

用于修复黏膜损伤或皮肤创伤的多肽及其应用

技术领域

本发明涉及用于修复黏膜损伤或皮肤创伤的新型多肽及其应用，本发明的多肽与已知多肽无同源性，而且能够在体内和体外均稳定存在，具有调控干细胞增殖和分化，修复黏膜损伤或皮肤损伤的效果；以及涉及所述新型多肽通过调控干细胞增殖和分化修复黏膜损伤或皮肤创伤的用途，以及用于预防、减轻或治疗胃肠疾病的用途。

背景技术

皮肤创伤和/或黏膜损伤是很多疾病的共同病理特征。皮肤创伤或皮肤损伤是指正常皮肤(组织)在外界致伤因子如外科手术、外力、热、电流、化学物质、低温以及机体内在因素如局部血液供应障碍等作用下所导致的损害。皮肤损伤常伴有皮肤完整性的破坏以及一定量正常组织的丢失，同时，皮肤的正常功能受损。也称为伤口或者创伤。目前有包括碱性成纤维生长因子、表皮生长因子、血小板生长因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子及生长激素等蛋白质/多肽药物具有明显的修复创面、护肤、抗敏和防衰老作用，但这些蛋白质/多肽药物的氨基酸序列较长导致制备成本高、稳定性较差等缺点，因而其应用受到了一定的限制。

人体黏膜是指呼吸系统、消化系统、生殖泌尿系统等腔道或囊状肌性器官的内层，是仅次于皮肤的人体第二道屏障，包括口腔、咽、气管、食道、胃、肠道、阴道、膀胱等，这些器官的管壁或囊壁均有共同的分层规律，又具有与其功能相适应的特点，其胚胎起源、组织结构、病理过程、临床表现、愈后等均有共同特点。

慢性胃炎是一种胃黏膜慢性炎症，是消化内科的常见病和多发病，临床上将不同原因引起的胃黏膜慢性炎症(即在病理上表现为单核细胞和淋巴细胞浸润)和(或)腺体萎缩性病变称为慢性胃炎。以胃黏膜上皮和腺体萎缩为特征的慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)，其起病隐匿、病程长、症状无特异性、难以治愈，在慢性胃炎中占 11%~31%，好发于中老年人群，发病和年龄有一定的关联但与性别没有关系，发病缓慢且病势缠绵，迁延难愈，治疗棘手。慢性萎缩性胃炎是胃癌发生发展重要阶段被视为胃癌前病变，1978 年世界卫生组织(WHO)已将 CAG 列为癌前状态，其常伴假幽门腺化生和肠上皮化生，或不典型增生阶段等癌前病变。尤其是伴有弥漫的肠上皮化生或不典型增生者，癌变可能性更大，业界大多数专业人士都赞同通过慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生、肠型胃癌这样的发展模式。故早期准确的诊断和治疗对慢性萎缩性胃炎患者有着重要的意义。目前现代医学治疗本病主要以改善症状、手术介入为主，在腺体萎缩、肠化生方面尚无良策。CAG 为慢性胃炎转变为胃癌的重要阶段，积极治疗 CAG 对预防其癌变、降低胃癌发病率有

着深远意义。寻求萎缩性胃炎的有效治疗方法,是更好地开展胃癌预防的重要措施之一。

黏膜组织的损伤临床上会导致慢性胃炎和消化道溃疡等胃肠道疾病。黏膜上皮的修复有修复(restitution)和再生(regeneration 或 renewal)两种不同的机制(Cur. Med. Chem., 2008, 15, 3133-3144): 修复或恢复一般在损伤后几分钟内就开始,通过细胞迁移快速修复浅表病变;再生是通过干细胞和祖细胞的分化和增殖持续再生,持续数天至数月。

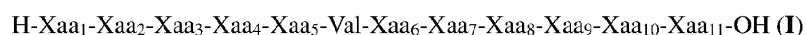
表皮生长因子(EGF)是一种由 53 个氨基酸残基组成的多肽,广泛存在于多种组织器官和体液中,其可促进上皮细胞增殖从而对皮肤起到保护作用。表皮生长因子主要是促进皮肤组织细胞的增殖与生长,使新生的细胞替代衰老的细胞,从而起到抗衰老和护肤保健等功能。表皮生长因子已经被报道具有修复创面作用,因皮肤创面需要消毒、清创时,会应用含碘或双氧水的消毒剂,EGF 在此条件下不稳定。生长因子与胃肠吻合口愈合有关(J. Surgical Res. 2014;17:202-210),但是 EGF 经胃肠口服给药时,进入体内后会发生降解,不能达到治疗效果。

因此,需要一种体内外稳定、能够治疗皮肤和/或黏膜损伤,特别是胃肠道黏膜损伤的肽类物质。

发明内容

为了克服现有技术的不足和缺陷,本发明的目的在于提供一类新型多肽。

第一方面,本发明提供式(I)的化合物或其生理学上相容的盐,其中所述式(I)的化合物如下:



其中

Xaa₁ 为 Pro、Gly、Ala 或缺失;

Xaa₂ 为 Ala、Leu、Ile、Gly、Cys、Ser 或缺失;

Xaa₃ 为 Ala、Pro、Gly、Leu、Ile、Cys、Ser 或缺失;

Xaa₄ 为 Glu、Gln、Asp、Asn、Leu、Ile、Val 或缺失;

Xaa₅ 为 Pro、Gly、Ala、Val 或缺失;

Xaa₆ 为 Pro、Gly 或 Ala;

Xaa₇ 为 Leu、Phe、Val、Ala、Tyr、Glu、Lys、Asp、Ile、Met 或缺失;

Xaa₈ 为 Val、Leu、Gln、Ile、Met 或缺失;

Xaa₉ 为 Lys、Arg、His、Asp、Val 或缺失;

Xaa₁₀ 为 Glu、Gln、Asp、Asn 或缺失; 以及

Xaa₁₁ 为 Glu、Asp、Asn、Gln 或缺失,

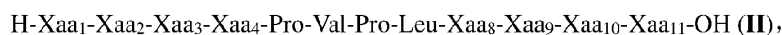
条件是：Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀ 和 Xaa₁₁ 中至多有 9 个是缺失的。

在一实施方案中，Xaa₅ 为 Pro。

在一实施方案中，Xaa₆ 为 Pro。

在一实施方案中，Xaa₇ 为 Leu。

在一实施方案中，式(I)化合物具有以下式(II)结构，



其中

Xaa₁ 为 Pro、Gly、Ala 或缺失；

Xaa₂ 为 Ala、Leu、Ile、Gly、Cys、Ser 或缺失；

Xaa₃ 为 Ala、Pro、Gly、Leu、Ile、Cys、Ser 或缺失；

Xaa₄ 为 Glu、Gln、Asp、Asn、Leu、Ile、Val 或缺失；

Xaa₈ 为 Val、Leu、Gln、Ile、Met 或缺失；

Xaa₉ 为 Lys、Arg、His、Asp、Val 或缺失；

Xaa₁₀ 为 Glu、Gln、Asp、Asn 或缺失；以及

Xaa₁₁ 为 Glu、Asp、Asn、Gln 或缺失。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₁ 为 Pro 或缺失；优选为 Pro。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₂ 为 Ala 或缺失；优选为 Ala。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₃ 为 Ala、Gly 或缺失；优选为 Ala。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₄ 为 Glu、Gln、Asp 或缺失；优选为 Glu、Asp 或 Gln。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₈ 为 Val 或缺失；优选为 Val。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₉ 为 Lys、Arg 或缺失；优选为 Lys 或缺失。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₁₀ 为 Glu、Gln 或缺失；优选为 Gln。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₁₁ 为 Asp 或缺失；优选为 Asp。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃ 和 Xaa₄ 中有一个是缺失的；或者有两个是缺失的；或者有三个是缺失的；或者都是缺失的。

在一实施方案中，式(I)或(II)中的 Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀ 和 Xaa₁₁ 中有一个是缺失的；或者有两个是缺失的；或者有三个是缺失的；或者都是缺失的。

在一实施方案中，所述化合物选自本发明化合物 1-73 中任一个。

在一实施方案中，所述化合物选自：

Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 1);
Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys (化合物 3);
Pro-Ala-Ala-Gln-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 10);
Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu (化合物 26);
Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 27);
Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu (化合物 30);
Glu-Pro-Val-Pro-Leu (化合物 31);
Pro-Val-Pro-Leu(化合物 32);
Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 28);
Pro-Ala-Ala-Asp-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 11);
Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 48);
Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Glu-Asp (化合物 57); 或
Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 38)。

为方便起见, 在本申请中描述本发明的化合物时, 省略左侧的 H 和右侧的 OH。

在一实施方案中, 所述化合物为 Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp (化合物 1)。

第二方面, 本发明提供一种修复黏膜损伤的方法, 所述方法包括对受试者给予本发明的化合物或其生理学上相容的盐或使黏膜损伤与本发明的化合物或其生理学上相容的盐接触。在一实施方案中, 所述修复是通过调控干细胞增殖和分化进行的。

在一实施方案中, 所述黏膜损伤是消化系统、呼吸系统等腔道内黏膜损伤。

消化系统黏膜损伤与口腔、食道、胃肠疾病相关, 所述口腔疾病包括口腔溃疡、口腔炎、牙龈炎、牙周炎等; 所述食道疾病包括食管炎、食管溃疡等; 所述胃肠疾病包括慢性胃炎、慢性萎缩性胃炎、急性胃炎、胃十二指肠溃疡、功能性胃肠道疾病、消化不良、癌前病变、消化系统肿瘤、胃肠道出血、胃食管返流疾病、急慢性肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和化疗引起的黏膜损伤, 但不限于此。

在优选的实施方案中, 所述消化道黏膜包括胃黏膜和肠黏膜。在优选的实施方案中, 慢性胃炎包括慢性萎缩性胃炎。在优选的实施方案中, 所述黏膜损伤是由刺激性物质或药物、应激状态引起的胃黏膜损伤。所述刺激性物质如盐酸、乙醇或酒精等, 所述药物例如非类固醇类抗炎药阿司匹林或吲哚美辛等。

本发明提供一种预防、减轻或治疗消化道疾病或消除炎症水肿的方法, 所述方法包括对受试者给予本发明的化合物或其生理学上相容的盐。所述消化道疾病包括口腔、食道、胃肠

疾病相关，所述口腔疾病包括口腔溃疡、口腔炎、牙龈炎、牙周炎等；所述食道疾病包括食管炎、食管溃疡等；所述胃肠疾病包括慢性胃炎、慢性萎缩性胃炎、急性胃炎、胃十二指肠溃疡、功能性胃肠道疾病、消化不良、癌前病变、消化系统肿瘤、胃肠道出血、胃食管返流疾病、急慢性肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病和放化疗引起的黏膜损伤；但不限于此。在一实施方案中，所述消化道疾病的预防、减轻或治疗是通过调控干细胞增殖和分化进行的。所述方法通过本发明的化合物或其生理学上相容的盐对胃黏膜或肠黏膜等消化道黏膜起到保护作用或修复胃黏膜或肠黏膜等消化道黏膜的损伤，从而起到预防、减轻或治疗胃肠疾病的作用。

本发明提供一种修复黏膜或皮肤创面的方法，所述方法包括对受试者给予本发明的化合物或其生理学上相容的盐。在一实施方案中，所述黏膜或皮肤创面的修复包括调控干细胞增殖和分化。

在上述本发明的方法中，本发明的化合物或其生理学上相容的盐是通过口服、注射、皮下等方式给药的。

第三方面，本发明提供一种修复皮肤创伤的方法，所述方法包括使皮肤创伤与本发明的化合物或其生理学上相容的盐接触。在优选的实施方案中，所述皮肤创伤与表皮炎症、机械及手术创面、烧伤及烫伤、溃疡、瘰管、褥疮、放化疗引起的皮肤损伤相关，但不限于此。在一实施方案中，所述皮肤创伤是指正常皮肤在外界致伤因子如外科手术、外力、热、电流、化学物质、低温以及机体内在因素如局部血液供应障碍等作用下所导致的损害。在一实施方案中，所述皮肤创伤常伴有皮肤完整性的破坏以及一定量正常组织的丢失。在另一实施方案中，所述皮肤创伤包括皮肤的正常功能受损。在一实施方案中，所述皮肤创伤的恢复是通过调控干细胞增殖和分化进行的。

本发明提供一种促进 HaCAT 细胞增殖的方法，所述方法包括使所述细胞与本发明的化合物或其生理学上相容的盐接触。

第四方面，本发明提供一种使损伤的血管再生的方法，所述方法包括使损伤的血管与本发明的化合物或其生理学上相容的盐接触。在优选的实施方案中，所述损伤的血管包括消化道黏膜损伤和皮肤创伤导致的血管损伤。

第五方面，本发明提供一种药物、食品、保健品或化妆品、日用品组合物，所述组合物包括本发明的化合物或其生理学上相容的盐以及生理学上可接受的载体。在一实施方案中，所述生理学上可接受的载体包括药学上可接受的载体或化妆品可接受的载体。所述药物食品、保健品或化妆品、日用品组合物可以按照制剂学或化妆品常规技术制备，包括将作为活性成分的本发明的化合物与载体混合，按照常规技术制成所需要的剂型。可以根据需要，将本发

明的组合物配制成口服施用制剂、黏膜施用制剂、注射制剂、吸入制剂和外用制剂。

本发明的多肽与已知多肽无同源性，便于人工多肽合成以获得高纯度多肽，与表皮生长因子多肽相比本发明的多肽由于仅由至多 12 个氨基酸残基组成在体内稳定，而且本发明的多肽能促进干细胞增殖分化，特别是能促进胃类器官的增殖和分化，参与并调控胃上皮干细胞的增殖和分化，从而可对胃肠干细胞，表皮干细胞损伤进行修复，具有显著的减轻诸如慢性胃炎及消化道溃疡的胃肠疾病病理发展、消除炎症水肿、促进消化道黏膜损伤修复和皮肤创伤修复、缩短创面愈合时间、调解免疫功能等作用。此外，本发明的多肽用于体表皮肤创面时即使经碘制剂或双氧水消毒之后也能够起作用或者在人工胃液、人工肠液等中也能稳定存在，而表皮生长因子用于体表皮肤时，经碘制剂或双氧水消毒之后结构会破坏，不能发挥作用。

附图说明

图 1 示出了多肽固相合成步骤的示意图。

图 2 示出了化合物 1 对乙醇诱导的小鼠胃溃疡的抗溃疡作用。

图 3 示出了化合物 1 对促进胃类器官的增殖和分化的结果。

图 4 示出了化合物 1 对促进胃类器官的分化的结果。

图 5 示出了化合物 1 对慢性萎缩性胃炎小鼠的治疗作用。

图 6 示出了化合物 1 对慢性萎缩性胃炎大鼠胃上皮干细胞的影响。

图 7 示出了化合物 1 对慢性萎缩性胃炎大鼠的治疗作用。

图 8 示出了化合物 1 对 HaCAT 细胞的促增殖作用。

图 9 示出了斑马鱼肠下血管面积分析部位示意图。

图 10 示出了经本发明化合物处理后的斑马鱼肠下血管面积典型图。

图 11 示出了经本发明化合物处理后的斑马鱼肠下血管分支数。

具体实施方式

术语“生理学上相容的盐”是指生理学上相容的(即药理学上可接受的)并且对将被施用本发明化合物的个体基本上无毒的盐形式。本发明化合物的生理学上相容的盐包括由适宜的、无毒的有机或无机酸或无机碱形成的常规的和化学计量的酸加成盐或碱加成盐。

术语“受试者”是指动物，优选为哺乳动物，最优选为人。具体地讲，术语“受试者”涉及具有皮肤创伤和/或黏膜损伤的哺乳动物或人。本领域技术人员应理解，本发明的皮肤创伤和/或黏膜损伤的修复可出于美容目的(即非治疗性目的)和治疗性目的施用。为此，本申请

的术语“皮肤损伤”还包括出于美容目的修复的皮肤损伤例如，皱纹(例如紫外线照射导致的皱纹)、皮肤纹、裂缝、肿块、大毛孔(例如与附件结构如汗腺管、皮脂腺或毛囊相关的)，或不平或粗糙，皮肤失去弹性(功能性皮肤弹性蛋白丧失和/或失活)、下垂(包括眼部和下颌浮肿)、皮肤硬度丧失、皮肤紧实度丧失、皮肤变形后的回复能力丧失、变色(包括黑眼圈)、斑疤、肤色灰黄、色素过量皮肤区域例如老年斑和雀斑、角质物、异常的分化、过度角质化、弹性组织变性、胶原蛋白的破坏，以及皮肤角质，真皮，表皮层，皮肤血管系统(例如毛细血管扩张或多叉血管)，以及皮下组织，特别是靠近皮肤的皮下组织中的其它组织变化。

以下是结合具体试验对本发明的说明，并不是对本发明保护范围的限制。

表 1 书写中所使用到试剂、溶剂的英文名或缩写

英文名或缩写	中文名
HBTU	苯并三氮唑- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脲六氟磷酸盐
Methanol	甲醇
Tert-Butyl methyl ether	甲基叔丁基醚
Ethanol	乙醇
AA	氨基酸

实施例 1：多肽的化学合成

多肽化合物的合成采用常规固相合成方法，经过树脂溶胀、取代、脱保护、洗涤、氨基酸溶解、氨基酸活化和缩合过程、洗涤、再脱保护多个循环过程，以及最后裂解和侧链脱保护。

多肽固相合成步骤示意图参见图 1。图 1 中，Cl-2-Cl-Resin 表示 2-氯三苯甲基氯树脂 (2-Chlorotrityl Chloride Resin)；Fmoc-Aa(n)等表示 9-苄基甲氧基羰基的氨基酸；DIPEA 为 N,N-二异丙基乙胺；DCM 为二氯甲烷；PIP 为哌啶；DMF 为 N,N-二甲基甲酰胺；HOBt 为 1-羟基苯并三唑；DIC 为 N,N'-二异丙基碳二亚胺；TFA 为三氟乙酸；TIPS 为三异丙基硅烷。

以下以化合物 1(Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp)为例，示出化合物 1 的合成和纯化的方法，所述方法包括步骤 1、全保护肽树脂的制备；2、切割、脱保护；3、纯化(换盐)冻干。

步骤 1、全保护肽树脂的制备

- (1) 树脂溶胀：称取 2-Chlorotrityl Chloride Resin 2.0192 g ($S = 0.73 \text{ mmol/g}$)，加入到有筛板的合成管中，用 40 ml 二氯甲烷溶胀 30 min，抽滤除去二氯甲烷。
- (2) 制备 Fmoc-Asp(OtBu)-树脂：按树脂、Fmoc- Asp(OtBu)-OH、DIPEA，以 1 : 1.5 :

1.65 的摩尔比分别称取 Fmoc-Asp(OtBu)-OH、DIPEA，溶解于二氯甲烷 20 ml 中，加入合成管中。室温 N₂ 鼓泡震荡 1~3 小时，直接向反应液中加入甲醇 2 ml 封闭 30 min。然后分别用二甲基甲酰胺洗涤 4 次，25 ml/ 次，抽干树脂。

(3) 脱除 Fmoc 保护基：向反应器中加入 20% 哌啶-DMF (v/v) 溶液 20 ml，N₂ 鼓泡反应 20 min，抽干；然后用二甲基甲酰胺洗涤 6 次，25 ml/ 次，3 分钟 / 次，抽干，茚三酮法检测 Fmoc 脱除结果。

(4) 氨基酸预活化：在 250 ml 圆底烧瓶中加入 4.38 mmol 的 Fmoc 保护的氨基酸、5.26 mmol HOBt、4.60 mmol DIC，用 1: 1 的 DCM-DMF(v/v)20 ml 溶解，-5-0 °C 冰浴搅拌下预活化 30~60 min。

(5) 氨基酸连接：将已活化的保护氨基酸溶液倒入反应器中，补加适量的 DCM 清洗用具。室温下 N₂ 鼓泡反应 1~3 小时，茚三酮法检测氨基酸连接是否完全，若完全，抽干。树脂用二甲基甲酰胺洗涤 4 次，25ml/ 次，3 min/ 次，抽干。每一种氨基酸、缩合剂的用量及具体反应时间见表 2。

(6) 第一个氨基酸缩合完成后，重复步骤 (3)~(5)，按照氨基酸顺序延长肽链至最后一个氨基酸偶联完毕。

(7) 树脂肽用二氯甲烷洗涤 6 次，25 ml/ 次，3 min/ 次，抽干。

表 2 氨基酸、缩合剂的用量

氨基酸名称	AA/eq	氨基酸用量/g	HOBt/g	DIPEA/g	DIC/g
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	2.19	0.90	0	0.31	0
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	4.38	2.67	0.71	0.57	0.58
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	4.38	2.05	0.71	0.57	0.58
Fmoc-L-Val-OH	4.38	1.49	0.71	0.57	0.58
Fmoc-L-Leu-OH	4.38	1.55	0.71	0.57	0.58
Fmoc-L-Pro-OH	4.38	1.48	0.71	0.57	1.16
Fmoc-L-Val-OH	4.38	1.49	0.71	0.57	0.58
Fmoc-L-Pro-OH	4.38	1.48	0.71	0.57	1.16
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH·H ₂ O	4.38	1.94	0.71	0.57	1.16
Fmoc-L-Ala-OH·H ₂ O	4.38	1.44	0.71	0.57	1.16
Fmoc-L-Ala-OH·H ₂ O	4.38	1.44	0.71	0.57	1.16
Fmoc-L-Pro-OH	4.38	1.48	0.71	0.57	1.16

步骤 2、切割、脱保护

(1)在步骤 1 的合成管中，加入切割剂(TFA : TIPS : H₂O = 95 : 2.5 : 2.5, v/v)50 ml, N₂ 鼓泡反应 1.5-3 小时。

(2)切割反应完成后，将切割剂抽滤至 250 ml 圆底烧瓶中。真空浓缩至原切割剂体积的三分之一后，加入 10 倍现有体积的甲基叔丁基醚，搅拌 30 min。将所得混合溶剂过滤，并用 30 ml 甲基叔丁基醚分别清洗 3 次后，将所得粗肽产品置于砂芯漏斗在通风橱中 N₂ 吹干，使溶剂挥发至粗肽为粉末状。得到粗肽 1.87g，粗产率 85.1%。

步骤 3、纯化(换盐)和冻干

采用以下色谱参数条件 A，对步骤 2 中获得的粗肽进行 HPLC 纯化。具体而言，用水和/或乙腈溶解步骤 2 中获得的粗肽，并经 0.45 μ m 滤膜过滤；进样；用乙腈-水流动相梯度洗脱；收集目的肽洗脱液；最后进行旋蒸浓缩。

色谱参数条件 A:

色谱柱: YMC-Actus Triart C18 30*250mm;

洗脱液 A: 0.1%(v/v)TFA/H₂O;

洗脱液 B: 乙腈;

流速 25ml/min;

紫外检测波长 220nm;

表 3 梯度洗脱条件

时间 min	洗脱液 A(%)	洗脱液 B(%)
0	90	10
30	75	25

接着采用以下色谱参数条件 B 利用 HPLC 法对上述步骤所获得的产品进行换盐，得到最终的肽化合物 1。具体而言，使用 95%A1+5%B 平衡色谱柱；然后进样；接着采用 95%A2+5%B 平衡色谱柱；用 A1 和 B 梯度洗脱；收集目的肽洗脱液；最后旋蒸浓缩并且冷冻干燥，得到化合物 1(纯化收率 73.3%，纯度 100%)。化合物 1 的结构经 MS、¹H-NMR 确认。

色谱参数条件 B:

色谱柱: YMC-Actus Triart C18 30*250mm

洗脱液 A1: 0.1M 乙酸

洗脱液 A2: 0.025M 乙酸+0.1M 乙酸铵

洗脱液 B: 乙腈

流速 25ml/min

紫外检测波长 220nm

表 4 梯度洗脱条件

时间 min	洗脱液 A1(%)	洗脱液 B(%)
0	95	5
5	95	5
35	70	30

以与合成化合物 1 类似的方式，合成其他化合物。结果参见表 5 和说明书其他部分。

表 5 合成的化合物

序号	化合物序列	粗品量 (g)	纯化收率	纯度	MS
1	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.87	73.3%	100%	1263.70, 632.50(双电荷), 422.10(三电荷)
2	Gly-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.07	N/A	100.0%	612.60(双电荷)
3	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys	1.62	33.8%	99.8%	511.00(双电荷)
4	Pro-Ala-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.00	56.8%	97.9%	612.60(双电荷)
5	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Gly-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.50	42.3%	99.2%	612.50(双电荷)
6	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Gly-Ala-Val-Lys-Gln-Asp	1.78	38.1%	100.0%	591.50(双电荷)
7	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Gly-Val-Val-Lys-Gln-Asp	1.50	46.5%	100.0%	605.50(双电荷)
8	Pro-Ala-Ala-Glu-Gly-Val-Gly-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.15	14.4%	100.0%	592.50(双电荷)
9	Pro-Ala-Ala-Glu-Gly-Val-Gly-Leu	2.12	67.9%	98.9%	713.40
10	Pro-Ala-Ala-Gln-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.36	57.4%	100.0%	632.00(双电荷)
11	Pro-Ala-Ala-Asp-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.39	52.9%	99.6%	625.50(双电荷)
12	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Phe-Val-Lys-Gln-Asp	2.95	78.3%	100.0%	649.5(双电荷), 433.4(三电荷)
13	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Tyr-Val-Lys-Gln-Asp	2.66	38.4%	100.0%	657.4(双电荷), 438.8(三电荷)
14	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Gly-Leu-Val-Lys	1.92	53.5%	100.0%	490.9(双电荷)
15	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Gly-Val-Val-Lys	1.81	56.9%	100.0%	483.8(双电荷)
16	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Ala-Leu-Val-Lys	1.98	60.1%	100.0%	497.8(双电荷)
17	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Ala-Val-Val-Lys	2.04	57.3%	100.0%	490.9(双电荷)
18	Pro-Ala-Ala-Glu-Ala-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.15	52.0%	100.0%	619.5(双电荷)
19	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Ala-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.92	37.7%	100.0%	619.4(双电荷)
20	Pro-Ala-Ala-Glu-Ala-Val-Ala-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.96	19.1%	99.7%	606.50(双电荷)
21	Ala-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.58	61.6%	100.0%	619.50(双电荷)
22	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Phe-Val-Lys	2.11	53.8%	100.0%	527.8(双电荷)
23	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Tyr-Val-Lys	2.05	51.1%	100.0%	535.8(双电荷)

24	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Gly-Phe-Val-Lys	1.81	55.5%	100.0%	507.9(双电荷)
25	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Ala-Phe-Val-Lys	1.81	59.0%	100.0%	514.8(双电荷)
26	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu	1.57	60.3%	100.0%	793.4, 397.3(双电荷)
27	Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.52	48.3%	100.0%	548.5(双电荷)
28	Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.05	43.6%	100.0%	448.40(双电荷)
29	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro	1.62	55.4%	100.0%	680.40
30	Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu	2.70	71.7%	100.0%	625.10
31	Glu-Pro-Val-Pro-Leu	1.82	52.2%	97.9%	554.40
32	Pro-Val-Pro-Leu	N/A	46.4%	100.0%	425.30
33	Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu	3.02	60.3%	100.0%	696.40
34	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val	2.50	94.3%	100.0%	583.40
35	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro	2.05	59.3%	99.2%	484.30
36	Pro-Ala-Ala-Glu	2.53	65.3%	100.0%	387.30
37	Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.54	N/A	100.0%	584.10(双电荷)
38	Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.48	56.0%	94.1%	513.00(双电荷)
39	Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.95	57.9%	100.0%	399.90(双电荷)
40	Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.82	49.8%	100.0%	350.30(双电荷)
41	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Ile-Val-Lys	2.04	58.5%	99.6%	511.00(双电荷)
42	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Val-Val-Lys	2.22	56.7%	98.7%	504.00(双电荷)
43	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Met-Val-Lys	2.22	48.8%	98.6%	520.10(双电荷)
44	Ala-Glu-Pro-Val-Pro	2.37	47.8%	100.0%	512.40
45	Ala-Glu-Pro-Val	0.43	57.8%	100.0%	415.30
46	Pro-Ala-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.58	57.5%	100.0%	625.10(双电荷)
47	Pro-Ala-Ala-Leu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.68	57.9%	100.0%	624.50(双电荷)
48	Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.74	56.7%	100.0%	625.50(双电荷)
49	Pro-Ala-Pro-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.92	22.2%	100.0%	645.40(双电荷)
50	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asn	3.10	48.4%	100.0%	632.10(双电荷)
51	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Val-Gln-Asp	2.71	53.9%	100.0%	618.00(双电荷)
52	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Val-Val-Lys-Gln-Asp	3.13	57.1%	100.0%	625.60(双电荷)
53	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Ile-Val-Lys-Gln-Asp	3.25	53.5%	100.0%	632.60(双电荷)
54	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Met-Val-Lys-Gln-Asp	1.82	59.4%	100.0%	641.60(双电荷)
55	Pro-Leu-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.34	62.7%	100.0%	653.60(双电荷)
56	Pro-Ile-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	3.22	41.9%	100.0%	653.60(双电荷)
57	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Glu-Asp	2.38	61.3%	100.0%	633.10(双电荷)
58	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Asn-Asp	3.10	57.7%	100.0%	625.60(双电荷)
59	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Asp-Asp	2.66	51.7%	99.5%	626.10(双电荷)
60	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Glu	1.91	80.8%	99.5%	639.60(双电荷)
61	Pro-Ala-Leu-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.14	64.7%	100.0%	653.60(双电荷)
62	Pro-Ala-Ile-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.93	72.1%	100.0%	653.60(双电荷)
63	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Leu-Lys-Gln-Asp	2.21	61.8%	100.0%	639.60(双电荷)
64	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Ile-Lys-Gln-Asp	2.53	57.2%	100.0%	639.60(双电荷)
65	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Met-Lys-Gln-Asp	3.17	33.3%	100.0%	648.50(双电荷)
66	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Arg-Gln-Asp	1.35	49.8%	100.0%	646.60(双电荷)
67	Pro-Ala-Ala-Val-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.24	54.4%	100.0%	617.60(双电荷)
68	Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.68	53.3%	100.0%	399.90(双电荷)

69	Gly-Ala-Ala-Val-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.66	58.9%	100.0%	597.60(双电荷)
70	Gly-Ala-Gly-Val-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	2.42	45.0%	100.0%	590.60(双电荷)
71	Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp	1.94	54.5%	100.0%	570.50(双电荷)
72	Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Ala-Phe-Val-Lys-Gln-Asp	3.20	43.3%	100.0%	636.60(双电荷)
73	Val-Pro-Leu-Val	2.37	58.3%	100.0%	427.40

注释：双电荷代表质谱出 1/2 目标峰，三电荷代表质谱出 1/3 目标峰；N/A 代表称量有难度，未计实际重量。

化合物 1: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.94 (dd, $J = 16.7, 8.0$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.48 (dd, $J = 13.3, 7.9$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.2, 4.2$ Hz, 1H), 4.35 – 4.21 (m, 6H), 4.18 – 4.03 (m, 3H), 3.71 – 3.47 (m, 5H), 2.93 – 2.69 (m, 4H), 2.45 – 2.32 (m, 2H), 2.25 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.01 – 1.93 (m, 3H), 1.93 – 1.84 (m, 14H, AcOH), 1.84 – 1.76 (m, 3H), 1.75 – 1.57 (m, 8H), 1.54 – 1.39 (m, 5H), 1.36 – 1.27 (m, 2H), 1.21 – 1.10 (m, 6H), 0.91 – 0.74 (m, 18H).

化合物 3: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.22 – 8.13 (m, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 4.52 – 4.43 (m, 1H), 4.39 – 4.19 (m, 6H), 4.12 – 4.04 (m, 1H), 3.89 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.67 – 3.46 (m, 6H), 2.85 (dt, $J = 10.2, 6.8$ Hz, 1H), 2.80 – 2.73 (m, 1H), 2.69 (s, 2H), 2.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.03 – 1.76 (m, 14H, AcOH), 1.73 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.70 – 1.61 (m, 4H), 1.61 – 1.52 (m, 3H), 1.47 (s, 4H), 1.26 (s, 2H), 1.20 – 1.12 (m, 6H), 0.91 – 0.83 (m, 9H), 0.83 – 0.77 (m, 9H).

化合物 4: Pro-Ala-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.45 – 4.16 (m, 10H), 4.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.93 – 3.76 (m, 3H), 3.67 – 3.58 (m, 1H), 3.42 – 3.28 (m, 2H), 2.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.72 (qd, $J = 16.4, 6.0$ Hz, 2H), 2.45 – 2.27 (m, 5H), 2.27 – 2.16 (m, 1H), 2.11 – 1.86 (m, 17H, AcOH), 1.84 – 1.47 (m, 8H), 1.45 – 1.25 (m, 8H), 0.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.89 – 0.73 (m, 15H).

化合物 5: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Gly-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{D}_3\text{COD}$) δ 4.66 – 4.62 (m, 2H), 4.40 (dd, $J = 8.1, 5.9$ Hz, 1H), 4.35 – 4.21 (m, 6H), 4.03 – 3.98 (m, 2H), 3.92 – 3.81 (m, 2H), 3.78 – 3.71 (m, 1H), 3.62 (dt, $J = 10.3, 7.1$ Hz, 1H), 3.39 – 3.30 (m, 2H), 2.96 – 2.87 (m, 4H), 2.51 – 2.35 (m, 3H), 2.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.26 – 2.19 (m, 1H), 2.10 – 1.91 (m, 14H, AcOH), 1.91 – 1.78 (m, 2H), 1.78 – 1.71 (m, 1H), 1.70 – 1.58 (m, 3H), 1.53 (d, $J = 3.6$ Hz, 3H), 1.42 – 1.34 (m, 2H), 1.33 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.30 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.94 – 0.88 (m, 6H), 0.88 – 0.83 (m, 9H), 0.82 – 0.79 (m, 3H).

化合物 8: Pro-Ala-Ala-Glu-Gly-Val-Gly-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.30 – 8.24 (m, 3H), 8.15 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.11 – 8.03 (m, 2H), 7.94 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J = 9.4$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.44 – 3.99 (m, 10H), 3.82 – 3.57 (m, 7H), 2.94 – 2.69 (m, 5H), 2.47 – 2.41 (m, 1H), 2.41 – 2.32 (m, 1H), 2.21 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.03 – 1.79 (m, 11H, AcOH), 1.78 – 1.26 (m, 14H), 1.19 (dd, $J = 6.9, 4.7$ Hz, 6H), 0.87 – 0.76 (m, 18H).

化合物 9: Pro-Ala-Ala-Glu-Gly-Val-Gly-Leu

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.29 – 8.23 (m, 2H), 8.22 – 8.14 (m, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.32 – 4.08 (m, 5H), 3.78 – 3.69 (m, 4H), 3.63 (dd, *J* = 16.4, 5.6 Hz, 1H), 2.98 – 2.86 (m, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.07 – 1.92 (m, 2H), 1.92 – 1.86 (m, 1H), 1.79 – 1.64 (m, 4H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.50 – 1.40 (m, 2H), 1.19 (dd, *J* = 7.0, 1.3 Hz, 6H), 0.86 – 0.78 (m, 12H).

化合物 10: Pro-Ala-Ala-Gln-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.28 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.95 (t, 2H), 7.58 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 15.3 Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.45 (q, *J* = 13.6, 7.9 Hz, 1H), 4.39 (dd, *J* = 8.3, 4.1 Hz, 1H), 4.33 – 4.20 (m, 6H), 4.20 – 4.09 (m, 2H), 4.09 – 4.02 (m, 1H), 3.69 – 3.47 (m, 5H), 2.86 (dt, *J* = 10.2, 6.7 Hz, 1H), 2.80 – 2.62 (m, 3H), 2.46 – 2.40 (m, 1H), 2.37 (dd, *J* = 15.5, 2.7 Hz, 1H), 2.14 – 2.03 (m, 4H), 2.02 – 1.76 (m, 16H, AcOH), 1.75 – 1.39 (m, 13H), 1.39 – 1.22 (m, 2H), 1.22 – 1.11 (m, 6H), 1.00 – 0.68 (m, 18H).

化合物 11: Pro-Ala-Ala-Asp-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.26 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.70 (q, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 1H), 4.37 – 4.21 (m, 7H), 4.16 – 4.10 (m, 2H), 4.09 – 4.03 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 2H), 3.68 – 3.59 (m, 4H), 3.49 – 3.45 (m, 1H), 2.99 – 2.84 (m, 3H), 2.80 – 2.71 (m, 2H), 2.63 (dd, *J* = 16.5, 7.5 Hz, 1H), 2.46 – 2.25 (m, 4H), 2.07 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.05 – 1.76 (m, 20H, AcOH), 1.74 – 1.58 (m, 6H), 1.56 – 1.42 (m, 5H), 1.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.88 – 0.74 (m, 18H).

化合物 12: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Phe-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.25 – 7.19 (m, 4H), 7.18 – 7.12 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 4.54 – 4.44 (m, 2H), 4.37 (q, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.33 – 4.21 (m, 5H), 4.19 – 4.10 (m, 2H), 4.09 – 4.02 (m, 1H), 3.64 – 3.53 (m, 5H), 3.51 – 3.45 (m, 2H), 3.00 (dd, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.89 – 2.82 (m, 2H), 2.80 – 2.71 (m, 3H), 2.46 – 2.36 (m, 2H), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.08 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.00 – 1.70 (m, 18H, AcOH), 1.69 – 1.64 (m, 2H), 1.63 – 1.56 (m, 2H), 1.55 – 1.47 (m, 3H), 1.34 (s, 2H), 1.16 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.87 – 0.76 (m, 12H).

化合物 26: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.25 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.53 – 4.46 (m, 1H), 4.39 (dd, *J* = 8.3, 4.2 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 8.4, 3.8 Hz, 1H), 4.31 – 4.19 (m, 3H), 4.13 (dd, *J* = 15.1, 7.7 Hz, 1H), 3.71 – 3.49 (m, 5H), 2.94 – 2.77 (m, 2H), 2.33 – 2.20 (m, 2H), 2.06 – 1.77 (m, 13H, AcOH), 1.77 – 1.56 (m, 6H), 1.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.25 – 1.11 (m, 6H), 0.95 – 0.76 (m, 12H).

化合物 27: Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.61 (dd, *J* = 9.6, 4.4 Hz, 1H), 4.44 – 4.22 (m, 8H), 4.09 – 3.99 (m, 2H), 3.85 – 3.72 (m, 2H), 3.69 – 3.57 (m, 2H), 2.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.79 – 2.63 (m, 2H), 2.43 –

2.16 (m, 7H), 2.09 – 1.74 (m, 19H, AcOH), 1.73 – 1.47 (m, 7H), 1.48 – 1.13 (m, 6H), 1.00 – 0.79 (m, 21H).

化合物 28: Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.28 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.13 – 7.87 (m, 3H), 7.57 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.40 – 4.31 (m, 2H), 4.29 – 4.21 (m, 2H), 4.19 – 4.02 (m, 3H), 3.67 – 3.60 (m, 1H), 3.59 – 3.53 (m, 2H), 2.92 – 2.85 (m, 1H), 2.80 – 2.70 (m, 3H), 2.47 – 2.38 (m, 1H), 2.38 – 2.31 (m, 1H), 2.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.04 – 1.76 (m, 14H, AcOH), 1.74 – 1.41 (m, 11H), 1.41 – 1.14 (m, 2H), 0.91 – 0.74 (m, 18H).

化合物 30: Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.29 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.42 – 4.38 (m, 1H), 4.37 – 4.28 (m, 2H), 4.09 (dd, $J = 14.2, 8.5$ Hz, 1H), 3.66 – 3.46 (m, 5H), 2.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.13 – 1.71 (m, 16H, AcOH), 1.71 – 1.58 (m, 2H), 1.53 – 1.32 (m, 2H), 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.90 – 0.83 (m, 9H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

化合物 31: Glu-Pro-Val-Pro-Leu 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7.94 – 7.86 (m, 2H), 4.44 (dd, $J = 8.3, 4.5$ Hz, 1H), 4.37 – 4.27 (m, 2H), 4.13 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.74 – 3.69 (m, 1H), 3.66 – 3.42 (m, 4H), 2.40 – 2.25 (m, 2H), 2.06 – 1.58 (m, 17H, AcOH), 1.46 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 0.89 – 0.84 (m, 9H), 0.81 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

化合物 32: Pro-Val-Pro-Leu 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.15 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.35 (dt, $J = 10.1, 5.2$ Hz, 2H), 4.22 – 4.02 (m, 1H), 3.67 – 3.59 (m, 2H), 3.56 (q, $J = 13.2, 9.3$ Hz, 1H), 2.96 – 2.88 (m, 1H), 2.86 – 2.76 (m, 1H), 2.05 – 1.59 (m, 11H, AcOH), 1.59 – 1.42 (m, 2H), 0.91 – 0.72 (m, 12H).

化合物 34: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.01 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.49 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.31 – 4.22 (m, 3H), 3.75 (dd, $J = 7.8, 4.7$ Hz, 1H), 3.70 – 3.61 (m, 2H), 2.88 – 2.81 (m, 1H), 2.81 – 2.75 (m, 1H), 2.27 – 2.13 (m, 2H), 2.01 – 1.64 (m, 18H, AcOH), 1.58 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.17 (dd, $J = 10.2, 7.1$ Hz, 6H), 0.78 (dd, $J = 6.9, 3.5$ Hz, 6H).

化合物 35: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.28 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.49 (dd, $J = 13.7, 7.7$ Hz, 1H), 4.35 – 4.13 (m, 3H), 3.76 – 3.50 (m, 3H), 2.97 – 2.79 (m, 2H), 2.33 – 2.18 (m, 2H), 2.16 – 1.77 (m, 10H, AcOH), 1.73 – 1.58 (m, 4H), 1.26 – 1.13 (m, 6H).

化合物 45: Ala-Glu-Pro-Val 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.36 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.65 – 4.53 (m, 1H), 4.35 (dd, $J = 8.6, 3.4$ Hz, 1H), 3.89 (dd, $J = 7.9, 5.4$ Hz, 1H), 3.74 – 3.53 (m, 3H), 2.38 – 2.19 (m, 2H), 2.05 – 1.64 (m, 10H, AcOH), 1.27 – 1.17 (m, 3H), 0.83 (d, $J = 7.1$ Hz, 6H).

化合物 48: Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.33 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.27 (d, 1H), 8.21 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.10

(d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.05 – 7.97 (m, 2H), 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.53 – 4.47 (m, 1H), 4.38 (dd, $J = 8.2, 4.2$ Hz, 1H), 4.35 – 4.20 (m, 5H), 4.18 – 4.09 (m, 2H), 4.06 (s, 1H), 3.75 – 3.50 (m, 8H), 2.93 – 2.69 (m, 5H), 2.45 – 2.41 (m, 1H), 2.41 – 2.30 (m, 1H), 2.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.01 – 1.76 (m, 15H, AcOH), 1.74 – 1.53 (m, 8H), 1.53 – 1.40 (m, 4H), 1.33 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.20 (t, $J = 9.0$ Hz, 3H), 0.91 – 0.73 (m, 18H).

化合物 50: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-leu-Val-Lys-Gln-Asn 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.17 – 8.06 (m, 2H), 8.05 – 7.99 (m, 2H), 7.97 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 15.7$ Hz, 2H), 4.48 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.1, 4.3$ Hz, 1H), 4.35 – 4.19 (m, 6H), 4.17 – 4.10 (m, 1H), 4.05 – 3.97 (m, 2H), 3.67 – 3.48 (m, 6H), 2.92 – 2.78 (m, 2H), 2.78 – 2.66 (m, 3H), 2.44 – 2.34 (m, 1H), 2.33 – 2.20 (m, 3H), 2.07 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.01 – 1.76 (m, 15H, AcOH), 1.75 – 1.62 (m, 6H), 1.62 – 1.53 (m, 3H), 1.49 – 1.29 (m, 6H), 1.19 – 1.12 (m, 6H), 0.91 – 0.73 (m, 18H).

化合物 51: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-leu-Val-Val-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.03 – 7.96 (m, 2H), 7.95 – 7.89 (m, 2H), 7.78 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 1H), 7.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.51 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.40 (dd, $J = 8.2, 4.2$ Hz, 1H), 4.35 – 4.12 (m, 10H), 4.01 – 3.95 (m, 1H), 3.69 – 3.51 (m, 4H), 3.09 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.45 – 2.40 (m, 1H), 2.39 – 2.34 (m, 1H), 2.27 (dd, $J = 13.4, 6.7$ Hz, 2H), 2.21 – 2.13 (m, 1H), 2.06 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.02 – 1.75 (m, 18H, AcOH), 1.75 – 1.58 (m, 5H), 1.44 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.22 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.85 (dd, $J = 6.5, 2.7$ Hz, 6H), 0.83 – 0.77 (m, 15H).

化合物 52: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Val-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.28 (s, 1H), 8.17 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.99 – 7.92 (m, 2H), 7.87 (dd, $J = 16.4, 8.8$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.50 – 4.45 (m, 1H), 4.44 – 4.35 (m, 2H), 4.32 – 4.21 (m, 4H), 4.18 – 4.10 (m, 3H), 4.08 – 3.99 (m, 1H), 3.66 – 3.49 (m, 6H), 2.90 – 2.82 (m, 1H), 2.82 – 2.72 (m, 3H), 2.46 – 2.30 (m, 2H), 2.27 – 2.23 (m, 1H), 2.07 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.01 – 1.76 (m, 19H, AcOH), 1.75 – 1.60 (m, 5H), 1.60 – 1.45 (m, 5H), 1.39 – 1.25 (m, 2H), 1.20 – 1.10 (m, 6H), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.86 – 0.76 (m, 15H).

化合物 56: Pro-Ile-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.27 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 8.05 – 7.97 (m, 2H), 7.92 (q, $J = 13.5, 8.1$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.54 – 4.45 (m, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.3, 4.2$ Hz, 1H), 4.35 – 4.22 (m, 5H), 4.21 – 4.09 (m, 3H), 4.10 – 4.00 (m, 1H), 3.67 – 3.48 (m, 6H), 3.41 – 3.16 (m, 4H), 2.95 – 2.86 (m, 1H), 2.81 – 2.68 (m, 3H), 2.47 – 2.41 (m, 1H), 2.41 – 2.32 (m, 1H), 2.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.02 – 1.75 (m, 19H, AcOH), 1.75 – 1.55 (m, 9H), 1.54 – 1.36 (m, 5H), 1.33 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.15 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.89 – 0.784 (m, 8H), 0.82 – 0.76 (m, 14H).

化合物 57: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Glu-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.96 – 7.87 (m, 2H), 7.58 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 8.8$ Hz,

1H), 4.49 (q, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.2, 4.4$ Hz, 1H), 4.35 – 4.20 (m, 7H), 4.19 – 4.12 (m, 2H), 4.10 – 4.00 (m, 1H), 3.67 – 3.49 (m, 7H), 2.91 – 2.84 (m, 2H), 2.84 – 2.70 (m, 4H), 2.46 – 2.38 (m, 1H), 2.38 – 2.33 (m, 1H), 2.29 – 2.18 (m, 4H), 2.04 – 1.76 (m, 19H, AcOH), 1.76 – 1.55 (m, 8H), 1.55 – 1.41 (m, 5H), 1.32 (s, 2H), 1.21 – 1.11 (m, 6H), 0.94 – 0.73 (m, 18H).

化合物 58: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Asn-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.00 – 7.89 (m, 3H), 7.50 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 4.56 – 4.46 (m, 2H), 4.38 (dd, $J = 8.1, 4.3$ Hz, 1H), 4.35 – 4.20 (m, 6H), 4.18 – 4.12 (m, 1H), 4.04 – 4.00 (m, 1H), 3.66 – 3.49 (m, 6H), 2.93 – 2.84 (m, 1H), 2.83 – 2.71 (m, 3H), 2.43 – 2.31 (m, 3H), 2.25 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.04 – 1.57 (m, 26H, AcOH), 1.56 – 1.46 (m, 3H), 1.46 – 1.43 (m, 2H), 1.35 – 1.27 (m, 2H), 1.20 – 1.10 (m, 6H), 0.86 (dd, $J = 14.8, 7.9$ Hz, 9H), 0.81 – 0.76 (m, 9H).

化合物 60: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Glu 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.48 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.1, 4.3$ Hz, 1H), 4.34 – 4.18 (m, 7H), 4.18 – 4.10 (m, 1H), 4.07 – 3.99 (m, 1H), 3.83 (q, $J = 12.8, 6.5$ Hz, 2H), 3.69 – 3.48 (m, 7H), 2.92 – 2.83 (m, 1H), 2.81 – 2.62 (m, 4H), 2.31 – 2.02 (m, 7H), 2.01 – 1.75 (m, 22H, AcOH), 1.74 – 1.25 (m, 16H), 1.20 – 1.11 (m, 6H), 0.91 – 0.83 (m, 9H), 0.81 – 0.76 (m, 9H).

化合物 62: Pro-Ala-Ile-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Lys-Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.31 – 8.23 (m, 1H), 8.20 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.99 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.57 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.49 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.41 – 4.20 (m, 6H), 4.19 – 4.00 (m, 5H), 3.71 – 3.61 (m, 2H), 3.61 – 3.47 (m, 4H), 2.91 – 2.73 (m, 4H), 2.45 – 2.39 (m, 1H), 2.39 – 2.29 (m, 1H), 2.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.07 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.02 – 1.76 (m, 20H, AcOH), 1.74 – 1.47 (m, 12H), 1.47 – 1.29 (m, 5H), 1.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 0.89 – 0.84 (m, 8H), 0.83 – 0.72 (m, 16H).

化合物 66: Pro-Ala-Ala-Glu-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Arg -Gln-Asp 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.30 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.96 – 7.89 (m, 3H), 7.52 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.49 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.2, 4.3$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.31 – 4.21 (m, 5H), 4.20 – 4.10 (m, 3H), 3.68 – 3.49 (m, 6H), 3.13 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.00 – 2.93 (m, 1H), 2.92 – 2.85 (m, 1H), 2.83 – 2.76 (m, 1H), 2.41 – 2.32 (m, 1H), 2.25 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 2.09 – 2.03 (m, 2H), 2.02 – 1.76 (m, 20H, AcOH), 1.74 – 1.70 (m, 1H), 1.69 – 1.56 (m, 7H), 1.55 – 1.39 (m, 4H), 1.22 – 1.11 (m, 6H), 0.93 – 0.83 (m, 9H), 0.83 – 0.77 (m, 9H).

化合物 73: Val-Pro-Leu-Val 醋酸盐

^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 4.54 – 4.49 (m, 1H), 4.40 (dd, $J = 9.2, 6.0$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 3.99 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 10.7, 5.0$ Hz, 1H), 3.65 – 3.58 (m, 1H), 2.32 – 2.20 (m, 2H), 2.19 – 2.01 (m, 3H), 2.00 – 1.86 (m, 4H, AcOH), 1.85 – 1.75 (m, 1H), 1.69 – 1.54 (m, 2H),

1.12 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.03 – 1.01 (m, 3H), 0.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.93 – 0.89 (m, 9H).

实施例 2：多肽(化合物 1)对乙醇诱导的小鼠胃溃疡模型的抗溃疡作用

1、实验动物：SPF 级 C57BL/6 小鼠，成都药康生物科技有限公司，动物许可证号：

SCXK(川)2020-034

2、方法：实验动物适应性喂养后，小鼠按随机分组法分成 4 组，每组 10 只，即：对照组(空白组)、模型组(无水乙醇造模)、阳性药物组(替普瑞酮 160mg/kg)，化合物 1 组(1mg/kg)。动物分组后，对照组及模型组给予纯水治疗外，其它给药组给予相应药物治疗，每天一次，连续 8 天。第 7 天给药后所有动物禁食不禁水 24 h，于第 8 天给药 30 min 后对各组(除对照组外)小鼠经口灌胃给予 0.15 mL 的无水乙醇造模，1 h 后 CO₂ 过量吸入处死动物，结扎胃贲门和关闭幽门，摘取全胃。向胃体内注入 1%甲醛溶液 1 mL，结扎贲门，取出胃后即放入 1%甲醛溶液中固定 25 min。沿胃大弯剪开，生理盐水清洗干净胃内容物，平铺后计算溃疡指数。溃疡指数计算方法：条索状损伤长度大于 1 mm 者，测量其长度，每毫米计 1 分；若其宽度大于 1 mm，将计分按宽度的毫米数加倍；长度小于 1 mm 计 0.5 分，将计分相加得出该动物的溃疡指数。

3、结果：

在小鼠乙醇诱导的胃溃疡模型中，化合物 1 每天一次连续 8 天经口灌胃可显著使小鼠胃溃疡指数降低，且效果优于阳性药物组(表 6)，结果表明化合物 1 治疗胃溃疡作用显著。实验结果参见图 2。

表 6.受试药对乙醇致胃溃疡小鼠溃疡指数的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

分组	溃疡指数
对照组	1.84±1.62
模型组	35.32±23.30 ^{##}
替普瑞酮组:	13.42±7.61*
化合物 1 组	8.13±4.17**

注：与对照组相比，^{##}P<0.01；与模型组相比，*P<0.05，**P<0.01

实施例 3：实施例 1 获得的部分多肽样品对乙醇诱导的小鼠胃溃疡模型的抗溃疡作用

1、实验动物：SPF 级 C57BL/6 小鼠，成都药康生物科技有限公司，动物许可证号：

SCXK(川)2020-034

2、方法：

实验动物适应性喂养后，实验前 1 天给药后所有动物开始禁食不禁水 24 h。造模前实验

小鼠随机分组：空白组 5 只、模型组 10 只、各给药组每组 10 只，除空白组及模型组灌胃给予纯化水以外，给药组均按照 0.2mg/kg 的给药剂量灌胃给予不同受试样品，给药 1 小时后，各组小鼠经口灌胃给予 0.9ml/kg 的无水乙醇造模，1 h 后利用脱颈法处死动物，结扎胃贲门和夹闭幽门，摘取全胃。向胃体内注入 1% 甲醛溶液 1 mL，结扎贲门，取出胃后即放入 1% 甲醛溶液中。浸泡 30 min 后取出胃组织，沿胃大弯剪开，使用生理盐水冲洗干净胃内容物，平铺后观察并测定小鼠胃黏膜的损伤，计算溃疡指数和溃疡抑制率。

溃疡指数计算方法：条索状损伤长度大于 1 mm 者，测量其长度，每毫米计 1 分；若其宽度大于 1 mm，将计分按宽度的毫米数加倍；长度小于 1 mm 计 0.5 分，将计分相加得出该动物的溃疡指数。

溃疡抑制率=(模型组溃疡指数-给药组溃疡指数)/模型组溃疡指数×100%；

相对溃疡抑制率=(测试化合物溃疡抑制率)/(化合物 1 溃疡抑制率)。

3、结果：表 7 示出了本发明化合物的相对溃疡抑制率

表 7 小鼠乙醇造模单次给药抗溃疡活性

序号	抗溃疡活性*	25	ND	50	/
1	+++	26	+++	51	ND
2	ND	27	+++	52	ND
3	+++	28	+++	53	ND
4	ND	29	ND	54	ND
5	ND	30	+++	55	ND
6	ND	31	+++	56	-
7	ND	32	+++	57	++
8	+	33	ND	58	/
9	ND	34	/	59	ND
10	++++	35	+	60	ND
11	++	36	ND	61	ND
12	/	37	ND	62	ND
13	ND	38	+++	63	ND
14	ND	39	ND	64	+
15	ND	40	ND	65	ND
16	ND	41	ND	66	+
17	ND	42	ND	67	+
18	ND	43	ND	68	ND
19	ND	44	+	69	ND
20	ND	45	-	70	ND
21	ND	46	ND	71	ND
22	ND	47	ND	72	ND
23	ND	48	++	73	++
24	ND	49	ND		

*注释:

每个化合物的抗溃疡作用经多批试验完成。为便于比较, 抗溃疡活性以相对溃疡抑制率(每批试验都以化合物 1 作为对照组)的平均值表示。

$$\text{相对溃疡抑制率} = (\text{测试化合物溃疡抑制率}) / (\text{化合物 1 溃疡抑制率})$$

相对溃疡抑制率 > 1.20, 表示为“++++”;

相对溃疡抑制率为 0.9 - 1.20, 表示为“+++”;

相对溃疡抑制率为 0.6 - 0.9, 表示为“++”;

相对溃疡抑制率为 0.3 - 0.6, 表示为“+”;

0 < 相对溃疡抑制率 < 0.3, 表示为“-”(极低活性);

相对溃疡抑制率 < 0, 表示为“-”;

ND 表示未与化合物 1 进行对比。

实施例 4: 化合物 1 对小鼠胃类器官的影响

方法: 用健康野生型小鼠的胃窦上皮组织进行类器官(organoid)培养, 体视镜下将小鼠胃窦上皮层与肌肉层分离, 剪成 0.5mm 左右大小的小块, 放入到 2.5mM 的 EDTA/DPBS 中 4℃ 条件下进行消化, 约 1h。将消化后的胃腺上皮细胞过滤离心并弃掉上清, 所得的细胞沉淀重悬于基质胶中, 在培养皿中加入含生长因子的类器官培养基中进行培养, 对照组除生长因子外不加入受试药物, 实验组在与对照组相同培养条件加入化合物 1, 用倒置显微镜观察拍照其在 Day1、Day3、Day5 和 Day7 时成球和生长状况, 观察化合物 1 对类器官生长的影响。

结果: 与对照组相比, 随着时间的推移, 在含有化合物 1 的培养基中类器官的生长速率明显加快, 通过对类器官直径进行定量分析, 结果表明化合物 1 处理的类器官体积明显大于对照组(参见图 3, 图 3 中与对照组相比, *代表 $p < 0.05$), 可以显著促进类器官的增殖(统计数据也均有显著性差异)。提取化合物 1 处理的类器官 RNA, 通过实时荧光定量 PCR 检测分化相关的基因表达发现, 内分泌细胞标志物 SST 和 Gastrin、颈部粘液细胞标志物 TFF2 的 mRNA 水平明显上升(参见图 4)。这些结果表明多肽化合物 1 能促进胃类器官的增殖和分化, 说明化合物 1 参与并调控胃上皮干细胞的增殖和分化。

实施例 5: 化合物 1 对小鼠慢性萎缩性胃炎模型的治疗作用

方法：小鼠(Lgr5-GFP-CreERT 小鼠)慢性萎缩性胃炎采用 MNNG(N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍)联合雷尼替丁造模法：小鼠自由饮用含有 MNNG(100mg/ml)的水溶液，同时每日固定时间给小鼠按照 150mg/kg 的剂量灌胃雷尼替丁(8mg/ml)水溶液，持续 20 周。造模 20 周后小鼠饮用普通蒸馏水基础上，每日灌胃化合物 1(5mg/kg)，给药 2 周后观察化合物 1 对慢性萎缩性胃炎的治疗效果。

结果：组织染色结果显示，模型组小鼠的胃体部和胃窦部腺体结构紊乱，伴随着胃酸细胞($H^+-K^+-ATPase$ 阳性)细胞数目的减少，并且胃窦部的粘膜上皮高度下降。通过 2 周的化合物 1 治疗，与模型组相比，化合物 1 组小鼠的胃腺结构恢复正常，胃酸细胞数目显著增多，胃窦部粘膜高度基本恢复至正常状态，结果参见图 5。这些结果表明化合物 1 能够促进小鼠慢性萎缩性胃炎的修复。

在慢性萎缩性胃炎中，上皮的修复过程需要干细胞的参与。我们通过免疫荧光染色技术检测胃上皮干细胞(Lgr5⁺和 AQP5⁺)的改变。实验结果表明，与对照组相比，模型组的干细胞数目显著减少；与模型组相比，化合物 1 治疗组的增殖活跃的干细胞数目(PCNA 阳性的 Lgr5⁺细胞和 Ki67 阳性的 AQP5⁺细胞)也存在显著增加，统计结果均存在显著性差异，结果参见参看图 6。

实施例 6：化合物 1 对慢性萎缩性胃炎大鼠的治疗作用

1、实验动物

SPF 级 SD 大鼠 85 只，雌雄各半，体重 160-280g，由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供，许可证编号：SCXK(京)2016-0002。

2、实验方法

SD 大鼠 85 只，适应性喂养 1 周后，随机分为空白对照组 10 只和慢性萎缩性胃炎造模组(简称 CAG 组)75 只。空白对照组给予每日灌胃去离子水 5ml/kg，正常饮食，自由饮水。CAG 组给予每日灌胃 120 μ g/mL 的 MNNG(N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍)水溶液，5ml/kg，自由食用 0.03%雷尼替丁饲料，自由饮用 2%水杨酸钠自由饮水。第 15 周起每周禁食 18 小时后灌胃高热淀粉糊(5ml/kg，60-70℃)，且当日不再灌胃 MNNG，余处理同前。第 18 周起，每 2 周分别随机取非空白组雌雄大鼠各 2 只，取胃粘膜，病理切片观察至模型成功(固有腺体减少+肠化)，造模过程死亡 19 只大鼠。造模第 25 周将成模大鼠随机分为 3 组，模型组、化合物 1 高剂量组(3mg/kg)、化合物 1 低剂量组(1mg/kg)。正常对照组和模型组每日灌胃等量生理盐水，其它各组灌胃给予相应药物，给药 8 周。

试验期间每周定期检测大鼠体重变化，测定摄食量与饮水量，观察大鼠活动状态等。给药 8 周后，大鼠禁食不禁水 24 小时，10%水合氯醛 3.5ml/kg 腹腔注射麻醉。摘离全胃，迅速沿大弯侧剪开，生理盐水漂洗后，取全小弯侧及近大弯侧上至食管端下至十二指肠端的胃黏膜组织，于 10%中性福尔马林液固定，常规石蜡包埋切片，常规 HE 染色，进行病理结果分析。

所有数据均采用 SPSS23 软件进行处理。计量资料以 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验，若符合正态分布，以均数加减标准差($\bar{X} \pm S$)表示，多组间均值比较，采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，方差齐者用 LSD 法进行组间比较，方差不齐者采用 Dunnett's T3 法进行组间比较， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。若不符合正态分布，进行秩和检验，多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验，组间两两比较采用 Mann-Whitney 检验。等级资料同非正态分布检验方法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3、结果

3.1 大鼠一般情况

正常组大鼠体毛顺滑浓密，毛色洁白有光泽。活动度较高，对饲养笼搬动、投喂食水等活动以及声响反应度高。精神状态佳，灌胃、称重等操作时情绪稳定。模型组大鼠体毛枯槁稀疏，易脱落，毛色晦暗偏米黄。活动度低，喜蜷卧，对饲养笼搬动、投喂食水等活动以及声响反应度低，精神状态萎靡，灌胃、称重等操作时容易出现情绪波动以及抓咬撕挠实验操作者行为，化合物 1 低、高剂量组均有不同程度改善大鼠活动度、反应性等整体状态。

3.2 大鼠体重情况

给药 8 周后，各组雌鼠体重无明显差异。与正常组相比，模型组雄鼠体重明显减轻，有统计学意义($P < 0.05$)；与模型组相比，化合物 1 低剂量组、高剂量组雄鼠体重明显升高，有统计学意义($P < 0.05$)，其余各给药组体重差异无统计学意义，见表 8。

表 8.各组给药 8 周后体重(g)

组别	动物数量	雌鼠体重(均值)	雄鼠体重(均值)
空白对照组	10	364	602
模型组	12	369	446 [#]
化合物 1 高	14	396	637 [*]
化合物 1 低	14	374	532 [*]

注：[#]与正常组相比有显著性差异($P < 0.05$)；^{*}与模型组相比有显著性差异($P < 0.05$)。

3.3 病理结果

大鼠胃黏膜病理切片显微镜下观察：正常组大鼠黏膜各层结构清晰，腺体排列紧密、整齐，黏膜层未见慢性炎症；模型组大鼠胃黏膜见炎细胞浸润，黏膜肌增生，固有层腺体不同程度减少，排列稀疏不规则，部分腺体扩张，未见肠上皮化生，少数见异型增生。与正常组相比，模型组炎症及萎缩评分明显增高($P<0.05$)；与模型组相比，化合物 1 低、高剂量组可显著改善大鼠胃黏膜炎症、萎缩程度($P<0.05$)。结果参见图 7。

实施例 7：化合物 1 对 HaCAT 细胞增殖的促进作用

方法：将 HaCAT 细胞浓度调整为 $1.0\times 10^5\sim 5.0\times 10^5/\text{mL}$ 进行传代培养，于 37°C ，5% CO_2 条件下培养 24~36 小时用于生物学活性检测。用胰酶消化并收集细胞，用无血清培养基配成浓度 $2.5\times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μL ，即 2500 个细胞/孔，于 37°C ，5% CO_2 条件下培养过夜。再加入 50 μL 用无血清培养基配制化合物溶液，使化合物 1 终浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；同时设置 EGF 对照组，即加入 50 μL 用无血清培养基配制的重组人表皮生长因子(EGF)溶液，终浓度为 100 ng/mL；模型对照组，即加入等体积的无血清培养基。于 37°C ，5% CO_2 条件下培养 72 小时，采用 CellTiter-Glo®试剂盒检测 HaCAT 细胞株增殖情况。

结果：如图 8 所示，0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 化合物 1 对 HaCAT 细胞具有显著的促增殖作用，表明化合物 1 对于表皮生长和皮肤损伤修复有较好的作用。图 8 中，与模型对照组相比，*代表 $p<0.05$ ，**代表 $p<0.01$ 。

实施例 8：化合物 1 及化合物 26 对斑马鱼血管损伤的修复作用

方法：转基因血管绿色荧光斑马鱼(Fli-1)的血管被绿色荧光蛋白标记，在荧光显微镜下清晰可见(图 9，图 9 中虚线框(原图为黄色)为分析部位肠下血管，箭头(原图为白色)指向为肠下血管分支)，成为观察血管变化的模式生物。Fli-1 斑马鱼，以自然成对交配繁殖方式进行。随机选取受精后 1 天的 Fli-1 斑马鱼于 6 孔板中，每孔(实验组)30 尾。正常对照组用标准稀释水处理斑马鱼，其余各实验组水溶给予辛伐他汀诱导 3 小时建立斑马鱼微血管缺失模型。3 小时后，所有组别水溶液替换为标准稀释水，终止辛伐他汀诱导。受试药物组分别静脉注射给予化合物 1(500 ng/尾)或化合物 26(500 ng/尾)， 28°C 处理 2 天。每组随机选取 10 尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照，用 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件分析并采集数据，分析肠下血管分支数。

结果：模型组可见肠下血管分支数量减少。**化合物 1** 和**化合物 26** 静脉注射可以显著逆转辛伐他汀造成的肠下微血管缺失，恢复斑马鱼肠下血管的分支数量。表明**化合物 1** 和**化合物 26** 可以促进血管的损伤后修复(图 10 和 11)。图 11 中，与模型对照组比较，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。

实施例 9：部分多肽样品的胃、肠稳定性试验

方法：取待测样品(化合物 1、化合物 26、化合物 27、化合物 28 及 EGF)各 1mg，加水 1ml 溶解。取样品溶液 100ul，加水 900ul，混匀，作为对照品溶液。取样品溶液各 100ul，分别加人工胃液(W)、人工肠液(X)、聚维酮碘溶液(I)、过氧化氢溶液(O)900ul，37℃恒温水浴 1 小时，放冷，滤过，作为供试品溶液，用高效液相色谱法分别检测处理前及处理后的样品峰面积,试验结果以样品的峰面积进行对比计算。以水稀释后不做任何处理的原液作为对照，对比统计其他供试品溶液相应位置的峰面积(含量)变化情况。

表 9 多肽样品的胃、肠稳定性试验

编号	W 保留 %	X 保留 %	I 保留 %	O 保留 %
化合物 1	96	0	101	100
化合物 26	100	103	101	102
化合物 27	97	0	100	101
化合物 28	96	0	99	99
EGF	0	0	0	0

注：W 表示人工胃液，X 表示人工肠液，I 表示聚维酮碘溶液，O 表示过氧化氢溶液

结果：如表 9 所示，4 个供试品(**化合物 1、26、27 和 28**)对人工胃液(W)、聚维酮碘溶液(I)和过氧化氢溶液(O)都 100%保留，说明很稳定；**化合物 26** 对人工肠液(X)也极其的稳定；EGF 在胃液和肠液里都没有保留，说明在胃液和肠液中不稳定，聚维酮碘溶液和过氧化氢溶液消毒后涂抹 EGF 外用也会被破坏。

实施例 10：化合物 1 对阿司匹林诱导的大鼠胃溃疡的影响

方法：SD 大鼠适应性喂养后，按 Excel 完全随机分组法分成 3 组(每组 10 只)，即：对照组、模型组、化合物 1(0.3 mg/kg)组。动物分组后，开始给予相应处理(对照组及模型组给予同体积纯化水，化合物 1 组给予相应药物治疗)，每天一次，连续 8 天。第 7 天给药后，所有动物禁食不禁水 24 h。第 8 天除对照组外，化合物 1 组及模型组大鼠给药(或

水)30 min 后经口灌胃给予 250 mg/kg 阿司匹林溶液造模。造模 4 h 后，处死动物，结扎贲门和夹闭幽门，摘取全胃。向胃体内注入 1%甲醛溶液 8 mL，结扎幽门，取出胃后即放入 1%甲醛溶液中固定，30 min 后沿胃大弯剪开，生理盐水清洗干净胃内容物，将胃平铺后，观察并拍摄胃全景照片，测定溃疡面积。

结果：每天 1 次连续 8 天经口灌胃给予化合物 1(0.3mg/kg)对阿司匹林诱导胃溃疡模型大鼠的体重变化无明显影响，化合物 1 减少了阿司匹林诱导的胃溃疡模型大鼠胃部出血点，显著降低大鼠胃溃疡面积。表 10 示出了化合物 1 对阿司匹林诱导的大鼠胃溃疡的影响。

表 10 化合物 1 对阿司匹林诱导的大鼠胃溃疡的影响。

组别/给药	溃疡面积(mm ²)
对照组:	7.42±7.32
模型组:	140.36±82.40 ^{##}
化合物 1 组:	20.55±10.45 ^{**}

注：^{##}与对照组相比， $p<0.01$ ；^{**}与模型组相比， $p<0.01$

尽管本发明披露了上述实施例，但本发明的实施方式并不限于上述实施例，其他的任何未背离本发明的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式均包含在本发明的保护范围之内。