

TN-1129

多肽纯化方法开发:比卢伐定的纯化应用

Marc Jacob, Joshua Heng 和 Tivadar Farkas
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501, USA

在此技术应用中,我们将介绍对固相合成的比卢伐定粗样品的纯化方法开发和规模放大实验。

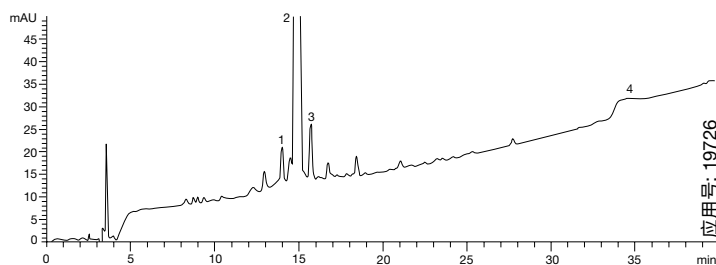
概述

图1所示的活性药物成分(API)比卢伐定是一种含有一个碱基和5个氨基酸残基的20氨基酸肽,其化学式为 $C_{96}H_{138}N_{24}O_{33}$, 分子量为 2180.3 g/mol, 又称 Angiomax。它是一种直接凝血酶抑制剂,用于抗凝血剂。

我们筛选了以下硅胶固定相:Luna®C5、Luna C8(2)、Luna C18(2)、Luna Phenyl-Hexyl、Gemini®C18 和 Synergi® Polar-rp, 以及以下缓冲液:三氟乙酸(TFA)、磷酸三乙铵(TEAP)、乙酸铵和磷酸钾。最终,我们得出了固定相筛选结果、所使用的缓冲液以及选定测试条件下的放大实验的结果。

我们对几种反相(RP)填料在不同的色谱条件下用于比卢伐定的纯化进行了测试,这是一种相对亲水的肽,在27%的乙腈作用下从C18固定相上洗脱。粗样肽通过固相肽合成(SPPS)制备而成,经TFA分裂后,粗样中肽的纯度为71.3%,如图2所示。样品由CS Bio, Co.生产,合成未优化。

图2. 比卢伐定 - 粗样中肽纯度



峰编号	时间(min)	面积	面积%
1	14.01	547	9.7
2	14.87	3611	71.3
3	15.53	652	13.1
4	35.90	258	5.9

色谱柱: Luna 5 μm C8(2)

规格: 250 x 4.6 mm

货号: 00G-4249-E0

流动相: A: 0.1 % TFA水溶液
B: 0.1 % TFA乙腈溶液

梯度: 20-60 % B, 40 min内, 80 % B保持5 min

流速: 1 mL/min

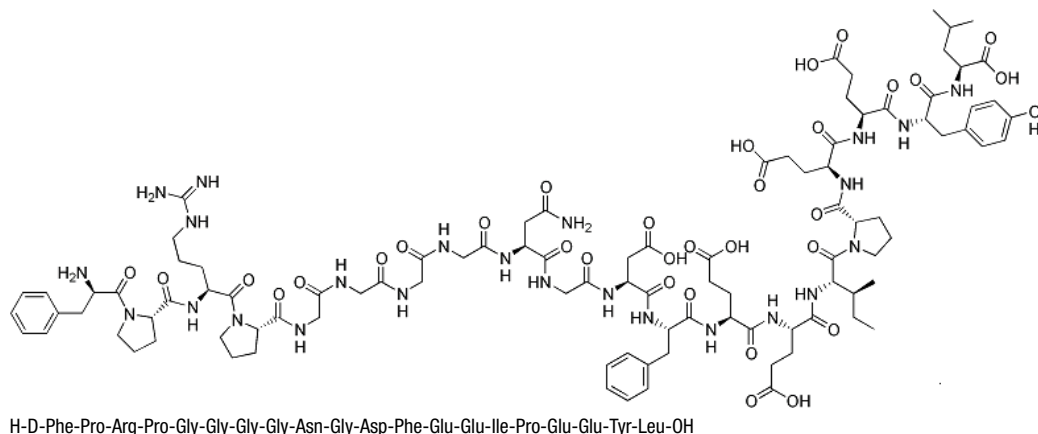
温度: 25 °C

检测: UV @ 220 nm

进样量: 5 μL

样品浓度: 1.5 mg/mL 水溶液

图1. 比卢伐定的结构



材料和方法

本研究中使用的所有化学品均购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国密苏里州圣路易斯)。溶剂均购自 EMD (美国加州圣迭戈)。粗比卢伐定样品由 CS Bio, Co. (美国加州门洛帕克) 提供。HPLC 色谱柱均取自 Phenomenex® (美国加利福尼亚州托伦斯市)。所有色谱分析均使用 Agilent Technologies (美国加州圣克拉拉) 的 Agilent 1100 HPLC 系统进行, 该系统配备了四元泵、脱气器、可变UV波长检测器和自动进样器。

结果和讨论

筛选试验

基于肽分子量和亲水性, 测试了以下填料的选择性: Luna C5、Luna C8(2)、Luna C18(2)、Luna Phenyl-Hexyl、Gemini C18 和 Synergi Polar-RP。

出于筛选目的, 我们选择了粒径为 5 μm 和 4 μm 的填料。使用色谱柱选择器, 我们能够在 24 小时内使用不同流动相评估 6 种填料。肽纯化是一个复杂的过程, 可能需要向流动相添加各种化学添加剂, 以更好地将杂质从目标产物中分离出来。表 1 列出了肽纯化中常用的流动相添加剂以及推荐的操作pH值。

表1 肽纯化的流动相添加剂和pH值

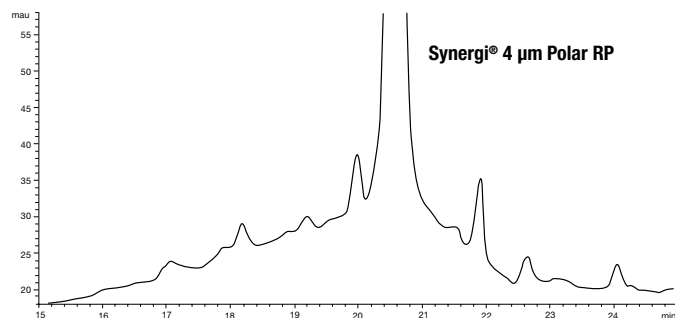
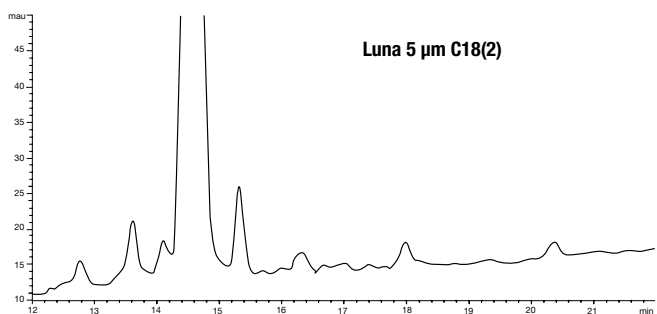
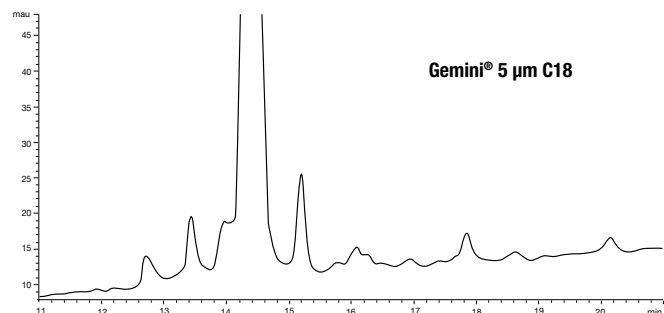
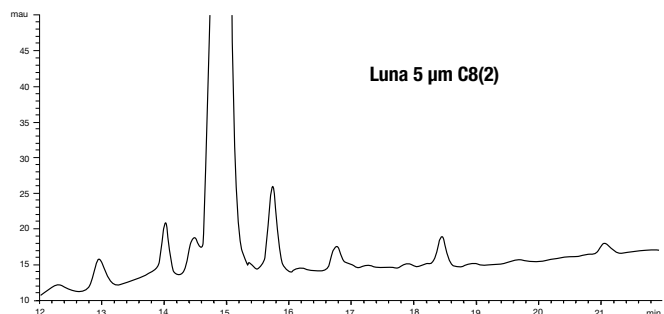
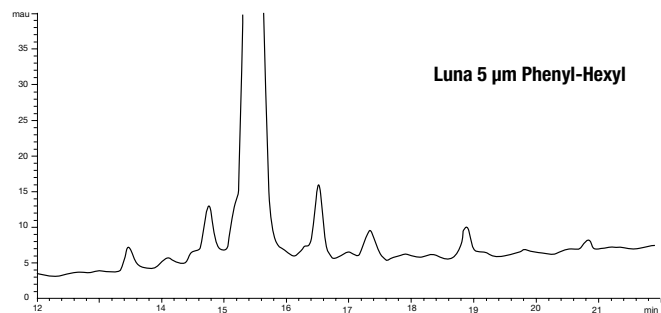
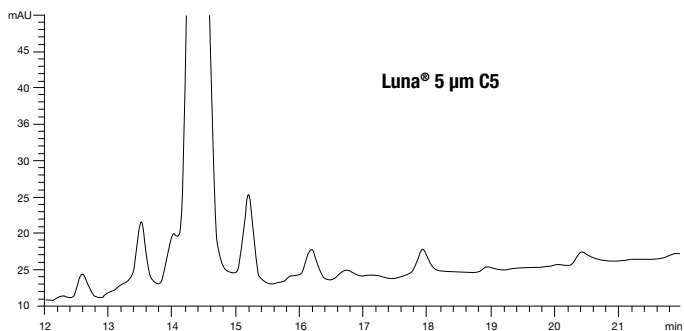
化合物	化学式	pKa	推荐的pH值
TFA	$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$	0.3	1.5-2.3
MSA*	$\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$	-1.9	1.5-2.2
甲酸	HCO_2H	3.8	2.8-4.8
醋酸	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	4.8	3.8-5.8
TEAP (磷酸盐1)	TEAH_2PO_4	2.2	1.5-3.2
TEAP (磷酸盐2)	$(\text{TEA})_2\text{HPO}_4$	7.2	6.2-8.2
磷酸钾	KH_2PO_4	7.2	6.2-8.2
氨	NH_4OH	9.2	8.2-9.0
醋酸铵	$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$	9.2	6.0-9.0
碳酸氢铵	NH_4HCO_3	9.2	7.8-9.0
甲酸铵	NH_4HCO_3	9.2	7.8-9.0

* MSA = 甲磺酸

本纯化开发研究中测试的流动相添加剂分别为 TFA、TEAP、磷酸钾和醋酸铵, 如图 3、4、5 和 6 所示。所示的每张色谱图都是对目标区域的放大图。结果表明, 使用醋酸铵 pH 4.7 和磷酸钾 pH 7 作为流动相添加剂在 Luna C8(2) 和 Luna C18(2) 上进行分离的效果较好, 具体分别如图 5 和 6 所示。



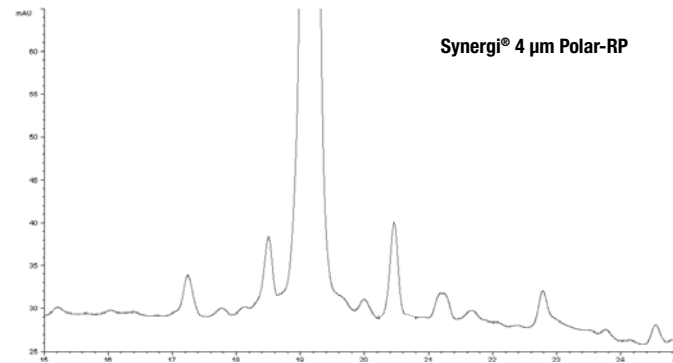
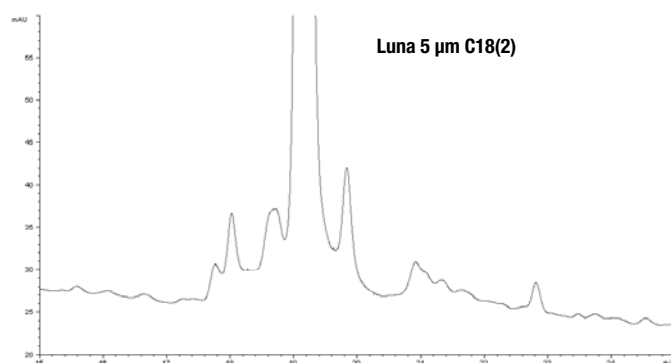
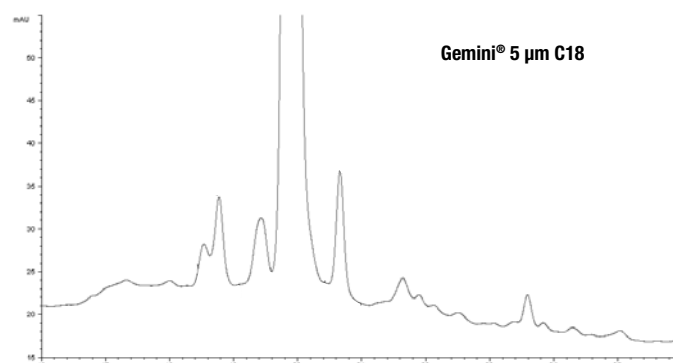
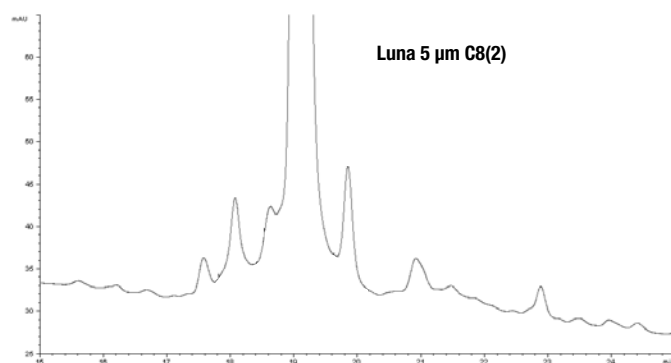
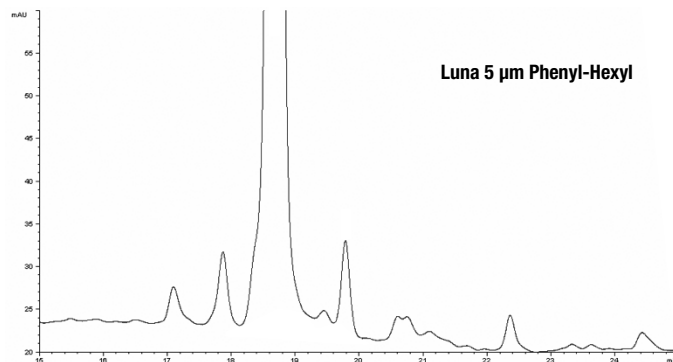
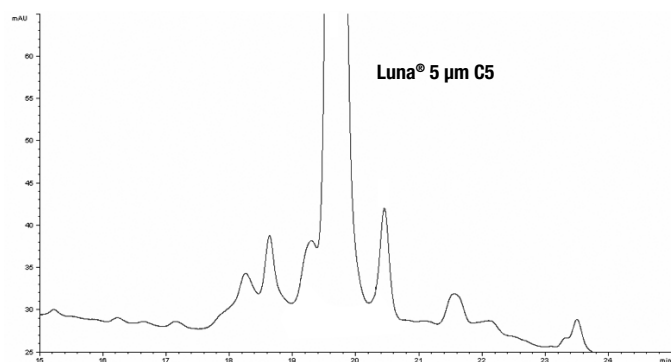
图3.0.1 TFA 筛选结果



色谱柱: 如所示
规格: 250 x 4.6 mm
流动相: A: 0.1 % TFA水溶液
 B: 0.1 % TFA乙腈溶液
梯度: 20-60 % B, 40 min内 (Synergi Polar-RP
 为15-55 % B, 40 min内) 至 5 min
 内80 %
流速: 1 mL/min
检测: UV @ 220 nm
温度: 25 °C
进样量: 5 µL
样品浓度: 1.5 mg/mL水溶液



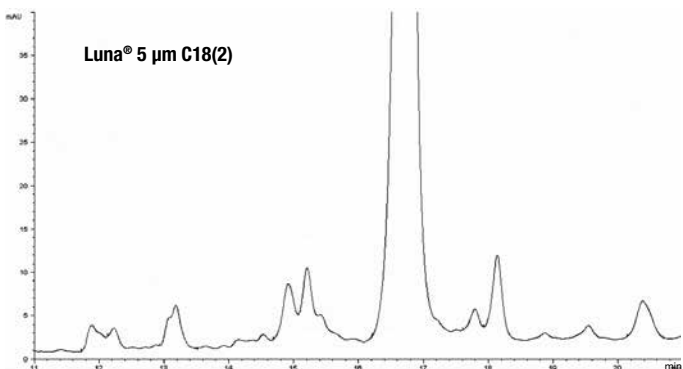
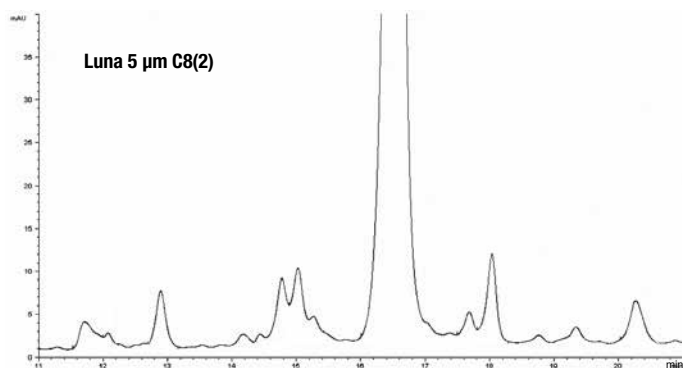
图4. 20 nm TEAP pH 2.3 筛选结果



色谱柱: 如所示
 规格: 250 x 4.6 mm
 流动相: A: 150 mL乙腈溶于1350 mL的20 mM(TEAP), pH 2.3
 B: 900 mL乙腈溶于600 mL的20 mM(TEAP), pH 2.3
 梯度: 10-90 % B, 40 min内
 流速: 1 mL/min
 检测: UV @ 220 nm
 温度: 25 °C
 进样量: 5 μL
 样品浓度: 1.5 mg/mL水溶液

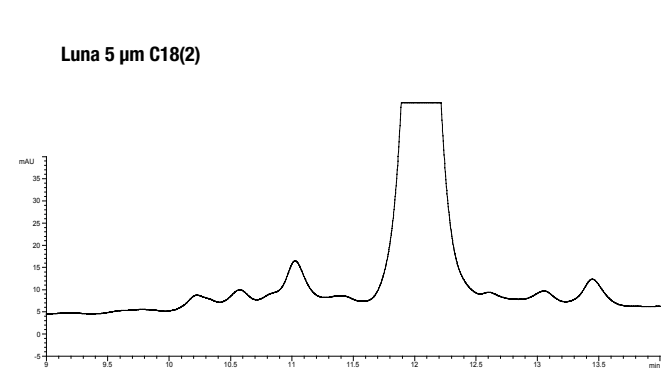
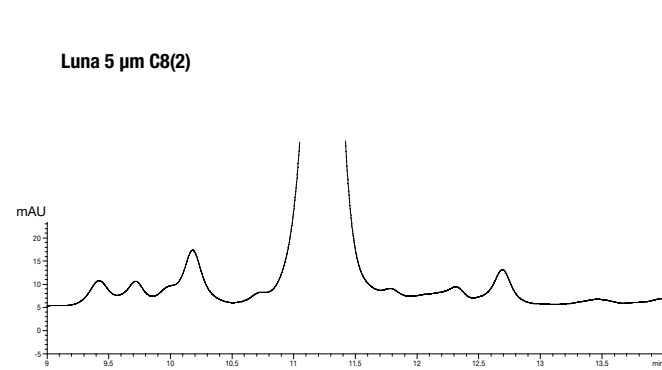


图5. 20 nm 磷酸钾 pH7 结果



色谱柱: 如所示
规格: 250 x 4.6 mm
流动相: A: 20 mM 磷酸钾 pH7 水溶液
 B: 0.1% TEA 乙腈溶液
梯度: 5-45% B, 40 min内
流速: 1 mL/min
检测: UV @ 220 nm
温度: 25 °C
进样量: 5 μL
样品浓度: 1.5 mg/mL水溶液

图6. 20 mM 醋酸铵 pH4.7 结果



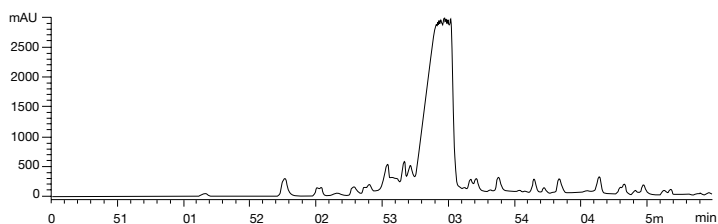
色谱柱: 如所示
规格: 250 x 4.6 mm
流动相: A: 20 mM 醋酸铵 pH4.7 水/乙腈溶液 (1:9)
 B: 20 mM 醋酸铵水/乙腈溶液 (1:1)
梯度: 0-100% B, 40 min内
流速: 1 mL/min
检测: UV @ 220 nm
温度: 25 °C
进样量: 5 μL
样品浓度: 1.5 mg/mL水溶液



过载实验

终产物的目标纯度为 98.0% 以上,单一杂质含量不大于 1.0%。在初步筛选实验的基础上,使用 Luna® C8(2) 100 Å 10 µm-PREP 250 x 4.6 mm 色谱柱进行过载实验。在纯化开发时,使用的色谱柱长度和颗粒尺寸最好相同,而非使用方法放大后的较大色谱柱长度和尺寸。使用醋酸铵在 pH 值 4.7 下进行过载实验的洗脱情况如图 7 所示。收集的馏分在 Luna C8(2) 5 µm 250 x 4.6 mm 分析柱上进行分析,结果如表 2 所示。

图 7. 1.5% 特定载样量下的纯化洗脱情况



色谱柱: Luna 10 µm-PREP C8(2)
规格: 250 x 4.6 mm
货号: 00G-4324-E0
流动相: A: 100 mM 醋酸铵 pH 4.7 水溶液
 B: 乙腈
梯度: 10-50 % B, 40 min 内; 80 % B 和 20 % C 保持
 5 min; 在 90 % A 再平衡 10 min
流速: 1 mL/min
检测: UV @ 220 nm
温度: 25 °C
进样量: 5 µL
样品浓度: 7 mg/mL 水溶液

分析 HPLC 条件

与图 1 使用 Luna 5 µm C8(2) 250 x 4.6 mm 色谱柱的条件相同。

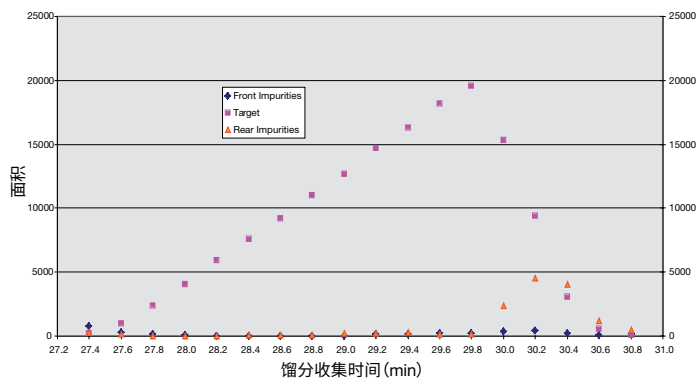
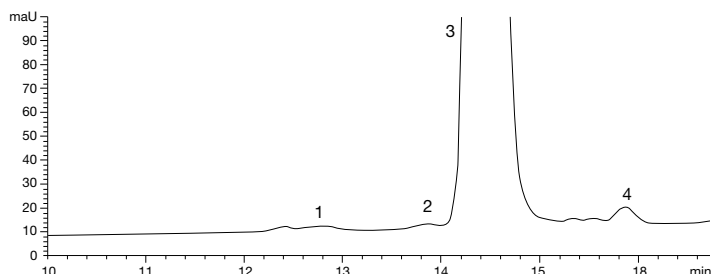


表 2 纯化 - 馏分分析

RT (min)	前端杂质 (面积)	目标化合物 (面积)	后端杂质 (面积)
27.4	781	200	296
27.6	247	985	122
27.8	107	2397	0
28.0	59	4012	0
28.2	0	5890	0
28.4	0	7619	39
28.6	0	9170	39
28.8	0	11003	74
29.0	0	12657	224
29.2	125	14659	238
29.4	151	16303	245
29.6	183	18191	158
29.8	190	19599	114
30.0	370	15293	2339
30.2	451	9379	4548

将纯度为 > 96% 的馏分合并并收集起来, 得到总纯度为 98.53% 的 80% 的加载的肽, 最大单一杂质含量为 0.93%, 如图 8 所示。在同样的纯度标准下, 使用磷酸钾进行了类似的过载实验, 但回收率较低 (数据未显示)。

图8. 纯化回收和终产物纯度



11合并馏分 27.8-29.8 min; 回收率 80.5, 纯度 ≥ 98.5 %

峰编号	时间 (min)	面积	面积%
1	12.74	73.7	0.35
2	13.83	40.6	0.19
3	14.37	21118.7	98.53
4	15.858	200.5	0.93

订购信息

侦查色谱柱

Luna (100 Å)		
固定相	250 x 4.6 mm	250 x 10 mm
<i>10 μm-PREP</i>		
C18(2)	00G-4324-E0	00G-4324-N0
C8(2)	00G-4323-E0	00G-4323-N0
C4(2)	00G-4460-E0	00G-4460-N0
Phenyl-Hexyl	00G-4325-E0	00G-4325-N0
Silica(2)	00G-4322-E0	00G-4322-N0
<i>15 μm</i>		
C18(2)	00G-4273-E0	00G-4273-N0
C8(2)	00G-4272-E0	00G-4272-N0
Phenyl-Hexyl	00G-4286-E0	00G-4286-N0
Silica(2)	00G-4271-E0	00G-4271-N0

Synergi (80 Å)		
固定相	250 x 4.6 mm	250 x 10 mm
<i>10 μm</i>		
Polar-RP	00G-4351-E0	00G-4351-N0

Gemini (110 Å)		
固定相	250 x 4.6 mm	250 x 10 mm
<i>10 μm</i>		
C18	00G-4436-E0	00G-4436-N0

HPLC 散装填料

Luna (100 Å)						
固定相	100 g	1 kg	5 kg	10 kg	50 kg	100 kg
<i>10 μm-PREP</i>						
C18(2)	04G-4324	04K-4324	04L-4324	04M-4324	04N-4324	04P-4324
C8(2)	04G-4323	04K-4323	04L-4323	04M-4323	04N-4323	04P-4323
C4(2)	04G-4460	04K-4460	04L-4460	04M-4460	04N-4460	04P-4460
Phenyl-Hexyl	04G-4325	04K-4325	04L-4325	04M-4325	04N-4325	04P-4325
Silica(2)	04G-4322	04K-4322	04L-4322	04M-4322	04N-4322	04P-4322
<i>15 μm</i>						
C18(2)	04G-4273	04K-4273	04L-4273	04M-4273	04N-4273	04P-4273
C8(2)	04G-4272	04K-4272	04L-4272	04M-4272	04N-4272	04P-4272
Phenyl-Hexyl	04G-4286	04K-4286	04L-4286	04M-4286	04N-4286	04P-4286
Silica(2)	04G-4271	04K-4271	04L-4271	04M-4271	04N-4271	04P-4271

Synergi (80 Å)						
固定相	100 g	1 kg	5 kg	10 kg	50 kg	100 kg
<i>10 μm</i>						
Polar-RP	04G-4351	04K-4351	04L-4351	04M-4351	04N-4351	04P-4351

Gemini (110 Å)				
固定相	100 g	1 kg	5 kg	10 kg
<i>10 μm</i>				
C18	04G-4436	04K-4436	04L-4436	04M-4436

灌装 Axia™ 的制备 HPLC 柱 (mm)

	固定相	250 x 21.2 mm	250 x 30 mm	250 x 50 mm
Luna	10 μm C5	00G-4092-P0-AX	00G-4092-U0-AX	00G-4092-V0-AX
Luna	10 μm PREP C18(2)	00G-4324-P0-AX	00G-4324-U0-AX	00G-4324-V0-AX
Luna	10 μm PREP C8(2)	00G-4323-P0-AX	请垂询	00G-4323-V0-AX
Luna	10 μm PREP Phenyl-Hexyl	00G-4325-P0-AX	请垂询	请垂询
Synergi	10 μm Polar-RP	00G-4351-P0-AX	00G-4351-U0-AX	00G-4351-V0-AX
Gemini	10 μm C18	00G-4436-P0-AX	00G-4436-U0-AX	00G-4436-V0-AX

结论

以 Luna C8(2) 100 Å 10 μm - PREP 作为吸着剂, 用反相色谱法对纯度为 71.3% 的通过 SPPS 获得的粗比卢伐定进行纯化。以 pH4.7 的醋酸铵为流动相时获得了较高的回收率和通量, 此条件下制备的比卢伐定样品纯度大于 98.0% 且单阶段纯化的回收率达 80%。此外, 必须指出的是, 终产物制备为醋酸盐形式, 大多数时候这是作为肽药物成分所需要的盐形式。

Australia 澳大利亚
电话: +61 (0)2-9428-6444
auiinfo@phenomenex.com

Austria 奥地利
电话: +43 (0)1-319-1301
anfrage@phenomenex.com

Belgium 比利时
电话: +32 (0)2 503 4015 (法语)
电话: +32 (0)2 511 8666 (荷兰语)
beinfo@phenomenex.com

Canada 加拿大
电话: +1 (800) 543-3681
info@phenomenex.com

China 中国
电话: +86 400-606-8099
cninfo@phenomenex.com

Czech Republic 捷克共和国
电话: +420 272 017 077
cz-info@phenomenex.com

Denmark 丹麦
电话: +45 4824 8048
nordicinfo@phenomenex.com

Slovakia 斯洛伐克
电话: +420 272 017 077
sk-info@phenomenex.com

Finland 芬兰
电话: +358 (0)9 4789 0063
nordicinfo@phenomenex.com

France 法国
电话: +33 (0)1 30 09 21 10
franceinfo@phenomenex.com

Germany 德国
电话: +49 (0)6021-58830-0
anfrage@phenomenex.com

Hong Kong 香港
电话: +852 6012 8162
hkinfo@phenomenex.com

India 印度
电话: +91 (0)40-3012 2400
indiainfo@phenomenex.com

Ireland 爱尔兰
电话: +353 (0)1 247 5405
eireinfo@phenomenex.com

Italy 意大利
电话: +39 051 6327511
italiainfo@phenomenex.com

Luxembourg 卢森堡
电话: +31 (0)30-2418700
nlinfo@phenomenex.com

Mexico 墨西哥
电话: 01-800-844-5226
tecnicomx@phenomenex.com

The Netherlands 荷兰
电话: +31 (0)30-2418700
nlinfo@phenomenex.com

New Zealand 新西兰
电话: +64 (0)9-4780951
nzinfo@phenomenex.com

Norway 挪威
电话: +47 810 02 005
nordicinfo@phenomenex.com

Poland 波兰
电话: +48 22 104 21 72
pl-info@phenomenex.com

Portugal 葡萄牙
电话: +351 221 450 488
ptinfo@phenomenex.com

Singapore 新加坡
电话: +65 800-852-3944
sginfo@phenomenex.com

Spain 西班牙
电话: +34 91-413-8613
espinfo@phenomenex.com

Sweden 瑞典
电话: +46 (0)8 611 6950
nordicinfo@phenomenex.com

Switzerland 瑞士
电话: +41 (0)61 692 20 20
swissinfo@phenomenex.com

Thailand 泰国
电话: +66 (0) 2 566 0287
thaiinfo@phenomenex.com

United Kingdom 英国
电话: +44 (0)1625-501367
ukinfo@phenomenex.com

USA 美国
电话: +1 (310) 212-0555
info@phenomenex.com

☎ **所有其他国家/地区**
请联系美国总部
电话: +1 (310) 212-0555
info@phenomenex.com

www.phenomenex.com

Phenomenex 产品在全球各地有售。如需了解您所在国家/地区的分销商, 请联系Phenomenex美国国际部, 邮箱地址为 international@phenomenex.com

条款和条件

本文档受 Phenomenex 标准条款与条件的约束, 具体详情请浏览 www.phenomenex.com.cn/TermsAndConditions。

商标

Luna, Gemini 和 Synergi 是 Phenomenex 的注册商标。Axia 是 Phenomenex 的商标。

对比不代表所有应用。

仅用于研究目的。并非用于临床诊断流程。

© 2021 Phenomenex, Inc. 保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 我们很乐意为您提供帮助!
请访问 <https://www.phenomenex.com.cn/chatcn>, 联系我们的技术专家。

