

PLRP-S カラムを用いた合成ペプチドの 分析と精製の最適化

スケールとポアサイズが最適な信頼性の高いカラムと
充填剤による合成ペプチドの適切な精製

著者

Andrea Angelo P. Tripodi and
Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

イオンペア試薬としてトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む移動相を用いた合成ペプチドの分析と精製において、逆相イオンペアクロマトグラフィーの有用性はますます高まっています。分析から分取高速液体クロマトグラフィー (HPLC) へのスケールアップは、結合相、pH 条件、粒子サイズ、カラム長の違いにより、コストと時間がかかり、実施するのが困難なことがよくあります。このアプリケーションノートでは、Agilent PLRP-S 分析 HPLC カラムを用いた、合成ペプチドの分析およびメソッドのスケールアップ方法について説明します。グラジエントと保持情報は、同一の物質が充填されたより大きい分取カラムに直接適用されます。

はじめに

がんの診断と治療、抗生物質の開発、新ワクチンなどのバイオテクノロジーおよびバイオエンジニアリングが発展していることにより、ペプチド治療は普及しつつあります。大部分のペプチド医薬品は、固相ペプチド合成 (SPPS) により生成されます。合成は高分子支持体や樹脂で実施されており、反応から簡単に分離できます。合成経路は、脱保護、活性化、結合の複数のステップで構成されています。最終的なペプチド配列は、捕捉剤やその他の成分を含む開裂混合物を用いて樹脂から分離され、精製に向けた最終未精製物が生成されます。

固相ペプチド合成により合成された未精製ペプチドを、アセトニトリル水溶液 (通常、イオンペア試薬として 0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む) でグラジエント溶出する逆相カラムを用いた HPLC で分析します。通常、液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) ベースのペプチド分析は、ターゲット分子の構造を確認するために使用されます。ただし、TFA はイオン抑制を引き起こし、生成される MS シグナルはより弱くなるため、LC/MS に適しているとはいえません。LC/MS メソッドに適したイオンペア試薬は、TFA より弱酸性であるギ酸 (FA) です。

この実験では、ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 7-36 アミドを使用します。これは、30 種類のアミノ酸を含む一本鎖ポリペプチドであり、分子質量は 3,297.7 ダルトン (Da) です (図 1)。

このアプリケーションノートでは、分析 PLRP-S、 4.6×250 mm、 $8 \mu\text{m}$ カラムから、よりスケールの大きい分取 PLRP-S、 21.2×250 mm、 $8 \mu\text{m}$ カラムに直接スケールアップする手法について説明します。100 および 300 \AA という、ペプチドの分離に適した 2 種類のポアサイズについて調査しました。Agilent PLRP-S は、硬質のマクロポーラススチレン/ジビニルベンゼン (PS-DVB) HPLC 固定相であり、化学的および物理的に優れた安定性を備えています。PLRP-S HPLC 充填剤は元来疎水性であり、C8 や C18 のような、疎水性を与えるための結合アルキル鎖は必要ありません。Agilent 6545XT AdvanceBio 液体クロマトグラフィー / 四重極飛行時間型質量分析法 (LC/Q-TOF) および直交型 AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、 2.1×100 mm、 $2.7 \mu\text{m}$ を用いて、最終製品の特性解析を確認しました。

サンプル前処理

グルカゴン様ペプチド GLP-17-36 アミドは、CS Bio (メンローパーク、カリフォルニア州 94025、米国) で合成しました。合成用の固相担体は、アジレント・テクノロジーから入手しました。合成は、標準の側鎖保護手法と結合条件 (フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 結合相) により実施しました。

分析機器

Agilent 1290 Infinity II LC システムは、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ、サンプルサーモスタット付き (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117C)、光路長 10 mm の InfinityLab Max-Light カートリッジセル (G7117-60020) を搭載

分取機器

Agilent 1290 Infinity II 分取 LC システムは、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1290 Infinity II 分取バイナリポンプ (G7161B)
- Agilent 1260 Infinity II フラクションコレクタ (G7157A)
- Agilent 1290 Infinity II 分取カラムコンパートメント (G7163B)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7165A)

LC/MS 機器

Agilent 1290 Infinity II LC システムと 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA) の組み合わせ

ソフトウェアおよびデータ処理

- Agilent OpenLab ソフトウェアスイート、バージョン 2.6
- OpenLab ChemStation CDS、バージョン C01.09
- Agilent MassHunter Data Workstation Acquisition、バージョン B10.00
- Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア、バージョン 10.00

H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂

図 1. 合成 GLP-1 (7-36) アミドのアミノ酸配列

カラム

- **分析カラム** : Agilent PLRP-S 100 Å、4.6 × 250 mm、8 μm (部品番号 PL1512-5800)、Agilent PLRP-S 300 Å、4.6 × 250 mm、8 μm (部品番号 PL1512-5801)
- **分取カラム** : Agilent PLRP-S 100 Å、21.2 × 250 mm、8 μm、Agilent PLRP-S 300 Å、21.2 × 250 mm、8 μm (カスタム寸法)
- **LC/MS カラム** : AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 100 mm、2.7 μm (部品番号 655750-902)

固相担体

- AmphiSpheres 40 RAM、0.4 mmol/g、75 ~ 150 μm (部品番号 PL3867-4764)
- PL-Rink 樹脂 (1 % DVB)、0.3 mmol/g、75 ~ 150 μm (部品番号 PL1467-4749)

試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。

メソッド条件

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

Agilent 1290 Infinity II 分析 LC システム			
パラメータ	設定値		
カラム	Agilent PLRP-S、4.6 × 250 mm、8 μm		
サーモスタット	4 °C		
溶媒 A	0.1 % TFA 水溶液		
溶媒 B	0.1 % TFA アセトニトリル溶液		
グラジエント	グラジエント 1 :		
	時間 (分)	%B	
	0 ~ 2	35	
	2 ~ 22	35 ~ 50	
	22 ~ 24	50 ~ 90	
	24 ~ 28	90	
	28 ~ 30	90 ~ 35	
	30 ~ 36	35	
	グラジエント 2 :		
	時間 (分)	%B	
0 ~ 2	35		
2 ~ 22	35 ~ 65		
22 ~ 24	65 ~ 90		
24 ~ 28	90		
28 ~ 30	90 ~ 35		
30 ~ 36	35		
カラム温度	25 °C		
流量	1.0 mL/min		
注入量	5.0 μL		
Agilent 1290 Infinity II 分取 LC システム			
カラム	Agilent PLRP-S、21.2 × 250 mm、8 μm		
サーモスタット	4 °C		
溶媒 A	0.1 % TFA 水溶液		
溶媒 B	0.1 % TFA アセトニトリル溶液		
グラジエント	時間 (分)	%B	
	0 ~ 2	35	
	2 ~ 22	35 ~ 50	
	22 ~ 24	50 ~ 90	
	24 ~ 28	90	
	28 ~ 30	90 ~ 35	
	30 ~ 45	35	
	カラム温度	室温	
	流量	21.2 mL/min	
	注入量	100 μL	
フラクション コレクション	2.5 mL フラクション、 時間ベース		

表 2. LC/MS データ取り込みパラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF		
パラメータ	設定値	
イオン源	デュアル AJS	
極性	ポジティブ	
ガス温度	325 °C	
ガス流量	13 L/min	
ネプライザ	35 psi	
シースガス温度	275 °C	
シースガス流量	12 L/min	
キャピラリー電圧	4,000 V	
ノズル電圧	500 V	
フラグメンタ電圧	175 V	
スキマ電圧	65 V	
取り込みモード	2.5 Hz	
質量範囲	100 ~ 2,100 m/z	
取り込みレート	5 スペクトル/秒	
Agilent 1290 Infinity II LC システム		
カラム	AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 100 mm、2.7 μm	
サーモスタット	4 °C	
溶媒 A	0.1 % 乳酸水溶液	
溶媒 B	0.1 % 乳酸アセトニトリル溶液	
グラジエント	時間 (分)	%B
	0 ~ 2	3
	2 ~ 23	3 ~ 47
	23 ~ 25	47 ~ 50
	25 ~ 26	50 ~ 97
	26 ~ 27	97 ~ 3
	27 ~ 30	3 [*]
	[*] イソクラティック (ポストラン)	
カラム温度	55 °C	
流量	0.3 mL/min	
注入量	20 μL	

結果と考察

2種類の樹脂を用いて、ターゲットの GLP-1 7-36 アミドペプチドを合成しました。最初に、分析困難なペプチドに対する樹脂の性能を高めるために、AmphiSpheres 40 RAM、0.4 mmol/g、75 ~ 150 μm に、ポリエチレングリコール鎖を加えています。次に、PL-Rink 樹脂 (1% DVB)、0.3 mmol/g、75 ~ 150 μm を少量保持していますが、これはより長いペプチド鎖の合成に適しています。

合成を同一条件下で実施し、ペプチド 1A (AmphiSpheres 樹脂で前処理)、ペプチド 1B (PL-Rink 樹脂で前処理) という2種類の未精製ペプチドを生成しました。

通常、ペプチドの精製に必要なポアサイズは 100 または 300 \AA です。このポアサイズで保持容量を最大化すると同時に、より大きい分子のアクセスまたは排除の制限を最小限に抑え、必要な質量移動を維持して最適な分離を実施します。

未精製ペプチドの分析クロマトグラフィーは、目的の分子の存在を確認し、溶出の特性について理解するための出発点として必要になります。最初は2種類のサンプルの溶出プロファイルが不明だったため、異なるグラジエントメソッドをスクリーニングし (図 2A、2B、3A、および 3B)、分取に最適なグラジエントを決定しました (35 ~ 50 %B)。実際のメソッド条件については、表 1 を参照してください。

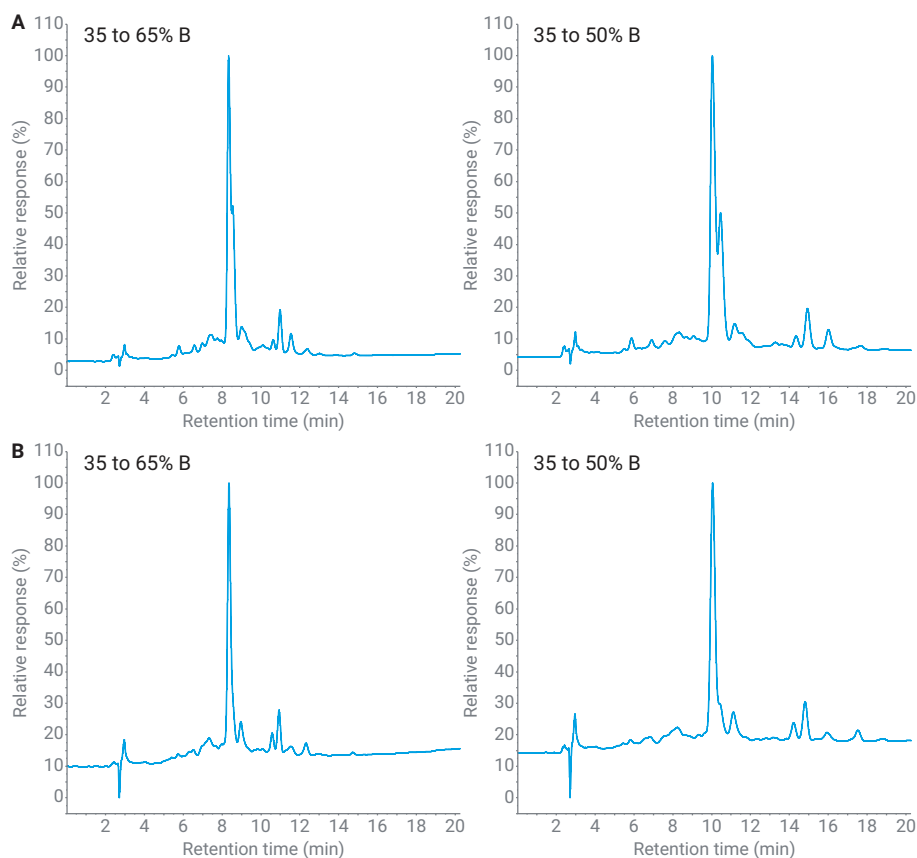


図 2. (A) Agilent PLRP-S 100 \AA カラムでのペプチド 1A のグラジエントの最適化。(B) Agilent PLRP-S 100 \AA カラムでのペプチド 1B のグラジエントの最適化

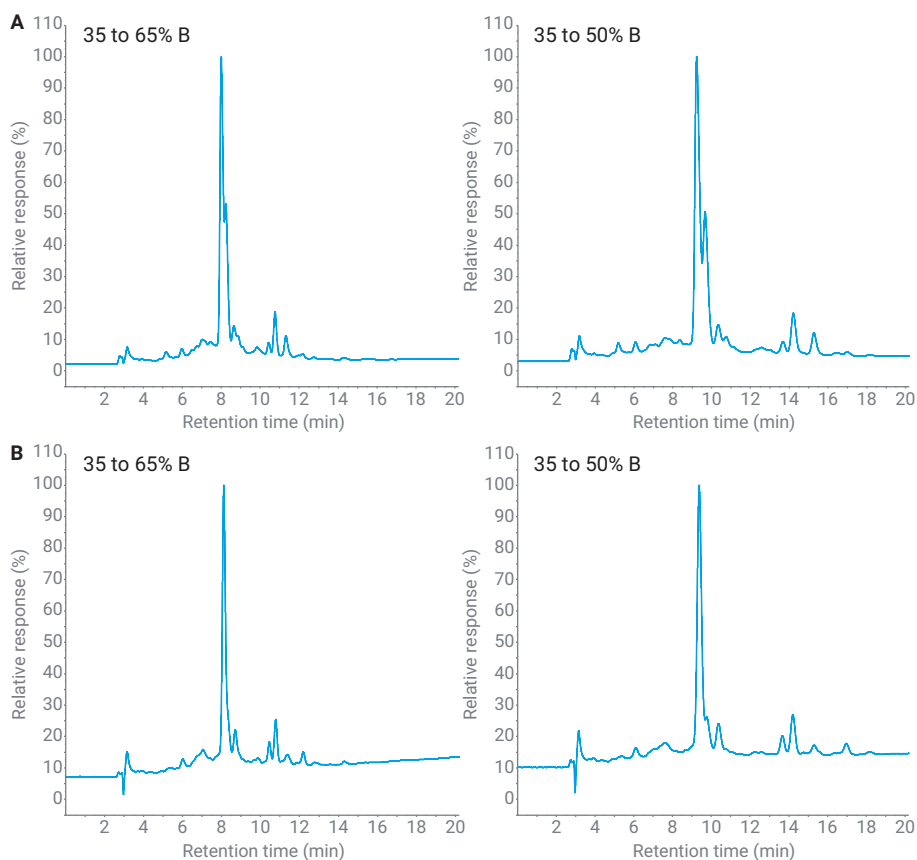


図 3. (A) Agilent PLRP-S 300 Å カラムでのペプチド 1A のグラジエントの最適化。(B) Agilent PLRP-S 300 Å カラムでのペプチド 1B のグラジエントの最適化

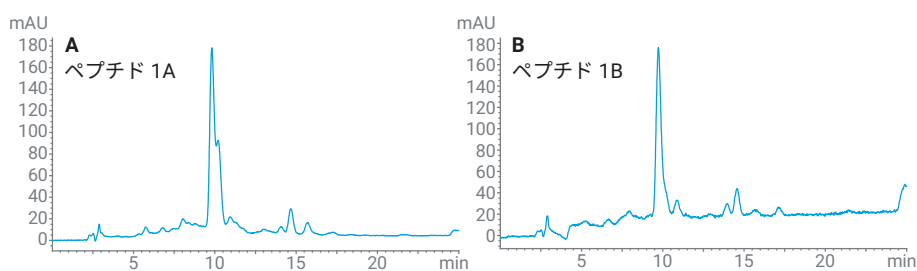


図 4. Agilent PLRP-S 100 Å カラムでのペプチド 1A (A) およびペプチド 1B (B) の分取クロマトグラム

この例では、AmphiSpheres 40 RAM と比較して、ペプチド 1B (PL-Rink 樹脂、0.3 mmol/g で前処理) の方が、未精製純度がより高くなっていることが明らかです (表 3)。

表 3. 未精製ペプチドの純度

	ペプチド 1A	ペプチド 1B
PLRP-S 100 Å	33.15 %	43.19 %
PLRP-S 300 Å	41.23 %	46.53 %

移動相 A (0.1 % TFA 水溶液を含む) に溶解した、濃度 1 mg/mL の 100 μ L の未精製ペプチドを注入して、分取スケールの分離を実施しました。カラムサイズを内径 4.6 mm から 21.2 mm にスケールアップした PLRP-S 100 Å カラムと PLRP-S 300 Å カラムの両方で、総量 1 mg を精製しました (図 4 および 6)。

2.5 mL 固定量のフラクションを使用し、メインピークが溶出する期間にわたって全長生成物 (FLP) を収集するようにフラクションコレクタを設定しました。製品および近接して溶出する不純物は、分析カラムで該当するフラクションを再分析することにより、簡単に同定できます (図 5 および 7)。

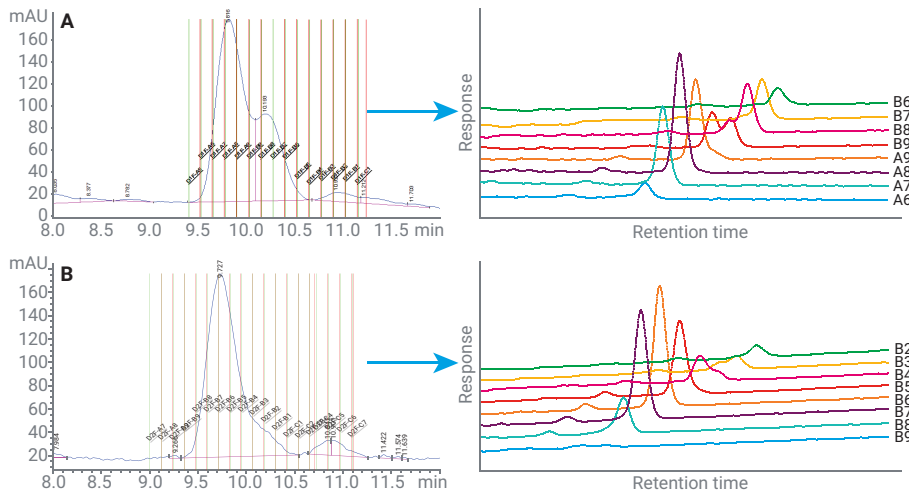


図 5. (A) フラクシオン再分析を示す、Agilent PLRP-S 100 Å カラムでのペプチド 1A (右側)。(B) フラクシオン再分析を示す、Agilent PLRP-S 100 Å カラムでのペプチド 1B (右側)

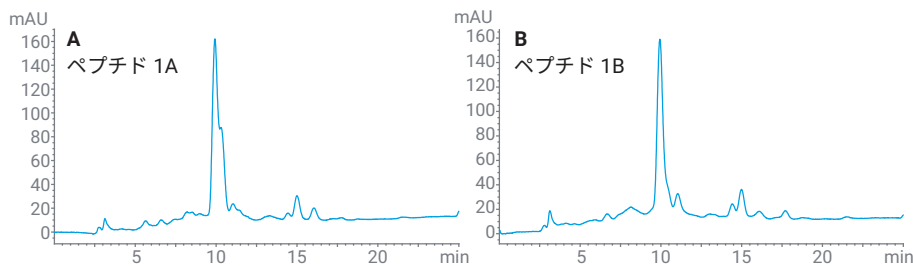


図 6. Agilent PLRP-S 300 Å カラムでのペプチド 1A (A) およびペプチド 1B (B) の分取クロマトグラム

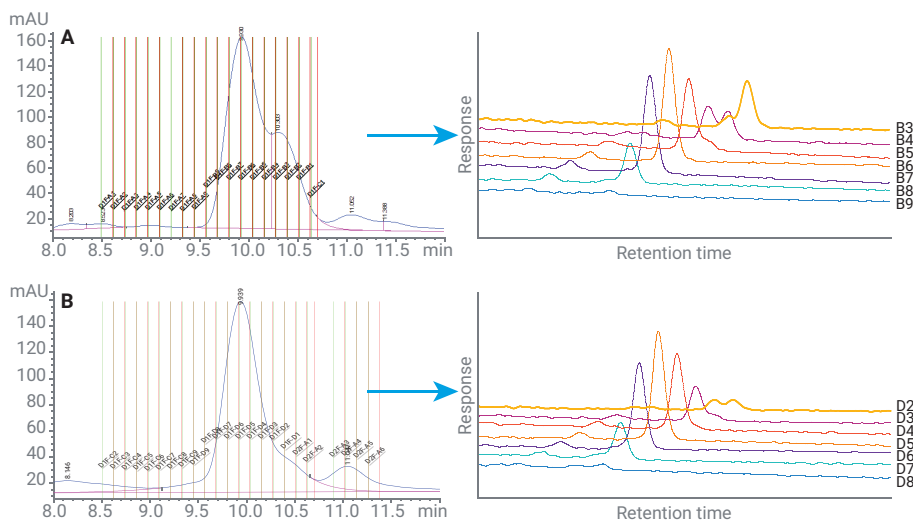


図 7. (A) フラクシオン再分析を示す、Agilent PLRP-S 300 Å カラムでのペプチド 1A (右側)。(B) フラクシオン再分析を示す、Agilent PLRP-S 300 Å カラムでのペプチド 1B (右側)

全体の純度レベルは、各フラクションのピーク面積パーセントから計算します (表 4)。

表 4. フラクシオンの組み合わせでの純度と収率の一覧

ペプチド 1A	面積 % (純度)	全体収率 %
PLRP-S 100 Å (フラクション A6 ~ B9)	89.28	85.59
PLRP-S 300 Å (フラクション B8 ~ B5)	90.26	73.02
ペプチド 1B	面積 % (純度)	全体収率 %
PLRP-S 100 Å (フラクション B8 ~ B4)	97.81	92.69
PLRP-S 300 Å (フラクション D7 ~ D3)	90.55	90.93

精製した主成分の LC/MS 分析を AdvanceBio ペプチドマッピングカラムで実施し、同定を確認しました。

合成ペプチドサンプルには、分子量の異なるもの、不純物、配列にアミノ酸が欠落しているものが多く、水分の損失などが多数含まれていることが多く、固相担体からの切断に失敗した場合、合成時の保護基がターゲット分子に付着している場合もあります。そのため、合成ペプチドの分析メソッドが、幅広い潜在的な不純物に対応していることが重要になります。最高純度のフラクションの主要成分として、660.34 で $[M + 2H]^{2+}$ 、825.42 で $[M + 3H]^{3+}$ 、1,099.89 で $[M + 4H]^{4+}$ 、1,649.34 で $[M + 5H]^{5+}$ が検出されました。この結果は、3,297.7 Da の (GLP-1) 7-36 アミドの全長アミノ酸配列に対応しています (図 8)。メソッド条件と機器パラメータについては、表 2 を参照してください。

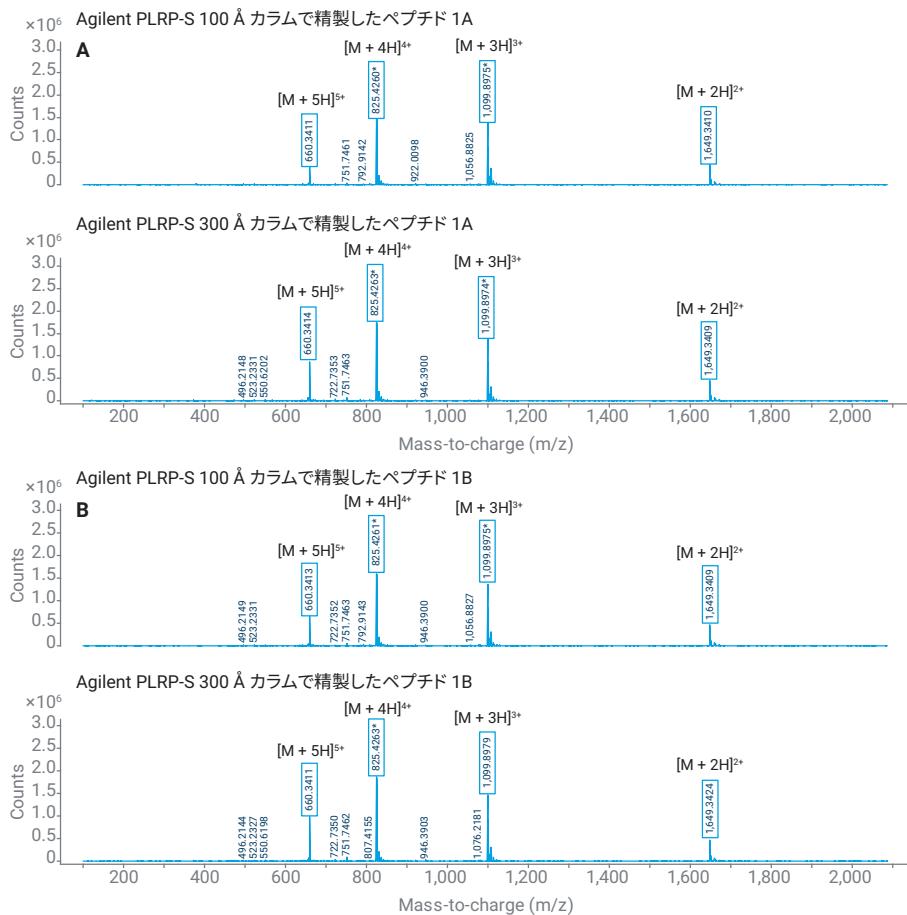


図 8. Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムで LC/MS により分析された、精製ペプチドの質量スペクトルの結果（メソッド条件については、表 2 を参照）

結論

このアプリケーションノートでは、未精製ペプチドの純度は、固相樹脂の選択などの合成条件に応じて異なる場合があることを実証しました。ただし、Agilent PLRP-S は、合成ペプチドのイオンペア逆相精製に最適なカラムです。利用できる表面積が大きくポアサイズが 100 Å と小さい粒子は、精製能力が高くなる可能性があります。ポアサイズが大きいと、多数の種において質量移動が適切に行われ、ピークがよりシャープになります。

Agilent PLRP-S 分取 HPLC カラムと Agilent 1290 Infinity II 分取 LC システムを組み合わせることで、分離を効率的に実施できます。最後に、LC/MS メソッドにおいて、Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムおよび移動相調整剤としてギ酸を適切に使用することにより、分子の同定を確認しました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE85357928

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, May 3, 2023

5994-6087JAJP