卡格列肽的制备工艺开发

段 煜[1]，东圆珍[1,2]，王成成[2]，路建光[1,2]，黄帅义[1,2]，冯 军[1,2]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：卡格列肽（cagrilintide，**1**）是一款长效脂化修饰胰岛淀粉素类似物，与司美格鲁肽的复方制剂 CagriSema 在最新的Ⅲ期临床试验中展现出高达 22.7%的减重效果。然而，由于氨基酸序列较长，给 **1** 的合成和纯化带来挑战。该研究采用固相肽合成策略，以 Rink Amide AM 树脂为固相载体，Fmoc 保护的氨基酸为原料，2- 肟氰乙酸乙酯、*N*,*N*'- 二异丙基碳二亚胺为缩合试剂，三氟乙酸体系为裂解试剂，按照 **1** 的氨基酸序列，从 C 端依次连接氨基酸直至 N 端的二十烷二酸，制得还原型 **1**；随后采用碘氧化法构建分子内二硫键，经反相高效液相色谱分离和纯化，获得纯度达 98%的精制品，总收率为 26%。该研究系统探讨和优化了相关制备工艺参数，可为 **1** 的工业化生产提供借鉴。

关键词：卡格列肽；减肥药；固相合成；反相纯化；工艺开发

中图分类号：TQ464.7 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2025)08-1017-10

引用：段 煜, 东圆珍, 王成成, 等. 卡格列肽的制备工艺开发[J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(8): 1017-1026. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2025.08.007

Development of Preparation Process for Cagrilintide

DUAN Yu[1], DONG Yuanzhen[1,2], WANG Chengcheng[2], LU Jianguang[1,2], HUANG Shuaiyi[1,2], FENG Jun[1,2]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai Domirui Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Cagrilintide(**1**) is a long-acting lipidated analogue of amylin, and its compound preparation with semaglutide, known as CagriSema, has demonstrated a weight reduction effect of up to 22.7% in the latest phase Ⅲ clinical trials. However, the long amino acid sequence of **1** poses challenges for its synthesis and purification. In this paper, using Rink Amide AM resin as the carrier, Fmoc-protected amino acids as raw materials, ethyl cyanoglyoxylate-2-oxime/*N*,*N*'-diisopropylcarbodiimide as condensation reagents, and trifluoroacetic acid system as the lysis solution, the reduced crude peptide was synthesized by a solid phase peptide synthesis(SPPS) method from the C-terminus to the N-terminus of C20 diacid according to the amino acid sequence of **1**. The intramolecular disulfide bonds were subsequently formed through iodine oxidation. The crude peptide was purified by RP-HPLC, affording a purified product with a purity of 98% and a total yield of 26%. Additionally, this study explored and optimized the preparation process parameters, providing valuable insights for industrial production of **1**.

Key Words: cagrilintide; anti-obesity drug; solid-phase synthesis; reverse purification; process development

卡格列肽（cagrilintide，**1**）是一款由诺和诺德公司开发的新型长效脂化修饰胰岛淀粉素（amylin）类似物[1]。**1** 由 37 个氨基酸组成，C 末端为酰胺型，N 末端的 α 氨基连接 1 个 γGlu 和 1 个二十烷二酸（C20 diacid），其氨基酸序列为 C20 diacid-γGlu-KCNTATCATQRLAEFLRHSSNNFGPILPPTNVGSNTP-NH_2(cycl 2-7)，化学结构如图 1 所示。胰岛淀粉素通过激活位于延髓和下丘脑的特定受体，产生饱腹感，同时在非低血糖状态下抑制餐后胰高血糖素分泌，并延缓胃排空，有助于调控血糖处于稳态[1—2]。

收稿日期：2025-02-17

基金项目：上海市自然科学基金项目（22ZR1425800）

作者简介：段 煜，硕士，微生物与生化药学。

通信作者：冯 军，博士，研究员，从事多肽、重组蛋白和抗体药物的创新与开发。

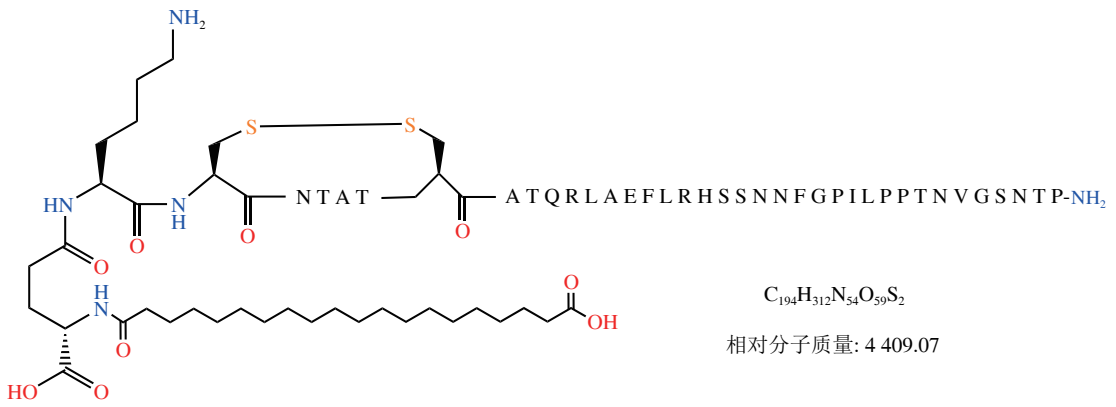
因此，研发并优化胰岛淀粉素类似物用于体质量管理和糖尿病治疗的潜力巨大。根据一项为期 68 周的Ⅲ期临床试验[3]报道，**1** 与司美格鲁肽的复方制剂 CagriSema 减重效果可达 22.7%，并显示出良好的安全性和耐受性。目前 **1** 的制备工艺报道较少，仅有 1 篇专利合成工艺[4]。原研公司的公开专利（CN 104395338A）[5]仅报道了采用常规固相合成方法的生产工艺。

目前，长肽的制备方法主要采用基因重组法和化学合成法。由于基因重组法所得多肽的 C 末端为羧基，需通过在 C 末端增加一个 Gly，再采用肽基甘氨酸 α 酰胺化单加氧酶（peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase，PAM）水解 Gly，以实现 C 末端酰胺化[6]。因 PAM 成本高昂，所以 C 端酰胺型多肽的合成主要采用固相合成法[7—10]。以往，对类似多肽的合成[9—10]通常使用 1- 羟基苯并三唑（1-hydroxybenzotriazole，HOBT）/*N*,*N*′- 二异丙基碳二亚胺（*N*,*N*′-diisopropylcarbodiimide，DIC）作为缩合剂，而本研究拟采用爆炸风险更低、消旋化副反应更少和偶联效率更佳的 2- 肟氰乙酸乙酯（Oxyma）[11]。本研究以 Rink Amide AM 树脂为固相载体，Oxyma 和 DIC 为缩合试剂，依次将 Fmoc 保护氨基酸与树脂偶联，得到 **1** 树脂肽，经三氟乙酸裂解得到还原型 **1** 粗品，再经过环化、分离、纯化、冻干得到高纯度 **1**。同时，探究了不同裂解条件的切割效率以及环化步骤中的氧化试剂、底物浓度，筛选了纯化过程中的固定相填料、流动相体系，以提高制备收率、降低生产成本，从而为后期工业化生产提供有价值的参考。

1　仪器与试剂

CS Bio Peptide Synthesizer CS136XT 型反应器（美国 CS Bio 公司）；LC 1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；依利特制备型高效液相色谱仪［依利特（大连）分析仪器有限公司］；BT125D 型电子天平（德国 Sartorius 公司）；Allegra X-22 型低温高速离心机（美国 Beckman 公司）；2.5 L 型立式冻干系统（美国 Labconco 公司）；ACQUITY QDa 型质谱仪（美国 Waters 公司）；Q Executive Plus 型质谱仪（美国 ThermoFisher 公司）；YMC C_4 分析柱、YMC C_4-12 nm 制备柱（日本 YMC 公司）；纳微 C_8-12 nm、C_{18}-12 nm 制备柱（苏州纳微科技股份有限公司）；Kromasil C_4-30 nm 制备柱（荷兰 Nouryon 公司）。

Rink Amide AM 树脂（批号 REI021）、Fmoc-Ala（批号 RCJ042）、Fmoc-Arg(Pbf)-OH（批号 RDI026）、Fmoc-Cys(Trt)-OH（批号 RDA009）、Fmoc-Gln(Trt)-OH（批号 F00700160721）、Fmoc-Gly-OH（批号 RDE010）、Fmoc-His(Trt)-OH（批号 RDH028）、Fmoc-Ile-OH（批号 F00900140906）、Fmoc-Lys(Boc)-OH（批号 RDF006）、Fmoc-Phe-OH（批号 F01600160418）、Fmoc-Pro-OH（批号 RBG038）、Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH（批号 RBI018）、Oxyma（批号 R EH003）均购于美国 CS Bio 公司；Fmoc-Asn(Trt)-OH(GLS090919-35102)、Fmoc-Glu(O*t*Bu)-OH(GLS220529-36601)、Fmoc-Leu-OH(GLS220801-35501)、



$C_{194}H_{312}N_{54}O_{59}S_2$

相对分子质量: 4 409.07

图 1　1 的结构图

Fig.1　Chemical Structure of **1**

Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH(GLS220719-36202) 均购于吉尔生化（上海）有限公司；DMF、DCM 均购于上海素元化工有限公司；甲醇、乙腈、无水乙醇购于朗阔生化科技（上海）有限公司；DIC、Fmoc-Glu-O*t*Bu、TFA、哌啶（piperidine，PIP）、三异丙基硅烷（triisopropylsilane，Tis）、甲基苯基硫醚（PhSMe）、苯酚（PhOH）、2,2'-(1,2- 乙二基双氧代）双乙硫醇（DODT）均购于上海阿达玛斯试剂有限公司；三（2- 羧乙基）膦[tris(2-carboxyethyl)phosphine，TCEP]盐酸盐、1,2- 乙二硫醇（1,2-ethanedithiol，EDT）、维生素 C(vitamin，Vc)、碘（I_2）、2,2'- 二硫二吡啶（2,2'-dipyridyl disulfide，DPDS）、过氧化氢和茚三酮等均为市售试剂；自制试剂：茚三酮检测试剂（A 为 5% 茚三酮 / 乙醇，B 为 80% 苯酚 / 乙醇）、PBS 缓冲液（pH 7 ～ 8）；孔径 0.22 μm 水系聚醚砜滤膜（天津津隆医疗器械销售有限公司）。

2 方法与结果

2.1 还原型 **1** 树脂肽的合成

2.1.1 树脂溶胀

称取取代度为 0.28 mmol/g 的 Rink Amide AM 树脂 1.0 g(0.28 mmol)，置多肽合成仪的反应器中，加入 DMF 15 mL，搅拌 60 min，使树脂充分溶胀，氮气鼓吹，除去溶液，剩余物用 DMF 10 mL 洗涤(2 min×2)。

2.1.2 脱 Fmoc 保护基

向溶胀好的树脂加入含 20% PIP 的 DMF 溶液 10 mL，搅拌（15 min×2）后过滤；剩余物用 DMF 10 mL 洗涤 2 次，再用甲醇 10 mL 洗涤 2 次，最后用 DMF 10 mL 洗涤 2 次。取少许树脂加入茚三酮检测试剂 A 40 μL 和 B 40 μL，置沸水浴中加热 5 min [7]，判断 Fmoc 去除程度，若树脂呈紫黑色则说明脱保护完全。

2.1.3 首个氨基酸的缩合

称取 Fmoc-Pro-OH 189 mg(0.56 mmol，2 eq)、Oxyma 120 mg(0.84 mmol，3 eq)、DIC 106 mg(0.84 mol，3 eq)，用 DMF 10 mL 溶解，预活化 30 min，投入反应器中，在氮气保护下反应，每隔 1 h 用茚三酮显色法检测，若树脂呈现无色或淡黄色则表示反应完全，反之则需要继续反应。

2.1.4 剩余氨基酸的缩合

缩合反应结束后，过滤除去母液，树脂用 DMF 10 mL 洗涤 1 次，再用甲醇 10 mL 洗涤 2 次，最后用 DMF 10 mL 洗涤 2 次。根据 **1** 的序列，从 C 端到 N 端偶联氨基酸，重复“**2.1.2**”项和“**2.1.3**”项下操作，直至全部氨基酸缩合完毕。最后用 DCM 10 mL 和甲醇 10 mL 交替洗涤 3 ～ 6 次，减压干燥 24 h，得到黄色树脂肽 3 220 mg。固相合成过程如图 2 所示。

2.2 树脂肽裂解与工艺优化

在酸裂解过程中，除了目标产物外，还会产生多种副产物，一般需要在裂解试剂中加入清除剂以捕获碳正离子。根据 **1** 的氨基酸组成以及合成时采用的侧链保护基，选取 PhOH、水、Tis、PhSMe、

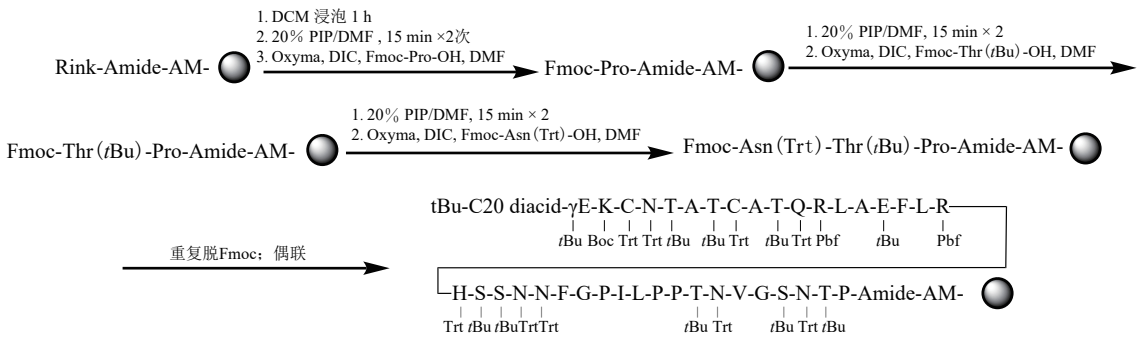


图 2 还原型 1 固相合成流程图

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

EDT、DODT 等作为清除剂[7—8]。其中，PhOH 能捕获 *t*Bu，也易于与氧化剂反应；水能清除 *t*Bu 和 Boc；Tis 能还原裂解过程中的敏感基团（如二硫键）；PhSMe 有助于去除 Trt 和 Pbf，并减少 Cys 侧链的氧化；EDT 也能够清除 *t*Bu，并减少 Cys 侧链的氧化；DODT 是 EDT 的一种替代品，具有恶臭较小的优点。

2.2.1　裂解配方优化

通过对比如表 1 所示的 9 组试剂对同一批还原型 **1** 树脂裂解含量以及纯度的影响，确定最优的裂解液组成分。

裂解方法：按表 1 配制各组裂解液，各 200 μL，分别与树脂肽 20 mg 在 20 ℃反应 2 h，用乙醚 1.6 mL 沉淀，离心（9 660×*g*）5 min；沉淀用乙醚洗涤 3 次，干燥后用水 1 mL 溶解，经孔径 0.22 μm 的水系聚醚砜滤膜过滤，用 HPLC 法分析。色谱条件如下：色谱柱 YMC C4 分析柱（4.6 mm×250 mm，5 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（0—5 min，B 25%；5—25 min，B 25%—65%）；检测波长 215 nm；流速 1 mL/min；柱温 45 ℃；进样量 10 μL。

结果如表 1 所示，配方 F 裂解液的成分较为简单，且裂解所得还原型 **1** 的峰面积较大。

2.2.2　裂解时间优化

通常增加反应时间有利于提高收率，但过长的反应时间也会增加副反应的发生风险，所以需要选择合适的反应时间。选用配方 F 裂解液，按“**2.2.1**”项下裂解方法操作，在反应 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h 时分别取样检测，对裂解时间进行优化。结果如图 3 所示，反应 2.0 h 时，还原型 **1** 主峰纯度和峰面积均较高，故确定裂解时间为 2.0 h。

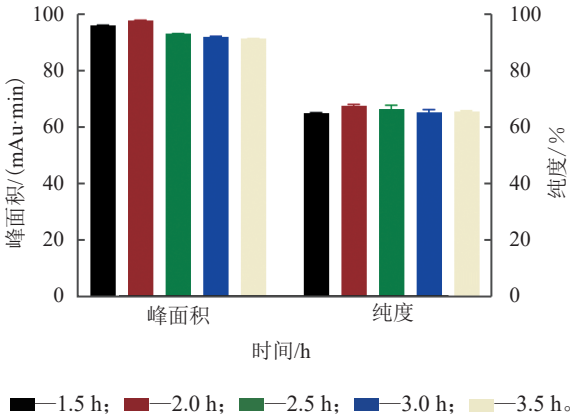


图 3　配方 F 不同裂解时长的比较（*n*=3）

Fig.3　Comparison of Different Lysis Durations for Recipe F (*n*=3)

2.2.3　裂解温度优化

裂解温度的变化对反应的影响尤为明显，温度较低会降低裂解效率，较高则会影响肽的稳定性，因此对裂解温度进行优化。设置如表 2 所示的反应温度进行裂解试验，采用配方 F 裂解液，裂解 2.0 h，其他条件同“**2.2.1**”项，所得结果见表 2。可见，在 25 ℃下反应，所得 **1** 主峰纯度和峰面积均较高。因此，后续试验的裂解温度设置为 25 ℃。

2.2.4　小结

综上所述，最终优化裂解工艺如下：取干燥的树脂肽 1.0 g，加入裂解液（由 TFA、PhOH、DODT、Tis 组成，体积比为 90∶2.5∶5∶2.5）10 mL，于 25 ℃搅拌反应 2 h。反应液用砂芯漏斗过滤，滤液加入冷乙醚（－20 ℃）80 mL，搅拌 5 min 后在－20 ℃静置 30 min，离心，弃去上层清液，白

表 1　不同裂解液比较（$\bar{x}\pm s$，*n*=2）

Tab.1　Comparison of Different Lysis Solutions ($\bar{x}\pm s$, *n*=2)

配方	裂解液组分	体积比	纯度 /%	峰面积 /(mAu·min)
A	TFA、水、Tis	95∶2.5∶2.5	59.80±1.18	163.87±1.88
B	TFA、水、DODT、Tis	85∶5∶5∶5	55.78±0.90	181.15±4.57
C	TFA、水、DODT、Tis	87.5∶5∶5∶2.5	57.41±1.20	205.38±1.72
D	TFA、水、PhSMe、Tis	85∶5∶5∶5	60.52±0.30	174.33±8.45
E	TFA、水、PhSMe、Tis	90∶5∶2∶3	56.96±1.10	177.95±0.47
F	TFA、PhOH、DODT、Tis	90∶2.5∶5∶2.5	60.18±0.10	214.35±1.52
G	TFA、水、EDT、Tis	85∶5∶5∶5	61.47±0.17	179.63±24.90
H	TFA、水、DODT、PhSMe、PhOH	82∶5∶5∶5∶3	54.51±1.09	172.73±0.75
I	TFA、水、DODT、PhSMe、PhOH、Tis	80∶2∶2∶4∶4∶8	60.54±0.08	202.02±3.63

表 2 配方 F 不同裂解温度的比较

Tab.2 Comparison of Different Lysis Temperatures for Recipe F

温度 / ℃	峰面积 /(mAu·min)	纯度 /%
15	108.52	34.79
20	197.21	61.26
25	220.05	61.33
30	186.24	57.24
35	159.55	51.33
45	77.78	34.10
55	9.82	7.91

色沉淀用乙醚洗涤 3 ～ 6 次，减压干燥。最终得白色固体（还原型 **1** 粗肽）325 mg。按式①计算得合成收率为 38.56%。

合成收率 =（实际粗肽质量 × 含量）/ 理论粗肽质量 ×100% ①

含量 =（粗肽峰面积 / 进样体积）/（标准品峰面积 / 进样体积）

2.3 还原型 1 粗肽分析

2.3.1 HPLC 分析

将所得还原型 **1** 粗肽配制成 1 mg/mL 的溶液，按“**2.2.1**”项下色谱条件进样检测，结果如图 4 所示。还原型 **1** 粗肽纯度为 61.53%，保留时间为 14.4 min。

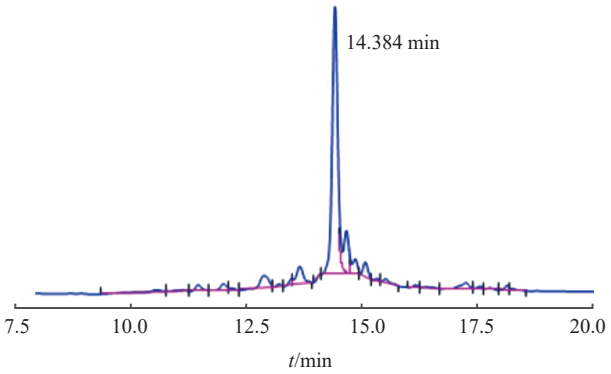


图 4 1 粗肽的 HPLC 图

Fig.4 HPLC Chromatogram of **1** Crude Peptide

2.3.2 ESI-MS 分析

质谱条件：离子源 电喷雾电离（electrospray ionization，ESI）源；检测模式 阳离子模式；质量扫描范围 *m/z* 100 ～ *m/z* 1 200；离子源温度 120 ℃；锥孔电压 15 V；毛细管电压 0.8 kV；脱溶剂气 N_2；脱溶剂温度 600 ℃；锥孔气 N_2；数据采集模式 全扫描模式。

取 1 mg/mL 的还原型 **1** 粗肽进行 ESI-MS 分析，结果如图 5 所示。主峰 *m/z* 为 1 103.63 $[M+4H]^{4+}$、883.00 $[M+5H]^{5+}$，与还原型 **1** 理论相对分子质量相一致。

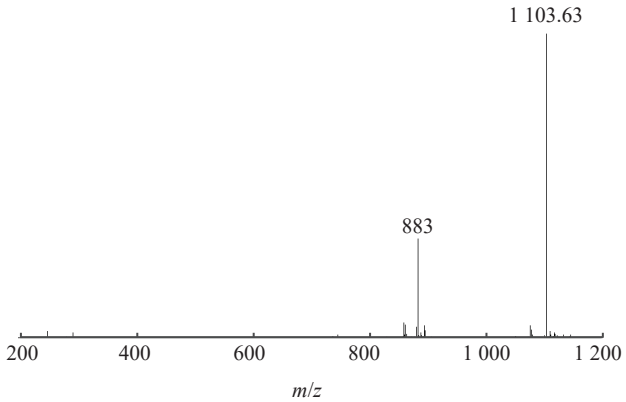


图 5 1 粗肽的 ESI-MS 图

Fig.5 ESI-MS of **1** Crude Peptide

2.4 环化工艺优化

N 端 2 位和 7 位 Cys 正确形成二硫键对胰岛淀粉素保留完全激动剂活性至关重要[12]。多肽的固相合成过程中，二硫键的形成主要采用氧化手段，**1** 序列中除了 Cys 外，还存在易氧化的 His。因此，为了提升氧化反应的效率并减少其他氨基酸的氧化，寻找合适的氧化策略显得尤为关键。

2.4.1 氧化试剂筛选

氧化方法：取 12 份还原型 **1**（每份 8 mg，每组氧化试剂 3 份）分别溶于碘溶液（1.05 eq）、DPDS 溶液（1.05 eq）、过氧化氢溶液（1%）、PBS 缓冲液（pH 7 ～ 8，暴露于空气中进行空气氧化），使 **1** 终质量浓度均为 2 mg/mL，25 ℃搅拌反应。

检测方法：每 0.5 h 取样 200 μL，经孔径 0.22 μm 的水系聚醚砜滤膜过滤，采用“**2.2.1**”项下色谱条件检测。

各氧化试剂对 **1** 的氧化效果如图 6 所示。对比结果显示，使用碘氧化剂反应 0.5 h 后基本反应结束，且所得产物的纯度较高。

2.4.2 化合物浓度对氧化结果的影响

在工业生产中，随着化合物浓度的增加，所需的溶剂减少，可降低生产工艺的复杂性和设备规模，从而提高生产效率和利用度，因此对化合物浓度进

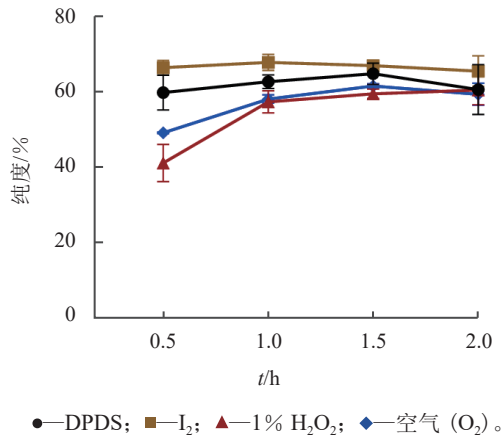


图 6　不同氧化试剂比较（*n*=3）

Fig.6　Comparison of Different Oxidizing Agents (*n*=3)

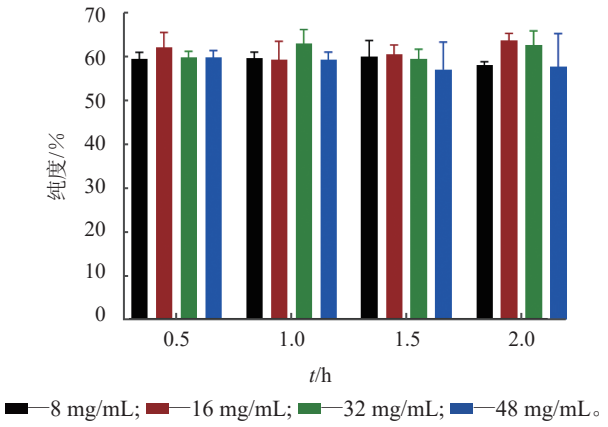


图 7　不同底物浓度的氧化效果比较（*n*=3）

Fig.7　Comparison of Oxidation Effect of Different Substrate Concentrations (*n*=3)

行筛选。

氧化方法：取 12 份还原型 **1**（每份 16 mg），分别配制成 **1** 质量浓度为 8、16、32、48 mg/mL 水溶液（每组 3 份），分别加入 1.05 eq 碘溶液（用甲醇溶解），25 ℃搅拌反应。

检测方法：每 0.5 h 取样 50 μL，用水稀释至 **1** 质量浓度为 2 mg/mL，经孔径 0.22 μm 的水系聚醚砜滤膜过滤，采用“**2.2.1**”项下色谱条件检测。

结果如图 7 所示，反应 0.5 ～ 2 h，各质量浓度组中 **1** 的纯度无显著性差异（系 GraphPad Prism 9.5.0 软件分析所得结果）。因此环化时间可为 0.5 ～ 2 h。

2.4.3　小结

氧化试剂优选碘溶液，环化时间控制在 0.5 ～ 2 h 之间；可根据生产需求以及设备可用性选择合适的底物浓度，满足从实验室到工业化生产的规模。

取还原型 **1** 200 mg，配制成 **1** 质量浓度为 10 mg/mL 溶液，缓慢滴入 50 mg/mL 碘的甲醇溶液，直至溶液微黄不褪色，搅拌 0.5 h 后滴入 20 mg/mL V_C 水溶液至反应体系呈无色。取样，按“**2.2.1**”项下色谱条件检测，结果如图 8 所示，可见氧化 0.5 h 时，二硫键的氧化完成，得氧化型 **1**。

2.5　分离和纯化

在多肽的反相 HPLC 纯化中，流动相的组成和色谱类型是影响多肽分离和纯化的关键因素，因此筛选了不同色谱柱填料以及不同流动相体系的分离

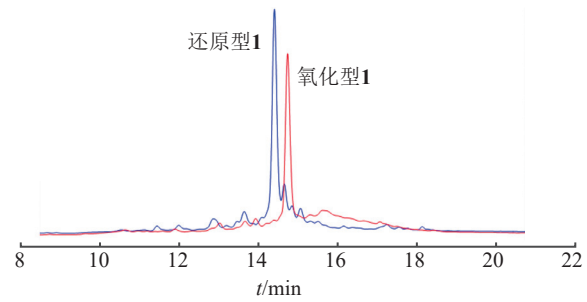


图 8　1 的氧化前后的 HPLC 图

Fig.8　HPLC Chromatograms of Reduced and Oxidized **1**

效果。

2.5.1　色谱柱填料筛选

反相色谱柱填料上键合的碳链越长，则疏水作用越强、吸附越强；较大孔径的色谱柱填料适合分离相对分子质量较大的长肽化合物。本项下选用制备型 HPLC 仪，对 C_4、C_8、C_{18} 色谱柱填料进行筛选。

试验过程：分别称取还原型 **1** 40 mg，配制成 **1** 质量浓度为 8 mg/mL 的水溶液，用碘氧化 0.5 h，使用 Vc 还原多余碘后用孔径 0.22 μm 的水系聚醚砜滤膜过滤并作为后续纯化工艺的上样料液。使用下述制备色谱条件，对制备色谱柱进行筛选。

制备色谱条件：流动相　A 为 0.5% 乙酸水溶液，B 为 0.5% 乙酸乙腈溶液，梯度洗脱，程序如表 3 所示；检测波长 215 nm，280 nm；流速 5 mL/min；柱

表 3 制备色谱的洗脱梯度

Tab.3 Liquid Phase Elution Gradient in Preparative Chromatography

柱体积（column volume，CV）	A/%	B/%
0	90	10
1	90	10
3	75	25
23	95	45

温 25 ℃。收集主峰纯度 >90%的馏分。

制备色谱柱类型：C_4-30 nm，C_4-12 nm，C_8-12 nm，C_{18}-12 nm。

结果如表 4 所示，其中 C_4-30 nm 色谱柱填料对 **1** 纯化效果较好。

表 4 不同色谱柱填料的比较结果

Tab.4 Comparison Results of Different Column Packings

填料	填料孔径 /nm	收率 /%	纯度 /%
C_4	30	84.12	96.91
C_4	12	82.35	95.53
C_8	12	76.60	95.66
C_{18}	12	68.99	96.47

2.5.2 流动相体系筛选

1 的结构中含有 C20 diacid，与色谱填料的键合相存在较强的相互作用，导致化合物峰形拖尾而影响分离效果。通过调整流动相的 pH 值和盐浓度可改善分离和纯化的效果。由于 **1** 在中性和碱性条件下稳定性较差[13]，因此仅考察酸性条件下常用离子对试剂 TFA、乙酸、硫酸钠的纯化效果，均使用 C_4-30 nm 填料，其他条件同“**2.5.1**”项。结果如表 5 所示，采用乙酸离子对试剂，即流动相 A 为 0.5% 乙酸水溶液，B 为 0.5%乙酸乙腈溶液时，**1** 的收率和纯度较高。

2.5.3 小结

1 含有 C20 diacid，与色谱柱填料的疏水作用强，疏水作用较弱的 C_4 填料对 **1** 的分离效果最佳，且 C_4-30 nm 填料优于 C_4-12 nm；纯化过程中乙酸体系相较于 TFA 体系和硫酸钠体系能获得更为平滑的色谱峰形，具有更高的杂质分离能力。

将“**2.4.3**”项下氧化结束的反应液使用孔径 0.22 μm 的水系聚醚砜滤膜过滤，使用制备型

表 5 不同流动相体系的比较

Tab.5 Comparison of Different Mobile Phase Systems

流动相体系	收率 /%	纯度 /%
A 为 0.05% TFA 水溶液，B 为 0.05% TFA 乙腈溶液	75.21	95.73
A 为 0.5%乙酸水溶液，B 为 0.5%乙酸乙腈溶液	84.12	96.91
A 为 50 mmol/L 硫酸钠水溶液（pH 2.4），B 为乙腈	72.77	93.75

HPLC 进行分离和纯化（流动相 A 为 0.5% 乙酸水溶液，B 为 0.5%乙酸乙腈溶液，梯度洗脱，0—40 CV，B 25%—35%）。收集主峰纯度 >95%的馏分，减压蒸馏除去乙腈，冷冻干燥得白色固体 41 mg。按“**2.2.1**”项下色谱条件进样检测，结果如图 9 所示。所得氧化型 **1** 纯度为 98.00%，保留时间为 14.7 min，纯化收率为 67.80%，路线总收率为 26.14%。

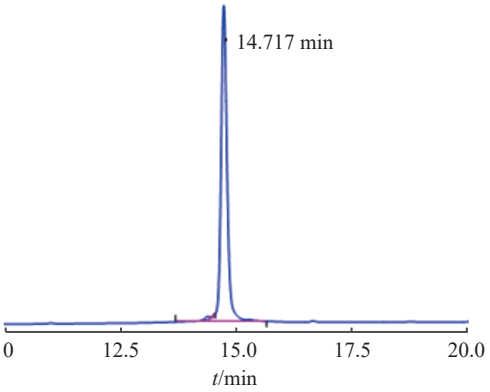


图 9 氧化型 1 的 HPLC 图

Fig.9 HPLC Chromatogram of Oxidized **1**

2.6 结构确证

2.6.1 高分辨质谱（HRMS）

质谱条件：Q Executive Plus 质谱仪；离子源 ESI 源，阳离子模式；质量扫描范围 *m/z* 500 ～ *m/z* 3 000；离子源温度 320 ℃；锥孔电压 55 V；毛细管电压 3.8 kV；脱溶剂气（N_2）流 30 L/min；脱溶剂温度 350 ℃；锥孔气（N_2）流速 10 L/min；归一化碰撞能量（Normalized Collision Energy，NCE）：20，30，40；数据采集模式 全扫描（Full MS）。

取纯化后的氧化型 **1** 进行高分辨质谱分析，结果如图 10 所示。*m/z* 为 1 470.429 42 $[M+3H]^{3+}$ 和 2 205.142 00 $[M+2H]^{2+}$，与理论相对分子质量相符。

2.6.2 液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）联用

色谱条件：色谱柱 Acclaim 120 色谱柱（2.1 mm×100 mm，3 μm）；流动相 A 为 0.1%的甲酸水溶液，B 为 0.1%的甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—2 min，B 20 %，2—10 min，B 20 % —35 %；10—15 min，B 35%—45%）；检测波长 280 nm；流速 0.3 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 1 μL。

质谱条件：离子源 ESI 源；检测模式 阳离子模式；质量扫描范围 *m/z* 100 ～ *m/z* 2 000；离子源温度 320 ℃；锥孔电压 55 V；毛细管电压 3.8 kV；脱溶剂气 N_2；脱溶剂流速 30 L/min；脱溶剂温度 350 ℃；锥孔气 N_2；锥孔气流速 10 L/min；NCE 20，30，40；数据采集模式 全扫描和数据依赖性二级扫描模式（Full MS-ddMS^2）。

采用 LC-MS/MS 进一步验证氧化型 **1** 的结构。取纯化后的氧化型 **1**，用终浓度为 5 mmol/L 的 TCEP 盐酸盐还原成还原型 **1** 进行 LC-MS/MS 分析，结果如图 11 所示。使用 BioPharma Finder 软件（5.0 版本）对得到的碎片离子进行归属，得到 **1** 的氨基酸序列，软件的序列匹配图如图 12 所示，测得的结果与理论序列相符，确证该产物为 **1**。（由于软件仅识别天然氨基酸，在图 11 和图 12 展示的氨基酸序列中，N 端的第 1 个氨基酸 E 实际是 γE；C20 diacid 作为 N 端修饰在图中未显示，但在计算过程中已经将其纳入考虑。）

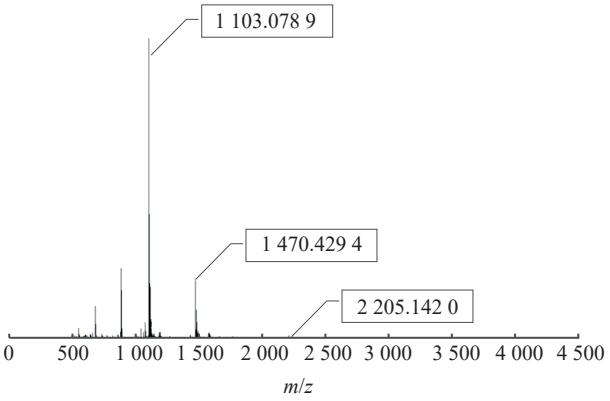


图 10 氧化型 **1** 的高分辨质谱图

Fig.10 HRMS of Oxidized **1**

3 结果与讨论

中国专利（CN114249808）[4] 公布了一种 **1** 的制备工艺，实施例中推算收率为 40.76 %，纯度

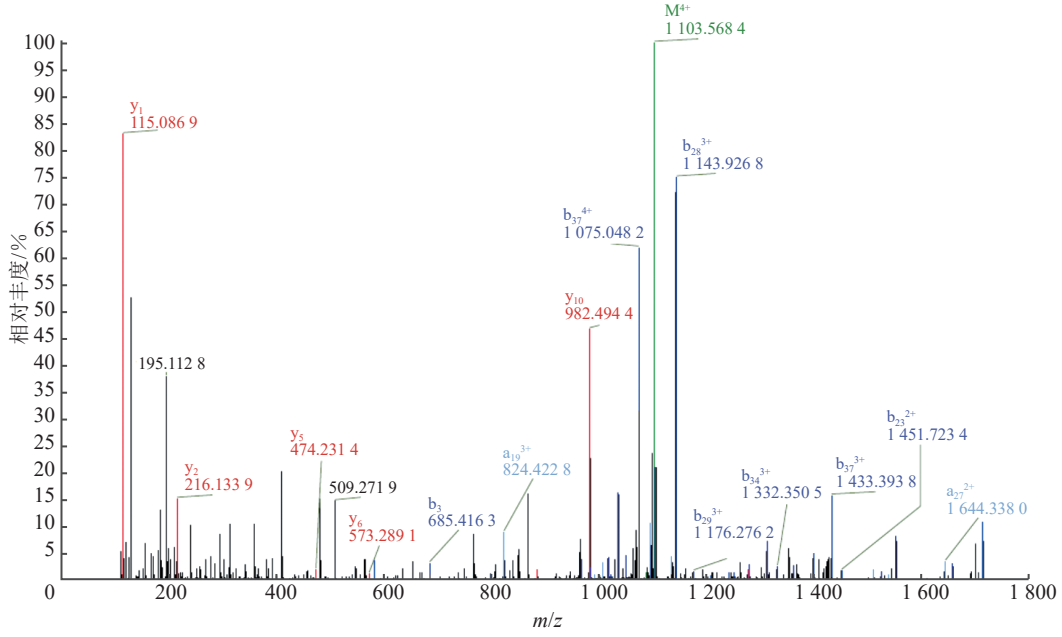


图 11 还原型 **1** 的液相色谱 - 串联质谱图

Fig.11 LC-MS/MS of Reduced **1**

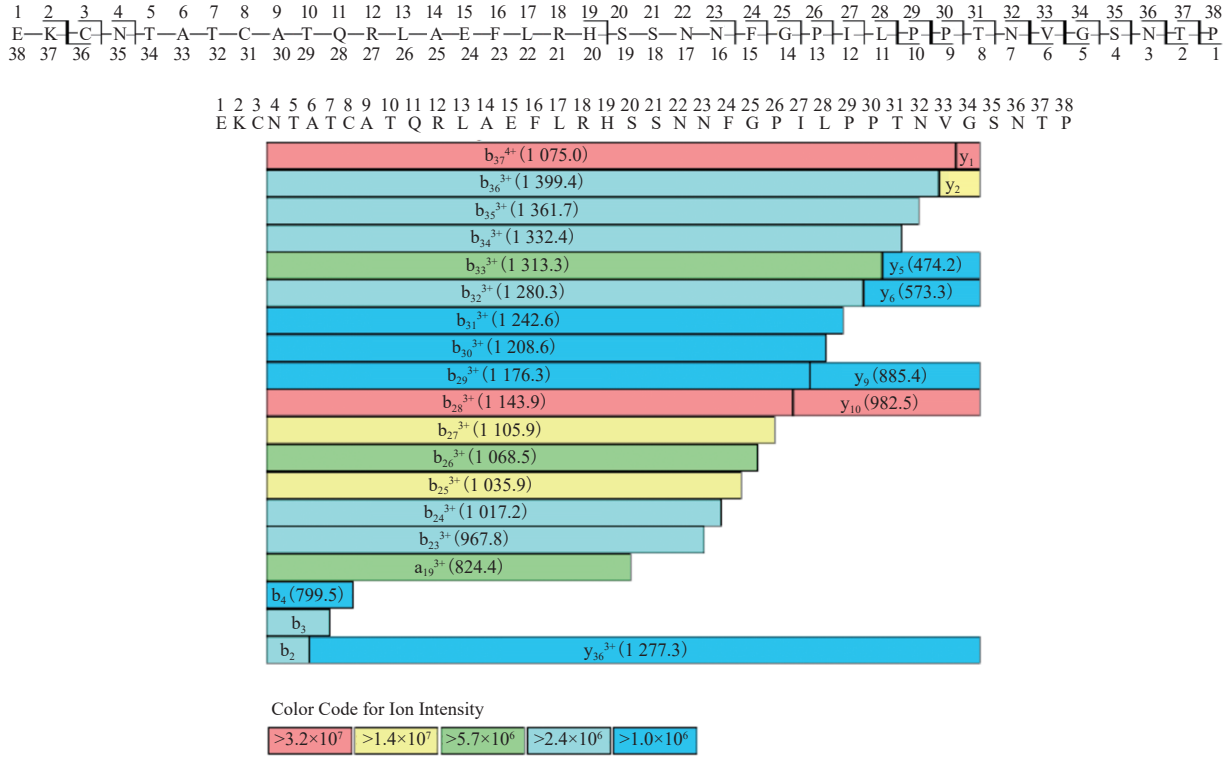


图 12　还原型 1 的序列匹配图

Fig.12　Sequence Matching Graph of Reduced **1**

97.55%，但其合成过程中采用理论合成规模 4 倍投料比的氨基酸、缩合试剂，成本较高；原研公司的专利 (CN104395338)[5] 也仅提及使用常规固相合成，并未对详细工艺参数进行讨论。

本研究采用 Fmoc 固相合成策略，以 Rink Amide AM 树脂为载体，采用 2 倍投料比、Oxyma/DIC 为缩合试剂进行固相合成，采用由 TFA、PhOH、DODT、Tis（体积比为 90 ∶ 2.5 ∶ 5 ∶ 2.5）组成的裂解液，于 25 ℃裂解 2 h 后得还原型 **1**；经碘氧化 0.5 h 后，使用乙酸、水、乙腈组成的流动相体系、C_4-30 nm 制备柱进行一步反相 HPLC 纯化，最终以 26.14%的路线总收率得到 **1**，HPLC 纯度为 98.00%。

本文主要研究了 **1** 的制备工艺，并旨在提高反应收率、降低工艺难度，为其工业化生产提供参考。下一步，将对自制的 **1** 进行细胞水平和动物水平的活性评价。此外，后续研究将采用二肽氨基酸、固相合成 / 液相合成混合法等合成策略，进一步探索产品的最佳合成工艺。

参考文献：

[1] KRUSE T, HANSEN J L, DAHL K, *et al*. Development of cagrilintide, a long-acting amylin analogue [J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(15): 11183-11194.

[2] LUTZ T A. Creating the amylin story [J]. *Appetite*, 2022, **172**: 105965.

[3] Novo Nordisk A/S. CagriSema demonstrates superior weight loss in adults with obesity or overweight in the REDEFINE 1 trial [EB/OL]. (2024-12-20) [2024-12-25]. https://www.novonordisk.com/content/nncorp/global/en/news-and-media/news-and-ir-materials/news-details.html?id=915082.

[4] 杭州诺泰澳赛诺医药技术开发有限公司. 一种 cagrilintide 的合成方法: 中国, 114249808A [P]. 2022-03-29.

[5] 诺和诺德 A/S（股份有限公司）. 人胰岛淀粉样多肽类似物: 中国, 104395338A [P]. 2015-03-04.

[6] PRIGGE S T, KOLHEKAR A S, EIPPER B A, *et al*. Amidation of bioactive peptides: the structure of peptidylglycine α-hydroxylating monooxygenase [J]. *Science*, 1997, **278**(5341): 1300-1305.

[7] 黄惟德, 陈常庆. 多肽合成 [M]. 北京: 科学出版社,

1985.

[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] 郭　晨 , 冯　军 , 蔡正艳 , 等. Setmelanotide 的制备工艺改进 [J]. 中国医药工业杂志 , 2022, **53**(8): 1133-1140.

[10] 杨桂英 , 李盈淳 , 王　华 , 等. 醋酸加尼瑞克的制备与工艺优化 [J]. 中国医药工业杂志 , 2016, **47**(8): 967-972.

[11] SUBIRÓS-FUNOSAS R T, PROHENS R A, BARBAS R, *et al*. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion [J]. *Chemistry*, 2009, **15**(37): 9394-9403.

[12] 吴伟洁 , 王彦超 , 凌　伟 , 等. 人胰淀素的研究进展 [J]. 生理学研究 , 2018, **6**(4): 27-33.

[13] 诺和诺德股份有限公司. 配制方法: 中国 , 118973602A [P]. 2024-11-15.

(上接第 1002 页)

进 [J]. 中国药物化学杂志 , 2012, **22**(3): 204-208.

[11] 李立标 , 张　瑾 , 郑　爱 , 等. 一种制备达比加群酯的改进方法 : 中国 , 105348262B [P]. 2018-09-04.

[12] 巩万春 , 黄　建 , 谢建树 , 等. 一种苯磺酸盐、其制备方法及其在制备达比加群酯中的应用 : 中国 , 111253369A [P]. 2020-06-09.

[13] 刘　雄 , 阮张寅 , 周国斌 , 等. 一种达比加群酯中间体的制备方法 : 中国 , 111440149A [P]. 2020-07-24.

[14] 张传磊 , 侯卫波 , 王　超 , 等. 镍催化加氢制备 T 酸的方法研究 [J]. 染料与染色 , 2020, **57**(2): 17-19.

[15] 工业和信息化部. 中华人民共和国工业和信息化部公告 2021 年第 25 号 [J]. 再生资源与循环经济 , 2021, **14**(11): 7.