



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117024528 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 10

---

(21) 申请号 202310829981.X

(22) 申请日 2023.07.07

(71) 申请人 杭州信海医药科技有限公司

地址 310000 浙江省杭州市杭州经济技术  
开发区银海街600号1幢4层401号

(72) 发明人 龚裕录 石海芳 李雪豪 纪东亮

(74) 专利代理机构 北京国翰知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11696

专利代理人 韩倩

(51) Int.Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

---

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

一种Retatrutide的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种Retatrutide的制备方法,属于多肽合成技术领域;该合成方法包括,肽树脂的制备:按Retatrutide的序列顺序,逐个偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段至固相载体树脂上,得到肽树脂;粗肽的制备:将肽树脂利用裂解液进行裂解,得到粗肽;Retatrutide精品的制备:将粗肽纯化,得到Retatrutide。本发明Retatrutide的合成方法采用带保护的多肽片段进行合成,具有以下优势:时长周期短,制备难度低,废液排放少,总体收率高,成本低,利于规模化生产。

1. 一种Retatrutide的制备方法,包括,

肽树脂的制备:按Retatrutide的序列顺序,逐个偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段至固相载体树脂上,得到肽树脂;

粗肽的制备:将所述肽树脂利用裂解液进行裂解,得到粗肽;和

Retatrutide精品的制备:将所述粗肽纯化,得到Retatrutide;

其中,带保护多肽片段选自Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Leu-Leu-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH或Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH中的至少一种。

2. 根据权利要求1所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:固相载体树脂选自Rink Amide AM Resin或Rink Amide MBHA Resin。

3. 根据权利要求1或2所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:固相载体树脂的交联度1-2%,固相载体树脂的粒径为100-200目,固相载体树脂的取代度为0.3-1.2mmol/g。

4. 根据权利要求1所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:Lys<sup>17</sup>采用Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH片段;Tyr<sup>1</sup>-Aib<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>采用Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH片段。

5. 根据权利要求1或4所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:Pro<sup>36</sup>-Pro<sup>37</sup>-Pro<sup>38</sup>采用Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH片段;Ser<sup>33</sup>-Gly<sup>34</sup>采用Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH片段。

6. 根据权利要求5所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:Gly<sup>29</sup>-Gly<sup>30</sup>采用Fmoc-Gly-Gly-OH片段。

7. 根据权利要求5所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:Leu<sup>26</sup>-Leu<sup>27</sup>采用Fmoc-Leu-Leu-OH片段。

8. 根据权利要求1所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:裂解液包括TFA、EDT、TIS和H<sub>2</sub>O,其体积比为TFA:EDT:TIS:H<sub>2</sub>O=80-100:1-10:0.5-5:0.5-5:0.5-5。

9. 根据权利要求1所述的一种Retatrutide的制备方法,其特征在于:纯化采用C8填料,经1-3次提纯和1-2次转盐后得到Retatrutide精品。

10. 带保护多肽片段在制备Retatrutide中的用途,带保护多肽片段选自Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Leu-Leu-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH或Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH中的至少一种。

## 一种Retatrutide的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于多肽合成技术领域,具体涉及一种Retatrutide的制备方法。

### 背景技术

[0002] Retatrutide(LY3437943)是一款GIPR/GLP-1R/GCGR三重激动剂肽,对葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)、胰高血糖素样多肽(GLP-1)、胰高血糖素受体具有强大的活性;另外,Retatrutide(LY3437943)减轻体重方面也有着显著的效果。Retatrutide(LY3437943)的序列结构如下:H-Tyr-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile- $\alpha$ MeLeu-Leu-Asp-Lys-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu-Eicosanedioic acid)-Ala-Gln-Aib-Ala-Phe-Ile-Glu-Tyr-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>。然而,目前对于Retatrutide(LY3437943)的合成方法的研究较少。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种合成周期短,合成过程中Retatrutide粗肽的HPLC纯度以及Retatrutide精品肽的纯度和纯化收率高的Retatrutide的合成方法。

[0004] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:

一种Retatrutide的制备方法,包括,

肽树脂的制备:按Retatrutide的序列顺序,逐个偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段至固相载体树脂上,得到肽树脂;

粗肽的制备:将肽树脂利用裂解液进行裂解,得到粗肽;和

Retatrutide精品的制备:将粗肽纯化,得到Retatrutide;

其中,带保护多肽片段选自Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Leu-Leu-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH或Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH中的至少一种。

[0005] Retatrutide的序列结构为:H-Tyr<sup>1</sup>-Aib<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Phe<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup>-Asp<sup>9</sup>-Tyr<sup>10</sup>-Ser<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup>- $\alpha$ MeLeu<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-Asp<sup>15</sup>-Lys<sup>16</sup>-Lys<sup>17</sup>(AEEA- $\gamma$ Glu-Eicosanedioic acid)-Ala<sup>18</sup>-Gln<sup>19</sup>-Aib<sup>20</sup>-Ala<sup>21</sup>-Phe<sup>22</sup>-Ile<sup>23</sup>-Glu<sup>24</sup>-Tyr<sup>25</sup>-Leu<sup>26</sup>-Leu<sup>27</sup>-Glu<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>-Gly<sup>30</sup>-Pro<sup>31</sup>-Ser<sup>32</sup>-Ser<sup>33</sup>-Gly<sup>34</sup>-Ala<sup>35</sup>-Pro<sup>36</sup>-Pro<sup>37</sup>-Pro<sup>38</sup>-Ser<sup>39</sup>-NH<sub>2</sub>。本发明Retatrutide的合成方法采用带保护的多肽片段进行合成,其优势在于:1)大大减少了偶联反应制备Retatrutide的步骤,缩短了Retatrutide的合成周期;2)解决了常规方法偶联困难的问题,使得Retatrutide的制备难度低;3)极大的提高了Retatrutide产品的整体收率,降低了生产成本及废液的产出量,4)降低了Retatrutide的合成成本,有利规模化生产。

[0006] 在一个实施方案中,固相载体树脂选自Rink Amide AM Resin或Rink Amide MBHA Resin。

[0007] 在一个实施方案中,固相载体树脂的交联度1-2%,固相载体树脂的粒径为100-200

目,固相载体树脂的取代度为0.3-1.2mmol/g。

[0008] 在一个优选的实施方案中,固相载体树脂的取代度为0.3-0.9mmol/g。

[0009] 在一个实施方案中,Lys<sup>17</sup>采用Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH片段;Tyr<sup>1</sup>-Aib<sup>2</sup>-Gln<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>采用Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH片段。

[0010] 在一个实施方案中,Pro<sup>36</sup>-Pro<sup>37</sup>-Pro<sup>38</sup>采用Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH片段;Ser<sup>33</sup>-Gly<sup>34</sup>采用Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH片段。

[0011] 在一个优选的实施方案中,Gly<sup>29</sup>-Gly<sup>30</sup>采用Fmoc-Gly-Gly-OH片段。

[0012] 在一个优选的实施方案中,Leu<sup>26</sup>-Leu<sup>27</sup>采用Fmoc-Leu-Leu-OH片段。

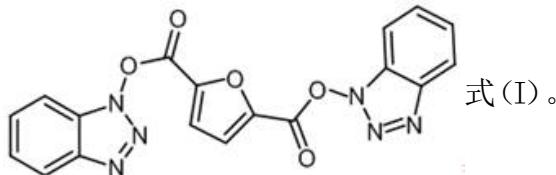
[0013] 在一个优选的实施方案中,带保护多肽片段包括Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH和Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH。

[0014] 在一个优选的实施方案中,带保护多肽片段包括Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Leu-Leu-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH和Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH。

[0015] 在一个更优选的实施方案中,肽树脂的制备中,按如下序列顺序偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段:1)Fmoc-Ser(tBu)-OH;2)Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH;3)Fmoc-Ala-OH;4)Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH;5)Fmoc-Ser(tBu)-OH;6)Fmoc-Pro-OH;7)Fmoc-Gly-Gly-OH;8)Fmoc-Glu(OtBu)-OH;9)Fmoc-Leu-OH;10)Fmoc-Leu-OH;11)Fmoc-Tyr(tBu)-OH;12)Fmoc-Glu(OtBu)-OH;13)Fmoc-Ile-OH;14)Fmoc-Phe-OH;15)Fmoc-Ala-OH;16)Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH;17)Fmoc-Ala-OH;18)Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH;19)Fmoc-Lys(Boc)-OH;20)Fmoc-Asp(OtBu)-OH;21)Fmoc-Leu-OH;22)Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH;23)Fmoc-Ser(tBu)-OH;24)Fmoc-Tyr(tBu)-OH;25)Fmoc-Asp(OtBu)-OH;26)Fmoc-Ser(tBu)-OH;27)Fmoc-Thr(tBu)-OH;28)Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH;29)Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH。按该序列顺序偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段,能够大大提高Retatrutide粗肽的HPLC纯度以及Retatrutide精品肽的纯度和纯化收率。

[0016] 在一个更优选的实施方案中,肽树脂的制备中,按如下序列顺序偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段:1)Fmoc-Ser(tBu)-OH;2)Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH;3)Fmoc-Ala-OH;4)Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH;5)Fmoc-Ser(tBu)-OH;6)Fmoc-Pro-OH;7)Fmoc-Gly-Gly-OH;8)Fmoc-Glu(OtBu)-OH;9)Fmoc-Leu-Leu-OH;10)Fmoc-Tyr(tBu)-OH;11)Fmoc-Glu(OtBu)-OH;12)Fmoc-Ile-OH;13)Fmoc-Phe-OH;14)Fmoc-Ala-OH;15)Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH;16)Fmoc-Ala-OH;17)Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH;18)Fmoc-Lys(Boc)-OH;19)Fmoc-Asp(OtBu)-OH;20)Fmoc-Leu-OH;21)Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH;22)Fmoc-Ser(tBu)-OH;23)Fmoc-Tyr(tBu)-OH;24)Fmoc-Asp(OtBu)-OH;25)Fmoc-Ser(tBu)-OH;26)Fmoc-Thr(tBu)-OH;27)Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH;28)Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH。按该序列顺序偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段,能够更进一步提高Retatrutide粗肽的HPLC纯度以及Retatrutide精品肽的纯度和纯化收率。

- [0017] 在一个实施方案中,肽树脂的制备具体包括:  
 固相载体树脂在脱保护剂中脱保护后得到脱保护树脂;  
 将脱保护树脂和经缩合剂活化的Fmoc-Ser(tBu)-OH缩合,得到氨基酸-树脂;  
 重复上述脱保护和缩合过程,按Retatrutide的序列顺序偶联带保护氨基酸或带保护多肽片段,得到肽树脂。
- [0018] 在一个优选的实施方案中,脱保护剂包括哌啶和DMF,其体积比为哌啶:DMF=1:3-5。
- [0019] 在一个更优选的实施方案中,脱保护剂包括六氢哌啶和DMF,其体积比为哌啶:DMF=1:4。
- [0020] 在一个优选的实施方案中,缩合剂为DIC和HOBT。
- [0021] 在一个更优选的实施方案中,HOBT的投料比为带保护氨基酸或带保护多肽片段摩尔数的0.5-1.0倍。
- [0022] 在一个更优选的实施方案中,DIC的投料比为带保护氨基酸或带保护多肽片段摩尔数的0.8-1.2倍。
- [0023] 在一个优选的实施方案中,带保护氨基酸或带保护多肽片段的投料比为树脂摩尔数的1.5-3.5倍。
- [0024] 在一个更优选的实施方案中,带保护氨基酸或带保护多肽片段的投料比为树脂摩尔数的2-3倍。
- [0025] 在一个优选的实施方案中,缩合剂为DIC和HOBT类似物,HOBT类似物的式(I)所示;



Retatrutide的合成过程中,利用该缩合剂缩合脱保护树脂和带保护氨基酸或带保护多肽片段,能够提高Retatrutide粗肽的纯度和Retatrutide精品肽的纯化收率。

- [0026] 在一个更优选的实施方案中,HOBT类似物的投料比为带保护氨基酸或带保护多肽片段摩尔数的0.5-1.0倍。
- [0027] 在一个更优选的实施方案中,DIC的投料比为带保护氨基酸或带保护多肽片段摩尔数的0.8-1.2倍。
- [0028] 在一个更优选的实施方案中,DIC的投料比为带保护氨基酸或带保护多肽片段摩尔数的0.8-1.2倍。
- [0029] 在一个实施方案中,裂解液包括TFA、EDT、TIS和H<sub>2</sub>O,其体积比为TFA:EDT:TIS:H<sub>2</sub>O=80-100:1-10:0.5-5:0.5-5:0.5-5。
- [0030] 在一个优选的实施方案中,裂解液包括TFA、EDT、TIS和H<sub>2</sub>O,其体积比为TFA:EDT:TIS:H<sub>2</sub>O=90:5:2.5:2.5:2.5。
- [0031] 在一个实施方案中,裂解温度为15-35℃,裂解时间为1-5小时。
- [0032] 在一个优选的实施方案中,裂解温度为20-30℃;裂解时间为1.5-3.5小时。
- [0033] 在一个实施方案中,纯化采用C8填料,经1-3次提纯和1-2次转盐后得到Retatrutide精品。

[0034] 在一个优选的实施方案中,纯化采用C8填料,经2次提纯和1次转盐后得到Retatrutide精品。

[0035] 在一个优选的实施方案中,一纯采用的流动相及洗脱梯度为:A相:5-10g/L的醋酸铵/水溶液,pH为6.0-7.0;B相:乙腈,洗脱梯度40% B相-60% B相,洗脱时长45-90分钟。

[0036] 在一个更优选的实施方案中,一纯采用的流动相及洗脱梯度为:A相:8g/L的醋酸铵/水溶液,用醋酸与氨水调PH到6.5;B相:乙腈,洗脱梯度43% B相-53% B相,洗脱时长60分钟。

[0037] 在一个优选的实施方案中,二纯采用的流动相及洗脱梯度为:A相:0.5-1.5%醋酸水溶液(V/V);B相0.5-1.5%醋酸乙腈溶液(V/V),洗脱梯度为40% B相-50% B相,洗脱时长60分钟。

[0038] 在一个更优选的实施方案中,二纯采用的流动相及洗脱梯度为:A相:1%醋酸水溶液(V/V);B相1%醋酸乙腈溶液(V/V),洗脱梯度为40% B相-50% B相,洗脱时长45-90分钟。

[0039] 在一个优选的实施方案中,转盐采用的流动相、转盐过程及洗脱梯度为:使用0.1-1.0M的NaCl水溶液进行替换转盐,A相:水,B相:乙腈,洗脱梯度为50-60% B相,洗脱时长30-60分钟。

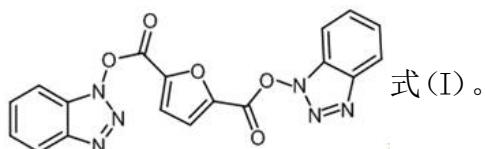
[0040] 在一个更优选的实施方案中,转盐采用的流动相、转盐过程及洗脱梯度为:使用0.5M的NaCl水溶液进行替换转盐,A相:水,B相:乙腈,洗脱梯度为55% B相,洗脱时长40分钟。

[0041] 本发明还公开了带保护多肽片段在制备Retatrutide中的用途,带保护多肽片段选自Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Leu-Leu-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH或Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH中的至少一种。

[0042] 在一个实施方案中,带保护多肽片段包括Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH和Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH。

[0043] 在一个优选的实施方案中,带保护多肽片段包括Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH、Fmoc-Gly-Gly-OH、Fmoc-Leu-Leu-OH、Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH、Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH、Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH和Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH。

[0044] 本发明还公开了缩合剂,其为DIC和HOBT类似物,HOBT类似物的式(I)所示;



多肽的合成过程中,利用DIC和HOBT类似物缩合脱保护树脂和带保护氨基酸或带保护多肽片段,能够提高粗肽的纯度和精品肽的纯化收率。

[0045] 本发明还公开了上述缩合剂在合成Retatrutide中的用途。

[0046] 本发明还公开了HOBT类似物的制备方法,包括,

将1-羟基苯并三唑(HOBT)和2,5-呋喃二甲酰氯于25-35℃下反应1-5小时,得到HOBT类似物。

[0047] 本发明由于大量带保护的多肽片段合成Retatrutide,因而具有如下有益效果:1)大大减少了偶联反应制备Retatrutide的步骤,缩短了Retatrutide的合成周期;2)解决了常规方法偶联困难的问题,使得Retatrutide的制备难度低;3)极大的提高了Retatrutide产品的整体收率,降低了生产成本及废液的产出量,4)降低了Retatrutide的合成成本,有利规模化生产。

### 具体实施方式

[0048] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,对本发明进一步详细说明。

[0049] 本发明所使用的缩写的结构和名称列于下表1。

[0050] 表1 缩写的结构和名称

英文缩写	结构或者名称
Fmoc	9-芴甲氧羰基
Boc	叔丁氧羰基
tBu	叔丁基
Trt	三苯甲基
$\alpha$ MeLeu	
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
DBLK	20%六氢吡啶/DMF 溶液
DIC	N,N-二异丙基碳二亚胺
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
TFA	三氟乙酸
HOBT	1-羟基苯并三唑
TIS	三异丙基硅烷

本发明所使用的固相载体树脂的交联度1%-2%,固相载体树脂的粒径为100-200目。

[0051] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0052] 实施例1:

一种Retatrutide的制备方法,包括,

1、肽树脂的制备

称取158.73g取代度为0.63的Rink Amide MBHA Resin(100mmol)倒入固相合成反应釜内,加入1500mL的DMF溶胀树脂60分钟,抽滤掉DMF,加入1500mL的DBLK(20%六氢吡啶/DMF溶液)进行去保护30分钟,抽滤掉反应液,用1500ml的DMF洗涤5次,称取77.40g的Fmoc-

Ser(tBu)-OH和27.02g的HOBT倒入烧杯中,加入200mL的DMF溶解,并使溶液冷却至0℃,加入31.50mL的DIC活化10分钟,将活化完的氨基酸加入到反应釜内,搅拌反应2小时,抽滤掉反应液,用1500mL的DMF洗涤3次。使用同样的操作流程,继续偶联剩余氨基酸或多肽片段,按表2中投料顺序及投料量进行偶联。偶联完成后,得到以下肽树脂:Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(0tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Ile- $\alpha$ MeLeu-Leu-Asp(0tBu)-Lys(Boc)-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-Ala-Gln(Trt)-Aib-Ala-Phe-Ile-Glu(0tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Glu(0tBu)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Rink Amide-氨基树脂751.18g,合成得率97.87%。

[0053] 表2 偶联的投料顺序及投料量

序号	原料名称	投料比	投料量	序号	原料名称	投料比	投料量
1	Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH	2倍	106.2g	2	Fmoc-Ala-OH	2倍	62.20g
3	Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH	2倍	88.00g	4	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2倍	76.60g
5	Fmoc-Pro-OH	2倍	67.40g	6	Fmoc-Gly-Gly-OH	2倍	70.80g
7	Fmoc-Glu(0tBu)-OH	2倍	85.00g	8	Fmoc-Leu-OH	2倍	70.60g
9	Fmoc-Leu-OH	2倍	70.60g	10	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	2倍	91.80g
11	Fmoc-Glu(0tBu)-OH	2倍	85.00g	12	Fmoc-Ile-OH	2倍	70.60g
13	Fmoc-Phe-OH	2倍	77.40g	14	Fmoc-Ala-OH	2倍	62.20g
15	Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH	2倍	139.00g	16	Fmoc-Ala-OH	2倍	62.20g
17	Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -0tBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH	2倍	215.60g	18	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3倍	140.40g
19	Fmoc-Asp(0tBu)-OH	3倍	123.30g	20	Fmoc-Leu-OH	3倍	105.90g
21	Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH	2倍	96.00g	22	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍	114.90g
23	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	3倍	137.70g	24	Fmoc-Asp(0tBu)-OH	3倍	123.3g
25	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍	114.90g	26	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3倍	119.10g
27	Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH	2倍	108.8g	28	Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH	2倍	169.80g

## 2、Retatrutide粗肽的制备

称取300g“肽树脂的制备”中得到的肽树脂,配置2000mL裂解液(裂解液中包括TFA、EDT、TIS和H<sub>2</sub>O,其体积比为TFA:EDT:TIS:H<sub>2</sub>O=90:5:2.5:2.5:2.5),将裂解液降温至0℃,在搅拌状态下将肽树脂加入到裂解液中,升温至25℃,反应3小时,过滤,取滤液,滤液倒入到与冷冻的冰乙醚中沉淀,离心后取沉淀,并用乙醚洗涤并离心沉淀3次,真空干燥12小时,得到218.54g Retatrutide粗肽,收率115.07%,Retatrutide粗肽的HPLC纯度86.33%。

## [0054] 3、Retatrutide精品的制备

称取“粗肽的制备”中得到的粗肽40g,使用2000mL溶剂(乙腈水溶液,体积比为乙腈:H<sub>2</sub>O=1:2)溶解粗肽,利用200mm×250mm柱子进行纯化,填料C8;一纯A相:8g/L的醋酸铵/水溶液,用醋酸与氨水调pH到6.5;B相:乙腈,洗脱梯度43% B相-53% B相,洗脱时长60分钟;对收集液进行检测并合并收集纯度大于98%的部分进行二纯;二纯A相:1%醋酸水溶液;B相1%醋酸乙腈溶液,洗脱梯度为40% B相-50% B相,洗脱时长60分钟,对收集液进行检测并合并收集液大于99.5%部分进行转盐;转盐A相:水;B相:乙腈;上样完毕先使用0.5M的NaCl水溶液进行替换转盐,再以55% B相进行洗脱,洗脱时长40分钟,对收集液进行检测,收取纯

度大于99.5%，单杂小于0.1%的组分进行冻干。将转盐的收集液进行冻干，时长72小时，最终得到Retatrutide精品23.17g，Retatrutide精品纯度99.85%，单杂均小于0.1%，纯化收率57.92%（以Retatrutide粗肽计）。

[0055] 实施例2：

一种Retatrutide的制备方法，包括，

1、肽树脂的制备

与实施例1中“肽树脂的制备”基本相同，不同之处为：按表3中投料顺序及投料量进行偶联剩余氨基酸或多肽片段。偶联完成后，得到以下肽树脂：Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Ile- $\alpha$ MeLeu-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-Ala-Gln(Trt)-Aib-Ala-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Rink Amide-氨基树脂。

[0056] 表3 偶联的投料顺序及投料量

序号	原料名称	投料比	序号	原料名称	投料比
1	Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH	2倍	2	Fmoc-Ala-OH	2倍
3	Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH	2倍	4	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2倍
5	Fmoc-Pro-OH	2倍	6	Fmoc-Gly-Gly-OH	2倍
7	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2倍	8	Fmoc-Leu-Leu-OH	2倍
9	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	2倍	10	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2倍
11	Fmoc-Ile-OH	2倍	12	Fmoc-Phe-OH	2倍
13	Fmoc-Ala-OH	2倍	14	Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH	2倍
15	Fmoc-Ala-OH	2倍	16	Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH	2倍
17	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3倍	18	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3倍
19	Fmoc-Leu-OH	3倍	20	Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH	2倍
21	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍	22	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	3倍
23	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3倍	24	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍
25	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3倍	26	Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH	2倍
27	Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH	2倍			

2、Retatrutide粗肽的制备

与实施例1中“Retatrutide粗肽的制备”相同，Retatrutide粗肽的收率112.27%，Retatrutide粗肽的HPLC纯度89.19%。

[0057] 3、Retatrutide精品的制备

与实施例1中“Retatrutide精品的制备”相同，Retatrutide精品的纯度99.91%，单杂均小于0.1%，Retatrutide精品的纯化收率62.35%（以Retatrutide粗肽计）。

[0058] 与实施例1相比，本实施例2合成方法制得Retatrutide粗肽的HPLC纯度得到了提高；与实施例1相比，本实施例2合成方法制得Retatrutide精品的纯度和纯化收率均得到了提高；以上结果这说明相较与Leu<sup>26</sup>采用“Fmoc-Leu-OH”片段和Leu<sup>27</sup>采用“Fmoc-Leu-OH”片段，Leu<sup>26</sup>-Leu<sup>27</sup>采用“Fmoc-Leu-Leu-OH”片段能够更进一步提高Retatrutide粗肽的HPLC纯度以及Retatrutide精品肽的纯度和纯化收率。

[0059] 实施例3：

一种Retatrutide的制备方法,包括,

### 1、肽树脂的制备

与实施例1中“肽树脂的制备”基本相同,不同之处为:按表4中投料顺序及投料量进行偶联剩余氨基酸或多肽片段。偶联完成后,得到以下肽树脂:Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Ile- $\alpha$ MeLeu-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-Ala-Gln(Trt)-Aib-Ala-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Rink Amide-氨基树脂。

[0060] 表4 偶联的投料顺序及投料量

序号	原料名称	投料比	序号	原料名称	投料比
1	Fmoc-Pro-OH	2倍	2	Fmoc-Pro-OH	2倍
3	Fmoc-Pro-OH	2倍	4	Fmoc-Ala-OH	2倍
5	Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH	2倍	6	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2倍
7	Fmoc-Pro-OH	2倍	8	Fmoc-Gly-Gly-OH	2倍
9	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2倍	10	Fmoc-Leu-OH	2倍
11	Fmoc-Leu-OH	2倍	12	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	2倍
13	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2倍	14	Fmoc-Ile-OH	2倍
15	Fmoc-Phe-OH	2倍	16	Fmoc-Ala-OH	2倍
17	Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH	2倍	18	Fmoc-Ala-OH	2倍
19	Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH	2倍	20	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3倍
21	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3倍	22	Fmoc-Leu-OH	3倍
23	Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH	2倍	24	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍
25	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	3倍	26	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3倍
27	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍	28	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3倍
29	Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH	2倍	30	Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH	2倍

### 2、Retatrutide粗肽的制备

与实施例1中“粗肽的制备”相同,Retatrutide粗肽的收率117.35%,Retatrutide粗肽的HPLC纯度84.05%。

[0061] 3、Retatrutide精品的制备

与实施例1中“Retatrutide精品的制备”相同,Retatrutide精品的纯度99.58%,单杂均小于0.1%,Retatrutide精品的纯化收率56.24%(以Retatrutide粗肽计)。

[0062] 与实施例1相比,本实施例3合成方法制得Retatrutide粗肽的HPLC纯度较低;与实施例1相比,本实施例3合成方法制得Retatrutide精品的纯度和纯化收率均较低;以上结果这说明相较与Pro<sup>36</sup>采用“Fmoc-Pro-OH”片段、Pro<sup>37</sup>采用“Fmoc-Pro-OH”和Pro<sup>38</sup>采用“Fmoc-Pro-OH”片段,Pro<sup>36</sup>-Pro<sup>37</sup>-Pro<sup>38</sup>采用“Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH”片段能够更进一步提高Retatrutide粗肽的HPLC纯度以及Retatrutide精品肽的纯度和纯化收率。

[0063] 实施例4:

一种Retatrutide的制备方法,包括,

### 1、肽树脂的制备

与实施例1中“肽树脂的制备”基本相同,不同之处为:按表5中投料顺序及投料量

进行偶联剩余氨基酸或多肽片段。偶联完成后,得到以下肽树脂:Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Ile- $\alpha$ MeLeu-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-Ala-Gln(Trt)-Aib-Ala-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-RinkAmide-氨基树脂。

[0064] 表5 偶联的投料顺序及投料量

序号	原料名称	投料比	序号	原料名称	投料比
1	Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH	2倍	2	Fmoc-Ala-OH	2倍
3	Fmoc-Gly-OH	2倍	4	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2倍
5	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2倍	6	Fmoc-Pro-OH	2倍
7	Fmoc-Gly-Gly-OH	2倍	8	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2倍
9	Fmoc-Leu-OH	2倍	10	Fmoc-Leu-OH	2倍
11	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	2倍	12	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2倍
13	Fmoc-Ile-OH	2倍	14	Fmoc-Phe-OH	2倍
15	Fmoc-Ala-OH	2倍	16	Fmoc-Gln(Trt)-Aib-OH	2倍
17	Fmoc-Ala-OH	2倍	18	Fmoc-Lys(AEEA- $\gamma$ Glu( $\alpha$ -OtBu)-Eicosanedioic acid(mon-tBu))-OH	2倍
19	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3倍	20	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3倍
21	Fmoc-Leu-OH	3倍	22	Fmoc-Ile- $\alpha$ MeLeu-OH	2倍
23	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍	24	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	3倍
25	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3倍	26	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3倍
27	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3倍	28	Fmoc-Thr(tBu)-Phe-OH	2倍
29	Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH	2倍			

## 2、Retatrutide粗肽的制备

与实施例1中“粗肽的制备”相同,Retatrutide粗肽收率116.44%,HPLC纯度84.96%。

[0065] 3、Retatrutide精品的制备

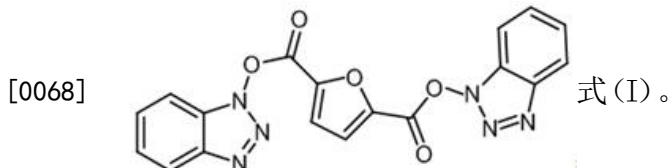
与实施例1中“Retatrutide精品的制备”相同,Retatrutide精品纯度99.64%,单杂均小于0.1%,纯化收率56.83%(以Retatrutide粗肽计)。

[0066] 与实施例1相比,本实施例4合成方法制得Retatrutide粗肽的HPLC纯度较低;与实施例1相比,本实施例4成方法制得Retatrutide精品的纯度和纯化收率均较低;以上结果这说明相较与Ser<sup>33</sup>采用“Fmoc-Ser(tBu)-OH”和Gly<sup>34</sup>采用“Fmoc-Ser(tBu)-OH”片段,Ser<sup>33</sup>-Gly<sup>34</sup>采用“Fmoc-Ser(tBu)-Gly-OH”片段能够更进一步提高Retatrutide粗肽的HPLC纯度以及Retatrutide精品肽的纯度和纯化收率。

[0067] 实施例5:

HOBT类似物的制备方法,包括,

将0.1mol 1-羟基苯并三唑(HOBT)溶于1000mL乙醚中,于28℃下搅拌均匀,然后滴加0.13mol 2,5-呋喃二甲酰氯(于30分钟内滴加完毕),于28℃下滴加完毕后继续反应3小时,待反应完成后进行抽滤,然后利用石油醚-乙酸乙酯重结晶,得到式(I)所示的HOBT类似物,产率为91.46%,<sup>1</sup>H-NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ7.89(d,4H),7.74(s,2H),7.52(t,4H)。



- [0069] 一种Retatrutide的制备方法,包括,  
1、肽树脂的制备  
与实施例1中“肽树脂的制备”基本相同,不同之处为:利用HOBT类似物替换HOBT。
- [0070] 2、Retatrutide粗肽的制备  
与实施例1中“粗肽的制备”相同,Retatrutide粗肽收率113.89%,HPLC纯度87.76%。
- [0071] 3、Retatrutide精品的制备  
与实施例1中“Retatrutide精品的制备”相同,Retatrutide精品纯度99.89%,单杂均小于0.1%,纯化收率61.05%(以Retatrutide粗肽计)。
- [0072] 与实施例1相比,本实施例5合成方法制得Retatrutide粗肽的HPLC纯度更高,Retatrutide精品的纯化收率也更高;以上结果这说明相较采用DIC和本实施例5制得的HOBT类似物作为缩合剂制备Retatrutide,能够提高Retatrutide粗肽的纯度和Retatrutide精品肽的纯化收率。
- [0073] 实施例6:  
一种Retatrutide的制备方法,包括,  
1、肽树脂的制备  
与实施例2中“肽树脂的制备”基本相同,不同之处为:利用实施例5制得的HOBT类似物替换HOBT。
- [0074] 2、Retatrutide粗肽的制备  
与实施例2中“粗肽的制备”相同,Retatrutide粗肽收率108.62%,HPLC纯度91.01%。
- [0075] 3、Retatrutide精品的制备  
与实施例1中Retatrutide精品的制备”相同,Retatrutide精品纯度99.92%,单杂均小于0.1%,纯化收率64.39%(以Retatrutide粗肽计)。
- [0076] 与实施例2相比,本实施例6合成方法制得Retatrutide粗肽的HPLC纯度更高,Retatrutide精品的纯化收率也更高;以上结果这说明相较采用DIC和本实施例5制得的HOBT类似物作为缩合剂制备Retatrutide,能够提高Retatrutide粗肽的纯度和Retatrutide精品肽的纯化收率。
- [0077] 本发明的操作步骤中的常规操作为本领域技术人员所熟知,在此不进行赘述。
- [0078] 以上所述的实施例对本发明的技术方案进行了详细说明,应理解的是以上所述仅为本发明的具体实施例,并不用于限制本发明,凡在本发明的原则范围内所做的任何修改、补充或类似方式替代等,均应包括在本发明的保护范围之内。