

含内酰胺修饰的多肽类化合物

本申请主张如下优先权：

CN202011402979.7，申请日：2020 年 12 月 02 日；

CN202011409947.X，申请日：2020 年 12 月 02 日；

CN202110432060.0，申请日：2021 年 04 月 21 日；

CN202110587056.1，申请日：2021 年 05 月 27 日。

技术领域

本发明涉及一类含内酰胺修饰的多肽类化合物，及其在制备治疗相关疾病的药物中的应用。

背景技术

中国预估有 1.1 亿糖尿病患者，占全世界糖尿病患者的 24%。随着经济发展与生活方式的改变，我国糖尿病患病率增加至 12.8%（部分省市高达 19.9%），并伴有肥胖或心血管疾病（CVD）。最近研究发现，葡萄糖依赖性促胰岛素样肽（GIP）/胰高血糖素样肽-1(GLP-1)双重激动剂可用于糖尿病治疗。

GLP-1 在胰岛中发挥保护胰岛 β 细胞的作用，以葡萄糖依赖的方式刺激胰岛 β 细胞释放胰岛素，有效控制餐后血糖的作用。因其独特的作用机制，低血糖风险大大降低。虽然 GLP-1R 激动剂在临床中展现了优秀的降糖效果，但还是有很多二型糖尿病患者未达到降糖及减重目标。因此，将 GLP-1R 激动剂与其它降糖靶点结合如 GIP 用于二型糖尿病治疗是一个迫切且有前景的需求。GIP 是由小肠的神经内分泌 K 细胞分泌的多肽，由 GIPR 介导其生理作用，主要为非葡萄糖依赖的促胰岛素分泌、增强胰高血糖素分泌、增强脂质代谢等。虽然 GIPR 激动剂的有益作用似乎在 2 型糖尿病患者的高血糖症状中减弱，但研究表明，GIP 减弱的促胰岛素分泌作用可以在血浆葡萄糖水平恢复正常一段时间后完全恢复。这表明共同激动 GLP-1R/GIPR 可发挥协同降血糖作用。GIP 和 GLP-1 双重激动对糖/脂代谢的调节功能具有协同效应，具有更优的降血糖、减体重、缓解肝脏脂肪的治疗效果。

发明内容

本发明提供了下式化合物或其药学上可接受的盐，

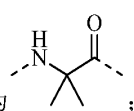
SEQ ID NO1: YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AZ₀K₀ Z₁FZ₂E₀W LZ₃AGG PSSGA PPPS₀

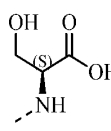
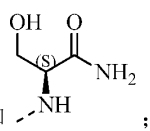
SEQ ID NO2: YAibEGT FTSDY SIAibLD KE₀AQK₀ AFVK¹W LIAGG PSSGA PPPS₀

SEQ ID NO3: YAibEGT FTSDY SIE₀LD KK₀AQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀

SEQ ID NO4: YAibEGT FTSDY SIE₀LD K₀IAQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀

其中，

Aib 的结构为  ;

S_0 选自  和  ;

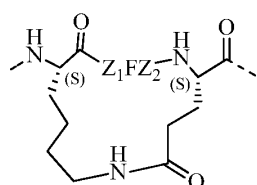
Z_0 选自谷氨酰胺(Q)和天冬酰胺(N);

Z_1 选自丙氨酸(A)和谷氨酸(E);

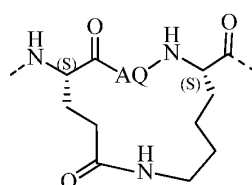
Z_2 选自缬氨酸(V)和异亮氨酸(I);

Z_3 选自异亮氨酸(I)和亮氨酸(L);

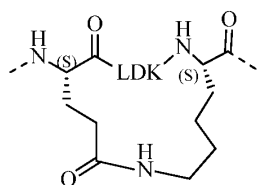
E_0 和 K_0 表示谷氨酸侧链上的羧基与赖氨酸侧链上的氨基共同构成内酰胺, 此时 $K_0Z_1FZ_2E_0$ 的结构为



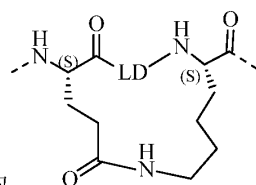
、 E_0AQK_0 的结构为



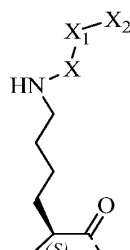
、 E_0LDK_0 的结构为



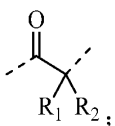
、 E_0LDK_0 的结构为



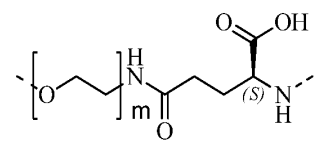
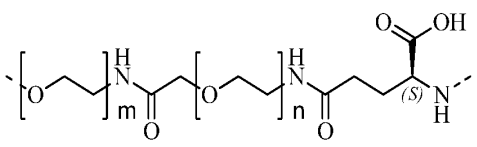
;

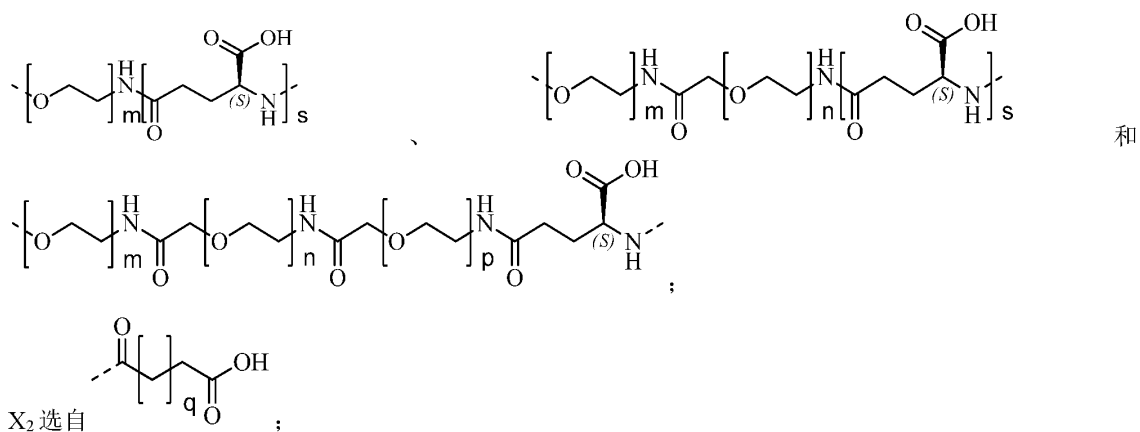


K^1 表示赖氨酸侧链上的氨基与 $-X-X_1-X_2$ 相连, 其结构为 $--NH$  ;

X 选自  ;

R_1 和 R_2 分别独立地选自 H 和 CH_3 ;

X_1 选自  、  、

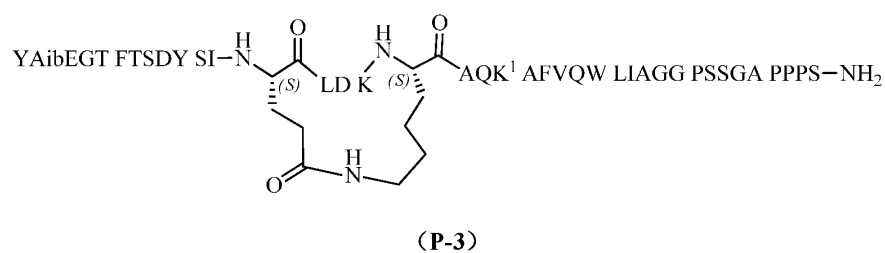
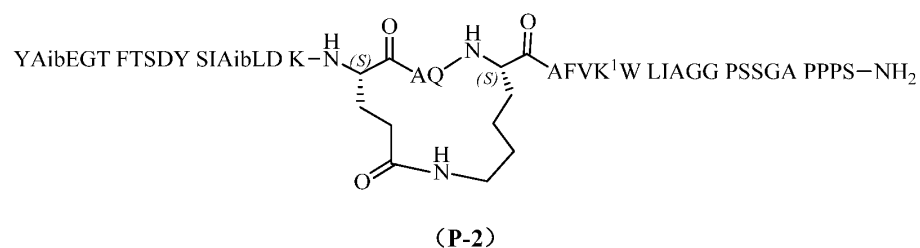
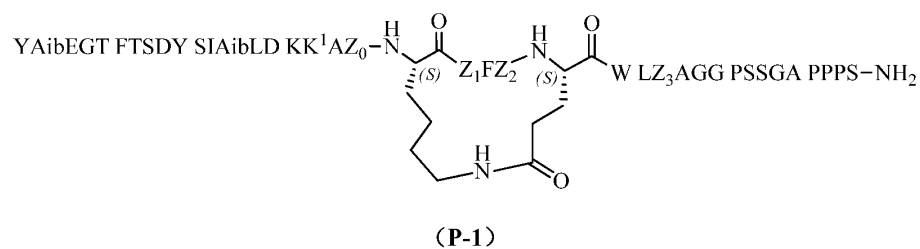


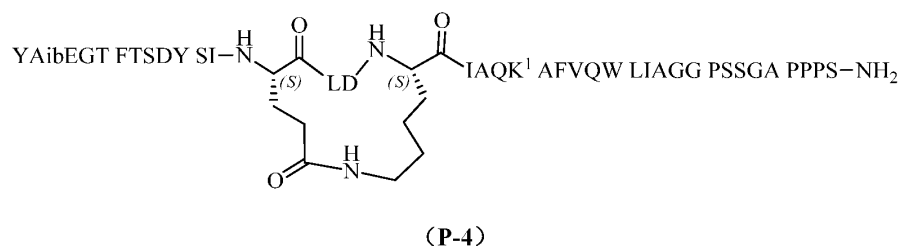
m、n 和 p 分别独立地选自 2 和 3；

s 选自 2 和 3；

q 选自 15、16、17、18 和 19。

在本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自：





其中,

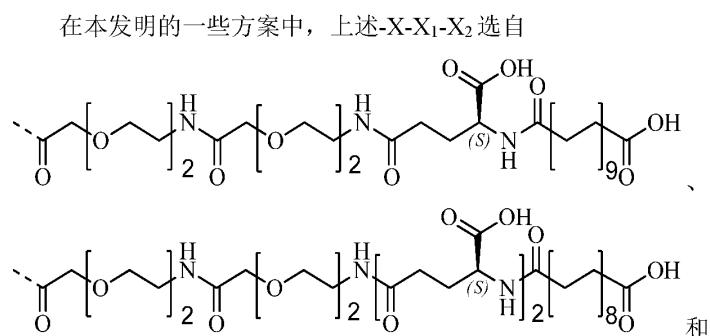
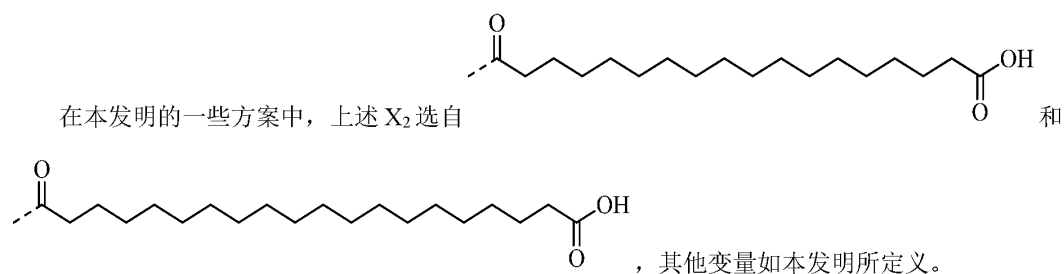
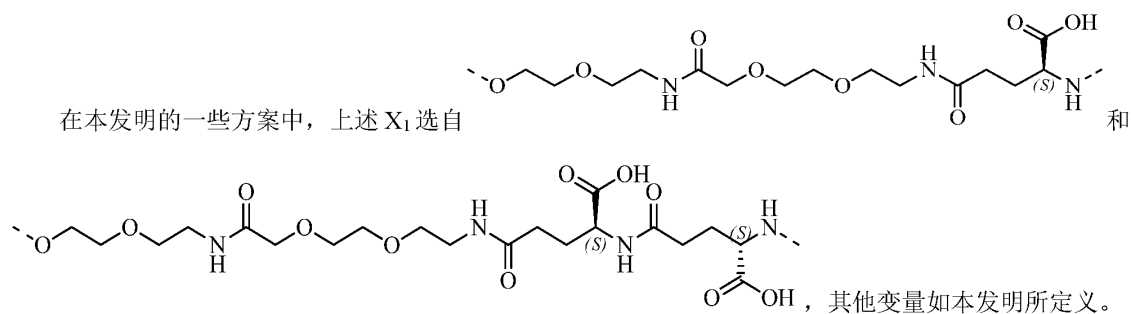
Aib、Z₀、Z₁、Z₂、Z₃和K¹如本发明所定义。

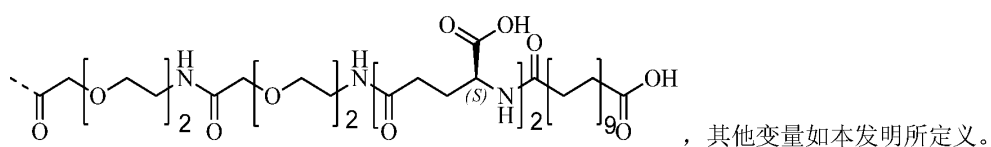
在本发明的一些方案中，上述 X 选自 -C(=O)-CH₂-, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 m 、 n 和 p 分别独立地选自 2，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 s 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 q 选自 15 和 17，其他变量如本发明所定义。





本发明提供了下式化合物或其药学上可接受的盐，

YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ AFVE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀

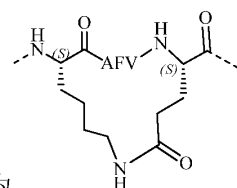
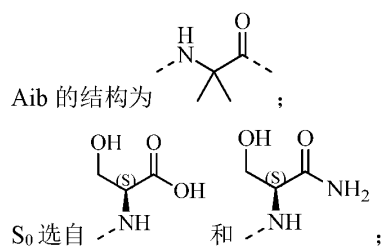
YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹ANK₀ AFVE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀

YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ EFVE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀

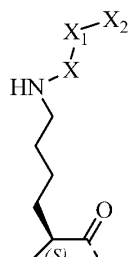
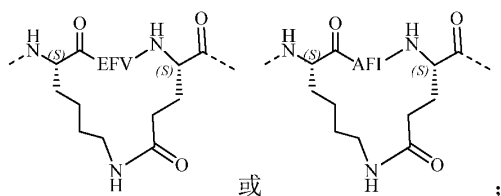
YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ AFIE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀

YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ AFVE₀W LLAGG PSSGA PPPS₀

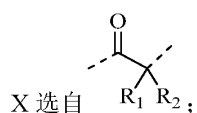
其中，



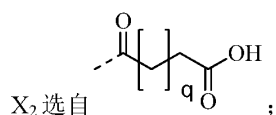
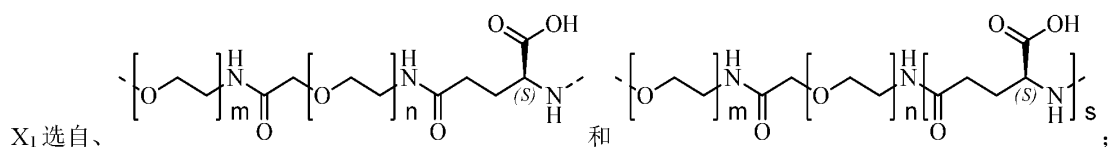
K₀ 和 E₀ 表示赖氨酸侧链上的氨基与谷氨酸侧链上的羧基共同构成内酰胺，其结构为



K¹ 表示赖氨酸侧链上的氨基与-X-X₁-X₂ 相连，其结构为 ；



R₁ 和 R₂ 分别独立地选自 H;



m 和 n 分别独立地选自 2 和 3;

s 选自 2 和 3;

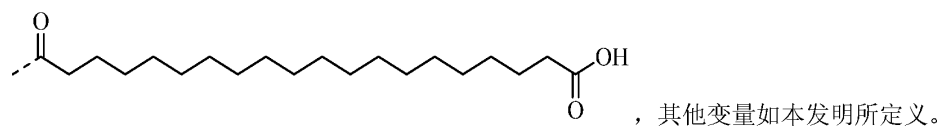
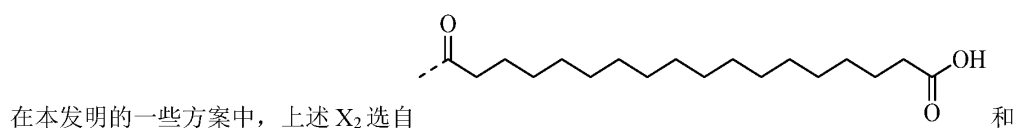
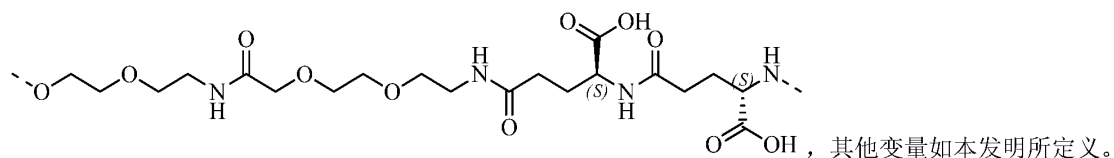
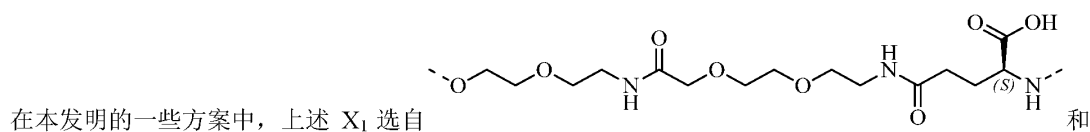
q 选自 15、16、17、18 和 19。

在本发明的一些方案中，上述 X 选自 -C(=O)-CH₂-, 其他变量如本发明所定义。

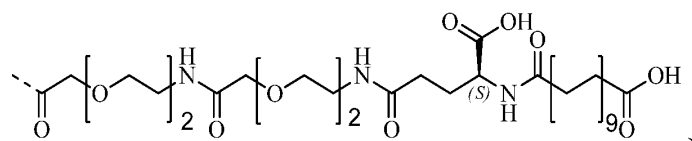
在本发明的一些方案中，上述 m 和 n 分别独立地选自 2，其他变量如本发明所定义。

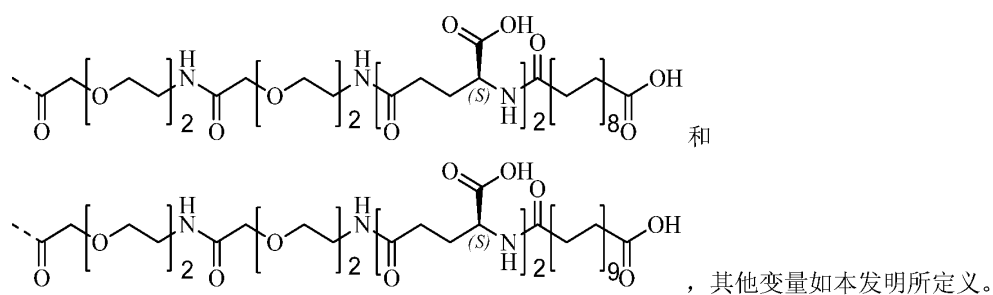
在本发明的一些方案中，上述 s 选自 2，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 q 选自 15 和 17，其他变量如本发明所定义。



在本发明的一些方案中，上述-X-X₁-X₂ 选自

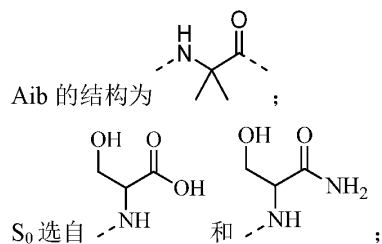




本发明提供了下式化合物或其药学上可接受的盐,



其中,



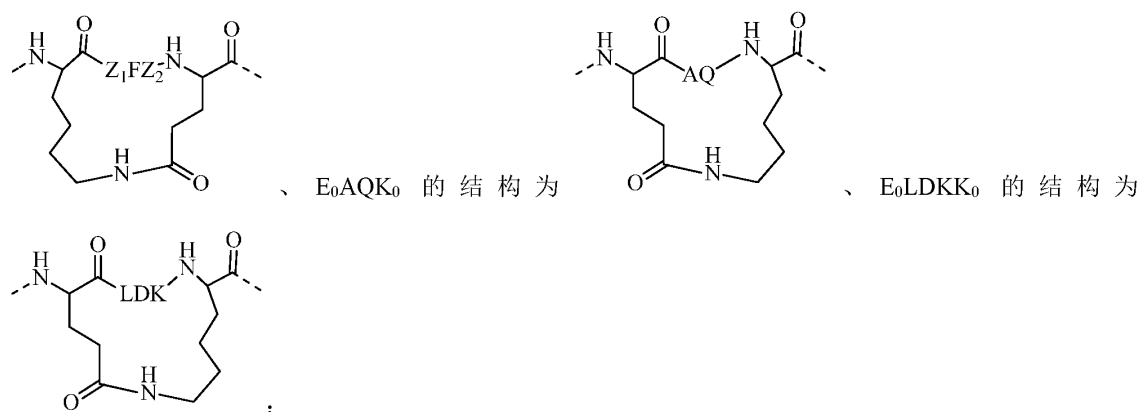
Z₀选自谷氨酰胺(Q)和天冬酰胺(N);

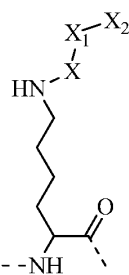
Z₁选自丙氨酸(A)和谷氨酸(E);

Z₂选自缬氨酸(V)和异亮氨酸(I);

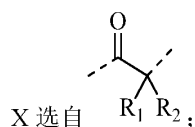
Z₃选自异亮氨酸(I)和亮氨酸(L);

E_0 和 K_0 表示谷氨酸侧链上的羧基与赖氨酸侧链上的氨基共同构成内酰胺, 此时 $K_0Z_1FZ_2E_0$ 的结构为



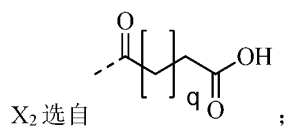
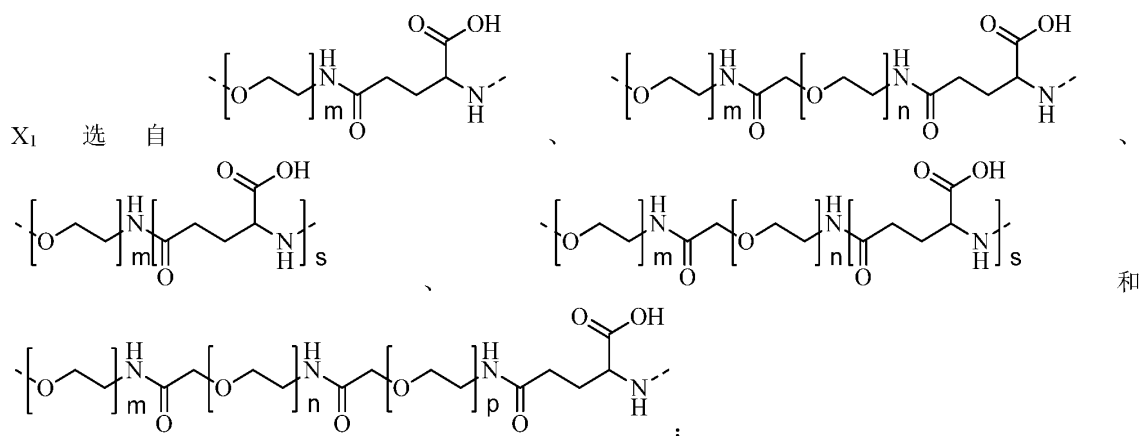


K¹ 表示赖氨酸侧链上的氨基与-X-X₁-X₂ 相连, 其结构为 --NH-- ;



X 选自 R_1R_2 ;

R₁ 和 R₂ 分别独立地选自 H;



X₂ 选自 R_1R_2 ;

m、n 和 p 分别独立地选自 2 和 3;

s 独立地选自 2 和 3;

q 独立地选自 15、16、17、18 和 19。

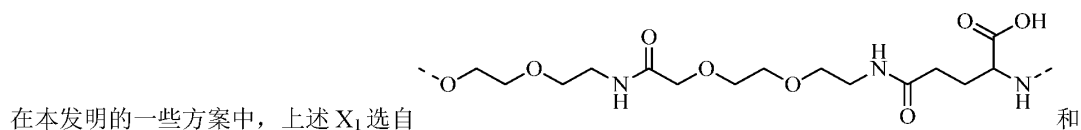
在本发明的一些方案中, 上述 X 选自 $\text{-C(=O)-CH}_2\text{-}$, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 m、n 和 p 分别独立地选自 2, 其他变量如本发明所定义。

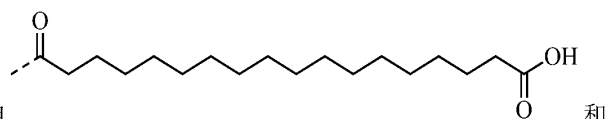
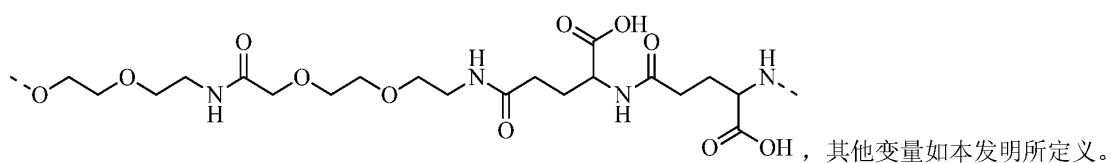
在本发明的一些方案中, 上述 s 独立地选自 2, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 q 独立地选自 15 和 17, 其他变量如本发明所定义。

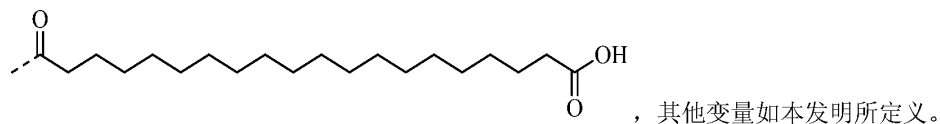
在本发明的一些方案中, 上述 q 独立地选自 17, 其他变量如本发明所定义。



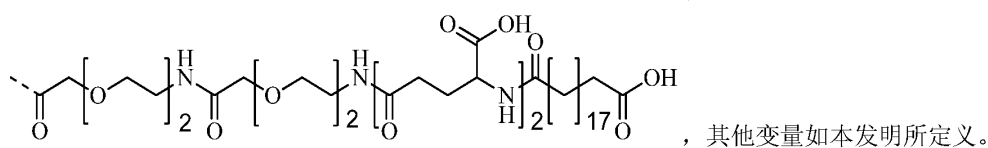
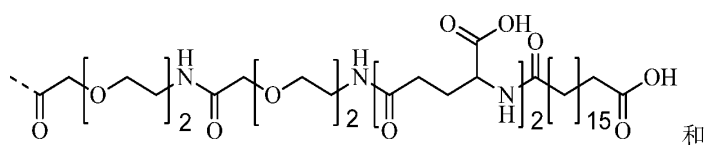
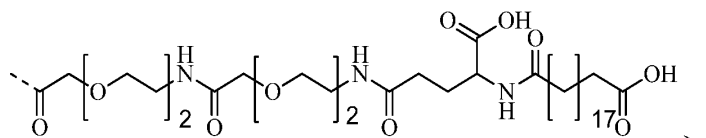
在本发明的一些方案中, 上述 X₁ 选自



在本发明的一些方案中，上述 X₂ 选自



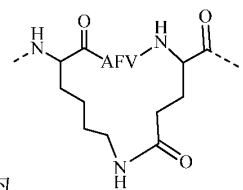
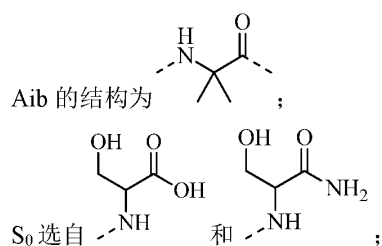
在本发明的一些方案中，上述 -X-X₁-X₂ 选自



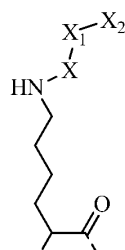
本发明提供了下式化合物或其药学上可接受的盐，



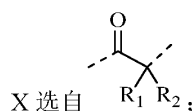
其中，



K₀ 和 E₀ 表示赖氨酸侧链上的氨基与谷氨酸侧链上的羧基共同构成内酰胺，其结构为

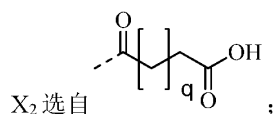
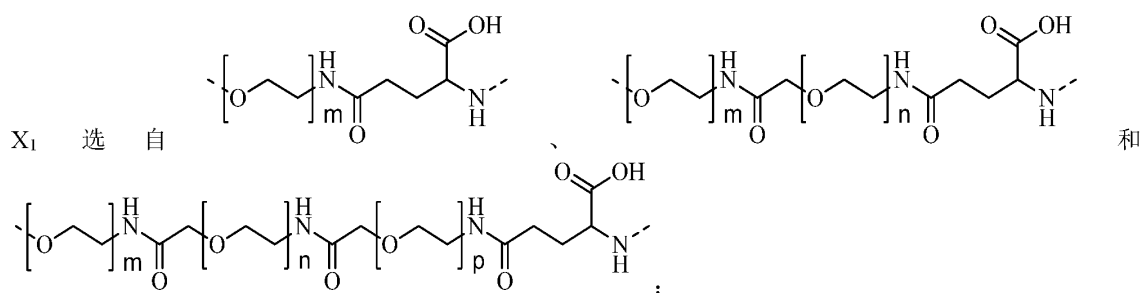


K^1 表示赖氨酸侧链上的氨基与 $-X-X_1-X_2$ 相连, 其结构为 $--NH$;



X 选自

R_1 和 R_2 分别独立地选自 H;



X_2 选自

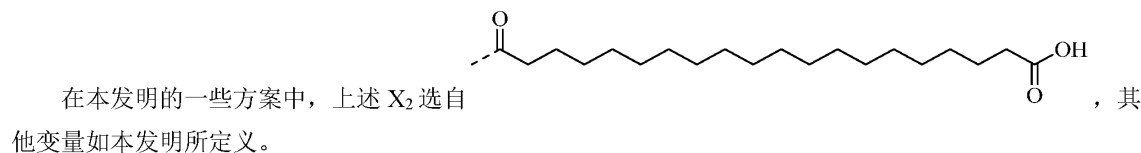
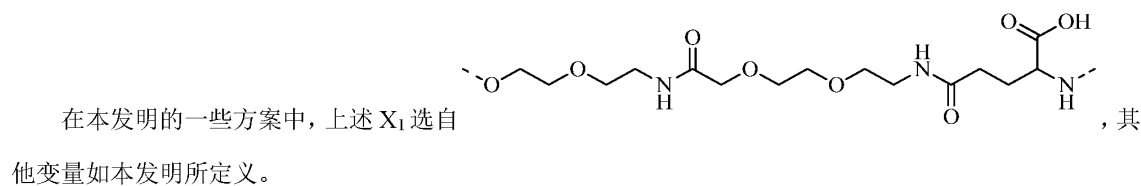
m 、 n 和 p 分别独立地选自 2 和 3;

q 独立地选自 15、16、17、18 和 19。

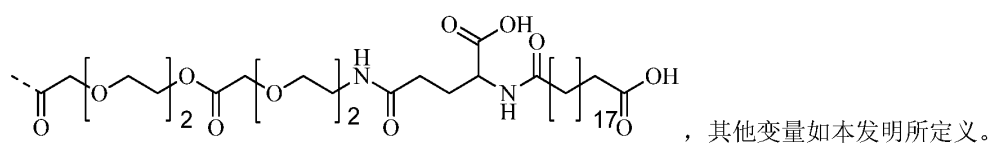
在本发明的一些方案中, 上述 X 选自 $-C(=O)-CH_2-$, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 m 、 n 和 p 分别独立地选自 2, 其他变量如本发明所定义。

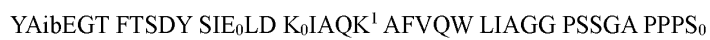
在本发明的一些方案中, 上述 q 独立地选自 17, 其他变量如本发明所定义。



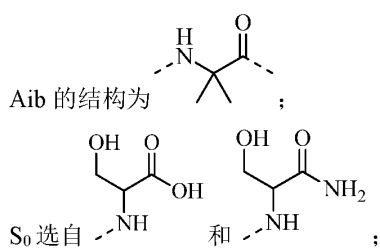
在本发明的一些方案中, 上述 $-X-X_1-X_2$ 选自



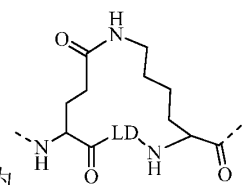
本发明提供了下式化合物或其药学上可接受的盐，

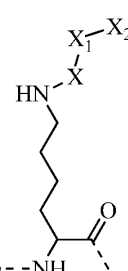


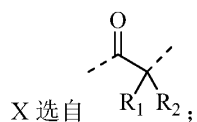
其中，



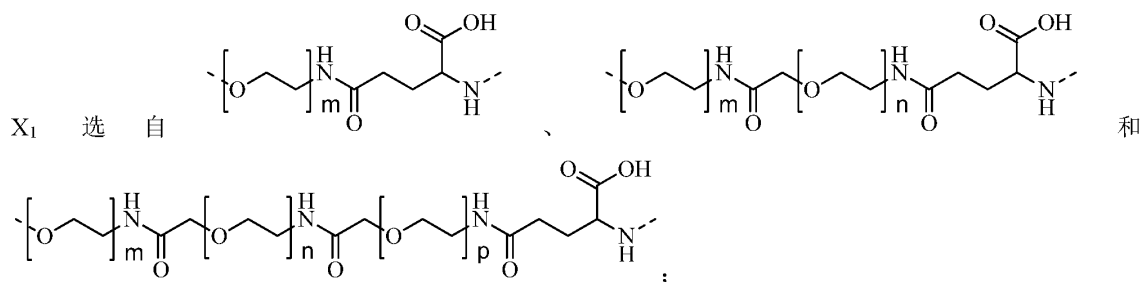
E_0 和 K_0 表示谷氨酸侧链上的羧基与赖氨酸侧链上的氨基共同构成内酰胺，其结构为

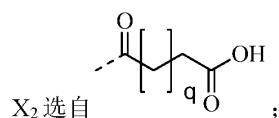


K^1 表示赖氨酸侧链上的氨基与 $\text{-X-X}_1\text{-X}_2$ 相连，其结构为 ---NH  ；



R_1 和 R_2 分别独立地选自 H；





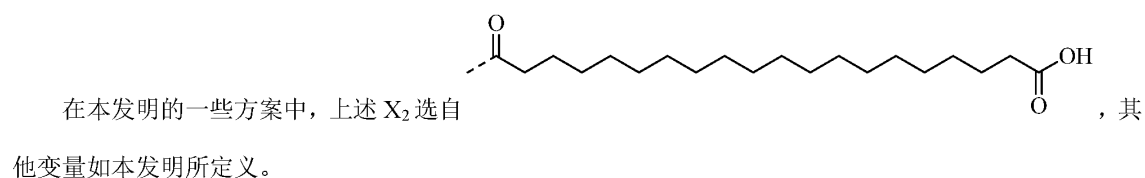
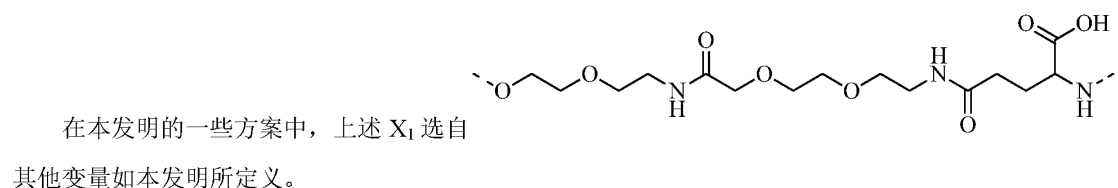
m、n 和 p 分别独立地选自 2 和 3；

q 独立地选自 15、16、17、18 和 19。

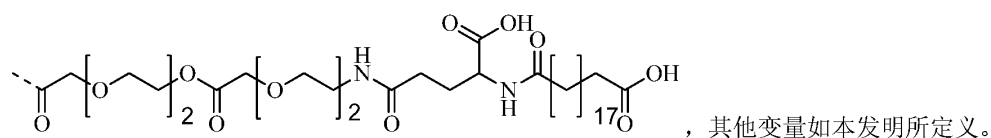
在本发明的一些方案中，上述 X 选自 -C(=O)-CH₂-, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 m、n 和 p 分别独立地选自 2，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 q 独立地选自 17，其他变量如本发明所定义。

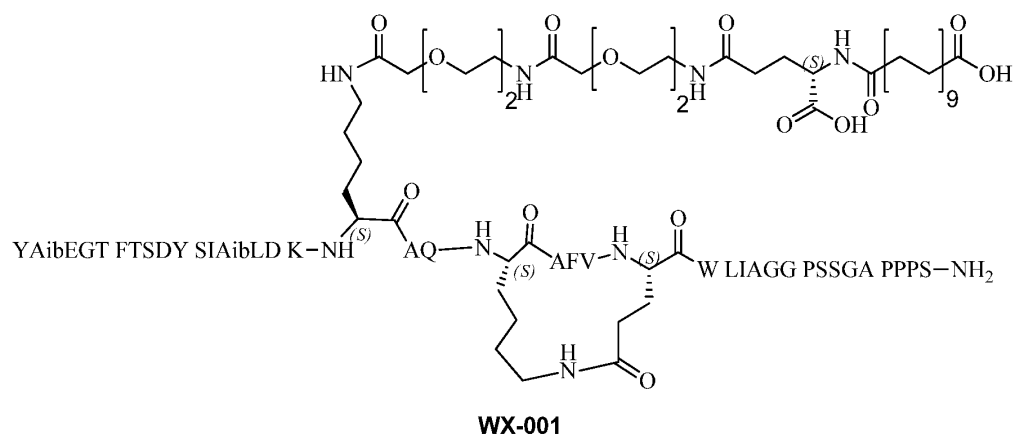


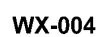
在本发明的一些方案中，上述 -X-X₁-X₂ 选自

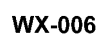
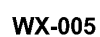


本发明还有一些方案由上述变量任意组合而来。

本发明还提供了下式所示化合物或其药学上可接受的盐，

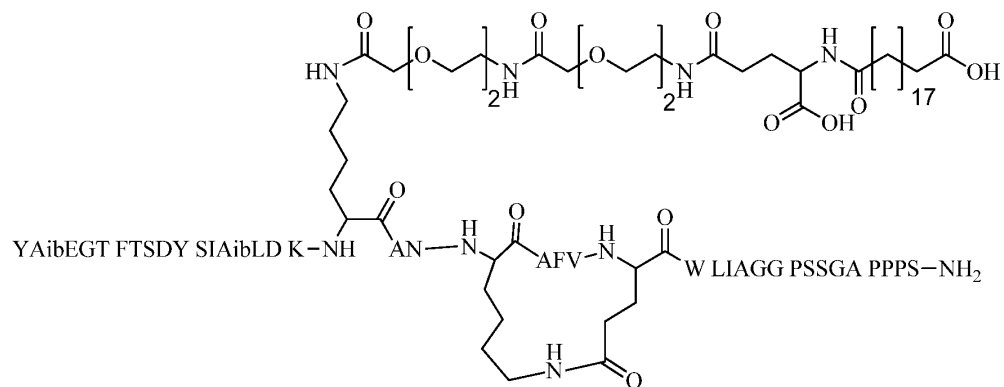
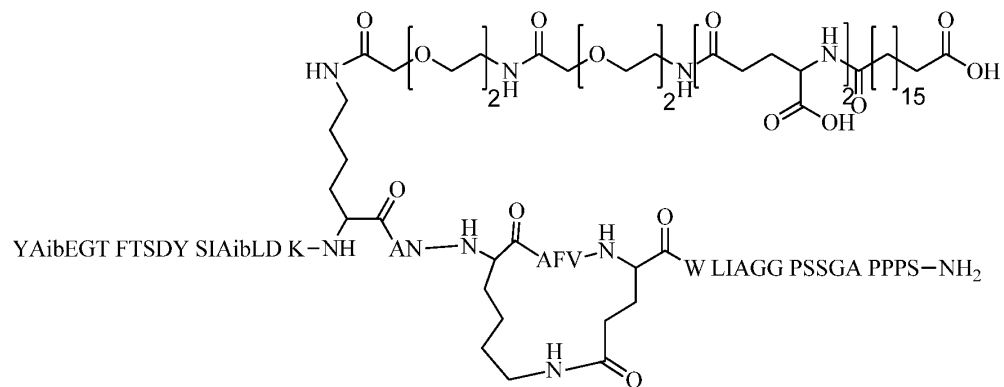
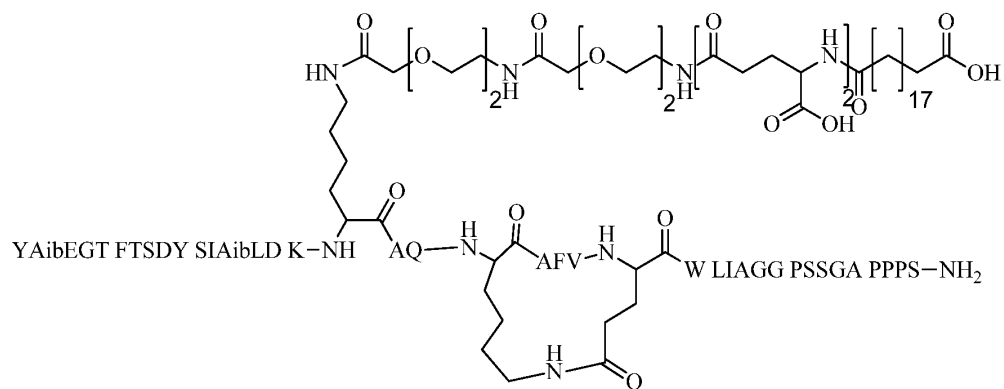
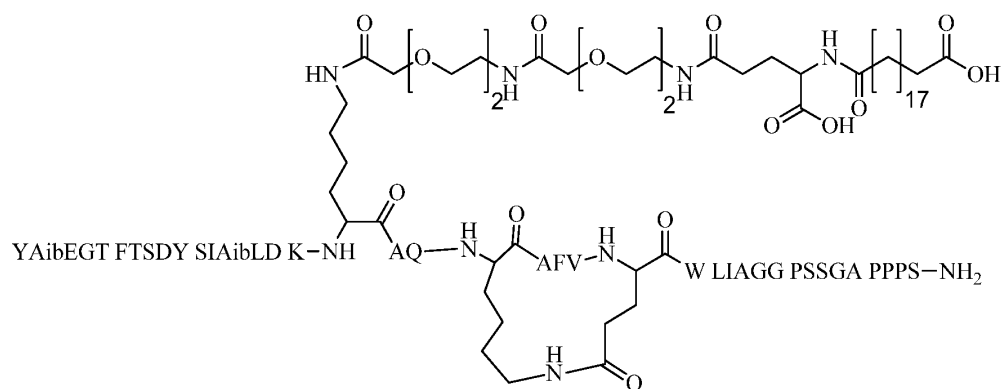


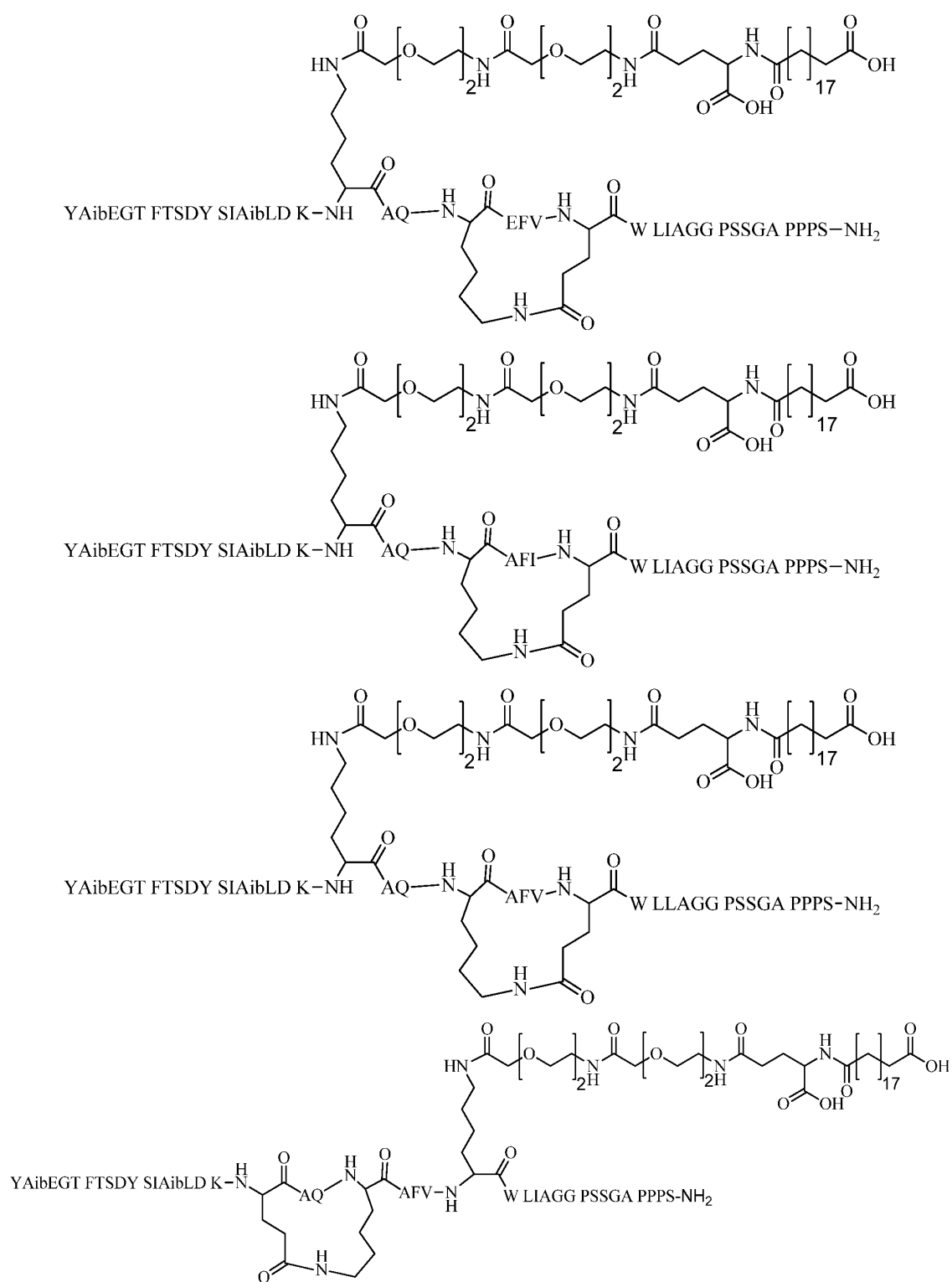


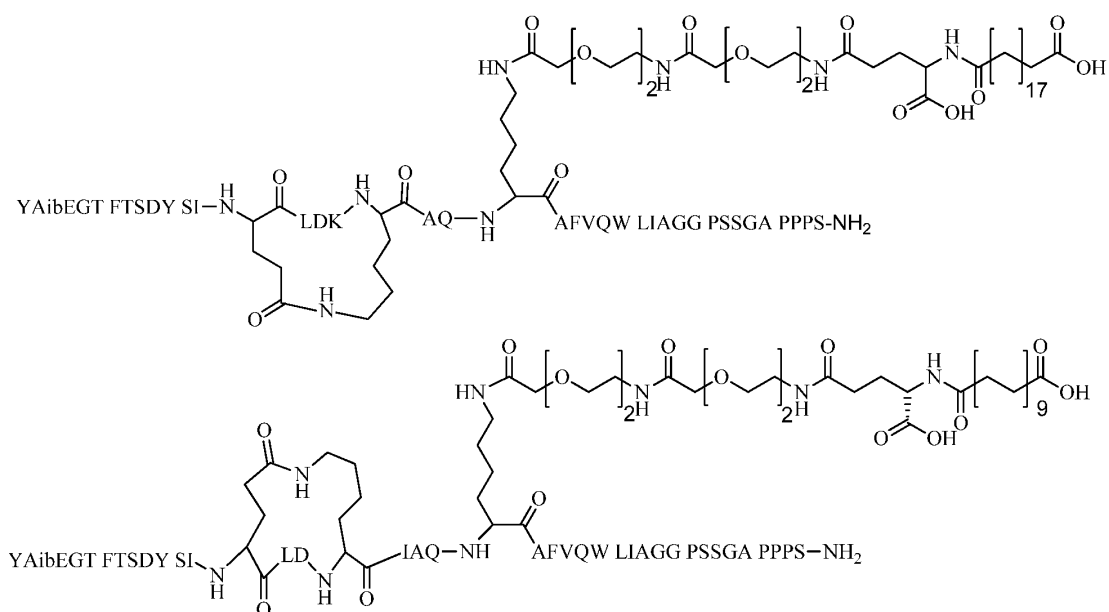




15







本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗肥胖症及糖尿病的药物上的应用。

本发明还提供了下述测试方法：

实验例：hERG 钾离子通道的抑制试验

A. 主要材料

CHO-hERG 细胞系（稳定表达hERG 通道的中国仓鼠卵巢细胞），中国科学院上海药物研究所内部构建；膜片钳放大器Axopatch 200B, 泰瑟国际公司；

B. 方法

a) 细胞培养

稳定表达 hERG 的 CHO 细胞培养于直径 35 mm 的细胞培养皿中，置于 37°C，5% CO₂ 的培养箱培养，每 48 小时按 1:5 比例进行传代，培养基配方：90% F12（Invitrogen），10% 胎牛血清（Gibco），100 µg/mL G418（Invitrogen）和 100 µg/mL Hygromycin B（Invitrogen）。试验当天，吸走细胞培养液，用细胞外液淋洗一遍后加入 0.25% Trypsin-EDTA（Invitrogen）溶液，在室温下消化 3~5 分钟。吸走消化液，用细胞外液重悬后将细胞转移到用于电生理记录的实验皿中备用。

b) 细胞内外液的配制

细胞外液需每个月配制一次。细胞内液须分装冻存在 -20°C。

细胞外液(mM)：145 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 Glucose和10 HEPES，用NaOH调节pH至7.4，渗透压 295mOsm。

细胞内液(mM)：120 KCl, 31.25 KOH, 5.374 CaCl₂, 1.75 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 10 HEPES和10 EGTA，用KOH

调节pH至7.2, 渗透压 285mOsm。

c) 化合物准备

化合物用DMSO 溶解成20 mM母液, 测试当天, 将化合物母液用DMSO进行3倍连续稀释, 即取10 μ L 的化合物母液加入到20 μ L DMSO 中, 依次得到6 个经DMSO 连续稀释的化合物中间浓度, 依次分别为20、6.66、2.22、0.74、0.24 和0.082 mM。然后再取10 μ L 的化合物中间浓度加入到4990 μ L 细胞外液中, 500 倍稀释得到需要测试的最终浓度, 最高测试浓度为40 μ M, 依次分别为40、13.3、4.44、1.48、0.49 和0.16 μ M。最终测试浓度中DMSO 的含量不超过0.2%, 此浓度的DMSO 对hERG 钾通道没有影响。

d) 电生理记录过程

稳定表达hERG 钾通道的CHO (Chinese Hamster Ovary) 细胞, 在室温下用全细胞膜片钳技术记录hERG 钾通道电流。玻璃微电极由玻璃电极毛胚 (BF150-86-10, Sutter) 经拉制仪拉制而成, 灌注电极内液后的尖端电阻为2-5 M Ω 左右, 将玻璃微电极插入放大器探头即可连接至Axopatch 200B (Molecular Devices) 膜片钳放大器。钳制电压和数据记录由pClamp 10 软件通过电脑控制和记录, 采样频率为10 kHz, 滤波频率为2 kHz。在得到全细胞记录后, 细胞钳制在-80 mV, 诱发hERG 钾电流 (I_{hERG}) 的步阶电压从 -80 mV 给予一个2 s 的去极化电压到 +20 mV, 再复极化到 -50 mV, 持续1 s 后回到 -80 mV。每10 s 给予此电压刺激, 确定hERG 钾电流稳定后 (1 分钟) 开始给药过程。化合物浓度从低测试浓度开始连续给药, 每个测试浓度至少给予1 分钟。化合物每个浓度至少测试3 个细胞 ($n \geq 3$), 阳性化合物每个浓度至少测试2 个细胞 ($n \geq 2$)。

e) 数据分析

在每一个完整电流记录中, 基于峰值电流在阴性对照中所占的百分比, 可以计算出每一化合物作用浓度的抑制百分比。利用标准希式方程拟合得到量效关系曲线, 具体方程如下:

$$I_{(C)} = I_b + (I_h - I_b) * c^n / (IC_{50}^n + c^n)$$

c为化合物测试浓度, n 为斜率

曲线拟合和抑制率计算均由Qpatch 分析软件分析完成, 若最低浓度下抑制率超过半数抑制或最高浓度下抑制率未达到半数抑制, 则该化合物相应的IC₅₀低于最低浓度或IC₅₀值大于最高浓度。

C. 测试结果和结论

本发明化合物无hERG相关风险。

实验例: 细胞色素P450同工酶抑制性

A. 实验目的

测定受试化合物对人肝微粒体细胞色素 P450 同工酶(CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4)活性的抑制作用。

B. 实验操作

首先将受试化合物(10mM)进行梯度稀释,制备工作液(100×最终浓度),工作液浓度分别为:5,1.5,0.5,0.15,0.05,0.015,0.005mM,同时准备P450同工酶(CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A4)各阳性抑制剂及其特异性底物混合物的工作液;将冷冻于-80℃冰箱的人肝微粒体置于冰上解冻,待人肝微粒体全部溶解,用PBS(磷酸缓冲液)进行稀释,制备一定浓度工作液(0.253mg/ml);并将20μL底物混合液加至反应板中(Blank孔中加入20μL PB)同时将158μL人肝微粒体工作液加入反应板中,将反应板置于冰上,待用;此时将2μL各个浓度的受试化合物(N=1)及阳性抑制剂(N=2)加入对应孔中,无抑制剂(受试化合物或阳性抑制剂)组加入对应的有机溶剂,作为对照组样品;在37℃水浴预孵育10min后,将20μL NADPH溶液加入反应板中,置于37℃水浴孵育10min;加入400μL冷的乙腈溶液终止反应;将反应板置于摇床,振荡10min;4,000rpm离心20min;取200μL上清加至100μL水中,进行样品稀释;最后封板,振荡,摇匀,进行LC/MS/MS检测。

C. 实验结果和结论

本发明化合物无相关CYP抑制风险。

技术效果

本发明化合物对 GLP-1R/GIPR 具有很强的激动活性;本发明化合物具有优异的药代动力学性质;本发明化合物具有优异的血浆稳定性;本发明化合物具有极高的血浆蛋白结合度;本发明化合物具有优异的体内药效。

定义和说明

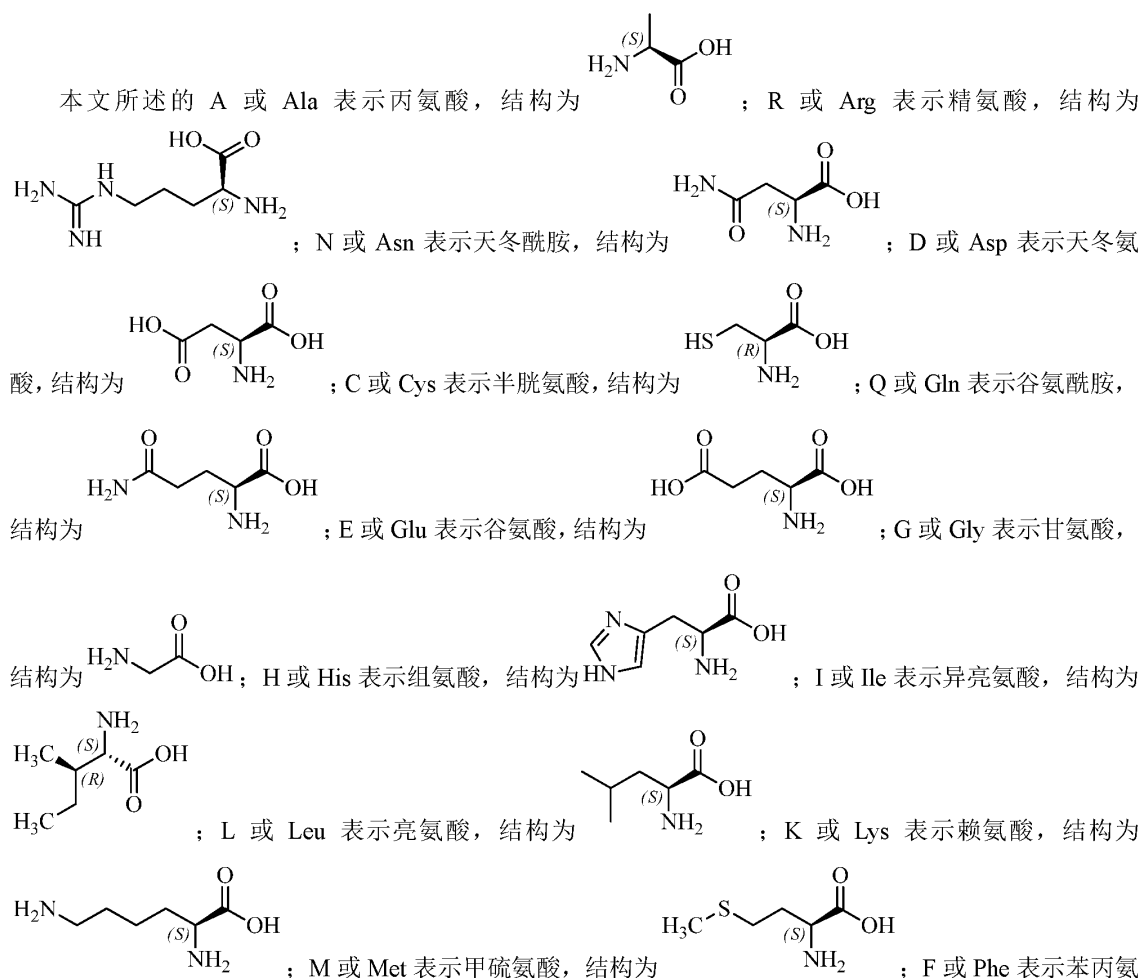
除非另有说明,本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的,而应该按照普通的含义去理解。当本文中出現商品名时,意在指代其对应的商品或其活性成分。

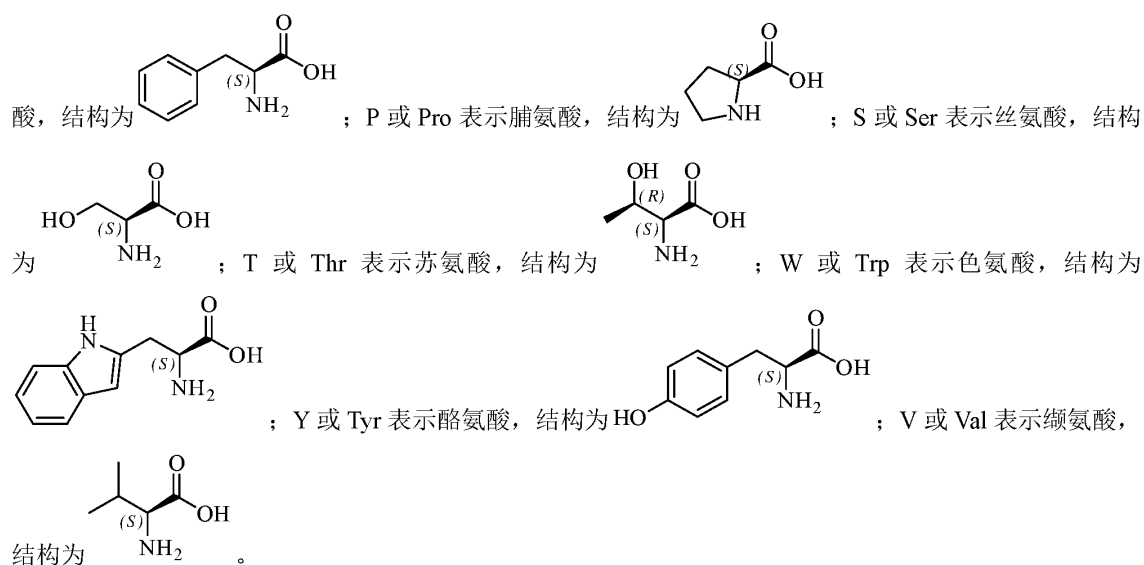
这里所采用的术语“药学上可接受的”,是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言,它们在可靠的医学判断的范围之内,适用于与人类和动物的组织接触使用,而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

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。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、

有机胺或镁盐或类似的盐。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。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐，所述无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸，碳酸氢根，磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等；以及有机酸盐，所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸和甲磺酸等类似的酸；还包括氨基酸（如精氨酸等）的盐，以及如葡萄糖醛酸等有机酸的盐。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。





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。

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。

除非另有规定，本发明化合物中“S-NH₂”用于表示丝氨酸上的羧基替换为酰胺。

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。

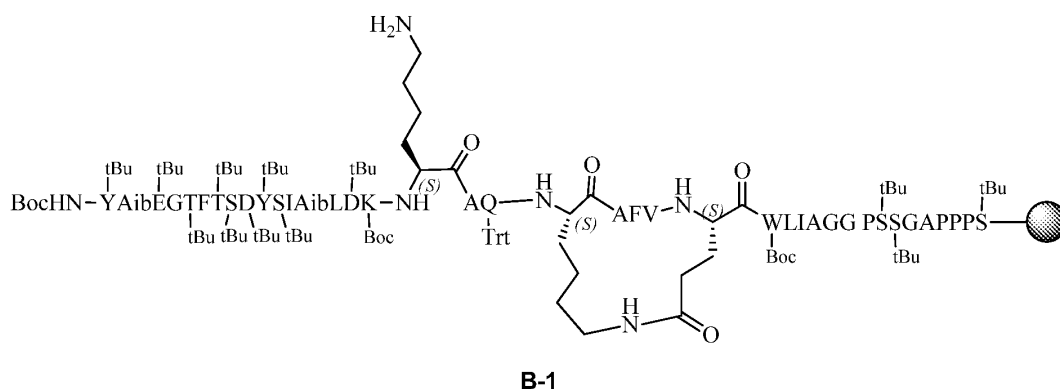
本发明所使用的溶剂可经市售获得。

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胺保护基团；rt.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。

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行将是显而易见的。

中间体 B-1



步骤 1: 称取 1.1 g 4-(2',4'-二甲氧基苯基-苄氧羰基-氨甲基)-苯氧基乙酰氨基-甲基二苯胺树脂(替代度 Sub=0.28 mmol/g) 加入到反应柱中，再加入 DMF(50 mL)至反应柱氮气鼓气体 2 小时，排废，直至没有液体流出，加入 DMF(50 mL) 洗涤 5 次每次 1 分钟，排废，直至没有液体流出。

步骤 2: 加入 20%的哌啶/DMF(50 mL)至反应柱中，氮气鼓起 20 分钟，排废，直至没有液体流出。加入 DMF(50 mL)洗涤 5 次每次 1 分钟，排废，直至没有液体流出。茚三酮检测，树脂蓝色。

步骤 3: 氨基酸的偶联

3.1 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的偶联

1. 称取 Fmoc-Ser(tBu)-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中，加入 DIEA(6.00 eq)补加 10 mL DMF 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 0.5h，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 1min，排废，直至没有液体流出。

3.2 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 20min, 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-Pro-OH(3.0 eq)加入到上述树脂中, 加入 DIEA(6.00 eq)补加 10 mL DMF 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 0.5h, 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 1min, 排废, 直至没有液体流出。

重复 3.2 步骤, 完成以下氨基酸的偶联

序号	原料	偶联试剂
3.3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.13	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
3.17	Fmoc-Val-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.19	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HOBT (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
3.21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.23	Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

3.24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.27	Fmoc-Aib-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
3.29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
3.37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
3.38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3.39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

3.40 脱 Alloc 和 OAll

1. 加入 PhSiH₃(20.0 eq) 和 DCM(10 mL) 至反应柱中, 氮气鼓起后加入 Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq), 氮气鼓起 20min, 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 1min, 排废, 直至没有液体流出。

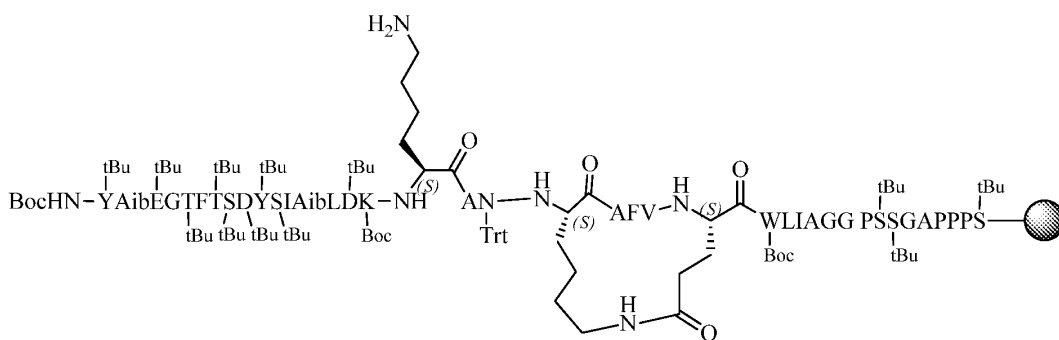
3.41 酰胺关环

1. 加入 DIEA(3.00 eq)补加 10 mL DMF 至反应柱中, 鼓氮气, 待溶解后加入 HATU(1.5 eq)。调节好氮气使树脂均匀鼓起。
2. 在 25°C 的环境中反应 0.5h, 茚三酮检测, 树脂无色透明。
3. 用 DMF 洗涤 5 次(50 mL 每次), 每次 1min, 排废, 直至没有液体流出。

3.42 脱 Ddc

1. 加入 3%的水合肼/DMF(50 mL)至反应柱中, 氮气鼓起 15min, 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, 得到中间体 **B-1**。茚三酮检测, 树脂蓝色。

中间体 B-2

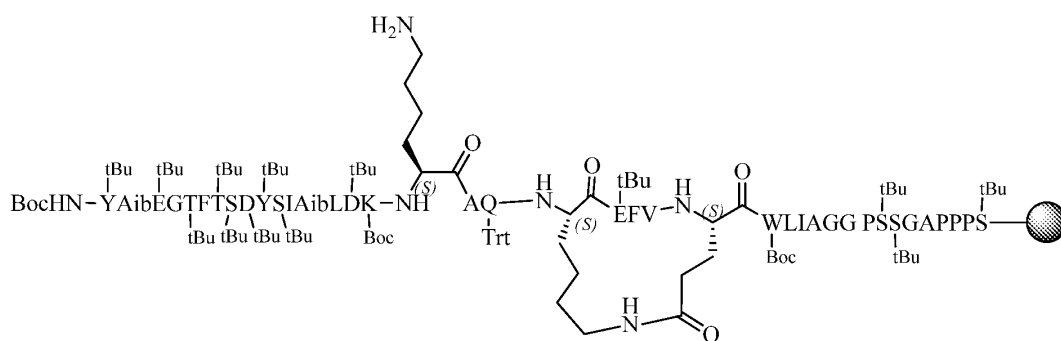
**B-2**

参考 **B-1** 的合成方式，完成以下氨基酸的偶联，脱 Alloc 和 OAll，酰胺关环及脱 Dde 保护等操作得到 **B-2**。

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
13	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
17	Fmoc-Val-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
19	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HOBT (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
21	Fmoc-Asn(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
27	Fmoc-Aib-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

中间体 B-3

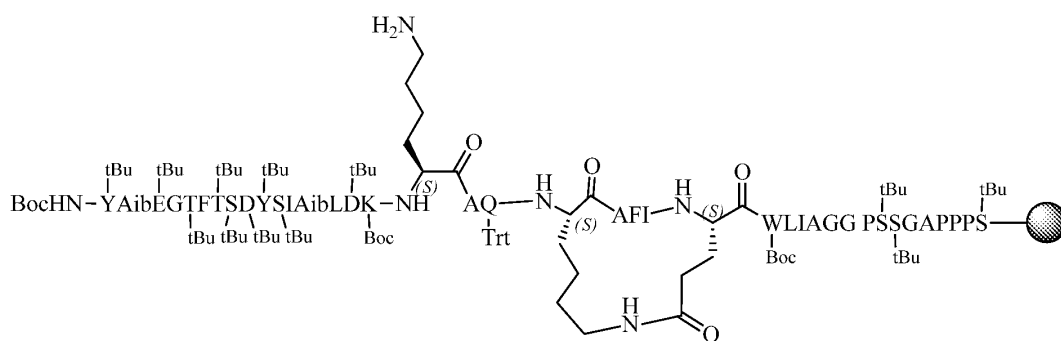
**B-3**

参考 **B-1** 的合成方式，完成以下氨基酸的偶联，脱 Alloc 和 OAll，酰胺关环及脱 Dde 保护等操作得到 **B-3**。

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
13	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
17	Fmoc-Val-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
19	Fmoc-Glu(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HOBt (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
27	Fmoc-Aib-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBt (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

中间体 B-4



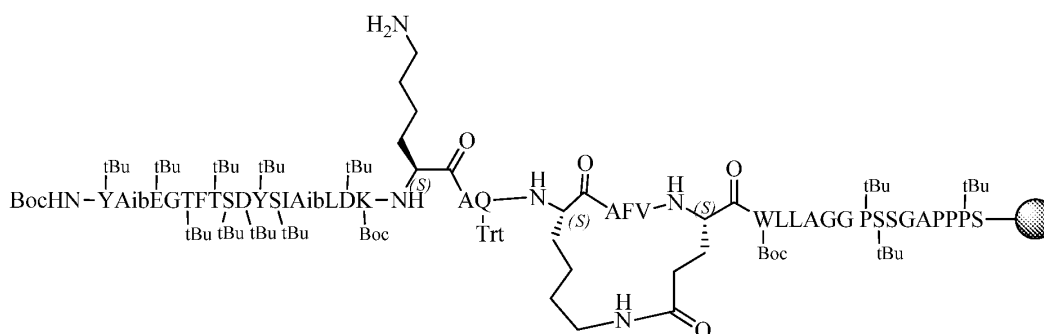
B-4

参考 **B-1** 的合成方式，完成以下氨基酸的偶联，脱 Alloc 和 OAll，酰胺关环及脱 Dde 保护等操作得到 **B-4**。

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
13	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
17	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
19	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HOBT (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
27	Fmoc-Aib-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

中间体 B-5



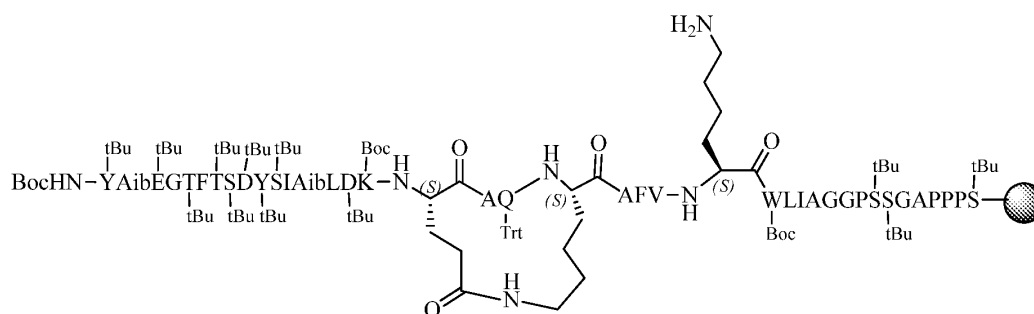
B-5

参考 B-1 的合成方式, 完成以下氨基酸的偶联, 脱 Alloc 和 OAll, 酰胺关环及脱 Dde 保护等操作得到 B-5.

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
13	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
17	Fmoc-Val-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
19	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HOBT (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)

27	Fmoc-Aib-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

中间体 B-6



B-6

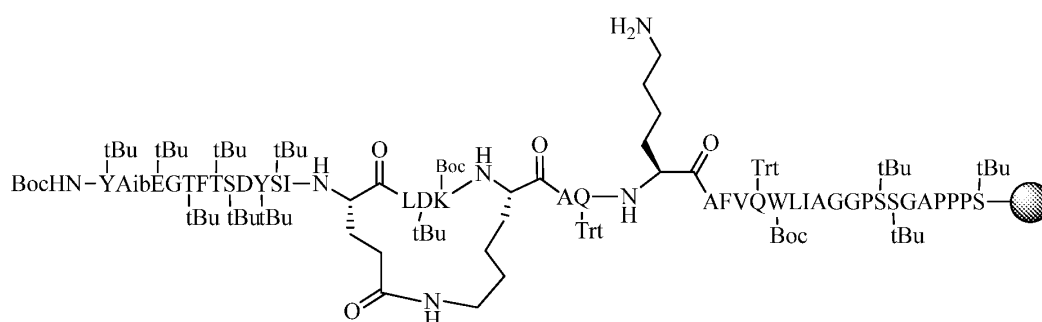
参考 B-1 的合成方式，完成以下氨基酸的偶联，脱 Alloc 和 OAll，酰胺关环及脱 Dde 保护等操作得到 B-6.

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
13	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
16	Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
17	Fmoc-Val-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
19	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HOBT (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
23	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
27	Fmoc-Aib-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)

34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

中间体 B-7



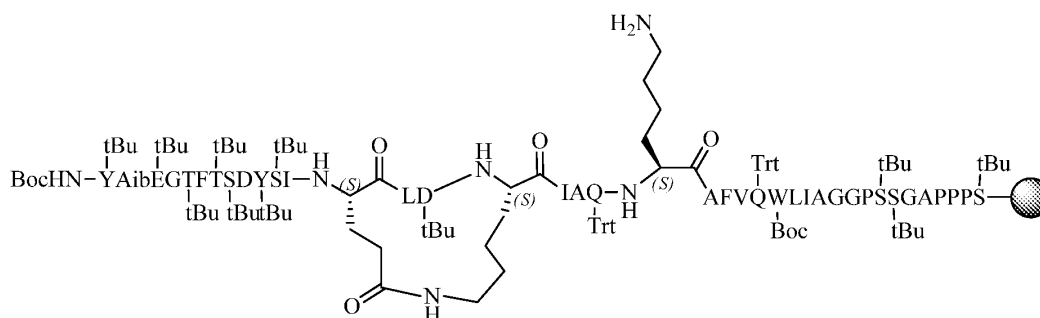
B-7

参考 B-1 的合成方式，完成以下氨基酸的偶联，脱 Alloc 和 OAll，酰胺关环及脱 Dde 保护等操作得到 B-7.

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

13	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
16	Fmoc-Gln(Trt)-OH (2.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
17	Fmoc-Val-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
19	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
20	Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.00 eq)	HOBT (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
23	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
27	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

中间体 B-8



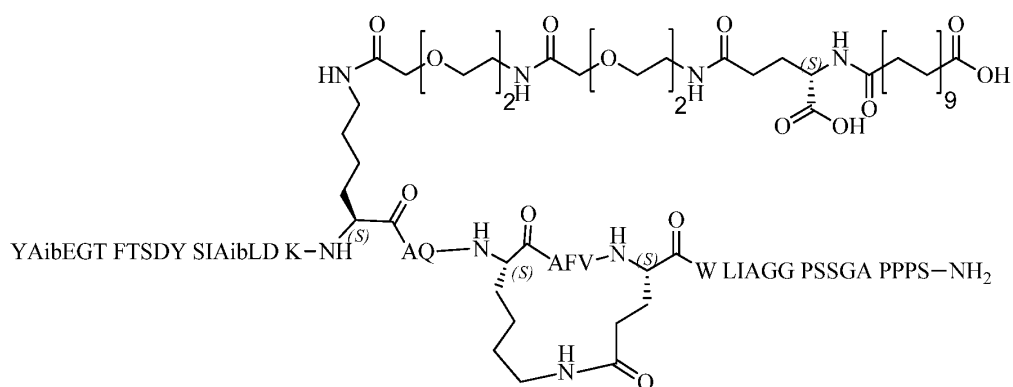
B-7

参考 **B-1** 的合成方式，完成以下氨基酸的偶联，脱 Alloc 和 OAll，酰胺关环及脱 Dde 保护等操作得到 **B-8**。

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
6	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
9	Fmoc-Pro-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
10	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
11	Fmoc-Gly-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
12	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
13	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
14	Fmoc-Leu-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
16	Fmoc-Gln(Trt)-OH (2.00 eq)	HBTU (1.90 eq) and DIEA (4.00 eq)
17	Fmoc-Val-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
18	Fmoc-Phe-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

19	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
20	Fmoc-Lys(Dde)-OH(3.00 eq)	HOBT (2.00 eq) and DIC (2.00 eq)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
22	Fmoc-Ala-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
23	Fmoc-Ile-OH (3.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
24	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2.00 eq)	HBTU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
26	Fmoc-Leu-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
27	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
28	Fmoc-Ile-OH (6.00 eq)	HOAT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
34	Fmoc-Phe-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
36	Fmoc-Gly-OH (6.00 eq)	HATU (5.70 eq) and DIEA (12.0 eq)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6.00 eq)	HOBT (6.00 eq) and DIC (6.00 eq)
38	Fmoc-Aib-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

实施例 1



WX-001

1. 长链脂肪酸的偶联：参考 B-1 合成步骤 3.2 完成以下片段的偶联：

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-AEEA-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-AEEA-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Glu-OtBu (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	20-(tBu)-二十烷二酸 (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

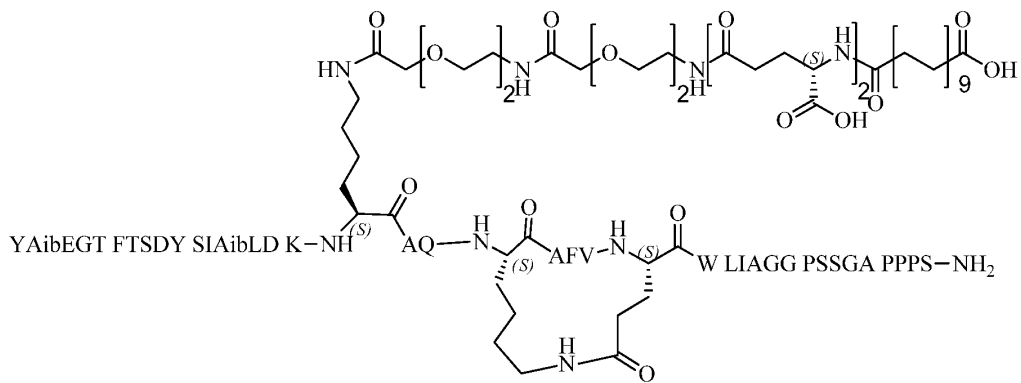
2. 切割及粗肽干燥

2.1. 按如下体积配置切割液

试剂	比例
三氟乙酸	91
三异丙基硅烷	3
H₂O	3
3-巯基丙酸	3

将干燥后的肽树脂加入到配好的切割液中，在摇床震荡 2.5h，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 3 次。在真空干燥 2h 得到粗肽，纯化得到多肽化合物 **WX-001**，多肽分子量经 ESI-MS 进行确认，计算值为 4811.4，检测值为 4812.0。

实施例 2



WX-002

1. 长链脂肪酸的偶联：参考 B-1 合成步骤 3.2 完成以下片段的偶联：

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-AEEA-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-AEEA-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Glu-OtBu (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Glu-OtBu (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	20-(tBu)-二十烷二酸 (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

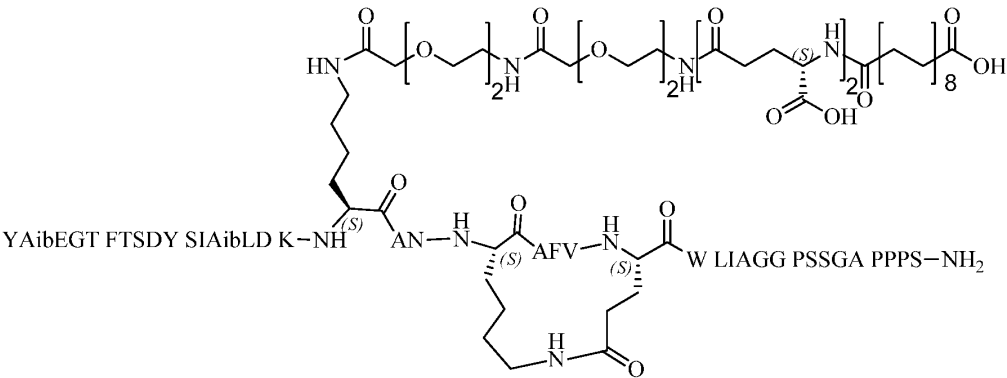
2. 切割及粗肽干燥

2.1. 按如下体积配置切割液

试剂	比例
三氟乙酸	91
三异丙基硅烷	3
H ₂ O	3
3-巯基丙酸	3

将干燥后的肽树脂加入到配好的切割液中，在摇床震荡 2.5h，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 3 次。在真空干燥 2h 得到粗肽，纯化得到多肽化合物 **WX-002**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认，计算值为 4940.5，检测值为 4940.6。

实施例 3



WX-003

1. 长链脂肪酸的偶联：参考 B-1 合成步骤 3.2 完成以下片段的偶联：

序号	原料	偶联试剂
1	Fmoc-AEEA-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
2	Fmoc-AEEA-OH (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
3	Fmoc-Glu-OtBu (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
4	Fmoc-Glu-OtBu (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)
5	20-(tBu)-十八烷二酸 (3.00 eq)	HATU (2.85 eq) and DIEA (6.00 eq)

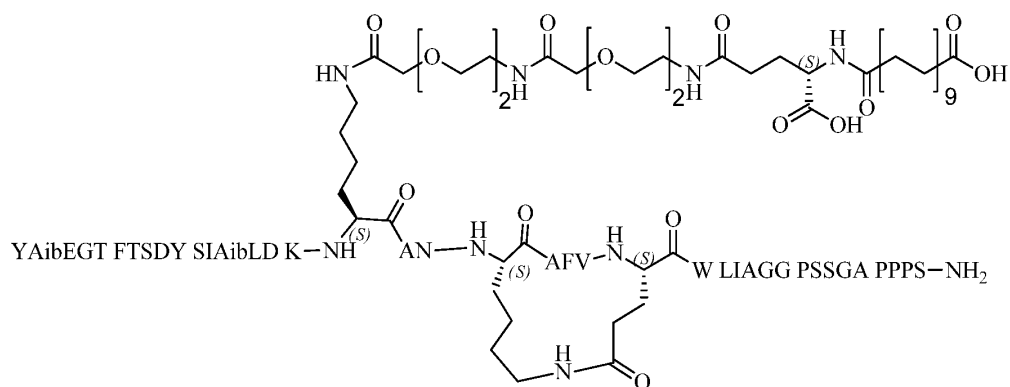
2. 切割及粗肽干燥

2.1. 按如下体积配置切割液

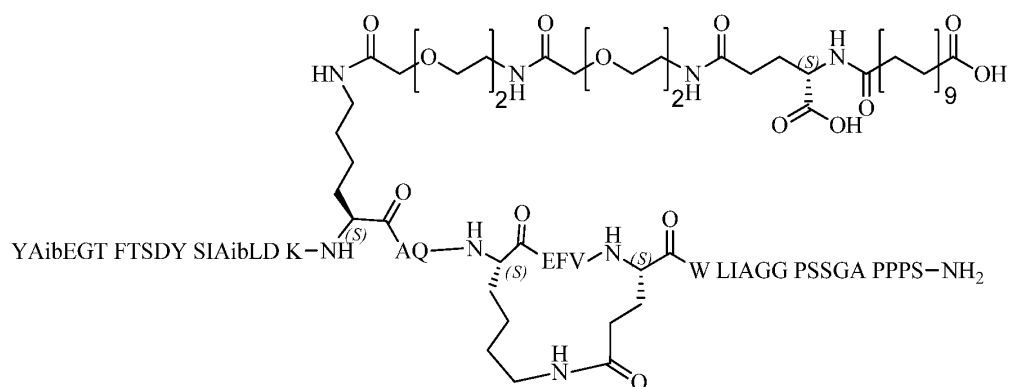
试剂	比例
三氟乙酸	91
三异丙基硅烷	3
H ₂ O	3
3-巯基丙酸	3

将干燥后的肽树脂加入到配好的切割液中，在摇床震荡 2.5h，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 3 次。在真空干燥 2h 得到粗肽，纯化得到多肽化合物 **WX-003**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认，计算值为 4912.5，检测值为 4913.1。

实施例 4

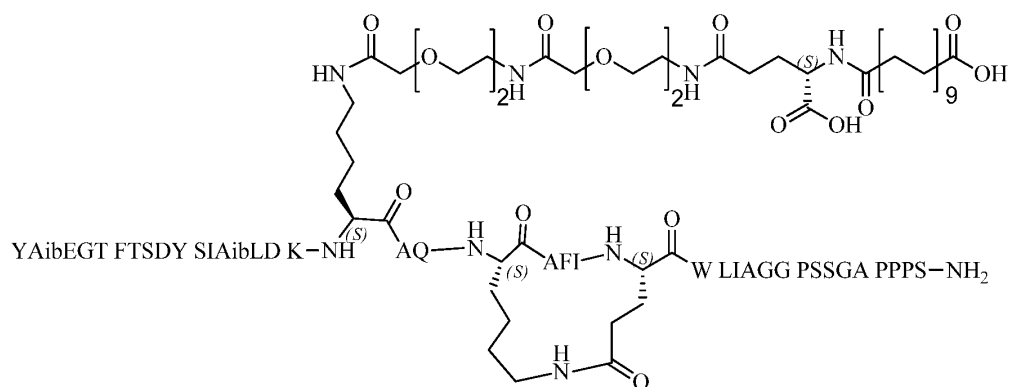
**WX-004**

参考 **WX-001** 的合成，通过中间体 **B-2** 得到 **WX-004**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认，计算值为 4797.4，检测值为 4797.3。

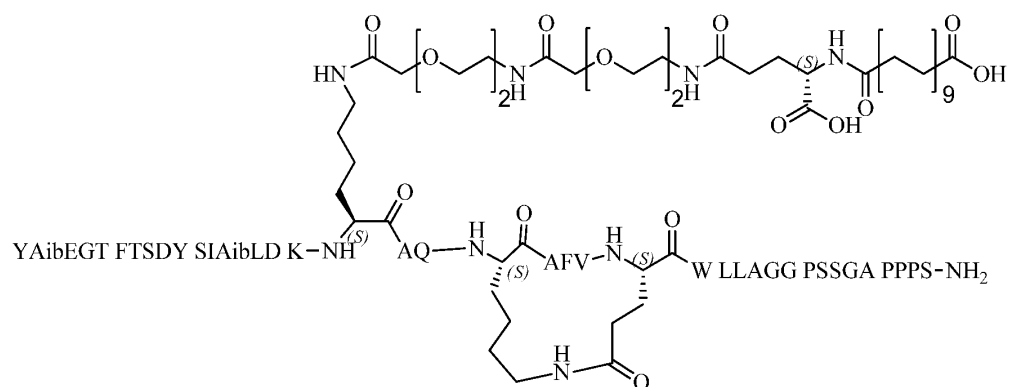
实施例 5**WX-005**

参考 **WX-001** 的合成，通过中间体 **B-3** 得到 **WX-005**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认，计算值为 4869.5，检测值为 4869.3。

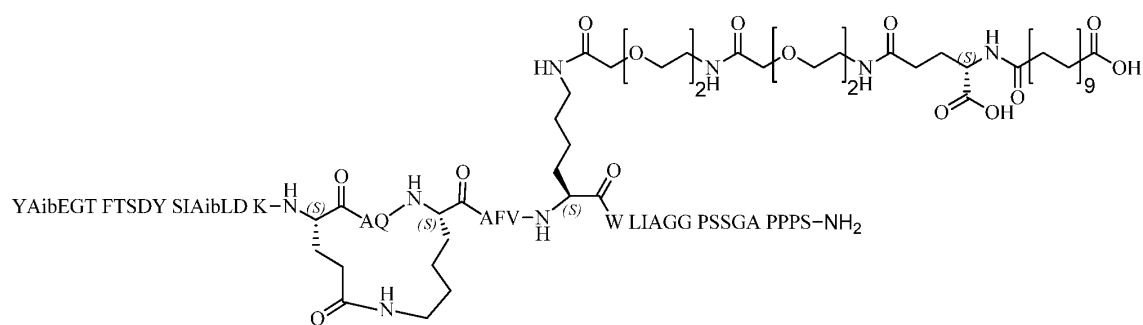
实施例 6

**WX-006**

参考 **WX-001** 的合成, 通过中间体 **B-4** 得到 **WX-006**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认, 计算值为 4825.5, 检测值为 4825.5。

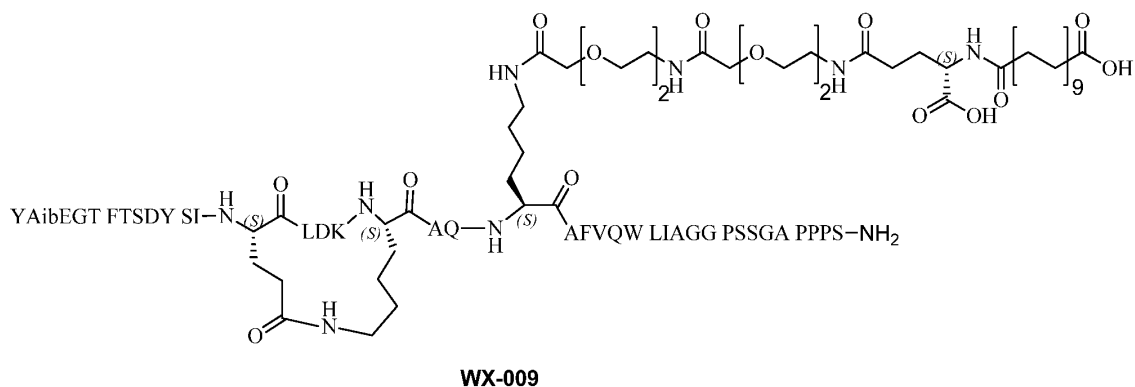
实施例 7**WX-007**

参考 **WX-001** 的合成, 通过中间体 **B-5** 得到 **WX-007**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认, 计算值为 4811.4, 检测值为 4811.1。

实施例 8**WX-008**

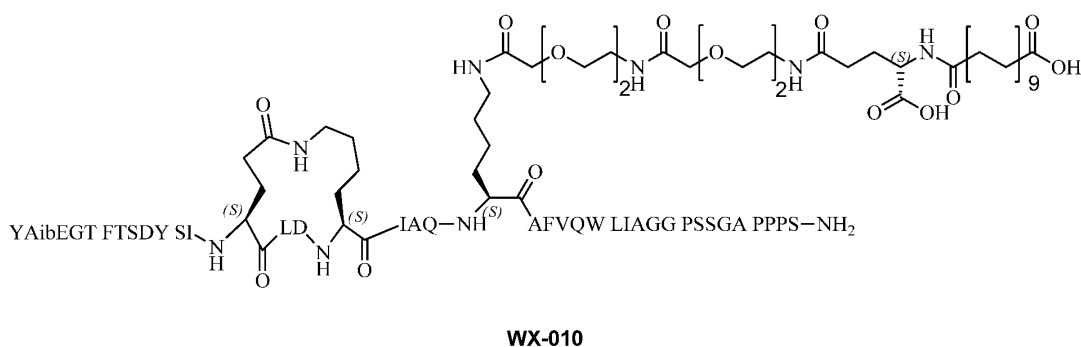
参考 **WX-001** 的合成, 通过中间体 **B-6** 得到 **WX-008**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认, 计算值为 4811.4, 检测值为 4811.4。

实施例 9



参考 **WX-001** 的合成, 通过中间体 **B-7** 得到 **WX-009**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认, 计算值为 4854.5, 检测值为 4854.9。

实施例 10



参考 **WX-001** 的合成, 通过中间体 **B-8** 得到 **WX-010**。多肽分子量经 ESI-MS 进行确认, 计算值为 4839.4, 检测值为 4839.6。

生物测试数据

实验例 1：体外 GLP-1R/GIPR 激动活性测试

A: 主要材料:

1)细胞株

该细胞株由上海药明康德构建。详情见下表。

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

2) 试剂与耗材

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

3) 仪器

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

1) 实验材料

实验缓冲液

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 μ L	0.5mmol/L
---------------------	-----------	------------	-----------

检测试剂制备

试剂	储存浓度	体积	终浓度
细胞裂解液	1x	9.5 mL	$\approx$ 1x
D2-cAMP 溶液	40x	250 μ L	1x
cAMP-抗体溶液	40x	250 μ L	1x

2) 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 μ M，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细胞冻存管迅速置于37°C温水中解冻。

2) 将细胞悬液转移至Transfer15 mL离心管中，用10ml 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细胞浓度稀释至 2.0×10^5 /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 μ L 800nM梯度稀释好的cAMP标准品。

2) 加入10 μ L 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 1 所示。

表 1 体外 GLP-1R/GIPR 激动活性测试结果

多肽药物	GLP-1R 激动活性			GIPR 激动活性		
	EC ₅₀ (nM)		比值	EC ₅₀ (nM)		比值
	(-) 1% HSA	(+) 1% HSA		(-) 1% HSA	(+) 1% HSA	
WX-001	0.014	3.664	265	0.44	23.04	53
WX-002	0.052	NA	NA	0.29	NA	NA
WX-003	0.090	NA	NA	0.30	NA	NA
WX-005	0.042	NA	NA	0.22	NA	NA
WX-006	0.051	NA	NA	0.45	NA	NA
WX-007	0.14	NA	NA	0.13	NA	NA
WX-008	0.08	NA	NA	0.32	NA	NA
WX-010	0.03448	33.96	984.9	11.86	443	37.4

结论：本发明化合物对 GLP-1R/GIPR 具有很强的激动活性。

实验例 2：化合物大鼠药代动力学评价

A. 实验目的

测试化合物在 SD 大鼠体内药代动力学

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，给予大鼠单次皮下注射（SC, 0.048 mpk）。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 2 所示。

表 2 药代动力学测试结果

化合物编号	最大血浆浓度(nM)	半衰期 T _{1/2} (h)	SC 浓度积分 AUC _{0-72 h} (nM.hr)
WX001	22	12	728
WX002	14	17	1316
WX005	14	17	1329
WX006	16	10	846

结论：本发明化合物具有优异的大鼠药代动力学性质。

实验例3：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静脉注射及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，给予小鼠单次静脉注射（IV, 0.048 mpk）及皮下注射给药(SC, 0.048 mpk)。静注溶媒为PBS缓冲液（pH=7），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3所示。

表3 药代动力学测试结果

化合物编号	清除率 (mL/min/kg)	半衰期 $T_{1/2}$ (h)	SC 浓度积分 AUC_{0-72h} (nM.hr)	生物利用度 F (%)
WX001	0.088	15.5	1554	85.5%

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4：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静脉注射及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4所示。

表4 药代动力学测试结果

化合物编号	C_{max} (nM)	T_{max} (h)	半衰期 $T_{1/2}$ (h)	SC 浓度积分 AUC_{0-240h} (nM.hr)
WX001	30	21	80	3973
WX002	33	29	81	4582
WX005	31	40	98	4553

WX006	30	29	72.4	3640
-------	----	----	------	------

结论：本发明化合物具有优异的猴药代动力学性质。

实验例5：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 稀释制得 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 H_3PO_4 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5所示。

表5 PLS测试结果

化合物编号	WX001	WX002	WX005	WX006
PLS (H/M) $T_{1/2}$ (min)	>289/>289	>289/>289	>289/>289	>289/>289

结论：本发明化合物具有优异的血浆稳定性。

实验例6：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 60 μL 的 4% H_3PO_4 的 H_2O 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 $^{\circ}\text{C}$ 下等待进一步处理。

3.2 将剩余的血浆样品放在 37 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 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（230 μL ）都被转移到聚碳酸酯管（ $n=2$ ）中，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 155000 $\times$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 60 μL 4%的 H_3PO_4 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 100 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

C. 实验结果

实验结果如表6所示。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。

表6 PPB测试结果

化合物编号	WX001	WX002	WX005	WX006
PPB% unbound (H/M)	NA/NA	NA/0.21%	NA/0.22%	NA/0.35%

结论：本发明化合物具有极高的血浆蛋白结合度。

实验例7：肾匀浆稳定性测试（BHS）

A. 实验目的

研究受试化合物在正常小鼠肾匀浆中的稳定性。

B. 实验操作

1. 实验前，将冷冻肾匀浆放入37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中解冻。
2. 测试化合物：用DMSO稀释10 mM的原液，制备1 mM的中间溶液；
3. 测试化合物：用DMSO稀释1 mM的中间溶液，制备50 μM 的加药溶液；

- 在每个时间点(0、10、30、60、120、180、240 min)分别加入100 μ L的4%的H₃PO₄和800 μ L的终止液来沉淀蛋白并充分混合。
- 样品4000 rpm离心10 min，每孔取100 μ L上清液至板上。样品在800 rpm下振荡约10 min，然后提交LC-MS/MS测试。

C. 实验结果

实验结果如表7所示。

表7 BHS测试结果

化合物编号	WX001	WX002	WX005	WX006
BHS (T _{1/2} (min))	14	20	21	234

实验例8：化合物小鼠腹腔糖耐量(ipGTT)实验-体内药效评价

A. 实验目的

研究受试化合物对于正常小鼠糖耐量的改善作用

B. 实验操作

- 根据小鼠体重和血糖分组后，对每组动物分别注射待测化合物(0.3 nmol/kg)和溶媒(20 mM柠檬酸盐缓冲液)，过夜禁食，18小时后腹腔注射葡萄糖溶液(2 g/kg, 10 mL/kg)；
- 使用血糖仪测定给葡萄糖后-60，0，15，30，60和120分钟的血糖浓度。

C. 实验结果

实验结果如表8所示。

表8 ipGTT测试结果

化合物编号	溶媒	WX001	WX002	WX005	WX006
血糖AUC _{0-120min} (mmol.min)	1916	1277	1150	1143	1164

结论：本发明化合物具有优异的糖耐量改善作用。

实验例9：在db/db小鼠中的药效研究-体内药效评价

A. 实验目的

研究受试化合物对于II型糖尿病 db/db 小鼠的血糖控制作用

B. 实验操作

- db/db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(15 nmol/kg)，给药时间：早上9:30-11:00，给药频率一天一次，连续给药4周。

C. 实验结果

实验结果如表9所示。

表9 测试化合物在db/db小鼠中的降糖效果

化合物编号	溶媒	WX001	WX002	WX005	WX006
ΔHbA1c% (连续给药四周后与第1天相比)	15%	-28%	-21%	-21%	-23%

结论：本发明化合物在db/db小鼠中展现了优异的降糖药效。

实验例10：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小鼠动物到达药明康德设施后，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22天。

C. 实验结果

实验结果如表10所示。

表10 测试化合物在DIO小鼠中的药效

化合物编号	溶媒	WX001	WX002	WX005	WX006
Δ体重% (22天后与第1天相比)	0.2%	-29%	-26%	-24%	-32%
Δ脂肪组织% (22天后与第1天相比)	2%	-54%	-48%	-47%	-62%
Δ非脂肪组织% (22天后与第1天相比)	-3%	-11%	-10%	-8%	-18%

结论：本发明化合物在DIO小鼠中展现了优异的减重药效。

权 利 要 求

1. 下式化合物或其药学上可接受的盐，

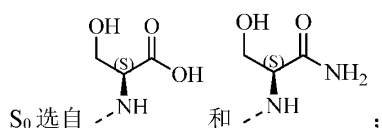
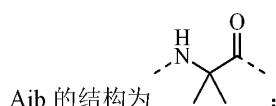
SEQ ID NO1: YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AZ₀K₀ Z₁FZ₂E₀W LZ₃AGG PSSGA PPPS₀

SEQ ID NO2: YAibEGT FTSDY SIAibLD KE₀AQK₀ AFVK¹W LIAGG PSSGA PPPS₀

SEQ ID NO3: YAibEGT FTSDY SIE₀LD KK₀AQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀

SEQ ID NO4: YAibEGT FTSDY SIE₀LD K₀IAQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀

其中，



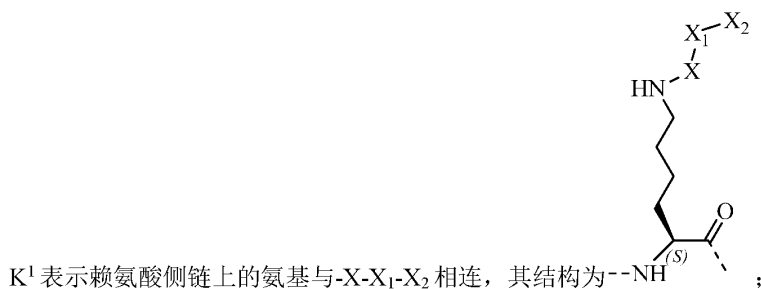
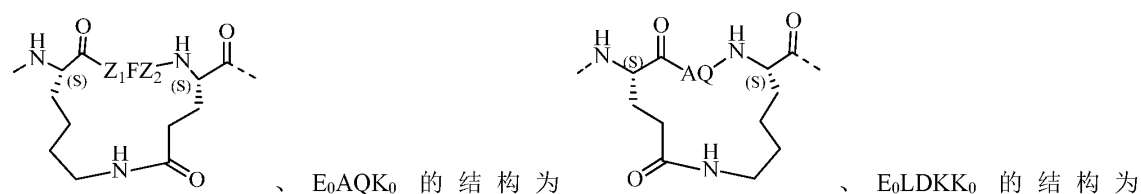
Z₀ 选自谷氨酰胺(Q)和天冬酰胺(N);

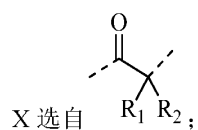
Z₁ 选自丙氨酸(A)和谷氨酸(E);

Z₂ 选自缬氨酸(V)和异亮氨酸(I);

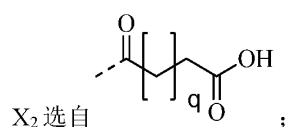
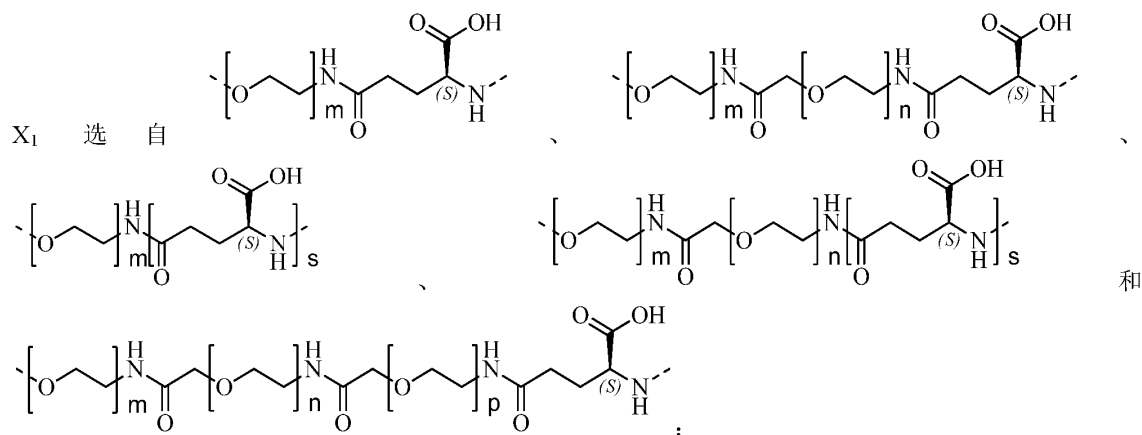
Z₃ 选自异亮氨酸(I)和亮氨酸(L);

E₀ 和 K₀ 表示谷氨酸侧链上的羧基与赖氨酸侧链上的氨基共同构成内酰胺，此时 K₀Z₁FZ₂E₀ 的结构为





R₁ 和 R₂ 分别独立地选自 H 和 CH₃;

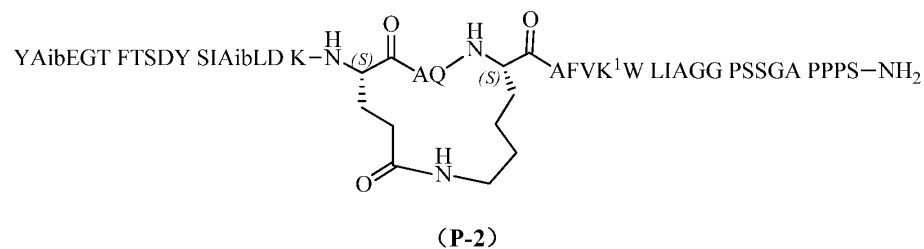
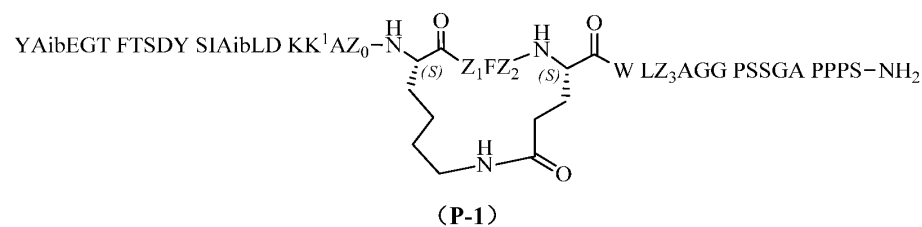


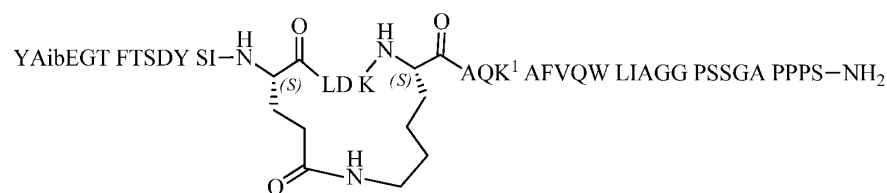
m、n 和 p 分别独立地选自 2 和 3;

s 选自 2 和 3;

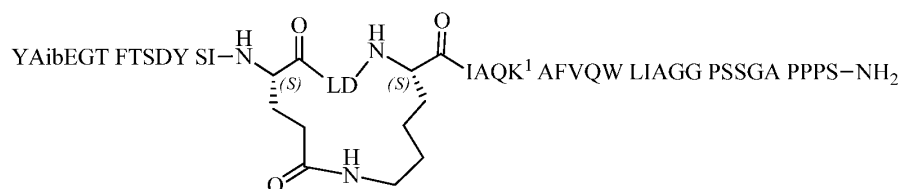
q 选自 15、16、17、18 和 19。

2. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其选自:





(P-3)



(P-4)

其中,

Aib、Z₀、Z₁、Z₂、Z₃和K¹如权利要求1所定义。

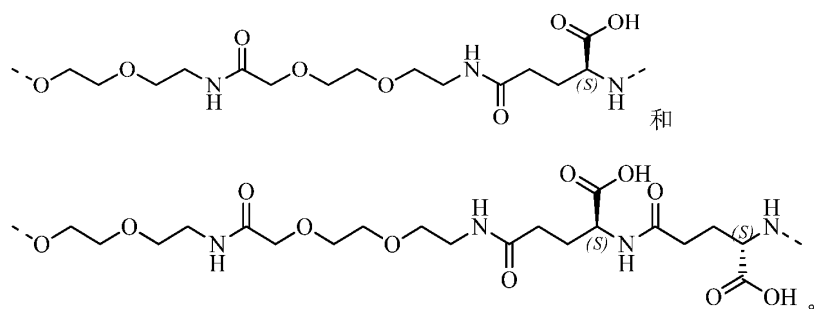
3.根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐,其中,X选自-C(=O)-CH₂-。

4.根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐,其中,m、n和p分别独立地选自2。

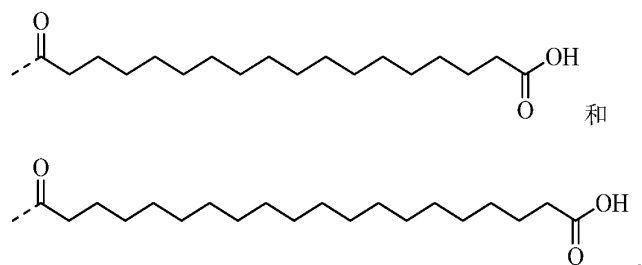
5.根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐,其中,s独立地选自2。

6.根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐,其中,q独立地选自15和17。

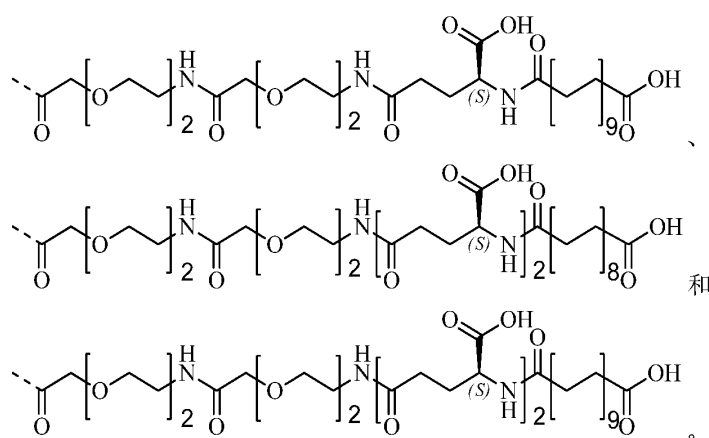
7.根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐,其中,X₁选自



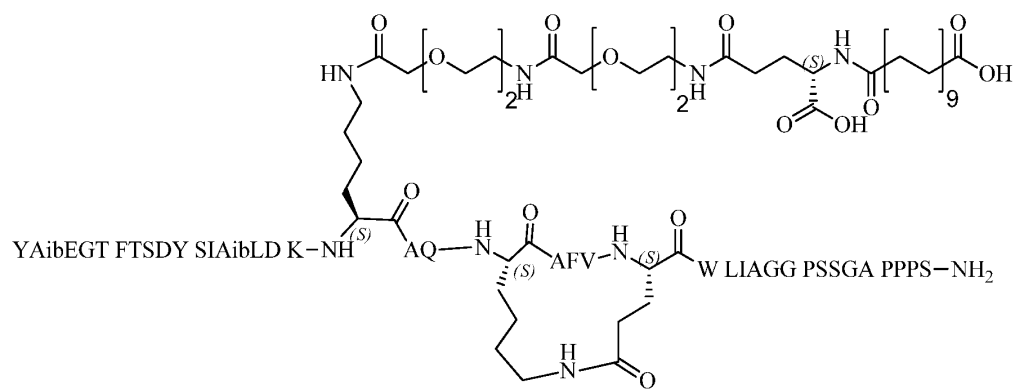
8.根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐,其中,X₂选自



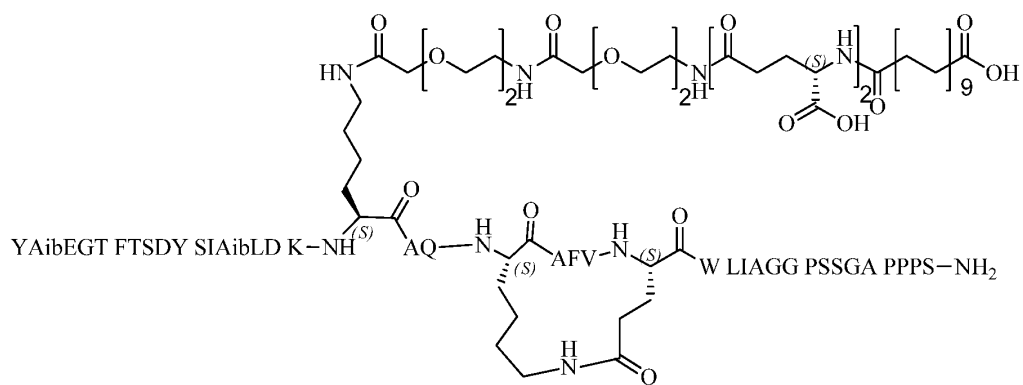
9.根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐,其中,-X-X₁-X₂选自



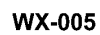
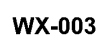
10. 下式所示化合物或其药学上可接受的盐，

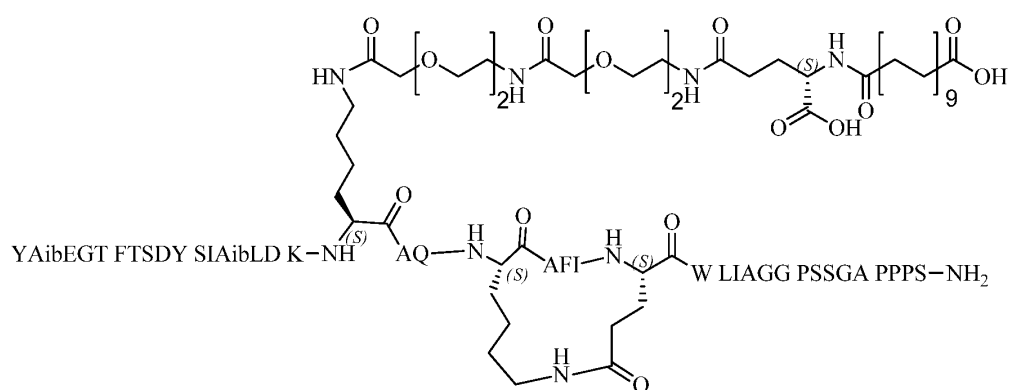


WX-001

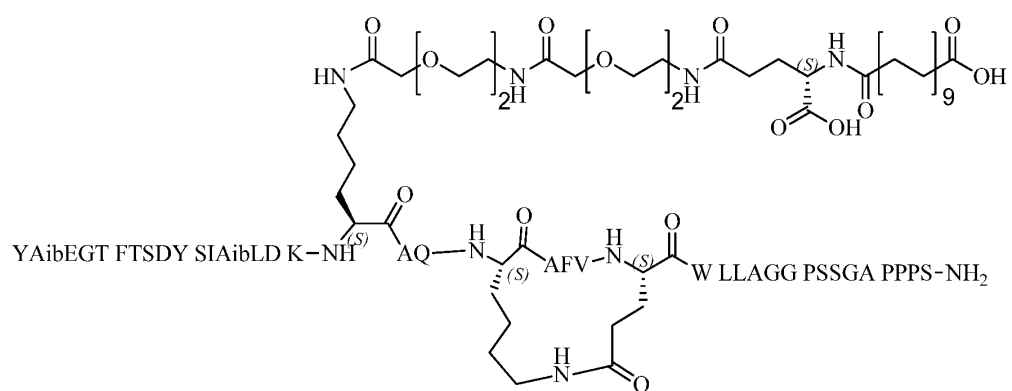


WX-002

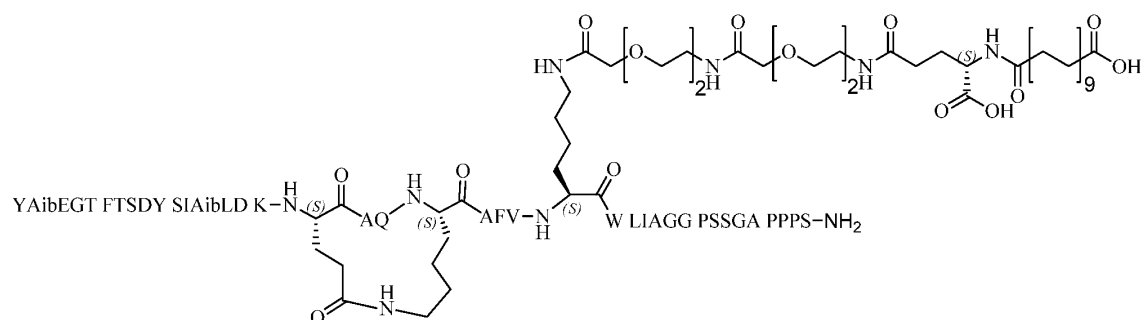




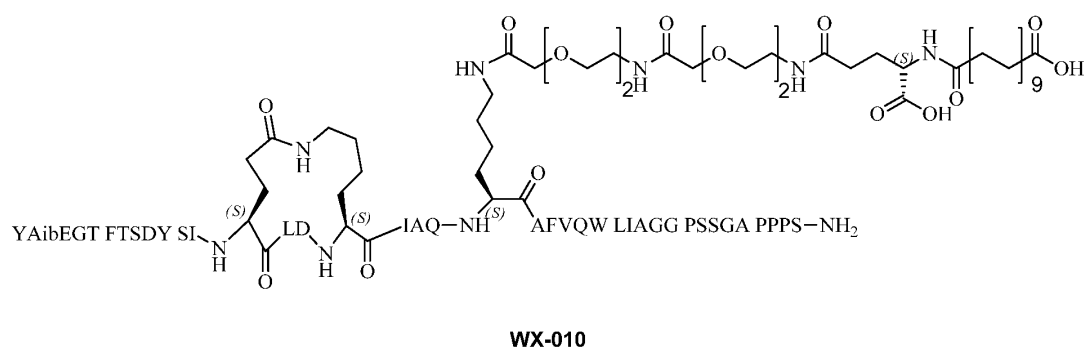
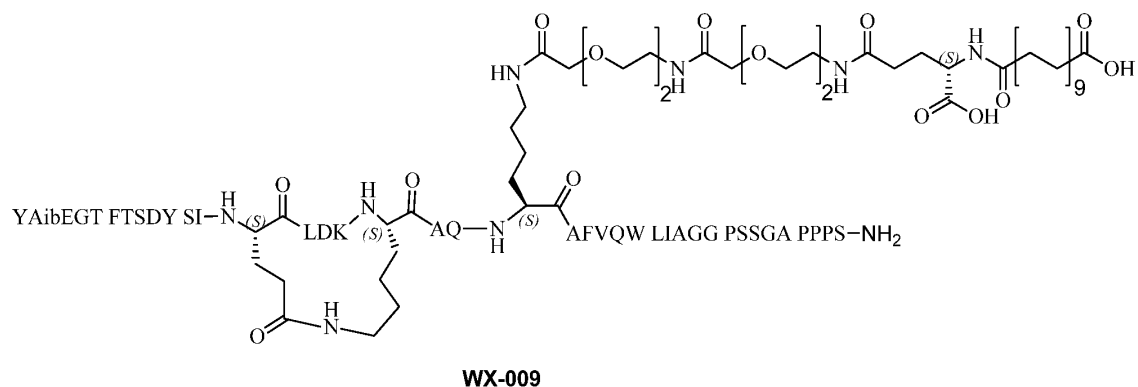
WX-006



WX-007



WX-008



11. 根据权利要求 1~10 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗肥胖症及糖尿病的药物上的应用。