研究论文

Setmelanotide 的制备工艺改进

郭 晨[1,2]，冯 军[3]，蔡正艳[2]，东圆珍[3]，杨桂英[3*]

（1. 中国药科大学生命科学与技术学院，江苏南京 211100；2. 中国医药工业研究总院，上海 201203；
3. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：采用固相合成法，以 Rink Amide MBHA 树脂为载体、Fmoc 保护的氨基酸为原料、1- 羟基苯并三唑（HOBt）/*N*,*N*'- 二异丙基碳二亚胺（DIC）为缩合试剂、三氟乙酸（TFA）体系为裂解液，按照减肥药 setmelanotide（**1**）的氨基酸序列制得还原型 **1** 粗肽，后采用双氧水氧化法环化还原型 **1**，用 RP-HPLC 技术进行分离纯化，得到纯度 98％以上的 **1** 精制品，总收率约 47％；并对其制备过程中的相关工艺参数进行了探讨和优化，明确了关键工艺参数，为工业化生产奠定基础，也为其他多肽药物研究提供了技术参考。

关键词：setmelanotide；固相合成；减肥药；工艺改进

中图分类号：R979.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2022）08-1133-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.006

Improvements in the Preparation Process of Setmelanotide

GUO Chen[1,2], FENG Jun[3], CAI Zhengyan[2], DONG Yuanzhen[3], YANG Guiying[3*]

(*1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211100; 2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 3. Shanghai Domirui Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: In this paper, using Rink Amide MBHA resin as the carrier, Fmoc-protected amino acids as the raw materials, 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)/*N*,*N*'-diisopropylcarbodiimide (DIC) as the condensation reagents, and trifluoroacetic acid (TFA) system as the lysis solution, the prototype setmelanotide (**1**) crude peptide was synthesized by a solid-phase synthesis method according to the amino acid sequence of **1**, a weight loss agent. Then the oxidative type **1** was obtained by hydrogen peroxide oxidation method. After separation and purification by the RP-HPLC method, the **1** purified product with a purity of more than 98% was obtained. The total yield of this process was about 47%. The related process parameters in the preparation process of **1** were discussed and optimized. In line with the principle of improving yield and reducing cost, the process parameters of each link were clarified and kept within a controllable range, which laid the foundation for its industrialized large-scale production and also provided a technical reference for other peptide drug researches.

Key Words: setmelanotide; solid-phase synthesis; weight loss agent; process improvement

Setmelanotide（**1**）是一种多肽类药物，为黑素皮质素 4 受体（melanocortin-4 receptor，MC4R）的选择性激动药，其氨基酸序列是 Ac-Arg[1]-Cys[2]-D-Ala[3]-His[4]-D-Phe[5]-Arg[6]-Trp[7]-Cys[8]-NH_2（cycl 2→8），化学结构式如图 1 所示。**1** 最早由法国 Ipsen 公司发

收稿日期：2021-11-17

作者简介：郭 晨（1997—），女，硕士研究生，专业方向：生物制药工程。

通信作者：杨桂英（1988—），女，助理研究员，从事多肽药物的研发。

E-mail：952921740@qq.com

现，由美国 Rhythm Pharmaceuticals 公司开发，于 2020 年 11 月 27 日被美国 FDA 批准用于 6 岁及以上由阿黑皮素原（proopiomelanocortin，POMC）、前蛋白转化酶枯草溶菌素（proprotein convertase subtilisin/kexin type 1，PCSK1）和瘦素受体（leptin receptor，LEPR）基因缺陷引起的肥胖患者的慢性体质量管理[1—4]，商品名为 Imcivree，系 FDA 批准的首个用于治疗这些罕见遗传性肥胖病的药物。研究显示在与 POMC、PCSK1 和与 MC4R 激活不足相关的 LEPR 缺乏症患者中，**1** 重新激活了 MC4R 途径的活性，从而通过减少热量摄入和增加能量消耗来减少饥饿感和促进减肥[5]。目前国内仅有一篇专利对 **1** 合成工艺有讨论[6]，其使用的氧化方法为碘氧化法；国外也只有原研专利中简单提到多肽合成的常规实验操作。

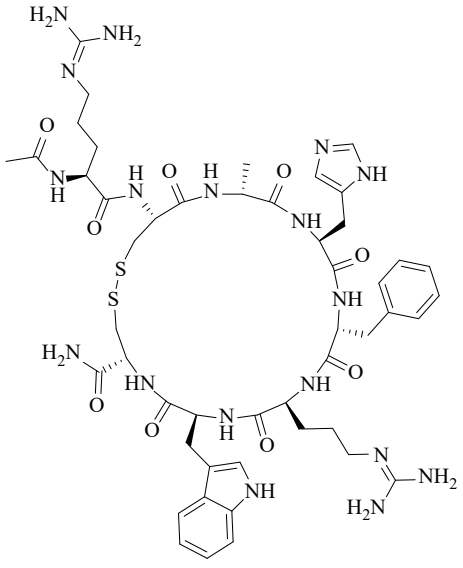


图 1　1 的化学结构式

Fig.1　Chemical Structure of **1**

本研究采用固相合成法得到还原型 **1** 粗肽后，对粗肽中的二硫键进行环化处理，通过反相高效液相色谱法分离纯化，最终得到高纯度 **1**，并对制备过程中的相关工艺参数进行了优化。

1　仪器与试药

CS136XT 型多肽固相合成仪［希施生物科技（上海）有限公司］；Allegra X-22 型低温高速离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；BT125D 型电子天平（德国 Sartorius 公司）；Dionex UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher 公司）；600E-2487 型半制备型液相分析仪和 Xevo G2-XS QTof 高分辨质谱仪（美国 Waters 公司）；USC-502 型超声仪（上海波龙电子设备有限公司）；R-300 型旋转蒸发仪（瑞士 Buchi 公司）；FD5-3 型真空冷冻干燥机［金西盟（北京）仪器有限公司］；SpectraMax i3X 型多功能酶标仪（美国 MD 公司）；Milli-Q-Advantage A10 型超纯水仪（美国 Millipore 公司）；CKX53 型倒置生物显微镜（日本 Olympus 公司）。

Rink Amide MBHA 树脂（0.47 mmol/g，西安蓝晓生物科技有限公司）；Fmoc- 氨基酸［希施生物科技（上海）有限公司］；*N*,*N*'- 二甲基甲酰胺（DMF）、二氯甲烷（DCM）均购自上海素元化工有限公司；1- 羟基苯并三唑（HOBt）、*N*,*N*'- 二异丙基碳二亚胺（DIC）、茴香硫醚、苯酚、三氟乙酸（TFA）、三异丙基硅烷（TIS）和乙二硫醇（EDT）均购自上海吉尔生化有限公司；*N*,*N*'- 二异丙基乙胺（DIEA，上海迈瑞尔化学技术有限公司）；乙酸酐、哌啶（PIP）、苯酚、茚三酮、二甲基亚砜（DMSO）、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 和双氧水等均为市售分析纯。

MC4R-CRE-bla CHO-K1 细胞（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，批号 879723B）；LANCE® Ultra cAMP 超环腺苷酸试剂盒（包括 cAMP Detection Buffer、ULight-anti-cAMP、Eu-cAMP tracer solution 等，美国 PerkinElmer 公司）；美拉诺坦（melanotan- Ⅱ，MT- Ⅱ）冻干粉［希施生物科技（上海）有限公司，批号 BA353］；DEME 分析培养基、胎牛血清、非必需氨基酸（non-essential amino acid，NEAA）、4- 羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES）、青霉素、链霉素、杜氏磷酸缓冲液（DPBS，pH 7.0）均购自美国 Gibco 公司。

2　方法与结果

2.1　固相合成步骤

以下合成过程均在氮气保护下，于多肽固相合成仪中进行[7—8]。

2.1.1　树脂溶胀

精密称取 Rink Amide MBHA（0.47 mmol/g）树脂（1.02 g，0.47 mmol）置多肽固相合成仪的反应器中，加入 DMF 15 ml 浸泡 2 h，使树脂充分溶胀，

将液体排空。

2.1.2 脱 Fmoc 保护基

向溶胀好的树脂中加入脱保护试剂（20% PIP 的 DMF 溶液）15 ml，混合 20 min，用 DMF（10 ml×6）洗涤。取少许树脂加入 5% 茚三酮的无水乙醇溶液 20 μl 和 80% 苯酚的无水乙醇溶液 80 μl[7]，检测 Fmoc 脱除情况，树脂颗粒呈紫黑色说明脱保护完全。

2.1.3 缩合反应

向反应器中加入 C 端第一个 Fmoc 保护氨基酸 Fmoc-Cys（Trt）-OH（树脂的 3 倍物质的量），并加入相当于树脂 3 倍物质的量的 HOBt 和 DIC，以及 DMF 10 ml，室温混合反应 1 h，取少量树脂进行茚三酮反应（操作同“**2.1.2**”项），树脂颗粒呈无色或淡黄色表明反应完全。

2.1.4 肽链的延长

缩合反应结束后排干系统，用 DMF（10 ml×6）洗涤，按照从肽链 C 端到 N 端的顺序依次加入各氨基酸，重复脱保护和缩合反应的步骤，直至所有氨基酸缩合完成，在 N 端结尾加入乙酸酐，得到 C 端与树脂连接、N 端乙酰化和侧链基团连有保护基的树脂肽，用 DCM（10 ml×6）洗涤，固相合成过程如图 2 所示。排空液体后于 37 ℃减压干燥 24 h。

2.1.5 裂解与沉淀

将干燥树脂肽置 50 ml 离心管中，按照每 100 mg 树脂肽加入 1 ml 的量加入裂解试剂（TFA ∶ 水 ∶ EDT ∶ TIS=85 ∶ 5 ∶ 5 ∶ 5），室温搅拌反应 2 h，裂解结束后用石英砂漏斗过滤，收集滤液，加入 10 倍滤液体积且预冷至 －18 ℃的无水乙醚，沉淀多肽，离心（10 000×*g*）5 min，弃去上清。取沉淀同上重复操作 6 次，减压干燥 24 h 后称重，得到的白色固体即全脱保护 **1** 粗肽（0.335 9 g，合成收率 63.72%，计算公式见式①）。

$$\text{合成收率}=\frac{W_{\text{实际}}}{W_{\text{理论}}}\times 100\%=\frac{W_{\text{实际}}}{n_{\text{树脂}}\times M}=$$

$$\frac{335.86}{0.471\times 1\,119}\times 100\%=63.72\% \qquad ①$$

其中，$W_{\text{实际}}$表示实际全脱保护粗肽质量；$W_{\text{理论}}$表示理论全脱保护粗肽质量；$n_{\text{树脂}}$表示树脂物质的量；M 表示还原型 **1** 粗肽的相对分子质量。

2.2 粗肽分析

2.2.1 HPLC 条件

色谱柱 YMC-Pack ODS-AM 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 20 mmol/L 硫酸钠溶液（pH 2.0），B 为乙腈，洗脱梯度（0—32 min，B 5%—

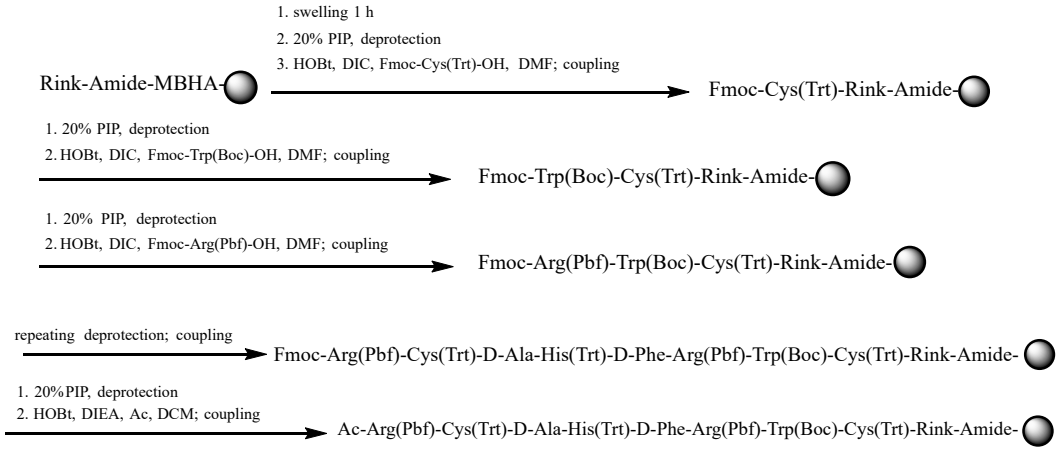


图 2 1 固相合成过程示意图

Fig.2 Schematic Diagram of Solid-phase Synthesis of **1**

45%）；检测波长 215 nm；流速 1 ml/min；柱温 35 ℃；进样量 10 μl。检测结果显示，粗肽纯度为 89.22%（峰面积归一化法），色谱图见图 3。

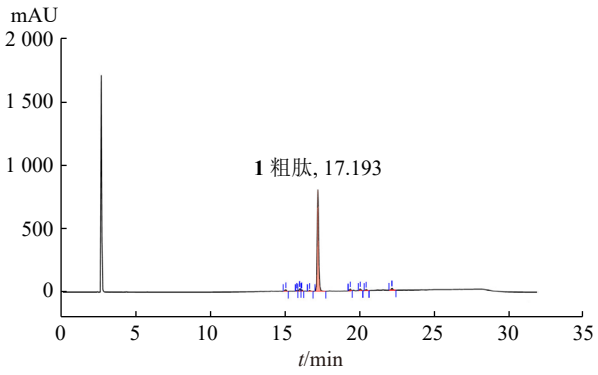


图 3　1 粗肽的 RP-HPLC 图谱

Fig.3　RP-HPLC Chromatogram of **1** Crude Peptide

2.2.2　ESI-MS 分析

取 1 mg/ml 的 **1** 粗肽产品进行 ESI-MS 分析，可知主峰 *m/z* 为 1 119.69[M+H]$^+$，与还原型 **1** 的理论相对分子质量基本一致。

2.3　二硫键的形成（环化）

上述得到的还原型 **1** 粗肽按照 5 mg/ml 的质量浓度溶于 3%双氧水中，室温密闭搅拌反应 3 h[9]，用 RP-HPLC 监测反应进程。3 h 后二硫键氧化反应完成 95%以上，用 0.22 μm 水膜过滤后纯化。

2.4　分离纯化

2.4.1　制备型色谱条件

采用制备型 HPLC 法进行纯化。色谱条件：色谱柱 YMC-Pack ODS-A-HG 制备柱（10 mm×250 mm，10 μm）；流动相 A 为 0.05% TFA 水溶液，B 为 0.05% TFA 乙腈溶液，梯度洗脱，程序见表 1；检测波长 215 和 280 nm；流速 5.0 ml/min；柱温 35 ℃。

表 1　梯度洗脱程序

Tab.1　Gradient Elution Procedure

t/min	A/%	B/%
0	90	10
5	90	10
15	80	20
60	40	60

2.4.2　真空冷冻干燥

将上述经纯化后样品浓度大于 95%的收集液合并，减压蒸除乙腈，剩余物真空冷冻干燥得到 **1** 精制品，纯度达 98.23%（HPLC 归一化法），按下式计算得纯化收率和精制品总收率分别为 74.19%和 47.27%。

$$\text{纯化收率}=\frac{\frac{A_{\text{纯化后}}}{V_{\text{进样}}}\times V_{\text{纯化后}}}{\frac{A_{\text{纯化前}}}{V_{\text{进样}}}\times V_{\text{纯化前}}\times D}=\frac{\frac{104.406\,2}{2}\times 23}{\frac{89.912\,2}{10}\times 18\times 10}=74.19\%$$

其中，$A_{\text{纯化后}}$表示纯化后峰面积；$V_{\text{进样}}$表示进样体积；$A_{\text{纯化前}}$表示纯化前峰面积；$V_{\text{纯化后}}$表示纯化后样品体积；$V_{\text{纯化前}}$表示纯化前样品体积；D 表示稀释倍数。

精制品总收率/%=合成收率×纯化收率=63.72% ×74.19% =47.27%

2.5　工艺参数优化

2.5.1　裂解试剂组成

影响 **1** 粗肽收率和纯度的关键因素之一是多肽从树脂上裂解下来的程度。裂解试剂不仅要把多肽尽可能从树脂上裂解下来，还要将多肽所有的侧链保护基脱除并减少副反应，以保证产物的收率和纯度[10]。本研究从此角度出发考察了不同裂解液配方对还原型 **1** 粗肽收率和纯度及对后续氧化效率的影响，以此确定 **1** 合成工艺最优裂解液配方，结果见表 2（均在 37 ℃裂解 2 h 时取样检测）。其中，氧化效率为：环肽纯度/（直链肽纯度＋环肽纯度）×100%，而直链肽纯度＋环肽纯度即为裂解肽纯度。

综合考虑，选择裂解肽纯度和氧化效率最好且裂解肽峰面积较高的配方 4 为最佳裂解试剂组合。

2.5.2　裂解时间的选择

一般情况下增加反应时间有利于提高收率，但反应时间过长也会增加副反应的发生从而影响粗肽纯度。称取合成的树脂肽 50 mg 用如上最佳配方 4 裂解，通过比较还原型 **1** 粗肽在 37 ℃裂解 2.0、2.5、3.0 和 3.5 h 时的裂解肽纯度和裂解肽峰面积来确定最佳裂解时长。结果见表 3、图 4。可见裂解 2.0 h 时，

表 2 不同裂解液的比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

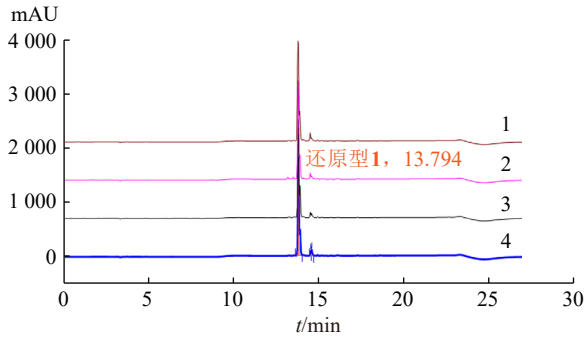
Tab.2 Comparison of Different Lysis Solutions ($\bar{x}\pm s$, n=3)

配方编号	裂解试剂组成及体积比	裂解肽纯度/%	裂解肽峰面积/mAU·min	氧化效率/%
1	TFA∶水=95∶5	58.54±0.85	125.26±2.51	27.55±1.07
2	TFA∶水∶TIS=95∶2.5∶2.5	60.62±0.97	177.37±2.43	63.08±1.03
3	TFA∶水∶EDT=95∶2.5∶2.5	80.72±1.17	116.30±2.37	72.44±1.12
4	TFA∶水∶EDT∶TIS=85∶5∶5∶5	86.42±0.58	169.04±1.47	98.20±1.05
5	TFA∶水∶EDT∶苯酚=85∶5∶5∶5	82.18±1.07	157.98±1.18	66.60±1.16
6	TFA∶水∶茴香硫醚∶TIS=85∶5∶8∶2	75.34±1.23	198.04±2.25	48.00±1.18
7	TFA∶水∶茴香硫醚∶TIS=85∶5∶5∶5	73.53±1.31	203.14±2.49	96.45±1.09

表 3 裂解时长对裂解肽纯度和峰面积的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Effect of Lysis Time on the Purity and Yield of Lytic Peptides ($\bar{x}\pm s$, n=3)

编号	裂解时长/h	裂解肽纯度/%	裂解肽峰面积/mAU·min
1	2.0	85.72±0.75	147.70±2.43
2	2.5	84.40±0.90	145.34±2.38
3	3.0	81.37±1.07	151.18±2.02
4	3.5	83.48±1.12	141.68±2.52



1－裂解 3.5 h；2－裂解 3.0 h；3－裂解 2.5 h；4－裂解 2.0 h

图 4 不同裂解时长的产物色谱图

Fig.4 Chromatograms of Products with Different Lysis Time

裂解肽纯度和裂解肽峰面积较好，裂解完成率较高且杂质峰较小，所以确定最佳裂解时长为 2.0 h。

2.5.3 二硫键形成方法优选

二硫键是保持蛋白质和多肽分子构象稳定和生物活性的关键因素，多肽分子内二硫键的形成给多肽固相合成带来了新的挑战，特别是高活性小分子多肽内二硫键的形成，这也是目前多肽药物研究的热点和难点之一。多肽分子内的二硫键一般是由两个半胱氨酸的巯基氧化生成，因此为了提高氧化效率、减少副产物的生成，需要进行合理选择，探索合适的氧化方法[11]。本研究对常见的氧化方法[12]，如 DMSO 氧化法、Cu^{2+} 氧化法、双氧水氧化法和空气氧化法进行测试；未选用铁氰化钾氧化法和碘氧化法的原因为：铁氰化钾见光或遇酸会产生剧毒物质，还原型 **1** 粗肽中含有对碘敏感的氨基酸残基 Trp 和 His。

在比较不同氧化方法的氧化效率时，称取 4 份还原型 **1** 粗肽分别溶于适量的水、0.3% 双氧水、20% DMSO 溶液及 2 mg/ml 硫酸铜水溶液中，使样品中 **1** 终质量浓度均为 5 mg/ml，室温搅拌反应，并用 RP-HPLC 监测反应进程，结果见图 5。

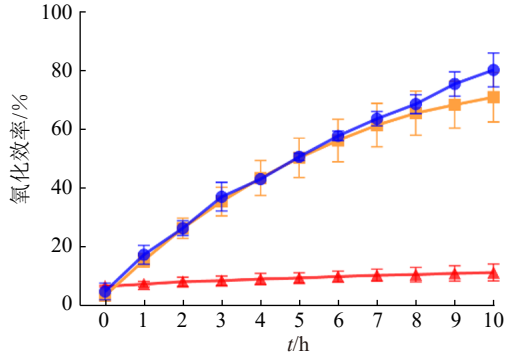


图 5 不同氧化方法的氧化效率比较（n=3）

Fig.5 Comparison of Oxidation Efficiencies of Different Oxidation Methods (n=3)

结果显示氧化效率依序为：双氧水氧化法 > DMSO 氧化法 >> 空气氧化法；而还原型 **1** 粗肽在加入 Cu^{2+} 时发生沉淀，尝试多种方法均无法使沉淀溶解。双氧水氧化法产生的杂质少，后处理也较为

方便，所以最终选定双氧水氧化法。

2.5.4 双氧水浓度和多肽浓度对氧化效率的影响

双氧水是一种高效氧化剂，一方面氧化剂浓度越高氧化速度越快，但反应越剧烈带来的副反应也势必会越多；另一方面多肽浓度越高，后处理越简单，但多肽受溶解度的限制，浓度过高时易形成胶体，不利于反应顺利进行，因此需要优化双氧水和多肽的浓度。

首先，称取 5 份还原型 **1** 粗肽分别溶于 0.3%、1%、2%、3%和 5%的双氧水中，使样品中 **1** 终质量浓度为 5 mg/ml，室温搅拌反应并用 RP-HPLC 跟踪进程，结果见图 6。可见随着双氧水浓度增大，样品氧化效率逐步提高；观察到双氧水浓度高于 3% 时，杂质数目增多，确定形成二硫键的最优双氧水浓度为 3%。

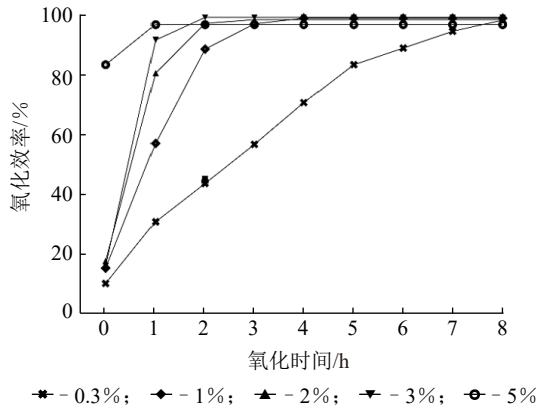


图 6　双氧水浓度对氧化效率的影响（*n*=3）

Fig.6　Effect of Hydrogen Peroxide Concentration on Oxidation Efficiency (*n*=3)

其次，称取 6 份还原型 **1** 粗肽分别溶于 3%双氧水中，使样品中 **1** 终质量浓度分别为 3、5、7、10、12 和 15 mg/ml。室温搅拌反应并用 RP-HPLC 跟踪进程，结果见图 7。可见，样品浓度越小，双氧水氧化效率越高，但为了工艺放大考虑，样品浓度不可过小，同时观察到样品质量浓度大于 5 mg/ml 时，氧化 3 h 后样品由溶液转变为胶体，所以最终确定 **1** 浓度为 5 mg/ml。

综上所述，当双氧水浓度为 3%、**1** 质量浓度为 5 mg/ml 时，二硫键氧化 3 h 基本反应完全，符合未来放大工艺的生产需求。

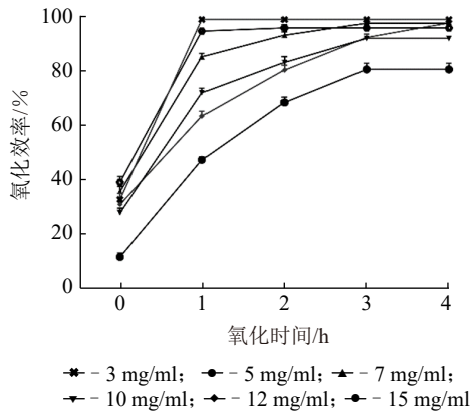


图 7　样品浓度对氧化效率的影响（*n*=3）

Fig.7　Effect of Sample Concentration on Oxidation Efficiency (*n*=3)

2.6 结构确证

2.6.1 高分辨质谱

取纯化后的 **1** 进行高分辨质谱 ESI-MS 分析，结果见图 8。**1** 分子式为 $C_{49}H_{68}N_{18}O_9S_2$，其精确相对分子质量的理论值为 1 116.485 8，从图 8 中可见测得的精确相对分子质量与理论值基本一致，单同位素分子离子峰与理论一致，元素组成为 $C_{49}H_{68}N_{18}O_9S_2$，与理论组成一致。

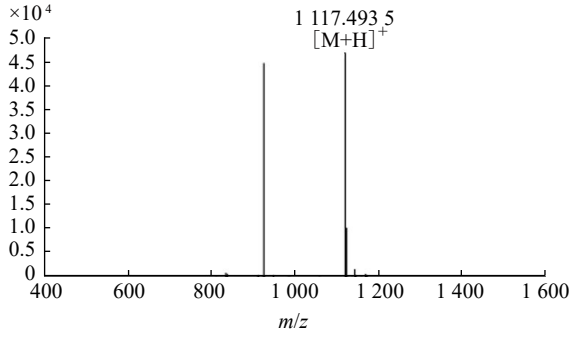


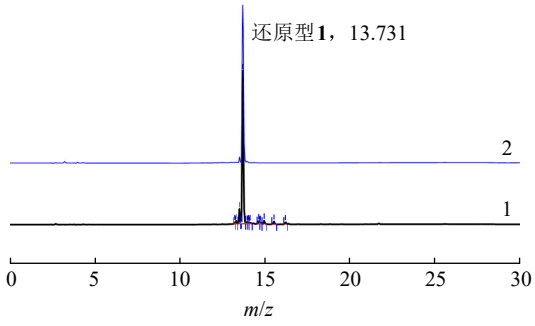
图 8　高分辨质谱图

Fig.8　High Resolution Mass Spectrum

2.6.2 二硫键确证

精密称取纯化后的氧化型 **1** 1 mg 置离心管中，加入 2 mmol/L 三（2- 羧乙基）膦（TCEP）水溶液

1 ml 将其溶解，置 37 ℃恒温水浴中还原反应 1 h，用 RP-HPLC 监测反应进程。同时将还原型 **1** 作为对照，色谱图见图 9。可见经 TCEP 还原后的样品与还原型 **1** 保留时间一致，证明 TCEP 还原成功，氧化型 **1** 中确实存在二硫键。对经 TCEP 还原后的样品进行 ESI-MS 确证，检测得 *m/z* 为 1 119.24[M+H]$^+$，与还原型粗肽 **1** 理论相对分子质量基本一致。



1 - 还原型 **1**，2 - 二硫键还原后的 **1**

图 9 还原型 1 色谱图

Fig.9 RP-HPLC Chromatogram of Prototype **1**

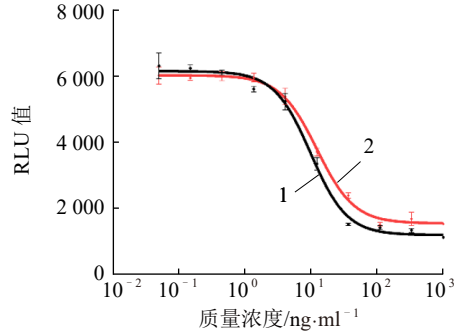
2.7 生物活性的测定

由于未能购买到国外上市的 **1** 制剂，本研究采用黑皮质素受体激动药 MT- Ⅱ作为阳性对照。采用时间分辨荧光共振能量转移法（time-resolved fluorescence energy transfer，TR-FRET）对自制 **1** 进行细胞生物学活性测定 [13]。

稀释培养基：在 DMEM 分析培养基中加入 10 % 胎牛血清、0.1 mmol/L NEAA、25 mmol/L HEPES、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素；pH 7.3；4 ℃保存。

取对数生长期的 MC4R-CRE-bla CHO-K1 细胞，铺在白色平底 384 孔细胞培养板中，每孔 2×10^5 个细胞。称取自制 **1** 冻干粉及对照品 MT- Ⅱ各 5 mg，分别溶于超纯水 1 ml 中，随后均用稀释培养基稀释至待测物起始质量浓度为 1 000 ng/ml，再进行 1 ∶ 3 梯度稀释，共 9 个稀释度，依次加至上述 384 孔板（含细胞液）中。25 ℃避光培养 0.5 h。ULight-anti-cAMP 和 Eu-cAMP tracer solution 分别用 cAMP Detection Buffer 稀释，再按 1 ∶ 1 混合后加至上述 384 孔板中，25 ℃避光培养 1 h，采用酶标仪进行 TR-FRET 检测。

利用 Prism 8 软件分析试验数据，以样品质量浓度为 X 轴，对应的 cAMP 积累量［用相对光单位（RLU）值表示］为 Y 轴，选用四参数方程进行拟合，绘制阳性对照和供试品的剂量反应曲线，计算 EC_{50} 值，结果见图 10。



1 - **1**；2 - MT-II

图 10 1 及 MT- Ⅱ生物活性测定（*n*=3）

Fig.10 **1** and MT- Ⅱ Bioactivity Assay (*n*=3)

结果表明，**1** 和 MT- Ⅱ的 EC_{50} 值分别为 9.94 和 12.42 ng/ml，可见相同药物浓度下，**1** 的生物学活性高于 MT- Ⅱ，与文献报道一致 [14]。

3 结论

中国专利 111718408 公布了一种 **1** 制备工艺 [6]，其中使用的二硫键氧化方法为碘氧化法，但是 **1** 肽链中含有对碘敏感的氨基酸残基 Trp 及 His，且后处理烦琐，产物需要检测碘残留；国外也仅报道了原研专利中的原料及常规合成手段，并未对详细工艺参数进行讨论。

本试验采用 Fmoc 固相合成法制备 **1** 并考察了工艺参数，最终确定以取代值为 0.47 mmol/g 的 Rink Amide MBHA 树脂为载体、HOBt 和 DIC 为缩合试剂、TFA ∶水∶ EDT ∶ TIS=85 ∶ 5 ∶ 5 ∶ 5 为配方的裂解试剂裂解 2.0 h 后得到还原型 **1** 粗肽，再以 3%双氧水氧化 5 mg/ml 的还原型 **1** 粗肽，RP-HPLC 分离纯化后得到纯度大于 98 %、总收率达 47.27%的 **1** 纯品。整体工艺简单经济且操作周期较短，适合工业化放大生产。后续将通过更换不同品

牌的制备型色谱柱及更改流动相的种类及比例等手段进一步提高产品收率和纯度。

参考文献：

[1] CLÉMENT K, VAN DEN AKKER E, ARGENTE J, *et al*. Efficacy and safety of setmelanotide, an MC4R agonist, in individuals with severe obesity due to LEPR or POMC deficiency: single-arm, open-label, multicentre, phase 3 trials [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, **8**(12): 960-970.

[2] FDA. FDA approves first treatment for weight management for people with certain rare genetic conditions [EB/OL]. (2020-11-27) [2021-10-19]. www. fda. gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-approves-first-treatment-weight-management-people-certain-rare-genetic-conditions.

[3] HAWS R, BRADY S, DAVIS E, *et al*. Effect of setmelanotide, a melanocortin-4 receptor agonist, on obesity in Bardet-Biedl syndrome [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, **22**(11): 2133-2140.

[4] MARKHAM A. Setmelanotide: first approval [J]. *Drugs*, 2021, **81**(3): 397-403.

[5] KUMAR K G, SUTTONA G M, DONG J Z, *et al*. Analysis of the therapeutic functions of novel melanocortin receptor agonists in MC3R- and MC4R-deficient C57BL/6J mice [J]. *Peptides*, 2009, **30**(10): 1892-1900.

[6] 董华建, 郭德文, 文永均. 一种setmelanotide的制备方法: 中国, 111718408A [P]. 2020-07-06.

[7] SARIN V K, KENT S B, TAM J P, *et al*. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction [J]. *Anal Biochem*, 1981, **117**(1): 147-157.

[8] 王德心. 固相有机合成原理及应用指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

[9] 王良友, 潘和平, 陈正英. 多肽合成中几种形成二硫键方法的介绍[J]. 有机化学, 1998, **18**(6): 576-580.

[10] 杨桂英, 东圆珍, 冯　军, 等. 兰瑞肽的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2013, **44**(10): 961-965.

[11] 杨桂英. 兰瑞肽的固相合成工艺研究[D]. 南京: 中国药科大学硕士学位论文, 2014.

[12] ANNIS I, HARGITTAI B, BARANY G. Disulfide bond formation in peptides [J]. *Methods Enzymol*, 1997, **289**: 198-221.

[13] HOLDER J R, XIANG Z, BAUZO R M, *et al*. Structure-activity relationships of the melanocortin tetrapeptide Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH_2 at the mouse melanocortin receptors. 4. Modifications at the Trp position [J]. *J Med Chem*, 2002, **45**(26): 5736-5744.

[14] GRIECO P, CAI M, HAN G, *et al*. Further structure-activity studies of lactam derivatives of MT-Ⅱ and SHU-9119: their activity and selectivity at human melanocortin receptors 3, 4, and 5 [J]. *Peptides*, 2007, **28**(6): 1191-1196.