
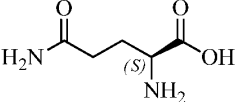
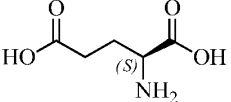
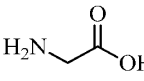
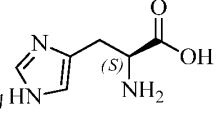
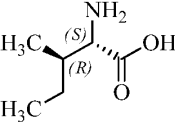
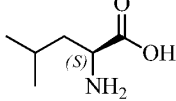
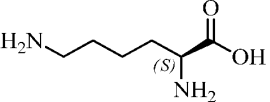
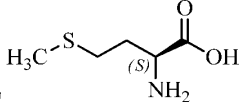
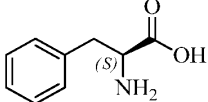
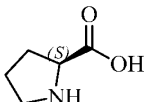
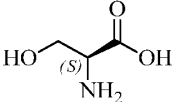
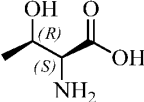
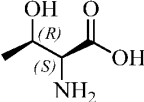
这里所采用的术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

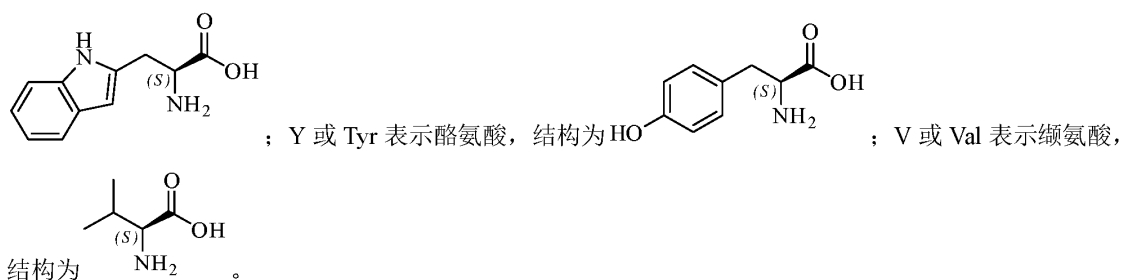
术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物接触的方式获得碱加成盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物接触的方式获得酸加成盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下，这样的盐的制备方法是：在水或有机溶剂或两者的混合物中，经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及起到与天然存在的氨基酸类似的作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来修饰的那些氨基酸，例如，羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结

构(例如与氢、羧基基团、氨基基团和 R 基团结合的 α 碳)的化合物, 例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物可以具有修饰的 R 基团(例如, 正亮氨酸)或修饰的肽骨架, 但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指其结构不同于一般的氨基酸化学结构, 但起到与天然存在的氨基酸相似的作用的化学化合物。

本文所述的 A 或 Ala 表示丙氨酸, 结构为  ; R 或 Arg 表示精氨酸, 结构为  ; N 或 Asn 表示天冬酰胺, 结构为  ; D 或 Asp 表示天冬氨酸, 结构为  ; C 或 Cys 表示半胱氨酸, 结构为  ; Q 或 Gln 表示谷氨酰胺, 结构为  ; E 或 Glu 表示谷氨酸, 结构为  ; G 或 Gly 表示甘氨酸, 结构为  ; H 或 His 表示组氨酸, 结构为  ; I 或 Ile 表示异亮氨酸, 结构为  ; L 或 Leu 表示亮氨酸, 结构为  ; K 或 Lys 表示赖氨酸, 结构为  ; M 或 Met 表示甲硫氨酸, 结构为  ; F 或 Phe 表示苯丙氨酸, 结构为  ; P 或 Pro 表示脯氨酸, 结构为  ; S 或 Ser 表示丝氨酸, 结构为  ; T 或 Thr 表示苏氨酸, 结构为  ; W 或 Trp 表示色氨酸, 结构为 



术语“治疗”包括抑制、减缓、停止或逆转现有症状或病患的进展或严重程度。

除非另有说明，术语“异构体”意在包括几何异构体、顺反异构体、立体异构体、对映异构体、旋光异构体、非对映异构体和互变异构体。

本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-)- 和 (+)-对映体、(R)- 和 (S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本发明的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本发明的范围之内。

除非另有说明，术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

除非另有说明，术语“顺反异构体”或者“几何异构体”系由因双键或者成环碳原子单键不能自由旋转而引起。

除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像的关系的立体异构体。

除非另有说明，“(+)”表示右旋，“(-)”表示左旋，“(±)”表示外消旋。

除非另有说明，用楔形实线键 () 和楔形虚线键 () 表示一个立体中心的绝对构型，用直形实线键 () 和直形虚线键 () 表示立体中心的相对构型，用波浪线 () 表示楔形实线键 () 或楔形虚线键 ()，或用波浪线 () 表示直形实线键 () 或直形虚线键 ()。

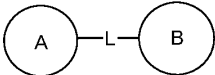
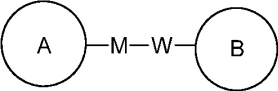
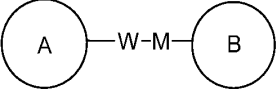
除非另有说明，术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%，并且，该异构体或对映体的含量大于等于 60%，或者大于等于 70%，或者大于等于 80%，或者大于等于 90%，或者大于等于 95%，或者大于等于 96%，或者大于等于 97%，或者大于等于 98%，或者大于等于 99%，或者大于等于 99.5%，或者大于等于 99.6%，或者大于等于 99.7%，或者大于等于 99.8%，或者大于等于 99.9%。

除非另有说明，术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。

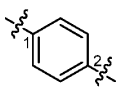
例如, 其中一种异构体或对映体的含量为 90%, 另一种异构体或对映体的含量为 10%, 则异构体或对映体过量 (ee 值) 为 80%。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的 (*R*)-和 (*S*)-异构体以及 *D* 和 *L* 异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体, 可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备, 其中将所得非对映体混合物分离, 并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者, 当分子中含有碱性官能团 (如氨基) 或酸性官能团 (如羧基) 时, 与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐, 然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分, 然后回收得到纯的对映体。此外, 对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的, 所述色谱法采用手性固定相, 并任选地与化学衍生法相结合 (例如由胺生成氨基甲酸盐)。

本发明的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如, 可用放射性同位素标记化合物, 比如氚 (^3H), 碘-125 (^{125}I) 或 C-14 (^{14}C)。又例如, 可用重氢取代氢形成氘代药物, 氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固, 相比于未氘化药物, 氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本发明的化合物的所有同位素组成的变换, 无论放射性与否, 都包括在本发明的范围之内。

当所列举的连接基团没有指明其连接方向, 其连接方向是任意的, 例如,  中连接基团 L 为 -M-W-, 此时 -M-W- 既可以按与从左往右的读取顺序相同的方向连接环 A 和环 B 构成 , 也可以按照与从左往右的读取顺序相反的方向连接环 A 和环 B 构成 。所述连接基团、取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

除非另有规定, 当某一基团具有一个或多个可连接位点时, 该基团的任意一个或多个位点可以通过化学键与其他基团相连。当该化学键的连接方式是不定位的, 且可连接位点存在 H 原子时, 则连接化学键时, 该位点的 H 原子的个数会随所连接化学键的个数而对应减少变成相应价数的基团。所述位点与其他基团连接的化学键可以用直形实线键 (—)、直形虚线键 (---)、或波浪线 (~~~~) 表示。例如 -OCH₃ 中的直形

实线键表示通过该基团中的氧原子与其他基团相连;  中的直形虚线键表示通过该基团中的氮原子的两端与其他基团相连;  中的波浪线表示通过该苯基基团中的 1 和 2 位碳原子与其他基团相连。

除非另有规定，术语“C₁₋₃ 烷基”用于表示直链或支链的由 1 至 3 个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述 C₁₋₃ 烷基包括 C₁₋₂ 和 C₂₋₃ 烷基等；其可以是一价（如甲基）、二价（如亚甲基）或者多价（如次甲基）。C₁₋₃ 烷基的实例包括但不限于甲基（Me）、乙基（Et）、丙基（包括 *n*-丙基和异丙基）等。

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构，如果本发明涉及化合物的绝对构型，则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶X射线衍射法（SXRD），把培养出的单晶用Bruker D8 venture衍射仪收集衍射强度数据，光源为CuK α 辐射，扫描方式： φ/ω 扫描，收集相关数据后，进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构，便可以确证绝对构型。

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备，包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术上人员所熟知的等同替换方式，优选的实施方式包括但不限于本发明的实施例。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。

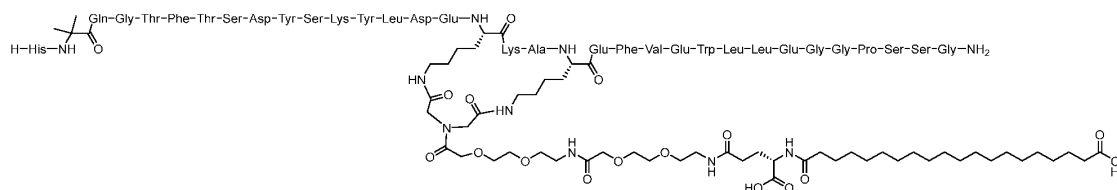
本发明采用下述缩略词：aq 代表水；eq 代表当量、等量；DCM 代表二氯甲烷；PE 代表石油醚；DMSO 代表二甲亚砜；MeOH 代表甲醇；Boc 代表叔丁氧羰基，是一种氨基保护基团；Dde 代表 (4, 4-二甲基-2, 6-二氧代环己亚基) 乙基，是一种氨基酸的侧链保护基；r.t.代表室温；O/N 代表过夜；THF 代表四氢呋喃；Boc₂O 代表二叔丁基二碳酸酯；TFA 代表三氟乙酸；DIEA 代表二异丙基乙基胺；DMF 代表 *N,N*-二甲基甲酰胺；HBTU 代表苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯；HOBT 代表 1-羟基苯并三唑；HOAT 代表 1-羟基-7-氮杂苯并三唑；DIC 代表 *N,N'*-二异丙基碳二亚胺；DBU 代表 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯；PhSiH₃ 代表苯硅烷；Pd(PPh₃)₄ 代表四三苯基膦钯；AEEA 代表 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸；DIEA 代表二异丙基乙胺。

化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw®软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

具体实施方式

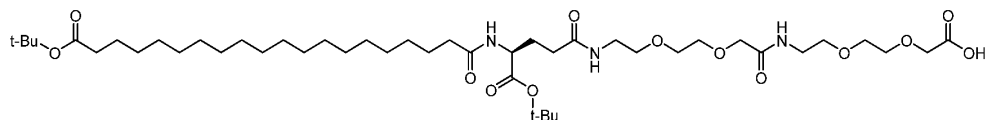
下面通过实施例对本发明进行详细描述，但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明，其中也公开了其具体实施方式，对本领域的技术人员而言，在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进将是显而易见的。

实施例 1



WX001

中间体 1 的合成



中间体 1

1. 中间体 1 挂树脂

1.1 称取 5.0 g 氯代(邻氯苯基)二苯基甲烷树脂(2-CTC Resin, 替代度 S=1.00 mmol/g)和 1.93 g Fmoc-AEEA-OH, 加入到反应柱中, 再加入 DCM(40 mL), 随后加入 DIEA(3.5 mL)至反应柱氮气鼓气 2 h, 然后加入 MeOH(5 mL)至反应柱氮气继续鼓气 30 min, 排废, 直至没有液体流出, 加入 DMF(50 mL) 洗涤 5 次每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

1.2 加入 20%的哌啶/DMF(100 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(100 mL)洗涤 5 次每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。

2. 氨基酸的偶联

2.1 Fmoc-AEEA-OH 的偶联

1. 称取 Fmoc-AEEA-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(30 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
2. 在 25°C的环境中反应 20 min, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
3. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.2 Fmoc-Glu-OtBu 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(100 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Glu-OtBu(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(30 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF(100 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.3 20-(叔丁氧基)-20-氧代二十烷酸的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(100 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出, 加入 DMF(100 mL)洗涤 5 次每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 20-(叔丁氧基)-20-氧代二十烷酸 (3.0 eq) 加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加

DMF(30 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。

3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

3. 切割及粗肽干燥

3.1. 按如下体积配置切割液

HFIP/DCM=20/80。

- 3.2. 将配好的 100 mL 切割液倒入装有干燥后的肽树脂的反应器中, 在反应器中鼓气 20 min, 过滤, 滤液加入烧瓶中, 重复此操作两次, 将两次收集的切割液旋干后得到 4.3 g 粗肽。

WX001 的合成

1. 挂树脂

1.1 称取 1.43 g 4-(2',4'-二甲氧基苯基-苄甲氧羰基-氨甲基)-苯氧基乙酰氨基-甲基二苯甲胺树脂(Rink Amide MBHA Resin, 替代度 Sub=0.28 mmol/g), 加入到反应柱中, 再加入 DMF(50 mL)至反应柱氮气鼓气 2 h, 排废, 直至没有液体流出, 加入 DMF(50 mL) 洗涤 5 次每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

1.2 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。

2. 氨基酸的偶联

2.1 Fmoc-Gly-OH 的偶联

1. 称取 Fmoc-Gly-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
2. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
3. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.2 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.3 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.0eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.4 Fmoc-Pro-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Pro-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.5 Fmoc-Gly-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。四氯苯醌检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Gly-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 四氯苯醌检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.6 Fmoc-Gly-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Gly-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.7 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。

2. 称取 Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.8 Fmoc-Leu-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Leu-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.9 Fmoc-Leu-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Leu-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.10 Fmoc-Trp(Boc)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.11 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。

3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.12 Fmoc-Val-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Val-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.13 Fmoc-Phe-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Phe-OH(3.0eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.14 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.15 Fmoc-Lys(Dde)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.16 Fmoc-Ala-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Ala-OH(3.0eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.17 Fmoc-Lys(Boc)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.18 Fmoc-Lys(Alloc)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Lys(Alloc)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.19 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3.0 eq) 加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.20 Fmoc-Asp(OtBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入

DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。

2. 称取 Fmoc-Asp(OtBu)-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.21 Fmoc-Leu-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Leu-OH (3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.22 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Tyr(tBu)-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.23 Fmoc-Lys(Boc)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Lys(Boc)-OH (6.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.24 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反

应柱中，鼓氮气，待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。

3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h，茚三酮检测，树脂无色透明。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.25 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.0 eq)加入到上述树脂中，加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 2 h，茚三酮检测，树脂蓝色。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.26 Fmoc-Asp(OtBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Asp(OtBu)-OH (6.0 eq)加入到上述树脂中，加入 HOAT(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸和 HOAT 溶解后加入 DIC(6.0 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 1 h，茚三酮检测，树脂无色透明。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.27 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Ser(tBu)-OH(6.0 eq)加入到上述树脂中，加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h，茚三酮检测，树脂无色透明。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.28 Fmoc-Thr(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Thr(tBu)-OH(6.0 eq)加入到上述树脂中，加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h，茚三酮检测，树脂无色透明。

4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.29 Fmoc-Phe-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Phe-OH(6.0 eq)加入到上述树脂中，加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h，茚三酮检测，树脂无色透明。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.30 Fmoc-Thr(tBu)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Thr(tBu)-OH(6.0 eq)加入到上述树脂中，加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h，茚三酮检测，树脂无色透明。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.31 Fmoc-Gly-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Gly-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中，加入 DIEA(6.00 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸溶解后加入 HATU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h，茚三酮检测，树脂无色透明。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.32 Fmoc-Gln(Trt)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 min，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Gln(Trt)-OH (6.0 eq)加入到上述树脂中，加入 HOBt(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中，鼓氮气，待氨基酸和 HOBt 溶解后加入 DIC(6.0 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h，茚三酮检测，树脂无色透明。
4. 抽掉反应液，用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次)，每次 1 min，排废，直至没有液体流出。

2.33 Fmoc-Aib-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Fmoc-Aib-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HATU(2.85 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应过夜, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.34 Boc-His(Trt)-OH 的偶联

1. 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。四氯苯醌检测, 树脂蓝色。
2. 称取 Boc-His(Trt)-OH (6.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(12.0 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HATU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 四氯苯醌检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.35 脱 Alloc

1. 加入 PhSiH_3 (10.0 eq) 和 DCM(10 mL) 至反应柱中, 氮气鼓起后加入 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.1 eq), 氮气鼓起 20 min, 反应二次, 排废, 直至没有液体流出。
2. 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.36 Fmoc-Ida-OH 的偶联

1. 称取 Fmoc-Ida-OH(6.0 eq) 加入到上述树脂中, 加入 DIEA (12.0 eq) 补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(5.70 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
2. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
3. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.37 中间体 1 的偶联

1. 加入 10%的 DBU/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 20 min, 排废, 直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次, 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。
2. 称取中间体 1(1.50 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(3.00 eq)补加 DMF(10 mL)至反应柱中, 鼓氮气, 待氨基酸溶解后加入 HBTU(1.45 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
3. 在 25°C的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
4. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。

2.38 脱 Dde

1. 加入 3%的水合肼/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 15 min, 排废, 加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。茚三酮检测, 树脂蓝色。

2.39 关酰胺环

1. 将 DIEA(3.0 eq)加入到上述树脂的 DMF 溶液中, 后把用 DMF 溶解好的 HATU(1.5 eq)缓慢滴加至反应柱中, 鼓氮气。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
2. 在 25°C 的环境中反应 0.5 h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
3. 抽掉反应液, 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1 min, 排废, 直至没有液体流出。
4. 用 MeOH(50 mL)收缩树脂, 每次 3 min, 排废, 直至没有液体流出, 将树脂倒出干燥, 备用。

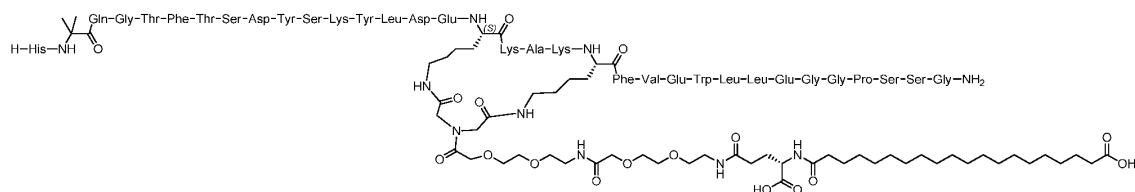
3.切割及粗肽干燥

3.1. 按如下体积配置切割液

TFA/三异丙基硅烷/H₂O/3-巯基丙酸=90/2.5/2.5/5。

- 3.2 将干燥后的肽树脂加入到配好的切割液中, 在摇床震荡 2.5 h, 过滤, 滤液加入到 10 倍体积冰异丙醚中, 离心, 再用异丙醚洗涤 5 次。在真空干燥 2 h 得到粗肽, 通过制备 HPLC 分离纯化(纯化步骤: 流动相乙腈/水(40%/60%), 0.075%TFA; 转盐步骤: 流动相乙腈/水(20%/80%), 0.01%醋酸铵)得到多肽 WX001。多肽分子量经 ESI-MS 确认, 计算值为 4660.1, 实测值为 4660.2。

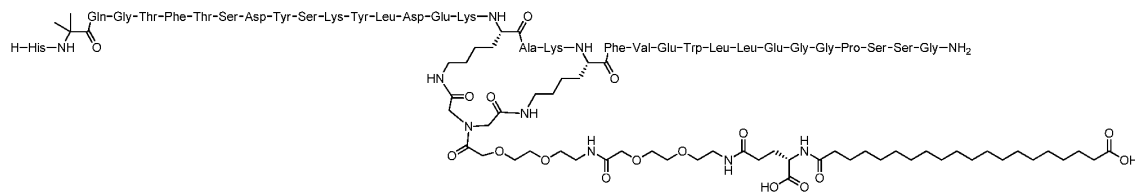
实施例 2



WX002

参考 WX001 的合成, 得到多肽 WX002。多肽分子量经 ESI-MS 确认, 计算值为 4659.2, 实测值为 4659.0。

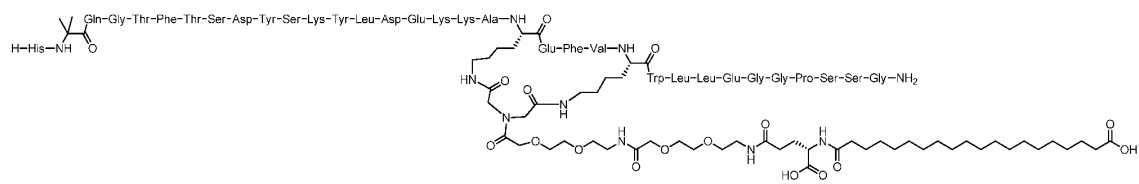
实施例 3



WX003

参考 WX001 的合成, 得到多肽 WX003。多肽分子量经 ESI-MS 确认, 计算值为 4659.2, 实测值为 4659.3。

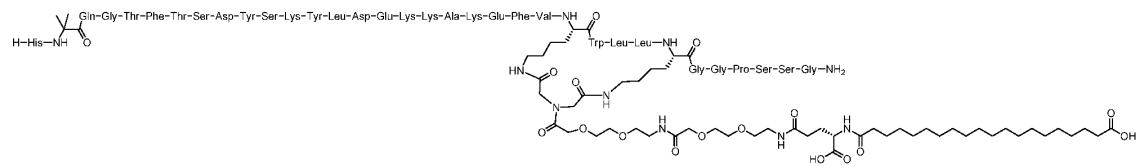
实施例 4



WX004

参考 WX001 的合成, 得到多肽 WX004。多肽分子量经 ESI-MS 确认, 计算值为 4659.2, 实测值为 4659.6。

实施例 5



WX005

参考 WX001 的合成, 得到多肽 WX005。多肽分子量经 ESI-MS 确认, 计算值为 4658.3, 实测值为 4658.7。

生物测试数据

实验例 1: 体外 GLP-1R/GIPR/GCGR 激动活性测试

A: 主要材料:

(I)细胞株

该细胞株由上海药明康德构建。详情见表1。

表1: 细胞株信息

靶点	宿主细胞	克隆
GLP-1R	HEK293	N/A
GCGR	HEK293	N/A
GIPR	CHO	N/A

(II) 试剂与耗材

详情见表2。

表2: 试剂与耗材信息

名称	批次	货号	厂家
cAMP 检测盒	29F	62AM4PEJ	Cisbio
1M HEPES	2120919	15630-106	Invitrogen

Hanks 平衡盐溶液(HBSS)	2185775	14025	Invitrogen
人血清白蛋白(HSA)	SLCF7301	A1653-10G	西格玛
酪蛋白	SLCC9458	C4765-10mL	西格玛
3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)	STBF6061V	I5879-5G	西格玛
ECHO qualified 384 孔板	0006433672	PP-0200	Labcyte
OptiPlate-384	8210-19481	6007299	珀金埃尔默

(III) 仪器

详情见表3。

表3：仪器信息

名称	型号	厂家
EnVision	envision2014	珀金埃尔默
Vi-cell counter	Vi-CELL™ XR Cell Viability Analyzer	贝克曼
Bravo	Bravo V11	安捷伦
ECHO	ECHO 555	Labcyte
Centrifuge	Allegra™ 25R Centrifuge	贝克曼

B. 方法**i) 实验材料**

实验缓冲液见表4。

表4：实验缓冲液信息

试剂	储存浓度	体积	终浓度
Hanks 平衡盐溶液	1x	48.7 mL/ 44.7mL	≈1x
HEPES 缓冲液	1mol/L	250 μL	5mmol/L
5%酪蛋白溶液(HEPES)/ 10%人血清白蛋白溶液(HSA)	5%/ 10%	1000 μL/ 5000μL	0.10%/ 1%
3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)	500mmol/L	50 μL	0.5mmol/L

检测试剂制备见表5。

表5：检测试剂制备信息

试剂	储存浓度	体积	终浓度
细胞裂解液	1x	9.5 mL	≈1x
D2-cAMP 溶液	40x	250 μL	1x
cAMP-抗体溶液	40x	250 μL	1x

ii) 实验方法

a) 制备化合物板：

待测化合物做10个点4倍稀释，起始浓度为30 μM，Bravo完成稀释

b) 转移化合物：

- 1) 使用Echo转移100 nL化合物至OptiPlate-384 plate。
- 2) 将OptiPlate-384 plate在1000 rpm离心5秒。

c) 细胞悬液的制备

- 1) 将一支GLP-1R/GIPR/GCGR细胞冻存管迅速置于37℃温水中解冻。
- 2) 将细胞悬液转移至Transfer15 mL离心管中，用10 ml HBSS轻柔冲洗。
- 3) 将离心管在1000 rpm室温离心1分钟。
- 4) 弃去上清。
- 5) 轻柔打散底部细胞并再用10 mL HBSS轻柔冲洗，离心沉降细胞，最后用实验缓冲液重悬细胞。
- 6) 利用Vi-cell测量细胞密度与活度。
- 7) 用实验缓冲液将GLP-1R/GIPR/GCGR细胞浓度稀释至2.0*10⁵ /mL。
- 8) 在OptiPlate-384 plate中转入100 nL稀释好的细胞悬液。
- 9) 室温孵育30分钟。

d) 加入检测试剂：

- 1) 在OptiPlate-384 plate空孔中加入10 μL 800nM梯度稀释好的cAMP标准品。
- 2) 加入10μL cAMP检测试剂。
- 3) 用TopSeal-A film覆盖OptiPlate-384 plate，室温孵育60分钟。

揭去 TopSeal-A,在 EnVision 读数。

C 实验结果

实验结果如表6所示。

表6：体外GLP-1R/GCGR/GIPR激动活性测试结果

ID	活性测试结果
----	--------

	GLP-1R 激动活性			GCGR 激动活性			GIPR 激动活性		
	EC ₅₀ (nM)	Max Dose (nM)	Max Activity (%)	EC ₅₀ (nM)	Max Dose (nM)	Max Activity (%)	EC ₅₀ (nM)	Max Dose (nM)	Max Activit y (%)
WX001	0.02271	20	122.64	0.02669	100	98.93	>20	20	2.26
WX002	0.01692	20	106.52	0.1948	100	144.14	>20	20	4.06
WX003	0.05822	20	111.18	0.6244	100	86.01	>20	20	1.57
WX004	0.04459	20	85.77	0.05312	100	68.62	>20	20	4.12
WX005	0.1122	20	104.24	2.993	100	140.57	>20	20	1.42

结论：本发明化合物对 GLP-1R/GCGR 具有很强的激动活性，而对 GIPR 无激动活性。

实验例2：在DIO小鼠中的药效研究-体内药效评价

A. 实验目的

研究受试化合物在 DIO 小鼠中的减重作用

B. 实验操作

1. DIO小鼠动物到达设施后，将其饲养于严格控制环境条件的动物饲养间中，饲养间的温度维持在20~24℃，湿度维持在30~70%。通过温湿度计对饲养间的温度和湿度进行实时监控，并且每天对温度和湿度记录两次（上午和下午各1次）。动物饲养间的采光由一个电子定时开灯系统来控制，每天开灯12小时关灯12小时（上午7:00开，下午19:00关）。实验过程中，动物单笼饲养，并给每个笼中提供玩具。实验过程中动物自由采食（大小鼠生长/繁殖饲料）和饮水。
2. 对每组动物分别皮下注射溶媒和待测化合物(10 nmol/kg)，给药时间：早上9:30，给药频率三天一次，给药周期为21天。

C. 实验结果

实验结果如表7所示。

表7：测试化合物在DIO小鼠中的药效

化合物编号	溶媒	WX001	WX004
Δ体重% (21天后与第1天相比)	3.28%	-28.91%	-31.89%

结论：本发明化合物在 DIO 小鼠中展现了优异的减重药效。

实验例3：血浆蛋白结合度测试（PPB）

A. 实验目的

研究受试化合物与人/小鼠血浆白蛋白的结合度。

B. 实验操作

1. 基质准备：实验当天，将血浆在冷水中解冻，并以 3220 rpm 的速度离心 5 min，以去除所有血块。测量得到的血浆的 pH 值，并根据需要使用 1%的磷酸或 1N 的氢氧化钠将其 pH 调整到 7.4±0.1。
2. 测试化合物的稀释步骤：测试化合物溶解在二甲基亚砜（DMSO）中，以制备浓度分别为 10 mM 和 2 mM 的原液。用 98 μL DMSO 稀释 2 μL 原液（2 mM），制得 40 μM 的工作溶液。用 240 μL DMSO 稀释 10 μL 原液，制得 400 μM 对照化合物的工作溶液。将化合物的工作溶液（5 μL）与空白基质（995 μL）按 1:200 的比例混合均匀以制备负载基质。
3. 分析步骤
 - 3.1 将等量的 30 μL 负载基质（n=2）转移至样品采集板，制备待测时间 0 (T0)样品用于残留测定。样品立即与相应的空白缓冲液进行匹配，最终体积为 60 μL，每孔中血浆与缓冲液的体积比为 1:1。然后，测试化合物的 T0 样品分别加入 60μL 的 4%H₃PO₄ 的 H₂O 和 480 μL 含有内标物的终止液。然后将它们与其他样品一起储存在 2-8℃ 下等待进一步处理。
 - 3.2 将剩余的血浆样品放在 37±1℃ 的二氧化碳培养箱预培养 30 min。准备无蛋白样品（F 样品），负载基质的样品（230μL）都被转移到聚碳酸酯管（n=2）中，并在 37℃ 和 155000×g (35000 rpm) 条件下超速离心 4 h。
 - 3.3 为了制备 T 样品（测试样品），额外一份含基质样品转移到单独的 96 孔板(样品培育板)上，并在 37℃ 下培育 4 h。
 - 3.4 离心结束后，从上清液第二层（上层以下）取 30 μL 的无蛋白样品和 30 μL 的 T 样品转移到新的样品收集板中。每个样品与相应的空白缓冲液或基质混合，最终体积为 60 μL，基质:缓冲液体积比 1:1。在所有样品加入 60μL 4%的 H₃PO₄ 水溶液和 480 μL 的终止溶液（含内标）。混合物在转速 4000 rpm 下离心 20 min，取各样品上清液 100μL 进行 LC-MS/MS 分析。

C. 实验结果

实验结果如表8所示。

表8：PPB测试结果

化合物编号	WX001	WX004
PPB% unbound (人/小鼠)	NA/NA	NA/NA

注：NA表示血浆蛋白结合度过高，在正常血浆蛋白浓度下未检出游离药物。

结论：本发明化合物具有极高的血浆蛋白结合度。

实验例4：血浆稳定性测试（PLS）

A. 实验目的

研究受试化合物在正常小鼠血浆中的稳定性。

B. 实验操作

1. 实验前，将凝结的冷冻血浆置于 37°C 的水浴锅中解冻。血浆 4000 rpm 离心 5 min，如有血块，清除血块，将 pH 值调到 7.4±0.1。
2. 测试化合物溶液的制备：用 DMSO 溶解制得 100 μM 的溶液。
3. 98 μL 的空白对照血浆加入 2 μL 的测试化合物溶液(100 μM)，使得两者混合溶液的最终浓度达到 2 μM，将其置于 37°C 水浴条件下培养。
4. 在每个时间点(0、10、30、60 和 120 min)分别加入 100 μL H₃PO₄ 溶液和 800 μL 终止溶液（200 ng/mL 甲糖宁和 200 ng/mL 拉贝洛尔 100% 的甲醇溶液）来沉淀蛋白并充分混合。
5. 样品在转速 4000 rpm 下离心 20 min，从每孔取 100 μL 上清液进行 LC-MS/MS 分析。

C. 实验结果

实验结果如表9所示。

表9：PLS测试结果

化合物编号	WX001
PLS (人/小鼠) T _{1/2} (min)	>289/>289

结论：本发明化合物具有优异的血浆稳定性。

实验例5：化合物小鼠药代动力学评价

A. 实验目的

测试化合物在C57BL/6小鼠体内药代动力学

B. 实验操作

以标准方案测试化合物皮下注射给药后的啮齿类动物药代特征，实验中候选化合物配成澄清溶液，给予小鼠单次皮下注射给药(SC, 0.048 mpk)。皮下注射溶媒为柠檬酸盐缓冲液（20 mM, pH=7）。收集全血，制备得到血浆，以LC-MS/MS方法分析药物浓度，并用Phoenix WinNonlin软件计算药代参数。

C. 实验结果

实验结果如表10所示。

表10：药代动力学测试结果

化合物编号	最大血浆浓度	T _{max} (h)	半衰期 T _{1/2} (h)	SC 浓度积分
-------	--------	----------------------	--------------------------	---------

	(nM)			AUC _{0-72h} (nM.hr)
WX001	46	8	21	1809
WX004	36	12	22	1161

结论：本发明化合物具有优异的小鼠药代动力学性质。

实验例6：化合物食蟹猴药代动力学评价

A. 实验目的

测试化合物在食蟹猴体内药代动力学

B. 实验操作

以标准方案测试化合物皮下注射给药后的哺乳类动物药代特征，实验中候选化合物配成澄清溶液，给予食蟹猴单次皮下注射给药(SC, 0.02 mpk)。皮下注射溶媒为柠檬酸盐缓冲液（20 mM, pH=7）。收集全血，制备得到血浆，以LC-MS/MS方法分析药物浓度，并用Phoenix WinNonlin软件计算药代参数。

C. 实验结果

实验结果如表11所示。

表11：药代动力学测试结果

化合物编号	最大血浆浓度(nM)	T _{max} (h)	半衰期 T _{1/2} (h)	SC 浓度积分 AUC _{0-240h} (nM.hr)
WX001	43	24	93	5510
WX004	48	32	67	5719

结论：本发明化合物具有优异的猴药代动力学性质。

实验例7：STZ-NASH小鼠模型体内药效验证

A. 实验目的

验证受试物在 C57BL/6 小鼠经链脲佐菌素（STZ）+高脂饲料（HFD）诱导的 NASH 模型中的药效。

B. 实验操作

建模方法：新生鼠在出生 48 小时内皮下注射 STZ（200 μg/只），母乳喂养 4 周后挑选空腹血糖值>12 mmol/L 的动物连续 6 周 HFD 喂养，最终建立 NASH 模型。另挑选 8 只动物不进行 STZ 注射和 HFD 喂养（正常对照组）。

给药方案：HFD 喂养一周后开始给药，设定首次给药当天为 Day1，之后每隔两天进行皮下注射，连续给药 5 周。

实验终点检测：病理苏木精-伊红染色和天狼星红染色。

C. 实验结果

实验结果如表13所示。

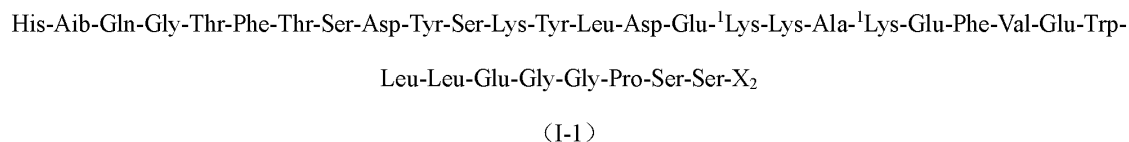
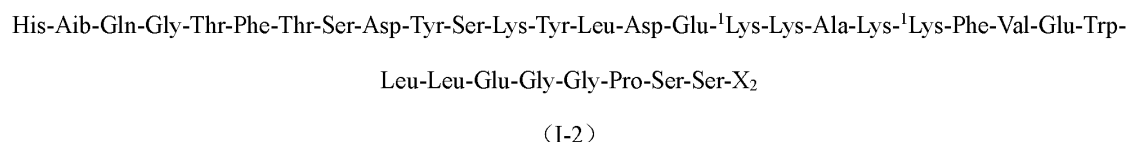
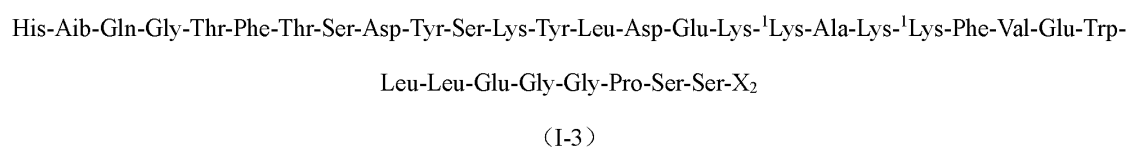
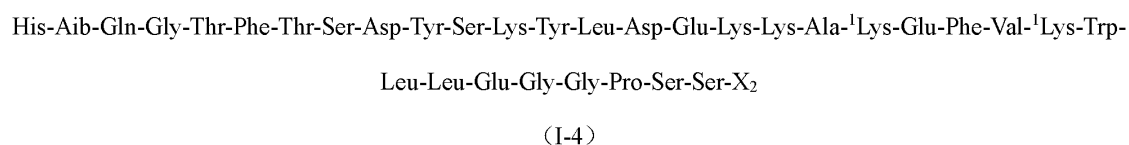
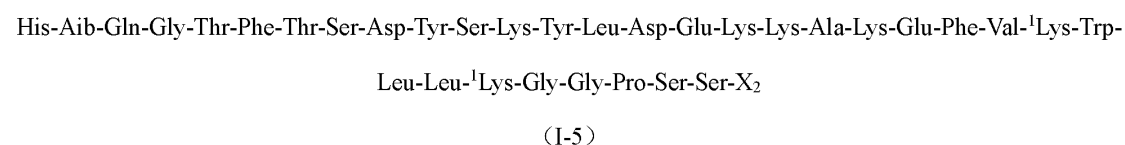
表13 STZ-NASH模型终点动物病理指标

	模型溶媒对照组	模型溶媒对照组	WX001 (20nmol/kg)
脂肪变性评分	0	2.54	1.0
炎症评分	0	1.67	1.63
气球样变评分	0	1.29	0
NAS 评分	0	5.5	2.63
纤维化(%)	0.71	1.11	1.21

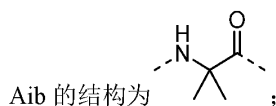
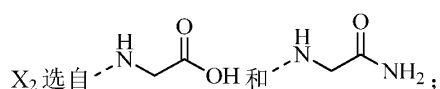
结论：本发明化合物在 STZ-NASH 小鼠模型中可显著改善 NAS 评分。

权 利 要 求 书

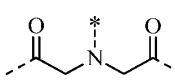
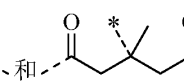
1. 下列所示序列的多肽,

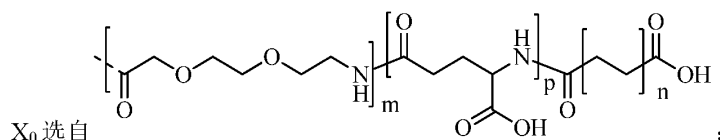


其中,



^1Lys 表示修饰的赖氨酸, 所述修饰为两个赖氨酸侧链上的氨基与  X-X_0 相连;

X 选自  和  , 其中, “*”表示与 X_0 相连的位置;



m 选自 2 和 3;

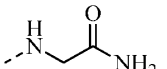
n 选自 8、9 和 10；

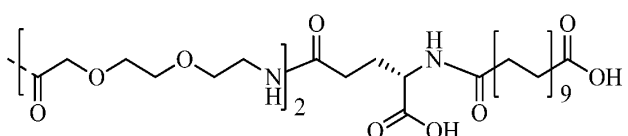
p 选自 1 和 2。

2. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中，m 选自 2。

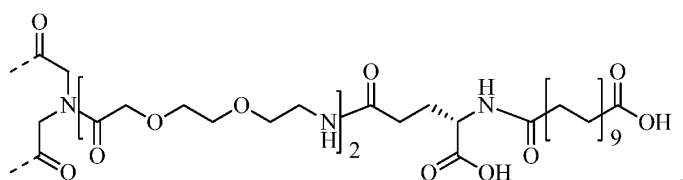
3. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中，n 选自 9。

4. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中，p 选自 1。

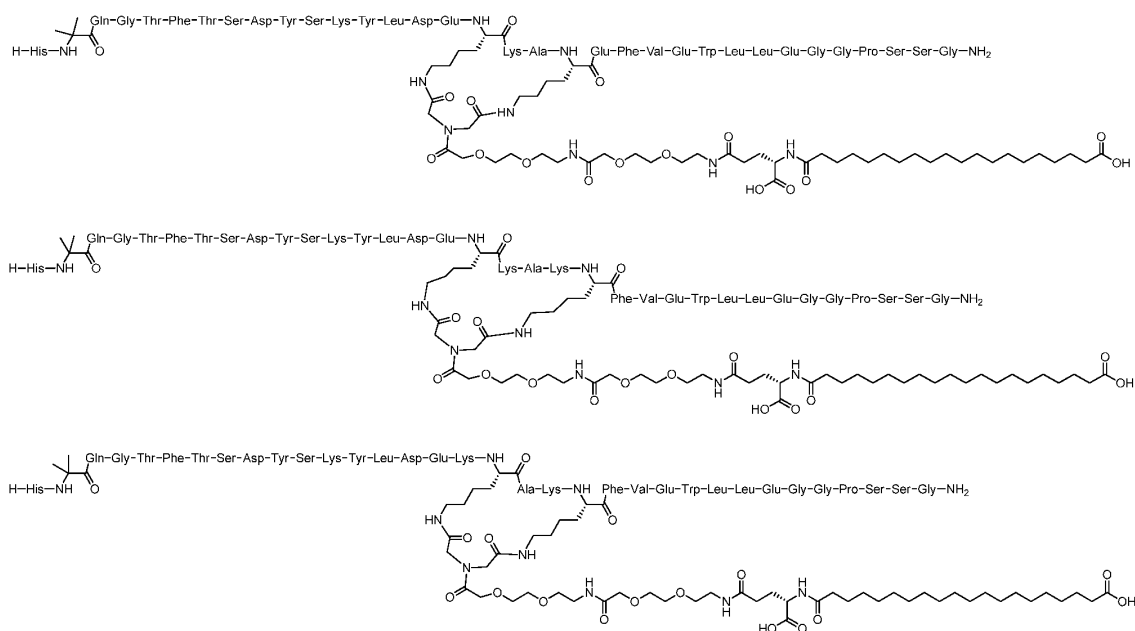
5. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中，X₂ 选自 .

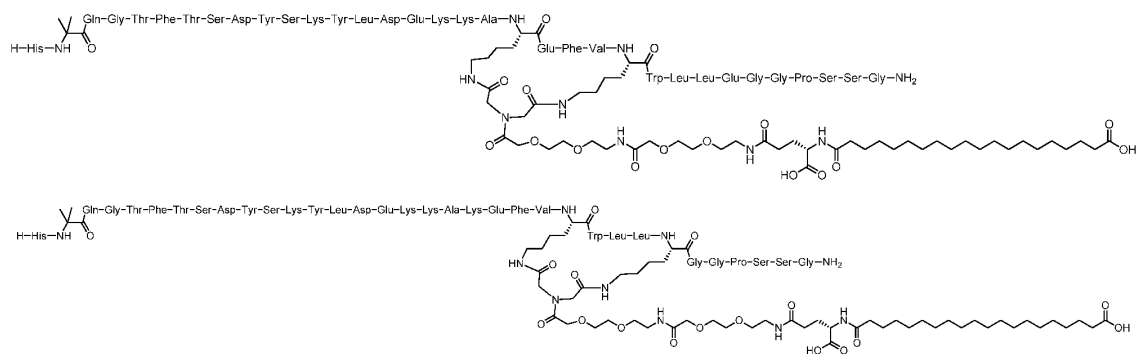
6. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中，X₀ 选自 .

7. 根据权利要求 1 所述的多肽，其中，结构单元  选自



8. 下式所示多肽，





o

9. 权利要求 1~8 任意一项所述多肽化合物在制备治疗与 GLP-1R/GCGR 相关疾病的药物中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的应用，所述与 GLP-1R/GCGR 相关疾病是肥胖和非酒精性脂肪性肝炎。