



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114478744 A

(43) 申请公布日 2022.05.13

(21) 申请号 202011268045.9

(22) 申请日 2020.11.13

(71) 申请人 成都奥达生物科技有限公司

地址 610041 四川省成都市高新区科园南路88号12栋5层511号

(72) 发明人 周述靓 王鹏 邓岚 潘文强

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 温可睿

(51) Int. Cl.

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

权利要求书1页 说明书17页

(54) 发明名称

一种长效GLP-1拮抗剂

(57) 摘要

本发明涉及医药合成领域,公开了一种长效GLP-1拮抗剂。本发明所述长效GLP-1拮抗剂,用于制备治疗疾病的药物组合物,所述药物组合物用于高胰岛素血症低血糖症和术后低血糖症的治疗。

1. 具有结构式I的长效GLP-1拮抗剂:

Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-
Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-
Pro-Pro-Pro-Ser-AA1-AA2 (R1) -AA3 (R2) -AA4

结构I

结构I中的AA1为 $\text{PEG}_{m1}(\text{CH}_2)_{m2}\text{CO}-$,或为不存在;

其中: $m1$ 为1至10的整数;

$m2$ 为1至5的整数;

结构I中的AA2不存在时,AA3为Cys;

结构I中的AA3不存在时,AA2为Lys,或为Dah,或为Orn,或为Dab,或为Dap;

结构I中的AA4为 NH_2 ,或为OH;

结构I中的R1为丁二酸胆固醇单酯,或为2-胆固醇乙酸,或为2-胆固醇丙酸,或为3-胆固醇丙酸,或2-胆固醇丁酸,或为2-胆固醇异丁酸,或为3-胆固醇丁酸,或为3-胆固醇异丁酸,4-胆固醇丁酸,或为2-胆固醇戊酸,或为2-胆固醇异戊酸,或为3-胆固醇戊酸,或为5-胆固醇戊酸,或为2-胆固醇己酸,或为6-胆固醇己酸,或为2-胆固醇庚酸,或为7-胆固醇庚酸,或为2-胆固醇辛酸,或为8-胆固醇辛酸,或为 $\text{HO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{n1}\text{CO}-(\gamma\text{Glu})_{n2}-(\text{PEG}_{n3}(\text{CH}_2)_{n4}\text{CO})_{n5}-$;

其中: $n1$ 为10至20的整数;

$n2$ 为1至5的整数;

$n3$ 为1至30的整数;

$n4$ 为1至5的整数;

$n5$ 为1至5的整数;

结构I中的R2为2-乙酸胆固醇酯,或为2-丙酸胆固醇酯,或为3-丙酸胆固醇酯,2-丁酸胆固醇酯,或为2-异丁酸胆固醇酯,或为3-胆固醇丁酸胆固醇酯,或为3-异丁酸胆固醇酯,4-丁酸胆固醇酯,或为2-戊酸胆固醇酯,或为2-异戊酸胆固醇酯,或为3-戊酸胆固醇酯,或为5-戊酸胆固醇酯,或为2-己酸胆固醇酯,或为6-己酸胆固醇酯,或为2-庚酸胆固醇酯,或为7-庚酸胆固醇酯,或为2-辛酸胆固醇酯,或为8-辛酸胆固醇酯。

2. 根据权利要求1所述的长效GLP-1拮抗剂,包含该类似物所成的可药用的盐、溶剂化物、螯合物或非共价复合物,基于该化合物基础上的药物前体,或上述形式的任意混合物。

3. 权利要求1或2所述的长效GLP-1拮抗剂在制备治疗疾病的药物中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述疾病为高胰岛素血症低血糖症和/或术后低血糖症的治疗。

一种长效GLP-1拮抗剂

技术领域

[0001] 本发明涉及药物技术领域,尤其涉及一种长效GLP-1拮抗剂。

背景技术

[0002] 胰岛素是机体所分泌用于控制高血糖的主要生理激素,胰岛素分泌的异常增加可导致严重的低血糖症,该病可导致严重的并发症,包括癫痫发作、脑损伤和昏迷。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是一种胃肠道激素,在餐后从肠道L细胞释放出来。GLP-1结合至胰腺β细胞上的GLP-1受体并增加胰岛素的释放。在术后低血糖症患者中,GLP-1介导的胰岛素分泌被功能失调地放大。

[0003] 在美国,每年大约有15-20万人会进行减肥外科手术,同时欧盟也有10万多例。据估计,在美国和欧盟分别有3万和2.5万例术后低血糖症患者。随着治疗肥胖及相关并发症的减肥外科手术数量的增加,经历术后低血糖症的患者人数也在增加,其症状通常发生在术后一年或多年后。术后低血糖症在不同的患者身上会出现不同程度的疾病变化,重度低血糖会导致神经低血糖症(精神状态改变、意识丧失、癫痫发作、昏迷),并且无法通过调整饮食对其进项改善。重度术后低血糖症严重影响患者的生活质量。目前还没有被批准治疗术后低血糖症的方法。

[0004] Avexitide是一种31个氨基酸的肽,选择性地靶向和阻断GLP-1受体,使胰岛素分泌正常化,从而减少餐后低血糖,是一种术后低血糖症的新型治疗方法。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是回肠内分泌细胞分泌的一种脑肠肽,GLP-1结合至胰腺β细胞上的GLP-1受体并增加胰岛素的释放。在术后低血糖症患者中,GLP-1介导的胰岛素分泌被功能失调地放大。

[0005] 由于Avexitide在体内半衰期短,患者每天需要大剂量用药,患者顺应性差,临床费用高。本发明的目的就是为患者提供长效的GLP-1拮抗剂,减少给药频率,降低患者费用。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种长效GLP-1拮抗剂,其半衰期可达9.2h。

[0007] 本发明提供了式II所示的保护基;

[0008] -AA1-AA2 (R1) -AA3 (R2) -AA4

[0009] 结构II

[0010] 其中,AA1为 $\text{PEG}_{m1}(\text{CH}_2)_{m2}\text{CO}-$,或为不存在;

[0011] $m1$ 为1至10的整数;

[0012] $m2$ 为1至5的整数;

[0013] AA2不存在时,AA3为Cys;

[0014] AA3不存在时,AA2为Lys,或为Dah,或为Orn,或为Dab,或为Dap;

[0015] AA4为 NH_2 ,或为OH;

[0016] R1为丁二酸胆固醇单酯,或为2-胆固醇乙酸,或为2-胆固醇丙酸,或为3-胆固醇丙

酸,或2-胆固醇丁酸,或为2-胆固醇异丁酸,或为3-胆固醇丁酸,或为3-胆固醇异丁酸,4-胆固醇丁酸,或为2-胆固醇戊酸,或为2-胆固醇异戊酸,或为3-胆固醇戊酸,或为5-胆固醇戊酸,或为2-胆固醇己酸,或为6-胆固醇己酸,或为2-胆固醇庚酸,或为7-胆固醇庚酸,或为2-胆固醇辛酸,或为8-胆固醇辛酸,或为 $\text{H}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{n1}\text{CO}-(\gamma\text{Glu})_{n2}-(\text{PEG}_{n3}(\text{CH}_2)_{n4}\text{CO})_{n5}-$;

[0017] 其中: n_1 为10至20的整数;

[0018] n_2 为1至5的整数;

[0019] n_3 为1至30的整数;

[0020] n_4 为1至5的整数;

[0021] n_5 为1至5的整数。

[0022] R_2 为2-乙酸胆固醇酯,或为2-丙酸胆固醇酯,或为3-丙酸胆固醇酯,2-丁酸胆固醇酯,或为2-异丁酸胆固醇酯,或为3-胆固醇丁酸胆固醇酯,或为3-异丁酸胆固醇酯,4-丁酸胆固醇酯,或为2-戊酸胆固醇酯,或为2-异戊酸胆固醇酯,或为3-戊酸胆固醇酯,或为5-戊酸胆固醇酯,或为2-己酸胆固醇酯,或为6-己酸胆固醇酯,或为2-庚酸胆固醇酯,或为7-庚酸胆固醇酯,或为2-辛酸胆固醇酯,或为8-辛酸胆固醇酯。

[0023] 一些实施例中,式II所示保护基为-Lys(AEEA-AEEA- γGlu -十八烷二酸)- NH_2 、-Lys($\text{PEG}_5\text{CH}_2\text{CO}-\gamma\text{Glu}$ -十八烷二酸)- NH_2 、-Cys(2-乙酸胆固醇酯)- NH_2 、-Lys(丁二酸胆固醇单酯)- NH_2 、-AEEA-Lys(丁二酸胆固醇单酯)- NH_2 或- $\text{PEG}_5\text{CH}_2\text{CO}-\text{Lys}$ (丁二酸胆固醇单酯)- NH_2 。

[0024] 式II所示保护基在延长Avexitide的半衰期中的应用。

[0025] 式II所示保护基连接在Avexitide的C端。

[0026] 本发明还提供了一种长效GLP-1拮抗剂,其如结构I所示:

[0027] Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-

[0028] Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

[0029] Pro-Pro-Pro-Ser-AA1-AA2(R_1)-AA3(R_2)-AA4

[0030] 结构I

[0031] 结构I中的AA1为 $\text{PEG}_{m1}(\text{CH}_2)_{m2}\text{CO}-$,或为不存在;

[0032] 其中: m_1 为1至10的整数;

[0033] m_2 为1至5的整数;

[0034] 结构I中的AA2不存在时,AA3为Cys;

[0035] 结构I中的AA3不存在时,AA2为Lys,或为Dah,或为Orn,或为Dab,或为Dap;

[0036] 结构I中的AA4为 NH_2 ,或为OH;

[0037] 结构I中的 R_1 为丁二酸胆固醇单酯,或为2-胆固醇乙酸,或为2-胆固醇丙酸,或为3-胆固醇丙酸,或2-胆固醇丁酸,或为2-胆固醇异丁酸,或为3-胆固醇丁酸,或为3-胆固醇异丁酸,4-胆固醇丁酸,或为2-胆固醇戊酸,或为2-胆固醇异戊酸,或为3-胆固醇戊酸,或为5-胆固醇戊酸,或为2-胆固醇己酸,或为6-胆固醇己酸,或为2-胆固醇庚酸,或为7-胆固醇庚酸,或为2-胆固醇辛酸,或为8-胆固醇辛酸,或为

[0038] $\text{H}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{n1}\text{CO}-(\gamma\text{Glu})_{n2}-(\text{PEG}_{n3}(\text{CH}_2)_{n4}\text{CO})_{n5}-$;

[0039] 其中: n_1 为10至20的整数;

[0040] n_2 为1至5的整数;

[0041] n3为1至30的整数；

[0042] n4为1至5的整数；

[0043] n5为1至5的整数。

[0044] 结构I中的R2为2-乙酸胆固醇酯,或为2-丙酸胆固醇酯,或为3-丙酸胆固醇酯,2-丁酸胆固醇酯,或为2-异丁酸胆固醇酯,或为3-胆固醇丁酸胆固醇酯,或为3-异丁酸胆固醇酯,4-丁酸胆固醇酯,或为2-戊酸胆固醇酯,或为2-异戊酸胆固醇酯,或为3-戊酸胆固醇酯,或为5-戊酸胆固醇酯,或为2-己酸胆固醇酯,或为6-己酸胆固醇酯,或为2-庚酸胆固醇酯,或为7-庚酸胆固醇酯,或为2-辛酸胆固醇酯,或为8-辛酸胆固醇酯。

[0045] 本发明所述的长效GLP-1拮抗剂在制备治疗疾病的药物中的应用。

[0046] 本发明中,所述疾病为高胰岛素血症低血糖症和/或术后低血糖症的治疗。

[0047] 本发明提供了多肽的保护基团,该保护基团连接于Avexitide的C端,能够延长Avexitide的半衰期,且不影响Avexitide的生理活性或稳定性。一些结构中,将该保护基团连接于Avexitide的C端,能够延长Avexitide的半衰期,且提高Avexitide的生理活性或稳定性。

具体实施方式

[0048] 本发明提供了一种长效GLP-1拮抗剂,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0049] 本发明所述的长效GLP-1拮抗剂,包含所成的可药用的盐、溶剂化物、螯合物或非共价复合物,基于该化合物基础上的药物前体,或上述形式的任意混合物。

[0050] 本发明还提供了包括根据本发明化合物的药物组合物,以及提供了本发明化合物的药物组合物用于制备治疗疾病的药物用途。

[0051] 进一步地,所述药物组合物用于高胰岛素血症低血糖症和术后低血糖症的治疗。

[0052] 本发明所涉及到的更多内容在以下有详细描述,或者有些也可以在本发明的实施例中体会。

[0053] 除非另有所指,本文中所用来表示不同成分的数量、反应条件,在任意情况下都可解读为“大致的”、“大约的”意思。相应的,除有明确的特指外,在下述以及权利要求中所引用的数字参数都是大致的参数,在各自的实验条件下由于标准误差的不同,有可能会得到不同的数字参数。

[0054] 本文中,当一个化合物的化学结构式和化学名称有分歧或疑义时,以化学结构式确切定义此化合物。本文所描述的化合物有可能含有一个或多个手性中心,和/或者双键以及诸如此类的结构,也可能存在立体异构体,包括双键的异构体(比如几何异构体)、旋光对映异构体或者非对映异构体。相应的,在本文描述范围内的任意化学结构,无论是部分或整体结构中含有上述类似结构,都包括了此化合物的所有可能的对映异构体和非对映异构体,其中也包括了单纯的任一种立体异构体(如单纯的几何异构体、单纯的对映异构体或者单纯的非对映异构体)以及这些异构体的任意一种混合物。这些消旋异构体和立体异构体

的混合物由本领域技术人员利用不停的分离技术或手性分子合成的方法也可进一步被拆分成其组成成分的对映异构体或立体异构体。

[0055] 结构式I的化合物包含了,但并不仅限于,这些化合物的光学异构体、消旋体和/或其他的混合物。上述情况下,其中单一的对映异构体或非对映异构体,如有旋光的异构体,可以用不对称合成的方法或消旋体拆分的方法获得。消旋体的拆分可用不同的方法实现,如常规的用助拆分的试剂重结晶,或用色谱方法。另外,结构式I的化合物也包含了带双键的顺式和/或反式的异构体。

[0056] 本发明所述化合物包含但不限于,结构式I所示化合物以及他们所有的在药学上可用的不同形式。这些化合物的药学上可用的不同形式包括各种可药用的盐、溶剂化物、络合物、螯合物、非共价的复合物、基于上述物质基础上的药物前体和上述这些形式的任意混合物。

[0057] 本发明中涉及的英文缩写所对应的中文名称如表1所示:

[0058] 表1

英文缩写	中文名称	英文缩写	中文名称
Fmoc	9-芴甲氧羰基	OtBu	叔丁氧基
tBu	叔丁基	Boc	叔丁氧羰酰基
Trt	三苯甲基	Pbf	(2,3-二氢-2,2,4,6,7-五甲基苯并呋喃-5-基)磺酰基
Ala	丙氨酸	Leu	亮氨酸
Arg	精氨酸	Lys	赖氨酸
Asn	天冬酰胺	Met	甲硫氨酸

[0059]

Asp	天冬氨酸	Phe	苯丙氨酸
Cys	半胱氨酸	Pro	脯氨酸
Gln	谷酰胺	Ser	丝氨酸
Glu	谷氨酸	Thr	苏氨酸
Gly	甘氨酸	Trp	色氨酸
His	组氨酸	Tyr	酪氨酸
Ile	异亮氨酸	Val	缬氨酸
Dap	2,3-二氨基丙酸	Dab	2,4-二氨基丁酸
Orn	鸟氨酸	Dah	2,7-二氨基庚酸
Aib	2-氨基异丁酸	Acpr	1-氨基环丙甲酸
Acp	1-氨基环丁甲酸	Acpe	1-氨基环戊甲酸
Ach	1-氨基环己甲酸		

[0060]

[0061] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0062] 实施例1化合物1的制备

[0063] Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-

[0064] Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

[0065] Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (AEEA-AEEA- γ Glu-十八烷二酸)-NH₂

[0066] 制备方法,包括:采用固相多肽合成法制备肽树脂,肽树脂再经酸解得到粗品,最后粗品经过纯化得到纯品;其中固相多肽合成法制备肽树脂的步骤为在载体树脂上通过固相偶联合成法依次接入下列序列中相对应的保护氨基酸或片段,制备肽树脂:

[0067] 上述制备方法中,所述的Fmoc-保护氨基酸或保护氨基酸片段的用量为所投料树脂总摩尔数的1.2~6倍;优选为2.5~3.5倍。

[0068] 上述制备方法中,所述的载体树脂取代值为0.2~1.0mmol/g树脂,优选的取代值为0.3~0.5mmol/g树脂。

[0069] 作为本发明优选的方案,所述固相偶联合成法为:前一步反应得到的保护氨基酸-树脂脱去Fmoc保护基后再与下一个保护氨基酸偶联反应。所述的去Fmoc保护的脱保护时间为10~60分钟,优选的为15~25分钟。所述的偶联反应时间为60~300分钟,优选的为100~140分钟。

[0070] 所述的偶联反应需添加缩合试剂,缩合试剂选自DIC (N,N-二异丙基碳二亚胺)、N,N-二环己基碳二亚胺,六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、2-(7-氮杂-1H-苯并三氮唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸酯、苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐或O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒四氟硼酸酯中的一种;优选的为N,N-二异丙基碳二亚胺。所述缩合试剂的摩尔用量为氨基树脂中氨基总摩尔数的1.2~6倍,优选为2.5~3.5倍。

[0071] 所述的偶联反应需添加活化试剂,活化试剂选自1-羟基苯并三唑或N-羟基-7-氮杂苯并三氮唑,优选的为1-羟基苯并三唑。活化试剂的用量为氨基树脂中氨基总摩尔数的1.2~6倍,优选的为2.5~3.5倍。

[0072] 作为本发明优选的方案,所述的脱去Fmoc保护的试剂为PIP/DMF (哌啶/N,N-二甲基甲酰胺)混合溶液,混合溶液中含哌啶为10~30% (V)。去Fmoc保护试剂的用量为每克氨基树脂5~15mL,优选的为每克氨基树脂8~12mL。

[0073] 优选的,肽树脂经酸解同时脱去树脂及侧链保护基得到粗品:

[0074] 进一步优选的,所述肽树脂酸解时采用的酸解剂为三氟醋酸(TFA)、1,2-乙二硫醇(EDT)和水的混合溶剂,混合溶剂的体积配比为:TFA为80~95%,EDT为1~10%,余量为水。

[0075] 更进一步优选的,混合溶剂的体积配比为:TFA为89~91%、EDT为4~6%,余量为水。最优的,混合溶剂的体积配比为:TFA为90%、EDT为5%,余量为水。

[0076] 所述酸解剂用量为每克肽树脂需要4~15mL酸解剂;优选的,每克肽树脂需要7~10mL酸解剂。

[0077] 使用酸解剂裂解的时间为室温条件下1~6小时,优选的为3~4小时。

[0078] 进一步的,粗品经高效液相色谱纯化、冻干得到纯品。

[0079] 1、肽树脂的合成

[0080] 使用Rink Amide BHHA树脂为载体树脂,通过去Fmoc保护和偶联反应,依次与下表所示的保护氨基酸偶联,制得肽树脂。本实施例使用的保护氨基酸相对应的保护氨基酸如下所示:

[0081]

接肽顺序 n=	保护氨基酸
1	Fmoc-Lys(Alloc)

[0082]

2	Fmoc-Ser(tBu)
3	Fmoc-Pro
4	Fmoc-Pro
5	Fmoc-Pro
6	Fmoc-Ala
7	Fmoc-Gly
8	Fmoc-Ser(tBu)
9	Fmoc-Ser(tBu)
10	Fmoc-Pro
11	Fmoc-Gly
12	Fmoc-Gly
13	Fmoc-Asn(Trt)
14	Fmoc-Lys(Boc)
15	Fmoc-Leu
16	Fmoc-Trp(Boc)
17	Fmoc-Glu(OtBu)
18	Fmoc-Ile
19	Fmoc-Phe
20	Fmoc-Leu
21	Fmoc-Arg(pbf)
22	Fmoc-Val
23	Fmoc-Ala
24	Fmoc-Glu(OtBu)
25	Fmoc-Glu(OtBu)
26	Fmoc-Glu(OtBu)
27	Fmoc-Met
28	Fmoc-Gln(Trt)
29	Fmoc-Lys(Boc)
30	Fmoc-Ser(tBu)

[0083]	31	Fmoc-Leu
	32	Boc-Asp(OtBu)
	侧链-1	Fmoc-AEEA
	侧链-2	Fmoc-AEEA
	侧链-3	Fmoc- γ Glu-OtBu
	侧链-4	十八烷二酸单叔丁酯

[0084] (1) 接入主链第1个保护氨基酸

[0085] 取0.03mol第1个保护氨基酸和0.03mol HOBt,用适量DMF溶解;另取0.03mol DIC,搅拌下慢慢加入至保护氨基酸DMF溶液中,于室温环境中搅拌反应30分钟,得到活化后的保护氨基酸溶液,备用。

[0086] 取0.01mol的Rink amide MBHA树脂(取代值约0.4mmol/g),采用20%PIP/DMF溶液去保护25分钟,洗涤过滤得到去Fmoc的树脂。

[0087] 将活化后的第1个保护氨基酸溶液加入到已去Fmoc的树脂中,偶联反应60~300分钟,过滤洗涤,得含1个保护氨基酸的树脂。

[0088] (2) 接入主链第2~32个保护氨基酸

[0089] 采用上述接入主链第1个保护氨基酸同样方法,依次接入上述对应的第2~32个保护氨基酸,得含主链32个氨基酸的树脂。

[0090] (3) 接入侧链第1个保护氨基酸

[0091] 取0.03mol侧链第1个保护氨基酸和0.03mol HOBt,用适量DMF溶解;另取0.03mol DIC,搅拌下慢慢加入至保护氨基酸DMF溶液中,于室温环境中搅拌反应30分钟,得到活化后的保护氨基酸溶液。

[0092] 取2.5mmol四三苯基膦钨和25mmol苯硅烷,用适量二氯甲烷溶解,去保护4小时,过滤洗涤,得到去Alloc的树脂备用。

[0093] 将加入活化后的侧链第1个保护氨基酸液加入到已去Alloc的树脂,偶联反应60~300分钟,过滤洗涤,得含侧链第1个保护氨基酸的树脂。

[0094] (4) 接入侧链第2~4个保护氨基酸

[0095] 采用上述接入主链第1个保护氨基酸同样方法,依次接入侧链对应的第2~4个保护氨基酸和单保护脂肪酸,得到肽树脂。

[0096] 2、粗品的制备

[0097] 取上述肽树脂,加入体积比为TFA:水:EDT=95:5:5的裂解试剂(裂解试剂10mL/克树脂),搅拌均匀,室温搅拌反应3小时,反应混合物使用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量TFA洗涤3次,合并滤液后减压浓缩,加入无水乙醚沉淀,再用无水乙醚洗沉淀3次,抽干得类白色粉末即为粗品。

[0098] 3、纯品的制备

[0099] 取上述粗品,加水搅拌,用氨水调pH8.0至完全溶解,溶液用0.45 μ m混合微孔滤膜过滤,纯化备用;

[0100] 采用高效液相色谱法进行纯化,纯化用色谱填料为10 μ m的反相C18,流动相系统为

0.1%TFA/水溶液-0.1%TFA/乙腈溶液,30mm*250mm的色谱柱流速为20mL/min,采用梯度系统洗脱,循环进样纯化,取粗品溶液上样于色谱柱中,启动流动相洗脱,收集主峰蒸去乙腈后,得纯化中间体浓缩液;

[0101] 纯化中间体浓缩液用0.45 μ m滤膜滤过备用,采用高效液相色谱法进行换盐,流动相系统为1%醋酸/水溶液-乙腈,纯化用色谱填料为10 μ m的反相C18,30mm*250mm的色谱柱流速为20mL/min(可根据不同规格的色谱柱,调整相应的流速);采用梯度洗脱,循环上样方法,上样于色谱柱中,启动流动相洗脱,采集图谱,观测吸收度的变化,收集换盐主峰并用分析液相检测纯度,合并换盐主峰溶液,减压浓缩,得到纯品醋酸水溶液,冷冻干燥,得纯品8.5g,纯度为98.7%,总收率为20.2%,分子量为4213.9(100%M+H)。

[0102] 实施例2化合物2的制备

[0103] Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-

[0104] Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

[0105] Pro-Pro-Pro-Ser-Lys (PEG₅CH₂CO- γ Glu-十八烷二酸)-NH₂

[0106] 制备方法同实施例1,使用的保护氨基酸如下表:

接肽顺序 n=	保护氨基酸
1	Fmoc-Lys(Alloc)
2	Fmoc-Ser(tBu)
[0107] 3	Fmoc-Pro
4	Fmoc-Pro
5	Fmoc-Pro
6	Fmoc-Ala

	7	Fmoc-Gly
	8	Fmoc-Ser(tBu)
	9	Fmoc-Ser(tBu)
	10	Fmoc-Pro
	11	Fmoc-Gly
	12	Fmoc-Gly
	13	Fmoc-Asn(Trt)
	14	Fmoc-Lys(Boc)
	15	Fmoc-Leu
	16	Fmoc-Trp(Boc)
	17	Fmoc-Glu(OtBu)
	18	Fmoc-Ile
	19	Fmoc-Phe
	20	Fmoc-Leu
[0108]	21	Fmoc-Arg(pbf)
	22	Fmoc-Val
	23	Fmoc-Ala
	24	Fmoc-Glu(OtBu)
	25	Fmoc-Glu(OtBu)
	26	Fmoc-Glu(OtBu)
	27	Fmoc-Met
	28	Fmoc-Gln(Trt)
	29	Fmoc-Lys(Boc)
	30	Fmoc-Ser(tBu)
	31	Fmoc-Leu
	32	Boc-Asp(OtBu)
	侧链-1	Fmoc-PEG ₅ CH ₂ COOH
	侧链-2	Fmoc- γ Glu-OtBu
	侧链-3	十八烷二酸单叔丁酯

[0109] 得纯品8.1g,纯度为98.3%,总收率为19.3%,分子量为4201.2(100%M+H)。

[0110] 实施例3化合物3的制备

[0111] Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-

[0112] Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

[0113] Pro-Pro-Pro-Ser-Cys (2-乙酸胆固醇酯)-NH₂

[0114] 制备方法同实施例1合成肽树脂,酸解后的线性肽粗品在碱催化下接入侧链而得到粗品,使用的保护氨基酸如下表:

[0115]

接肽顺序 n=	保护氨基酸
1	Fmoc-Cys(Trt)
2	Fmoc-Ser(tBu)
3	Fmoc-Pro
4	Fmoc-Pro
5	Fmoc-Pro
6	Fmoc-Ala
7	Fmoc-Gly
8	Fmoc-Ser(tBu)
9	Fmoc-Ser(tBu)
10	Fmoc-Pro
11	Fmoc-Gly
12	Fmoc-Gly
13	Fmoc-Asn(Trt)
14	Fmoc-Lys(Boc)
15	Fmoc-Leu
16	Fmoc-Trp(Boc)
17	Fmoc-Glu(OtBu)
18	Fmoc-Ile
19	Fmoc-Phe

[0116]

20	Fmoc-Leu
21	Fmoc-Arg(pbf)
22	Fmoc-Val
23	Fmoc-Ala
24	Fmoc-Glu(OtBu)
25	Fmoc-Glu(OtBu)
26	Fmoc-Glu(OtBu)
27	Fmoc-Met
28	Fmoc-Gln(Trt)
29	Fmoc-Lys(Boc)
30	Fmoc-Ser(tBu)
31	Fmoc-Leu
32	Fmoc-Asp(OtBu)
侧链-1	2-溴代乙酸胆固醇酯

[0117] 得纯品4.7g,纯度为98.1%,总收率为12.0%。分子量为3900.8(100%M+H)。

[0118] 实施例4化合物4的制备

[0119] Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-

[0120] Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

[0121] Pro-Pro-Pro-Ser-Lys(丁二酸胆固醇单酯)-NH₂

[0122] 制备方法同实施例1,使用的保护氨基酸如下表:

[0123]

接肽顺序 n=	保护氨基酸
1	Fmoc-Lys(Alloc)
2	Fmoc-Ser(tBu)
3	Fmoc-Pro
4	Fmoc-Pro
5	Fmoc-Pro
6	Fmoc-Ala

	7	Fmoc-Gly
	8	Fmoc-Ser(tBu)
	9	Fmoc-Ser(tBu)
	10	Fmoc-Pro
	11	Fmoc-Gly
	12	Fmoc-Gly
	13	Fmoc-Asn(Trt)
	14	Fmoc-Lys(Boc)
	15	Fmoc-Leu
	16	Fmoc-Trp(Boc)
	17	Fmoc-Glu(OtBu)
	18	Fmoc-Ile
	19	Fmoc-Phe
[0124]	20	Fmoc-Leu
	21	Fmoc-Arg(pbf)
	22	Fmoc-Val
	23	Fmoc-Ala
	24	Fmoc-Glu(OtBu)
	25	Fmoc-Glu(OtBu)
	26	Fmoc-Glu(OtBu)
	27	Fmoc-Met
	28	Fmoc-Gln(Trt)
	29	Fmoc-Lys(Boc)
	30	Fmoc-Ser(tBu)
	31	Fmoc-Leu
	32	Boc-Asp(OtBu)
	侧链-1	丁二酸胆固醇单酯

[0125] 得纯品5.9g,纯度为97.9%,总收率为14.9%。分子量为3966.8(100%M+H)。

[0126] 实施例5化合物5的制备

[0127] Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-

[0128] Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

[0129] Pro-Pro-Pro-Ser-AEEA-Lys (丁二酸胆固醇单酯)-NH₂

[0130] 制备方法同实施例1,使用的保护氨基酸如下表:

[0131]

接肽顺序 n=	保护氨基酸
1	Fmoc-Lys(Alloc)
2	Fmoc-AEEA
3	Fmoc-Ser(tBu)
4	Fmoc-Pro
5	Fmoc-Pro
6	Fmoc-Pro
7	Fmoc-Ala
8	Fmoc-Gly
9	Fmoc-Ser(tBu)
10	Fmoc-Ser(tBu)
11	Fmoc-Pro
12	Fmoc-Gly
13	Fmoc-Gly
14	Fmoc-Asn(Trt)
15	Fmoc-Lys(Boc)
16	Fmoc-Leu
17	Fmoc-Trp(Boc)
18	Fmoc-Glu(OtBu)
19	Fmoc-Ile
20	Fmoc-Phe
21	Fmoc-Leu

	22	Fmoc-Arg(pbf)
	23	Fmoc-Val
	24	Fmoc-Ala
	25	Fmoc-Glu(OtBu)
	26	Fmoc-Glu(OtBu)
	27	Fmoc-Glu(OtBu)
[0132]	28	Fmoc-Met
	29	Fmoc-Gln(Trt)
	30	Fmoc-Lys(Boc)
	31	Fmoc-Ser(tBu)
	32	Fmoc-Leu
	33	Boc-Asp(OtBu)
	侧链-1	丁二酸胆固醇单酯

[0133] 得纯品5.3g,纯度为98.9%,总收率为12.9%。分子量为4112.0(100%M+H)。

[0134] 实施例6化合物6的制备

[0135] Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-

[0136] Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-

[0137] Pro-Pro-Pro-Ser-PEG₅CH₂CO-Lys(丁二酸胆固醇单酯)-NH₂

[0138] 制备方法同实施例1,使用的保护氨基酸如下表:

	接肽顺序 n=	保护氨基酸
	1	Fmoc-Lys(Alloc)
	2	Fmoc-PEG ₅ CH ₂ COOH
[0139]	3	Fmoc-Ser(tBu)
	4	Fmoc-Pro
	5	Fmoc-Pro
	6	Fmoc-Pro
	7	Fmoc-Ala

	8	Fmoc-Gly
	9	Fmoc-Ser(tBu)
	10	Fmoc-Ser(tBu)
	11	Fmoc-Pro
	12	Fmoc-Gly
	13	Fmoc-Gly
	14	Fmoc-Asn(Trt)
	15	Fmoc-Lys(Boc)
	16	Fmoc-Leu
	17	Fmoc-Trp(Boc)
	18	Fmoc-Glu(OtBu)
	19	Fmoc-Ile
	20	Fmoc-Phe
[0140]	21	Fmoc-Leu
	22	Fmoc-Arg(pbf)
	23	Fmoc-Val
	24	Fmoc-Ala
	25	Fmoc-Glu(OtBu)
	26	Fmoc-Glu(OtBu)
	27	Fmoc-Glu(OtBu)
	28	Fmoc-Met
	29	Fmoc-Gln(Trt)
	30	Fmoc-Lys(Boc)
	31	Fmoc-Ser(tBu)
	32	Fmoc-Leu
	33	Boc-Asp(OtBu)
	侧链-1	丁二酸胆固醇单酯

[0141] 得纯品6.6g,纯度为97.5%,总收率为15.6%。分子量为4244.2(100%M+H)。

[0142] 实施例6初步药代特性的测定

[0143] 将每个化合物分两个给药组:SD大鼠,每组雄各4只,共8只。

[0144] 尾静脉静注组:剂量为1mg/kg,分别于药前(0h)、以及给药后30min、1h、2h、4h、8h、24h、48h、96h、144h大鼠眼眶静脉取血,离心分离血浆样本。

[0145] 皮下给药组:剂量为1mg/kg,分别于药前(0h)、以及给药后1h、2h、3h、4h、8h、24h、48h、96h、144h大鼠眼眶静脉取血,离心分离血浆样本。

[0146] 用液质联用法分别测定SD大鼠血浆样本中相应化合物的血药浓度,静脉和皮下给药后,化合物SD大鼠皮下(SC)给药半衰期见下表:

[0147]

化合物	$t_{1/2}$ (h)
化合物1	8.3
化合物2	9.2
化合物3	8.1
化合物4	7.8
化合物5	8.3
化合物6	8.9

[0148] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。