(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2015 年 7 月 9 日 (09.07.2015)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2015/100876 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 1/04 (2006.01) *C07K 14/605* (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/075113

(22) 国际申请日: 2014 年 4 月 10 日 (10.04.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201410001671.X 2014 年 1 月 3 日 (03.01.2014) CN

(71) 申请人: **杭州阿德莱诺泰制药技术有限公司 (ADLAI NORTYE PHARMACEUTICAL CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国浙江省杭州市经济技术开发区 6 号大街 452 号, Zhejiang 310018 (CN)。

(72) 发明人: **路杨 (LU, Yang)**; 中国浙江省杭州市经济技术开发区 6 号大街 452 号, Zhejiang 310018 (CN)。 **杨东晖 (YANG, Donghui)**; 中国浙江省杭州市经济技术开发区 6 号大街 452 号, Zhejiang 310018 (CN)。 **方晨 (FANG, Chen)**; 中国浙江省杭州市经济技术开发区 6 号大街 452 号, Zhejiang 310018 (CN)。 **周亮 (ZHOU, Liang)**; 中国浙江省杭州市经济技术开发区 6 号大街 452 号, Zhejiang 310018 (CN)。 **刘少华 (LIU, Shaohua)**; 中国浙江省杭州市经济技术开发区 6 号大街 452 号, Zhejiang 310018 (CN)。

(74) 代理人: **北京格旭知识产权代理事务所（普通合伙） (GEXU INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM)**; 中国北京市海淀区马甸东路 19 号金澳国际公寓 1002 室, Beijing 100088 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,

[见续页]

(54) **Title**: METHOD FOR PREPARING LIRAGLUTIDE

(54) **发明名称** : 一种制备利拉鲁肽的方法

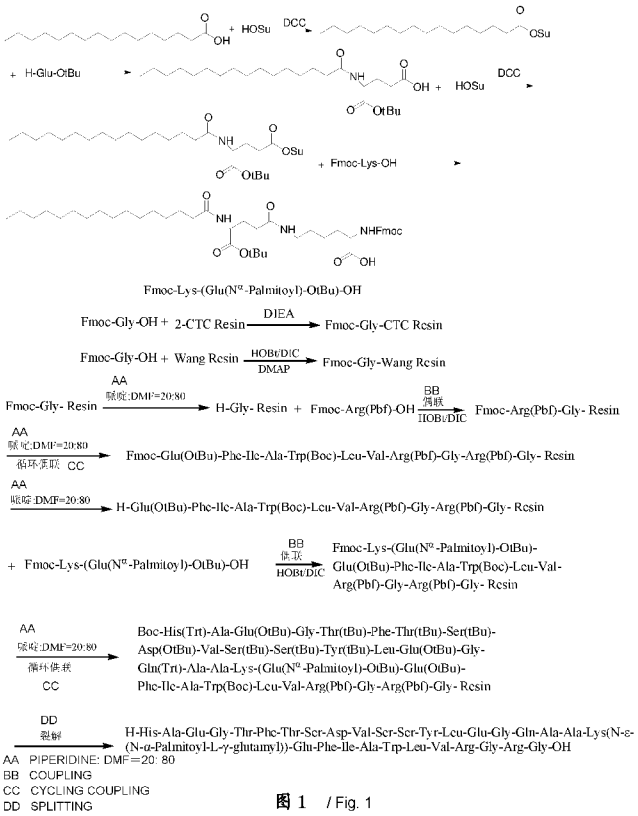


图 1 / Fig. 1

(57) **Abstract**: Disclosed is a method for synthesizing liraglutide. The method comprises the specific steps: A) synthesizing a segment Fmoc-Lys-(Glu(N$^{\alpha}$-Palmitoyl)-OtBu)-OH by using a liquid phase manner; B) coupling a resin solid-phase carrier and Fmoc-Gly-OH, so as to obtain Fmoc-Gly-resin; C) sequentially coupling amino acids with N-end Fmoc protection and side chain protection according to a liraglutide main chain peptide sequence by using a solid-phase synthesis method, a lysine tripeptide segment using Fmoc-Lys-(Glu(N$^{\alpha}$-Palmitoyl)-OtBu)-OH; and D) performing splitting, purification and freeze-drying to obtain liraglutide. The method needs a short synthesis period and low cost, produces high yield, and is suitable for large-scale production.

(57) **摘要**: 本发明公开了一种合成利拉鲁肽的方法，具体步骤为：A）液相合成片段 Fmoc-Lys-(Glu(N$^{\alpha}$-Palmitoyl)-OtBu)-OH；B）树脂固相载体和 Fmoc-Gly-OH 偶联得到 Fmoc-Gly-树脂；C）通过固相合成法，按照利拉鲁肽主链肽序依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链保护的氨基酸，其中赖氨酸三肽片段采用 Fmoc-Lys-(Glu(N$^{\alpha}$-Palmitoyl)-OtBu)-OH；D）裂解，纯化，冻干后得到利拉鲁肽。该方法合成周期短、成本低、收率较高，适合规模化生产。

WO 2015/100876 A1

MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国** (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括经修改的权利要求及声明(条约第 19 条(1))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

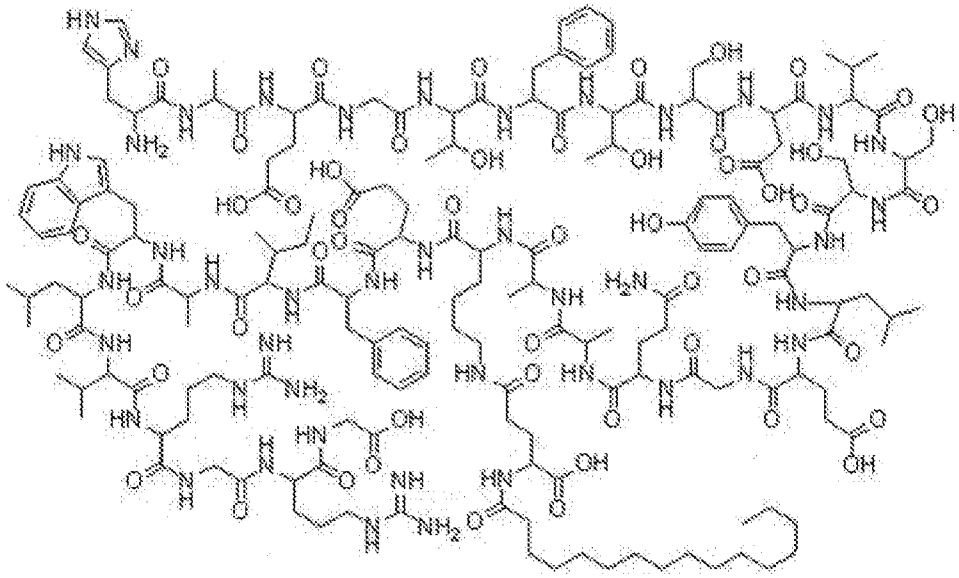
一种制备利拉鲁肽的方法

技术领域

本发明涉及一种多肽类药物的制备方法，是一种合成的具有胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂的长效II型糖尿病的治疗特效药-利拉鲁肽的制备方法。

背景技术

利拉鲁肽，英名为：Liraglutide，结构式如下：



肽序列为：

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(N-ε-(N-α-Palmitoyl-L-γ-glutamyl))-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

利拉鲁肽是由丹麦诺和诺德公司开发的第一个也是目前唯一一个长效人**GLP-1类似物**，具有GLP-1受体激动剂作用，在分子结构、生物活性、作用靶点及免疫原性等方面与GLP-1相似。利拉鲁肽的分子结构与GLP-1(7-37) 的同源性达97％，结构差异表现在Lys^{34}被Arg替代，Lys^{26}经由谷氨酸介导发生棕榈酰化，脂肪酸侧链可以使利拉鲁肽在血液中与白蛋白可逆性地结合，使利拉鲁肽的作用时间延长，且增强对DPP-4酶降解的抵抗，脂肪酸侧链还可以使

利拉鲁肽分子在注射部位自交联成七聚体，从而延缓其自皮下吸引，使其作用时间可长达接近 24 小时，每天注射一次并且可在任意时间注射，且低血糖发生风险小。此外，本品还能够以血糖依耐性方式降低胰高血糖素的分泌，并延迟胃排空。

诺和诺德的利拉鲁肽通过基因工程等生物学方法进行制备，技术难度大，生产成本高，不利于利拉鲁肽的大规模生产。US6268343B1 和 US6458924B2 报道了利拉鲁肽的固液合成法，中间体 GLP-1(7-37)-OH 均需要反相 HPLC 纯化，再在液相条件下与 N^{α}-Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu 反应，此方法需两次纯化，合成周期长，废液多，成本昂贵，不利于大规模生产的缺点。

WO2013037266A1 公开了一种利拉鲁肽的制备方法，具体步骤为：通过 Fmoc 固相合成法，按照利拉鲁肽主链肽序依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链保护的氨基酸，其中赖氨酸采用 Fmoc-Lys (Alloc）-OH，脱去 Alloc，通过固相合成法在赖氨酸侧链氨基上偶联 Palmitoyl-Glu-Offiu，裂解后得到产品。此方法由于使用四（三苯基膦）钯脱去 Alloc，不仅使成本偏高，不利于大规模生产，还会使金属残留导致重金属含量超标，导致产品质量和含量不高。

综上所述，现有利拉鲁肽的固相合成过程中，由于合成周期长，成本高，收率低，杂质多，不适用于工业化生产。

发明内容

本发明人用现有的合成方法，制备利拉鲁肽，发现现有技术存在的技术问题是：合成步骤较多，合成周期长，纯度和收率不高，不适于工业化规模生产。为此，本发明人对利拉鲁肽的合成方法进行了研究，从而得到了本发明的技术方案。

本发明的目的是提供一种利拉鲁肽的固相合成方法。本发明的合成路线如图 1 所示：首先通过液相方法合成赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH，其次在活化剂系统的存在下，由树脂固相载体和 Fmoc-Gly-OH 偶联得到 Fmoc-Gly-树脂，然后通过固相合成法，按照利拉鲁肽主链肽序依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链保护的氨基酸，其中赖氨酸三肽片段采用 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH，最后裂解，纯化，

冻干，得到利拉鲁肽，该利拉鲁肽的氨基酸序列如序列表（SEQ No. 1）所示。

本发明中一些常用的缩写具有以下含义;

Fmoc ： 芴甲氧羰基

Fmoc-AA ： 芴甲氧羰基保护的氨基酸

DIC ： N，N′-二异丙基碳化二亚胺

DCC ： N，N′-二环己基碳二亚胺

PyBOP ： 六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷

HATU ： 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯

HOBt ： 1- 羟基苯骈三唑

HOSu ： N-羟基琥珀酰亚胺

tBu ： 叔丁基

Trt ： 三苯甲基

Boc ： 叔丁氧羰基

Palmitoyl ： 棕榈酰基

Pbf ： 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基

Tyr ： 酪氨酸

Ile ： 异亮氨酸

Gln ： 谷氨酰胺

Asn ： 天冬酰胺

Cys ： 半胱氨酸

Pro ： 脯氨酸

Leu ： 亮氨酸

Gly ： 甘氨酸

Arg ： 精氨酸

Val ： 缬氨酸

Trp ： 色氨酸

Ala ： 丙氨酸

Phe ： 苯丙氨酸

Glu ： 谷氨酸

Lys： 赖氨酸

Ser： 丝氨酸

Asp： 天冬氨酸

Thr： 苏氨酸

His： 组氨酸

DMF： N，N′-二甲基甲酰胺

MeOH： 甲醇

DCM： 二氯甲烷

NMP： N-甲基吡咯烷酮

DMSO： 二甲基亚砜

TFA： 三氟醋酸

EDT： 乙二硫醇

Piperidine： 六氢吡啶

DMAP： 4-二甲氨基吡啶

DIEA： N，N′-二异丙基乙胺

TMP： 2,4,6-三甲基吡啶。

NMM: N-甲基吗啉

2-CTC: 2-氯三苯甲基氯

为此本发明提供一种利拉鲁肽的合成方法，其步骤如下:

步骤 1，通过液相方法合成赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH;

步骤 2，在活化剂系统的存在下，由树脂固相载体和 Fmoc-Gly-OH 偶联得到 Fmoc-Gly-树脂;

步骤 3，通过固相合成法，按照利拉鲁肽主链肽序依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链保护的氨基酸，其中赖氨酸三肽片段采用 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH;

步骤 4，裂解，纯化，冻干，得到利拉鲁肽。

其中，步骤 1 所述的固相合成方法，所述片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 的液相合成为：正十六烷酸、HOSu、

DCC 偶联得到 Palmitoyl-OSu 活化酯，然后和 H-Glu-OtBu 反应得到二肽片段 Palmitoyl-Glu-OtBu ； Palmitoyl-Glu-OtBu 、 HOSu 、 DCC 偶联得到 Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu 活化酯，然后和 Fmoc-Lys-OH 反应得到赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH。

其中，步骤 2 所述的固相合成方法，所述树脂固相载体采用 2-CTC 树脂，所述活化剂系统选自 DIEA、TMP 或 NMM，所述 Fmoc-Gly-树脂为 0.10~0.35mmol/g 取代度的 Fmoc-Gly-CTC 树脂。

其中，步骤 2 所述的固相合成方法，所述树脂固相载体采用王树脂，所述活化剂系统由 DIC、HOBt 和 DMAP 组成，所述 Fmoc-Gly-王树脂为 0.10~0.35mmol/g 取代度的 Fmoc-Gly-王树脂。

本发明中，所述的树脂的取代度是采用紫外吸光光度法测定的树脂的取代度，用 20%哌啶/DMF 溶液将偶联 Fmoc 保护型氨基酸的树脂上的 Fmoc 保护基脱保护下来，用紫外吸光光度法测定其浓度，然后采用含 Fmoc 的氨基酸标准化合物例如 Fmoc-Leu-OH，以外标法标定树脂上的 Fmoc 的 mmol 数值，除以树脂重量，即得到树脂的取代度或称之为替代度。

其中，步骤 3 所述的固相合成方法，

1）采用由体积比为 1:4 的哌啶和 DMF 组成的去保护液脱除 Fmoc-Gly-树脂上的 Fmoc 保护基，得到 H-Gly-树脂;

2）在偶联剂系统的存在下，H-Gly-树脂和 Fmoc 保护且侧链保护的精氨酸偶联得到 Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-树脂;

3）重复步骤 1）、2），按照利拉鲁肽主链肽序依次进行氨基酸的偶联，其中赖氨酸采用 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH, 偶联氨基酸顺序为: Fmoc-Gly-OH 、 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 、 Fmoc-Val-OH 、 Fmoc-Leu-OH 、 Fmoc-Trp(Boc)-OH 、 Fmoc-Ala-OH 、 Fmoc-Ile-OH 、 Fmoc-Phe-OH 、 Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc- Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH 、 Fmoc-Gln(Trt)-OH 、 Fmoc-Gly-OH 、 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、 Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH 、 Fmoc-Thr(tBu)-OH 、 Fmoc-Gly-OH 、 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、

Fmoc-Ala -OH、Boc-His(Trt)-OH;

所述偶联剂系统包括缩合剂和反应溶剂，所述缩合剂选自 DIC/HOBt、PyBOP/HOBt/DIEA 或 HATU/HOBt/DIEA；所述反应溶剂选自 DMF、DCM、NMP、DMSO 或他们之间的任意组合。

优选地，步骤 3）中，氨基酸偶联过程中，其中当缩合剂选择 HATU/HOBt/DIEA 时，

H-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-树脂(以下简称 AA-树脂):Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH:HATU:HOBt:DIEA 的摩尔比优选为：1:3:3:3:3~1:5:5:5:5，即所述 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 和缩合剂 HATU/HOBt/DIEA 这 4 种物质的摩尔数相等，它们各自相对于所述 AA 树脂的摩尔比例为 3/1~5/1，反应温度为 25~35℃，反应时间为 2~3 小时；更优选，它们各自相对于所述 AA 树脂的摩尔比例为 5/1，反应温度为 35℃，反应时间为 2 小时。

本发明的方法是经过筛选获得的，筛选过程如下：

1）摩尔比的选择:

H-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-树脂:Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH:HATU:HOBt:DIEA 的摩尔比为：1:3:3:3:3 和 1:5:5:5:5;

2）反应温度的选择:

25°C 和 35°C;

3）反应时间的选择:

2 小时和 3 小时。

为此提出了 8 种实验条件：

实验条件 1：取 3.43g H-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-树脂(1.0mmol)、2.16g Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH (3.0 mmol)、0.41g HOBt (3.0 mmol)和 1.14g HATU (3.0 mmol)加入 20ml DMF 中搅拌溶解，冷却到 0°C，将 0.5ml DIEA (3.0 mmol)加入上述溶液中，在 25°C 反应 2 小时，然后依次偶联剩下的氨基酸，偶联氨基酸顺序为：Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH、

Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ala -OH、Boc-His(Trt)-OH，裂解，纯化，冻干，得到利拉鲁肽精肽;

实验条件 2—8，实验操作如实验条件 1 所示，不同的实验条件及其实验结果如下面的表 1 所示:

表 1

实验条件	摩尔比	温度	时间	总收率	纯度
实验条件 1	1:3:3:3	25℃	2 小时	23%	99.10%
实验条件 2	1:5:5:5	25℃	2 小时	27%	99.11%
实验条件 3	1:3:3:3	35℃	2 小时	27%	99.23%
实验条件 4	1:5:5:5	35℃	2 小时	31%	99.75%
实验条件 5	1:3:3:3	25℃	3 小时	28%	99.54%
实验条件 6	1:5:5:5	25℃	3 小时	29%	99.64%
实验条件 7	1:3:3:3	35℃	3 小时	28%	99.13%
实验条件 8	1:5:5:5	35℃	3 小时	26%	99.26%

以上结果表明，实验条件 4 的纯化效果最优。

本发明的方法和现有技术相比具有明显的优势，有关对比实验如下表 2 所示:

表 2 对比实验结果

专利	总收率	纯度
本发明技术	31%	99.75%
WO2013037266A1	16%	99.17%
US6458924B2	22%	NA

本发明的有益效果是：选用片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 直接固相合成利拉鲁肽，解决了现有技术存在的合成周期长，成本高，纯度低，杂质多，不适用于工业化生产的问题；本发明提供了一种合成周期短、成本低、收率较高，适合规模化生产的利拉鲁肽的合成工艺。

附图说明

图 1 本发明利拉鲁肽的合成路线；

图 2 赖氨酸三肽片段的 HPLC 谱图；

图 3 利拉鲁肽粗肽的 HPLC 谱图；

图 4 利拉鲁肽精肽的 HPLC 谱图；

图 5 赖氨酸三肽片段的质谱谱图；

图 6 实施例十三利拉鲁肽精肽质谱谱图。

具体实施方式：

以下通过实施例进一步说明本发明。

具体地，关于下面实施例中涉及的各商购氨基酸以及氨基酸片段，以及各商购树脂，其生产厂家和商品型号如下：

Fmoc 保护基氨基酸原料、2-CTC 树脂和王树脂均为常规的市售试剂（厂家：吉尔生化（上海）有限公司；化学纯）；赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 是本专利描述合成的。

有机溶剂和其它原料来源均为市售品（厂家：国药集团化学试剂有限公司；化学纯）。

另外，下面实施例中提到的“旋蒸浓缩”以及“冻干”以及测定 HPLC 和质谱的条件和所用设备型号及生产厂家说明如下：

旋蒸浓缩设备：旋转蒸发仪 R-200/205（瑞士 Buchi(布奇)公司）；

旋蒸浓缩条件：30℃下，真空（-0.1Mpa）条件下旋蒸浓缩，浓缩后体积在旋蒸前总体积 75%以下。

冻干设备：冻干机 FD-3（北京博医康实验仪器有限公司）；

冻干条件：将冻干盘放入冰箱冷冻室(-20℃) 中，预冻 6 h。开启冻干机，打开制冷，预冷 30 min 以上，设置冻干曲线如下：

第一段：在-27 ℃运行 16 h；第二段：在-5℃运行 4 h；第三段：在 5℃运行 2 h；第四段：在 30℃运行 16 h。

HPLC：Dionex 高效液相色谱仪；用十八烷基硅烷键合硅胶（5μm，250 × 4.6mm）为填充剂；以 0.1%TFA 溶液为流动相 A，以乙腈为流动相 B，进行梯度洗脱；流速为每分钟 1.0ml；检测波长为 220nm；柱温 30℃。取供试品溶液 20μl，注入液相色谱仪，记录色谱图。

质谱： MALDI-TOF-MS 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱；仪器型号为 AUTO FLEX SPEED TOF-TOF。

实施例一：Palmitoyl- OSu 活化酯的合成

称取 256.42g 正十六烷酸（1.0mol），138.10g HOSu（1.2mol）加入 2000ml THF 中，冰水浴下加入 247.56g DCC（1.2mol），反应 1 小时，升温到室温反应 3 小时，反应液过滤，母液旋干，加 DCM 溶解，过滤，饱和碳酸氢钠洗 3 遍，纯水 2 遍，反萃 2 遍，合并有机相，无水碳酸钠干燥，旋干，冰乙醇重结晶 3 次，过滤，固体油泵拉干的到 314.62g Palmitoyl-OSu 活化酯，收率 89%。

实施例二：Palmitoyl-Glu-OtBu 的合成

称取 101.62g H-Glu-OtBu（0.5mol）和 79.50g Na_2CO_3（0.75mol）加入到 500ml 水和 500ml THF 的混合溶液中溶解，称取 176.75g Palmitoyl-OSu（0.5mol）加入到 500ml THF，溶解后滴加上述混合溶液中，室温下反应过夜，用 10%稀盐酸调节 PH 到 7，旋蒸除去 THF，之后调节 PH 到 3。得到大量白色沉淀，过滤。将得到的白色沉淀用冰乙醇重结晶。固体油泵拉干的到 192.11g Palmitoyl-Glu-OtBu，收率 87%。

实施例三： Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu 的合成

称取 88.33g Palmitoyl-Glu-OtBu（0.2mol），27.62g HOSu（0.24mol）加入 1000ml THF 中，冰水浴下加入 49.51g DCC（0.24mol），反应 1 小时，升温到室温反应 3 小时，反应液过滤，母液旋干，加 DCM 溶解，过滤，饱和碳酸氢钠洗 3 遍，纯水 2 遍，反萃 2 遍，合并有机相，无水碳酸钠干燥，旋干，冰乙醇重结晶 3 次，过滤，固体油泵拉干的到 94.81g Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu 活化酯，收率 88%。

实施例四：Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 的合成

称取 36.74g Fmoc-Lys-OH（0.1mol）和 15.90g Na_2CO_3（0.15mol）加入到 100ml 水和 100ml THF 的混合溶液中溶解，称取 53.87g Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu（0.1mol）加入到 100ml THF，溶解后滴加上述混合溶液中，室温下反应过夜，用 10%稀盐酸调节 PH 到 7，旋蒸除去 THF，之后调节 PH 到 3。得到大量白色沉淀，过滤。将得到的白色沉淀用冰乙醇重结晶。固体油泵拉干的到 67.24g Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH，其 HPLC 谱图如图 2 所示，HPLC 纯度为 97.40%，收率 85%; 其质谱如图 5 所示，$[M+Na]^+$: 814.555、$[M+K]^+$: 830.605，赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 的理论精确分子量为：791.5，样品质谱结果与理论分子量相符，结构正确。

实施例五：取代度为 0.10mmol/g 的 Fmoc-Gly-CTC 树脂的合成

称取取代度为 0.40mmol/g 的 2-CTC 树脂 20g，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 1 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，取 13.37g Fmoc-Gly-OH(45mmol)用 DMF 溶解，冰水浴下加入 7.5ml DIEA(45mmol)活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，反应 2 小时后，加入 100ml 无水甲醇封闭 1 小时。用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，用无水甲醇封闭 30 分钟，甲醇收缩干燥，得到 22.34g Fmoc-Gly-CTC 树脂，检测替代度为 0.10mmol/g。

实施例六：取代度为 0.25mmol/g 的 Fmoc-Gly-CTC 树脂的合成

称取取代度为 0.95mmol/g 的 2-CTC 树脂 10g，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 1 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，取 14.11g Fmoc-Gly-OH(47mmol)用 DMF 溶解，冰水浴下加入 8.0ml DIEA(47mmol)活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，反应 2 小时后，加入 100ml 无水甲醇封闭 1 小时。用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，用无水甲醇封闭 30 分钟，甲醇收缩干燥，得到 Fmoc-Gly-CTC 树脂，检测替代度为 0.25mmol/g。

实施例七：取代度为 0.10mmol/g 的 Fmoc-Gly-王树脂的合成

称取取代度为 0.45mmol/g 的王树脂 20g，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 1 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，取 13.37g Fmoc-Gly-OH(45mmol)、6.01g HOBt(45mmol)用 DMF 溶解，冰水浴下加入 7.0ml DIC(45mmol)活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，5 分钟后加入 2.75g DMAP(22.5mmol)，反应 2 小时后，

用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，用 100ml 醋酸酐/吡啶封端过夜，甲醇收缩干燥，得到 Fmoc-Gly-王树脂，检测替代度为 0.10mmol/g。

实施例八：取代度为 0.25mmol/g 的 Fmoc-Gly-王树脂的合成

称取取代度为 0.75mmol/g 的王树脂 20g，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 1 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，取 22.28g Fmoc-Gly-OH(75mmol)、10.13g HOBt(75mmol)用 DMF 溶解，冰水浴下加入 11.6 ml DIC(75mmol)活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，5 分钟后加入 4.5g DMAP(37.5mmol)，反应 2 小时后，用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，用 100ml 醋酸酐/吡啶封端过夜，甲醇收缩干燥，得到 22.54g Fmoc-Gly-王树脂，检测替代度为 0.25mmol/g。

实施例九：利拉鲁肽 CTC 树脂的制备

称取 4.46g 取代度为 0.10mmol/g 的 Fmoc-Gly-CTC 树脂(1mmol)，加入固相反应柱中，用 DMF 洗涤 1 次，用 DMF 溶胀 Fmoc-Gly-CTC 树脂 30 分钟后，用 DMF:吡啶体积比为 4:1 的混合溶液脱去 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次，称取 3.24g Fmoc-Arg(Pbf)-OH（5mmol）、0.68g HOBt（5mmol）加入体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 0.8ml DIC（5mmol）活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，室温下反应 2 小时后，以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需要再反应 1 小时，此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤，按照利拉鲁肽主链肽序，依次完成 Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH 、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc- Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH 、 Fmoc-Gln(Trt)-OH 、 Fmoc-Gly-OH 、 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH 、 Fmoc-Thr(tBu)-OH 、 Fmoc-Gly-OH 、 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、Fmoc-Ala -OH、Boc-His(Trt)-OH 的偶联。其中 Fmoc-Leu-OH 和 Fmoc-Phe-OH 偶联时溶剂换为：选用体积比为 1:4 的 DMSO 和 DMF 混合溶液；Fmoc-Asp(OtBu)-OH 偶联时偶联试剂换为： PyBOP/HOBt/DIEA ；

Boc-His(Trt)-OH 偶联时偶联试剂换为：HATU/HOBt/DIEA，偶联完毕，将利拉鲁肽 CTC 树脂用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，MeOH 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，MeOH 洗涤 3 次，抽干得到 9.67g 利拉鲁肽 CTC 树脂。

实施例十：利拉鲁肽王树脂的制备

称取 4.57g（1mmol）取代度为 0.10mmol/g 的 Fmoc-Gly-王树脂，加入固相反应柱中，用 DMF 洗涤 1 次，用 DMF 溶胀 Fmoc-Gly-王树脂 30 分钟后，用 DMF:吡啶体积比为 4:1 的混合溶液脱去 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次，称取 3.24g Fmoc-Arg(Pbf)-OH（5mmol）、0.68g HOBt（5mmol）加入体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 0.8ml DIC（5mmol）活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，室温下反应 2 小时后，以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需要再反应 1 小时，此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤，按照利拉鲁肽主链肽序，依次完成 Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH 、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc- Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH 、 Fmoc-Gln(Trt)-OH 、 Fmoc-Gly-OH 、 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、Fmoc-Leu-OH 、 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 、 Fmoc-Ser(tBu)-OH 、 Fmoc-Ser(tBu)-OH 、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH 、 Fmoc-Thr(tBu)-OH 、 Fmoc-Gly-OH 、 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、Fmoc-Ala -OH、Boc-His(Trt)-OH 的偶联。

其中 Fmoc-Leu-OH 和 Fmoc-Phe-OH 偶联时溶剂换为：选用体积比为 1:4 的 DMSO 和 DMF 混合溶液；Fmoc-Asp(OtBu)-OH 偶联时偶联试剂换为：PyBOP/HOBt/DIEA; Boc-His(Trt)-OH 偶联时偶联试剂换为: HATU/HOBt/DIEA，偶联完毕，将利拉鲁肽王树脂用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，MeOH 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，MeOH 洗涤 3 次，抽干得到 9.78g 利拉鲁肽王树脂。

实施例十一：利拉鲁肽王树脂的规模化制备

称取 4570g（1mol）取代度为 0.10mmol/g 的 Fmoc-Gly-王树脂，加入固相反应柱中，用 DMF 洗涤 1 次，用 DMF 溶胀 Fmoc-Gly-王树脂 30 分钟后，用

DMF:吡啶体积比为 4:1 的混合溶液脱去 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次，称取 3240g Fmoc-Arg(Pbf)-OH（5mol）、682g HOBt（5mol）加入体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 800ml DIC（5mol）活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，室温下反应 2 小时后，以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需要再反应 1 小时，此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤，按照利拉鲁肽主链肽序，依次完成 Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH 、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc- Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH 、Fmoc-Gln(Trt)-OH 、Fmoc-Gly-OH 、Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH 、Fmoc-Thr(tBu)-OH 、Fmoc-Gly-OH 、Fmoc-Glu(OtBu)-OH 、Fmoc-Ala -OH、Boc-His(Trt)-OH 的偶联。其中 Fmoc-Leu-OH 和 Fmoc-Phe-OH 偶联时溶剂换为：选用体积比为 1:4 的 DMSO 和 DMF 混合溶液；Fmoc-Asp(OtBu)-OH 偶联时偶联试剂换为：PyBOP/HOBt/DIEA；Boc-His(Trt)-OH 偶联时偶联试剂换为：HATU/HOBt/DIEA，偶联完毕，将利拉鲁肽王树脂用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，MeOH 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，MeOH 洗涤 3 次，抽干得到 9795g 利拉鲁肽王树脂。

实施例十二：利拉鲁肽粗肽的制备

称取 100g 全保护的利拉鲁肽 CTC 树脂或者利拉鲁肽王树脂，加入到 1000mL 的三口圆底烧瓶中，按 TFA:苯甲硫醚:苯甲醚:EDT=90: 5: 3:2 的体积比配置裂解液 10L，将裂解液加入上述树脂中，室温反应 2 小时，过滤，用少量 TFA 洗涤裂解后的树脂 3 次，合并滤液，浓缩，将浓缩后的液体加入到冰乙醚中沉淀 1 小时，离心，无水乙醚离心洗涤 6 次，真空干燥，得到利拉鲁肽粗肽 34.13g，其 HPLC 谱图如图 3 所示，HPLC 纯度 83.03%，粗肽收率 78%。

实施例十三：利拉鲁肽精肽醋酸盐的制备

称取 3413g 利拉鲁肽粗肽用 50%乙腈+50%水的混合溶液 30L 溶解后，通

过C18或C8柱2次纯化、转盐、冷冻干燥后得到目标产物。第一次纯化条件：流动相为：A相： 0.1%TFA；B相：乙腈，检测波长220nm，收集目的峰馏分。第二次纯化条件：流动相为：A相： 0.3%乙酸；B相：乙腈。检测波长220nm，收集目的峰馏分。转盐条件：流 动 相：A相：20mM乙酸铵-水溶液；B相：乙腈；检测波长 220nm。收集目的峰馏分，旋蒸浓缩，冻干得到利拉鲁肽醋酸盐精肽11.24g，其HPLC谱图如图4所示，HPLC纯度99.75%，纯化总收率40%，总收率31%。其质谱如图6所示， $[M]^+$：3751.848，利拉鲁肽的理论精确分子量为：3751.2，样品质谱结果与理论分子量相符。

以上内容是结合具体的修选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保户范围。

权利要求书

1. 一种利拉鲁肽的合成方法，所述方法步骤如下:

步骤 1，通过液相方法合成赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH;

步骤 2，在活化剂系统的存在下，由树脂固相载体和 Fmoc-Gly-OH 偶联得到 Fmoc-Gly-树脂;

步骤 3，通过固相合成法，按照利拉鲁肽主链肽序依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链保护的氨基酸，其中赖氨酸三肽片段采用 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH;

步骤 4，裂解，纯化，冻干，得到利拉鲁肽。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是:

其中，步骤 1 所述的固相合成方法，所述片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 的液相合成步骤为: 正十六烷酸、HOSu 和 DCC 偶联得到 Palmitoyl-OSu，然后 Palmitoyl-OSu 和 H-Glu-OtBu 反应得到二肽片段 Palmitoyl-Glu-OtBu; Palmitoyl-Glu-OtBu、HOSu 和 DCC 偶联得到 Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu，然后 Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu 和 Fmoc-Lys-OH 反应得到赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是:

其中，步骤 2 所述的固相合成方法，所述树脂固相载体采用 2-CTC 树脂，所述活化剂系统选自 DIEA、TMP 或 NMM，所述 Fmoc-Gly-树脂为 0.10~0.35mmol/g 取代度的 Fmoc-Gly-CTC 树脂。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是:

其中，步骤 2 所述的固相合成方法，所述树脂固相载体采用王树脂，所述活化剂系统由 DIC、HOBt 和 DMAP 组成，所述 Fmoc-Gly-树脂为 0.10~0.35mmol/g 取代度的 Fmoc-Gly-王树脂。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是:

其中，步骤 3 所述的固相合成方法包括如下步骤: 1）采用由体积比为 1:4 的哌啶和 DMF 组成的去保护液脱除 Fmoc-Gly-树脂上的 Fmoc 保护基，得到

H-Gly-树脂;

2）在偶联剂系统的存在下，H-Gly-树脂和 Fmoc 保护且侧链保护的精氨酸偶联得到 Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-树脂;

3）重复步骤 1)、2)，按照利拉鲁肽主链肽序依次进行氨基酸的偶联，其中赖氨酸三肽片段采用 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH;

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征是:

所述偶联剂系统包括缩合剂和反应溶剂，所述缩合剂选自 DIC/HOBt、PyBOP/HOBt/DIEA 或 HATU/HOBt/DIEA；所述反应溶剂选自 DMF、DCM、NMP、DMSO 或他们之间的任意组合。

经修改的权利要求
国际局收到日：24.12月2014(24.12.2014)。

1. 一种利拉鲁肽的合成方法，所述方法步骤如下：

步骤 1，通过液相方法合成赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH；

步骤 2，在活化剂系统的存在下，由树脂固相载体和 Fmoc-Gly-OH 偶联得到 Fmoc-Gly-树脂；

步骤 3，通过固相合成法，按照利拉鲁肽主链肽序依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链保护的氨基酸，其中赖氨酸三肽片段采用 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH；

步骤 4，裂解，纯化，冻干，得到利拉鲁肽。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是：

其中，步骤 1 所述的液相合成方法，所述片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH 的液相合成步骤为：正十六烷酸、HOSu 和 DCC 偶联得到 Palmitoyl-OSu，然后 Palmitoyl-OSu 和 H-Glu-OtBu 反应得到二肽片段 Palmitoyl-Glu-OtBu；Palmitoyl-Glu-OtBu、HOSu 和 DCC 偶联得到 Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu，然后 Palmitoyl-Glu(OSu)-OtBu 和 Fmoc-Lys-OH 反应得到赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是：

其中，步骤 2 所述的固相合成方法，所述树脂固相载体采用 2-CTC 树脂，所述活化剂系统选自 DIEA、TMP 或 NMM，所述 Fmoc-Gly-树脂为 0.10~0.35mmol/g 取代度的 Fmoc-Gly-CTC 树脂。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是：

其中，步骤 2 所述的固相合成方法，所述树脂固相载体采用王树脂，所述活化剂系统由 DIC、HOBt 和 DMAP 组成，所述 Fmoc-Gly-树脂为 0.10~0.35mmol/g 取代度的 Fmoc-Gly-王树脂。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是：

其中，步骤 3 所述的固相合成方法包括如下步骤：1）采用由体积比为 1:4 的哌啶和 DMF 组成的去保护液脱除 Fmoc-Gly-树脂上的 Fmoc 保护基，得到

H-Gly-树脂;

2）在偶联剂系统的存在下，H-Gly-树脂和 Fmoc 保护且侧链保护的精氨酸偶联得到 Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-树脂;

3）重复步骤 1)、2)，按照利拉鲁肽主链肽序依次进行氨基酸的偶联，其中赖氨酸三肽片段采用 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征是:

所述偶联剂系统包括缩合剂和反应溶剂，所述缩合剂选自 DIC/HOBt、PyBOP/HOBt/DIEA 或 HATU/HOBt/DIEA；所述反应溶剂选自 DMF、DCM、NMP、DMSO 或他们之间的任意组合。

条约第19条第（1）款的声明

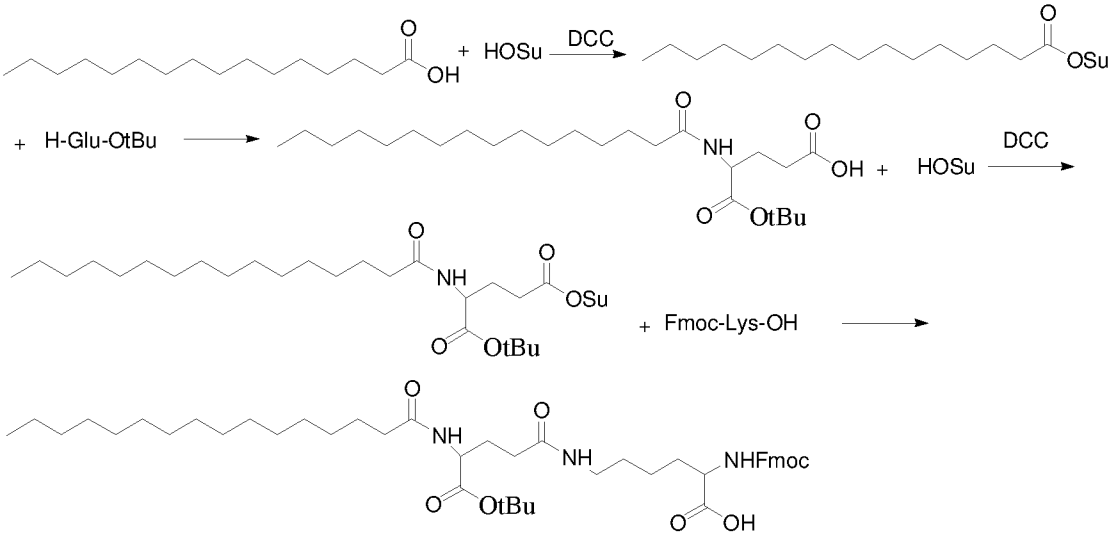
针对 PCT/CN2014/075113 的国际检索报告和国际检索书面意见，申请人根据 PCT 条约 19 条的规定，对权利要求书做了以下修改：

1. 将权利要求 2 中的“固相合成方法”修改为“液相合成方法”。

2. 将权利要求 5 结尾的分号改为句号。

上述第 1 点的修改依据在于：原权利要求 1 公开了：通过液相方法合成赖氨酸三肽片段 Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH。由此可见，原权利要求 1 所述的方法为液相合成方法。

因此，以上修改没有超出原始公开的范围，克服了书面意见中所述“权利要求 2 不清楚”和“权利要求 5 没有以句号结尾”的缺陷，符合 PCT 条约的规定。



Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH

Fmoc-Gly-OH + 2-CTC Resin $\xrightarrow{\text{DIEA}}$ Fmoc-Gly-CTC Resin

Fmoc-Gly-OH + Wang Resin $\xrightarrow[\text{DMAP}]{\text{HOBt/DIC}}$ Fmoc-Gly-Wang Resin

Fmoc-Gly- Resin $\xrightarrow{\text{哌啶:DMF=20:80}}$ H-Gly- Resin + Fmoc-Arg(Pbf)-OH $\xrightarrow[\text{HOBt/DIC}]{\text{偶联}}$ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly- Resin

$\xrightarrow[\text{循环偶联}]{\text{哌啶:DMF=20:80}}$ Fmoc-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly- Resin

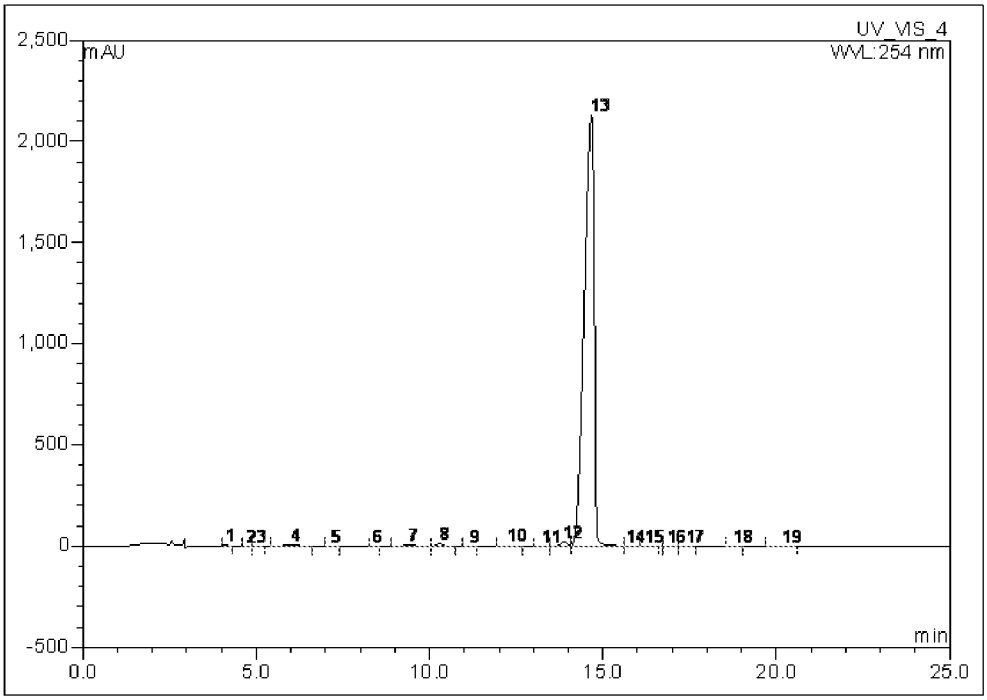
$\xrightarrow{\text{哌啶:DMF=20:80}}$ H-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly- Resin

+ Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-OH $\xrightarrow[\text{HOBt/DIC}]{\text{偶联}}$ Fmoc-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly- Resin

$\xrightarrow[\text{循环偶联}]{\text{哌啶:DMF=20:80}}$ Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys-(Glu(N^{α}-Palmitoyl)-OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly- Resin

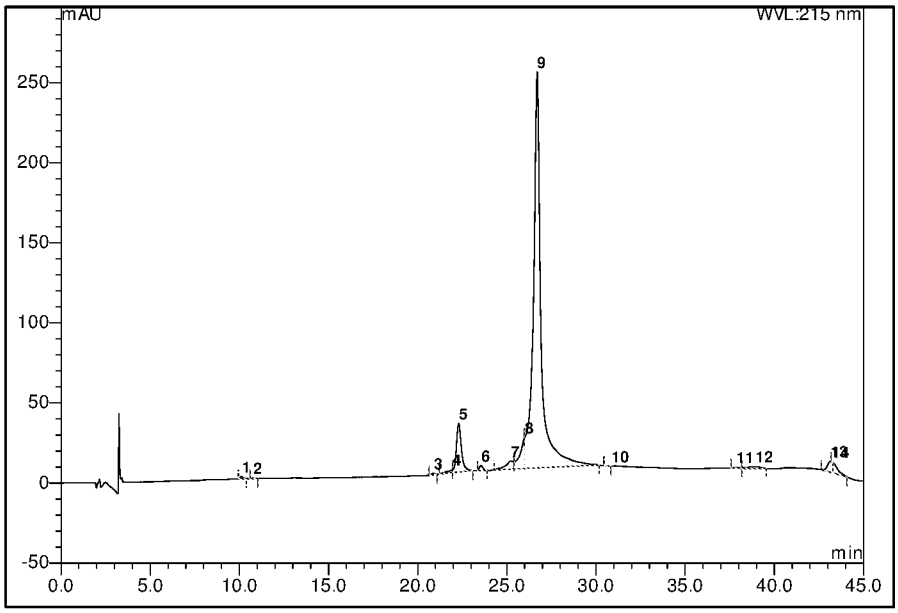
$\xrightarrow{\text{裂解}}$ H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(N-ε-(N-α-Palmitoyl-L-γ-glutamyl))-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

图 1



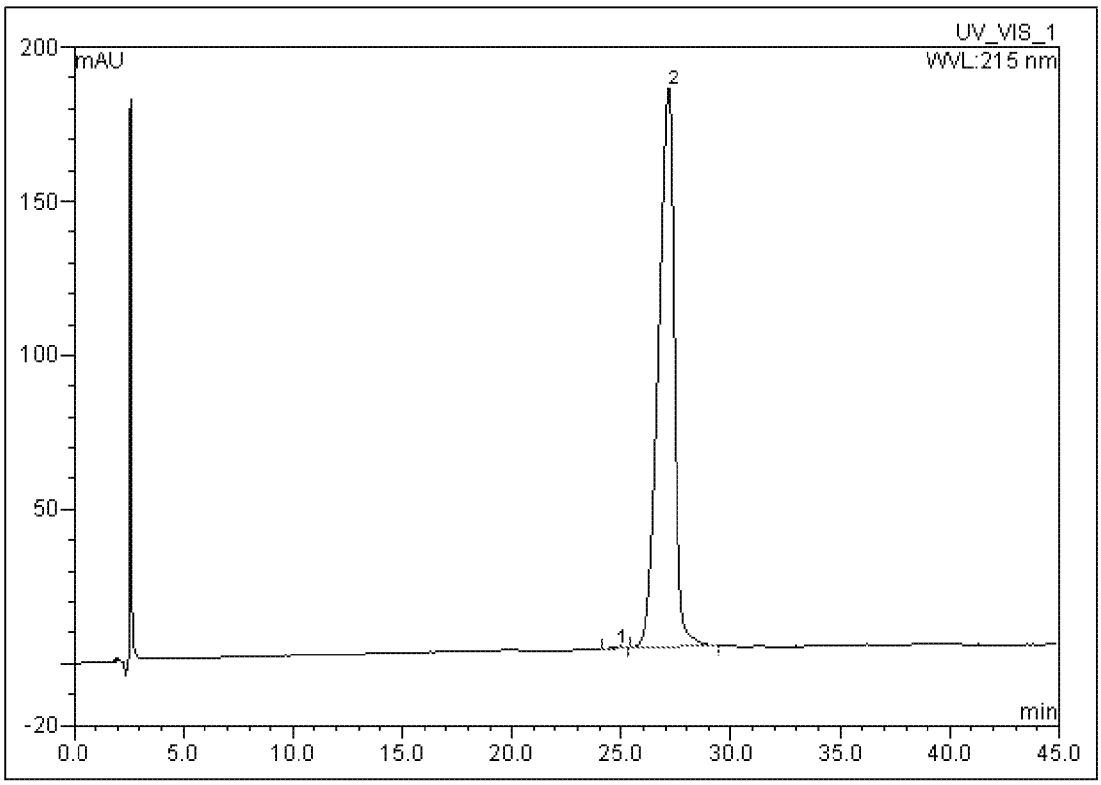
序号	保留时间	峰面积	相对峰面积	分离度	不对称度	塔板数
	min	mAU*min	%	(EP)	(EP)	(EP)
1	4.138	0.405	0.06	2.92	1.01	6814
2	4.760	0.051	0.01	1.13	0.82	7113
3	5.040	0.250	0.03	2.01	1.12	5544
4	6.022	2.820	0.39	2.24	0.97	1157
5	7.200	0.425	0.06	3.95	0.93	6868
6	8.378	0.102	0.01	2.76	1.28	17794
7	9.412	2.510	0.35	2.15	1.10	5653
8	10.306	2.783	0.38	2.74	1.02	15342
9	11.184	0.121	0.02	3.04	0.87	20996
10	12.267	0.757	0.10	2.61	1.17	14534
11	13.262	0.120	0.02	1.65	n.a.	22023
12	13.869	5.174	0.72	1.73	n.a.	21332
13	14.671	704.537	97.40	n.a.	0.67	11323
14	15.704	0.968	0.13	n.a.	n.a.	n.a.
15	16.222	0.066	0.01	n.a.	n.a.	n.a.
16	17.063	0.292	0.04	n.a.	n.a.	n.a.
17	17.302	0.173	0.02	n.a.	n.a.	n.a.
18	18.793	0.067	0.01	2.83	1.01	29356
19	20.175	0.358	0.05	45.47	1.06	22181
20	34.058	0.924	0.13	1.85	n.a.	3731265
21	34.344	0.463	0.06	n.a.	n.a.	331810
总和:		723.364	100.000			

图 2



序号	保留时间 min	峰面积 mAU*min	相对峰面积 %	分离度 (EP)	不对称度 (EP)	塔板数 (EP)
1	10.131	0.258	0.17	2.22	1.08	18425
2	10.801	0.074	0.05	29.24	1.00	19910
3	20.910	0.213	0.14	n.a.	0.83	46662
4	21.958	0.642	0.43	n.a.	n.a.	n.a.
5	22.299	9.896	6.64	2.88	n.a.	34477
6	23.550	0.706	0.47	n.a.	1.20	57828
7	25.215	2.605	1.75	n.a.	n.a.	n.a.
8	25.992	5.552	3.73	n.a.	n.a.	n.a.
9	26.705	123.684	83.03	n.a.	n.a.	36097
10	30.837	0.006	0.01	n.a.	n.a.	n.a.
11	37.846	0.229	0.14	1.12	n.a.	59289
12	38.925	0.899	0.60	3.71	n.a.	14066
13	43.137	4.180	2.81	n.a.	1.56	31972
14	43.199	0.012	0.01	n.a.	n.a.	n.a.
总和		148.957	100.00			

图 3



序号	保留时间 min	峰面积 mAU*min	相对峰面积 %	分离度 (EP)	不对称度 (EP)	塔板数 (EP)
1	25.192	0.387	0.25	2.03	0.80	3406
2	26.719	152.317	99.75	n.a.	0.80	2794
总和		152.704	100.00			

图 4

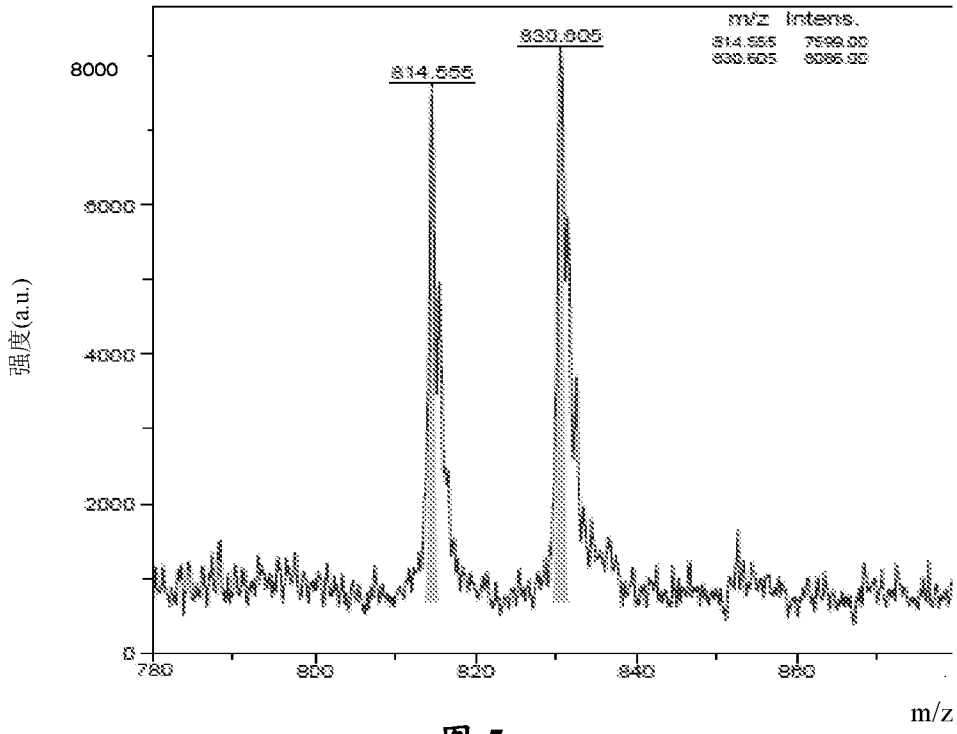

m/z Intens.
814.555 7599.00
830.605 8095.00
814.555
830.605
8000
6000
4000
2000
0
强度(a.u.)
780
800
820
840
860
m/z

图 5

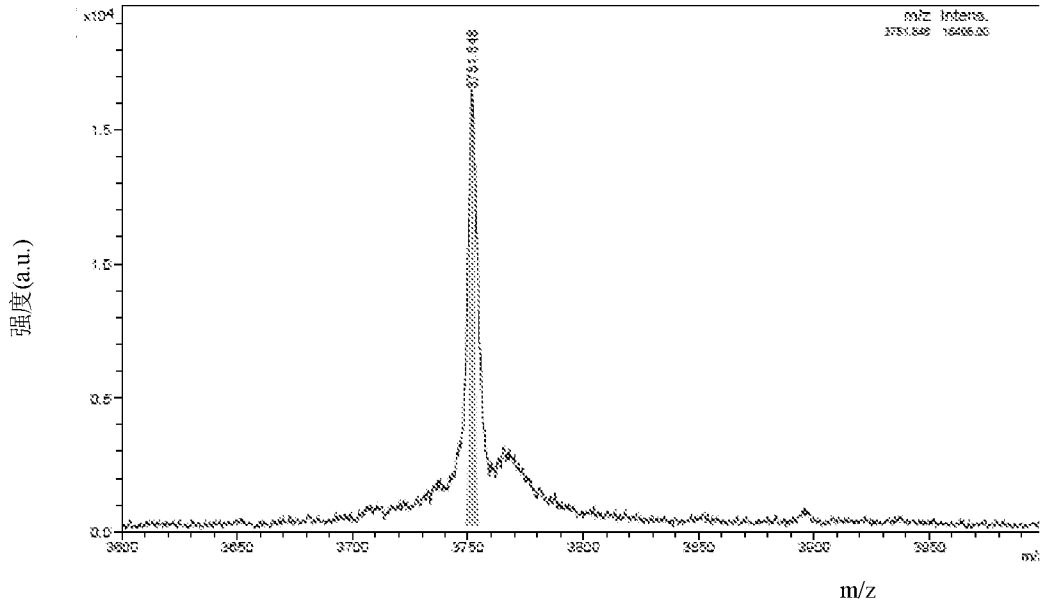

x10^4
m/z Intens.
3751.848 16408.00
1.5
1.0
0.5
0.0
3600
3650
3700
3750
3800
3850
3900
3950
m/z
强度(a.u.)

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/075113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/04 (2006.01) i; C07K 1/02 (2006.01) i; C07K 14/605 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and searched terms: liraglutide, solid phase, liquid phase, synthesis, Fmoc-Lys-(Glu(Nα-Palmitoyl)-OtBu)-OH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103304660A (SHANGHAI ANGBO BIOTECHNOLOGY CO LTD) 18 September 2013 (18.09.2013) the whole document, especially claims 1-6	1-6
A	CN 103288951A (HYBIO PHARM CO LTD) 11 September 2013 (11.09.2013) the whole document, especially claims 1-10	1-6
A	WO 9943705A1 (NOVO NORDISK AS) 02 September 1999 (02.09.1999) the whole document	1-6
A	CN 103275208A (CHENGDU SHENGNUO BIOPHARMACEUTICAL CO) 04 September 2013 (04.09.2013) the whole document	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 September 2014	26 September 2014
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Chen Telephone No. (86-10) 62411100

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/075113

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103304660 A	18 September 2013	None	
CN 103288951 A	11 September 2013	None	
WO 9943705 A1	2 September 1999	WO 9943705 A8	14 October 1999
		AU 2610599 A	15 September 1999
		EP 1056774 A1	6 December 2000
		JP 2002508162 A	19 Mach 2002
CN 103275208 A	4 September 2013	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/075113

A. 主题的分类

C07K 1/04(2006.01)i；C07K 1/02(2006.01)i；C07K 14/605(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词：利拉鲁肽，固相，液相，合成，liraglutide, solid phase, liquid phase, synthesis,Fmoc-Lys-(Glu(Nα-Palmitoyl)-OtBu)-OH

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103304660 A (上海昂博生物技术有限公司) 2013年 9月 18日 (2013-09-18) 全文，尤其是权利要求1-6	1-6
A	CN 103288951 A (深圳翰宇药业股份有限公司) 2013年 9月 11日 (2013-09-11) 全文，尤其是权利要求1-10	1-6
A	WO 9943705 A1 (NOVO NORDISK AS) 1999年 9月 02日 (1999-09-02) 全文	1-6
A	CN 103275208 A (成都圣诺生物制药有限公司) 2013年 9月 04日 (2013-09-04) 全文	1-6

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2014年 9月 12日	2014年 9月 26日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	受权官员 李晨 电话号码 (86-10)62411100

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/075113

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	103304660	A	2013年 9月 18日	无			
CN	103288951	A	2013年 9月 11日	无			
WO	9943705	A1	1999年 9月 02日	WO	9943705	A8	1999年 10月 14日
				AU	2610599	A	1999年 9月 15日
				EP	1056774	A1	2000年 12月 06日
				JP	2002508162	A	2002年 3月 19日
CN	103275208	A	2013年 9月 04日	无			