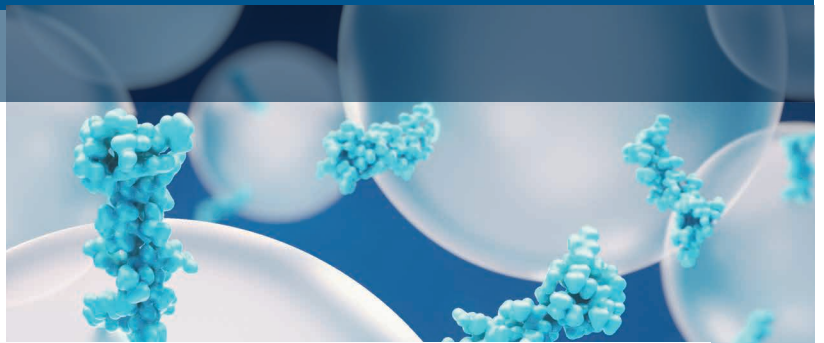
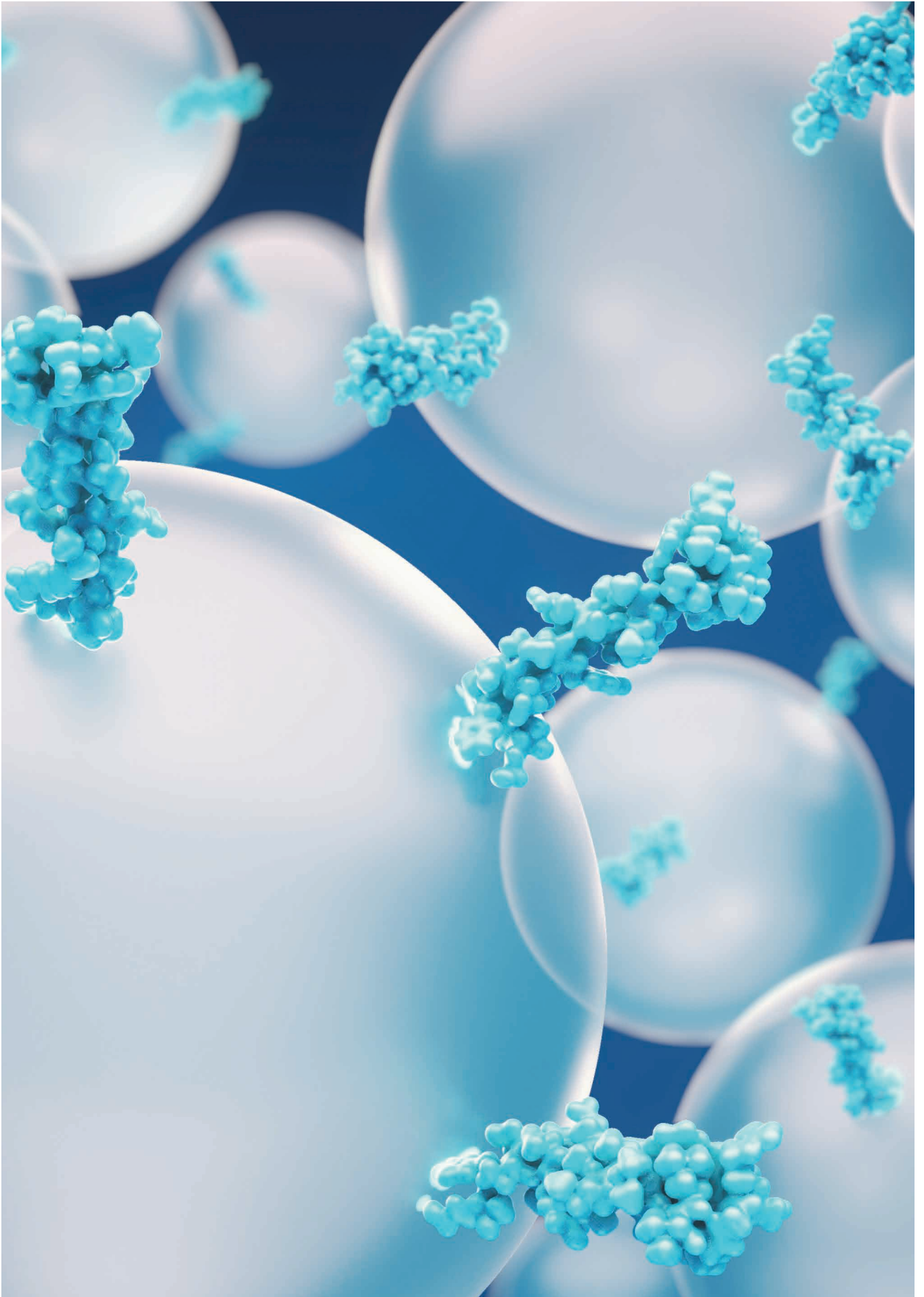


# 液体クロマトグラフィーによる 合成ペプチドの分析と精製

ワークフローと消耗品ガイド





# 合成ペプチド治療薬

合成ペプチド治療薬は効能や特異性が向上し、また毒性が低いことから、医薬品開発研究において重要性が高まっています。ペプチドは、経路シグナル伝達から、酵素調整や細胞コミュニケーションまで、さまざまな生物学的パスウェイにおいて不可欠な役割を担っています。合成ペプチドは、これらのさまざまな生物学的機能に重要な、生体内に存在するペプチドやタンパク質の機能を再現するように設計されています。また、新しい機能をターゲットとするように操作したり、安定性とバイオアベイラビリティを向上させるよう構造的にさらに修飾したりすることで全般的な治療効果を促進することも可能です。

## ペプチドの精製方法

ペプチドは、連鎖長が2～50個のアミノ酸からなる短いアミノ酸ポリマーです。多くの合成ペプチドは、固相ペプチド合成（SPPS）により生成されます。SPPSでは、高分子固相担体樹脂に固着されるペプチド鎖に、アミノ酸を段階的に添加します。1個のアミノ酸のカルボキシル基は他のアミノ酸のアミノ基と反応し、ペプチド結合を形成します。SPPSによる合成ペプチドの作成プロセスは、脱保護、活性化、結合の複数のステップを伴い、その後固相担体からの最終配列を切断します。最終粗生成物には、医薬品の安全性と効能に影響する不純物が含まれているため、それらを液体クロマトグラフィーによって分離し、特性解析し、モニタリングする必要があります。

UV検出器と組み合わせた逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、このような分離のための確立された手法となっています。トリフルオロ酢酸（TFA）は、この種の分析に使用される一般的な移動相添加物およびイオンペア試薬です。分取精製のために分析メソッドをスケールアップしたい場合に不可欠な、アミノ酸配列のカルボキシル基をプロトン化する低pH環境を作成し、二次的反応を低減しつつ、クロマトグラフィー分離とピーク形状を向上させます。TFAはまた、非極性逆相クロマトグラフィーによりペプチドの全般的な疎水性相互作用を向上させ、ペプチド配列の正電荷官能基によりイオンペアを形成することができます。ただし、質量分析（MS）検出により精製フラクションの同定と特性解析を行う場合、TFAはイオン化効率を妨げ、感度が低下する可能性があります。このため、ギ酸を用いた代替LC/MSメソッドは、最終製品の特性解析に最適です。

## アジレントのペプチド精製用逆相カラム

アジレントは、合成ペプチド分析ワークフローを効率化するための逆相カラムおよび充填剤を幅広く用意しています。Agilent PLRP-S 逆相カラムには、硬質なポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS/DVB) 粒子が含まれています。PS/DVB 粒子は幅広いポアサイズと粒子サイズが揃っており、分取精製に簡単にスケールアップ可能な、ペプチド分離分析に最適な粒子ケミストリとなっています。ポリマー性粒子には疎水性があり、残存表面シラノールおよび微量金属元素が存在しません。従来のシリカ系粒子担体に確認される残存表面シラノールや微量金属元素は、ペプチド配列の荷電官能基との不必要な二次的反応を発生させることで、ピーク幅の拡大やピークテーリングの原因となります。

合成ペプチド治療薬の特性解析では高分離能 2.7  $\mu\text{m}$  Agilent Poroshell 粒子担体が充填された Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングと AdvanceBio ペプチドプラスカラムが最適です。これらの AdvanceBioカラムは、出荷時にペプチド標準品の分析証明書が添付されるため、安心してペプチド分析に利用できます。表面シラノールとの二次的反応によってピークの広がりやテーリングが生じる困難なペプチド分離の場合、AdvanceBio ペプチドプラスのカラムケミストリは、これらの望ましくない二次的反応を低減する荷電表面修飾を取り入れることで、異なる C18 選択性により設計されており、LC/MS に適したイオン強度の低いギ酸添加の移動相で優れたピーク形状と分離能を示します。

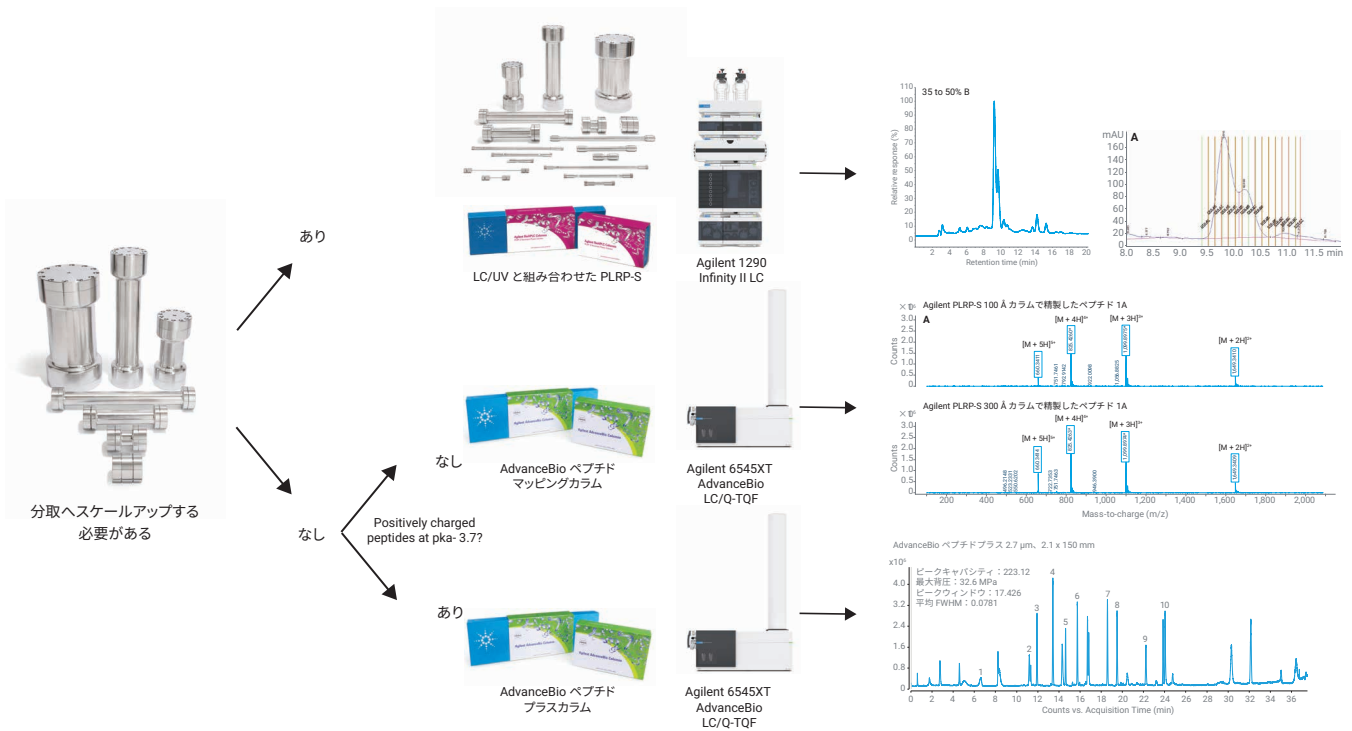


図 1. 合成ペプチドの分析ワークフローの選択は、分離のスケールと、MS 検出によるサンプルの特性解析の必要性によって異なります。

# 最適なクロマトグラフィー分離と 検出のヒント



## サンプル前処理

- 高性能で高品質の樹脂<sup>1</sup>からなる Agilent StratoSpheresは、固相担体ペプチド合成経路を通じた合成ペプチドの開発と製造のための代表的なポリマー担体です。
- Boc および Fmoc ケミストリに対応した StratoSpheres SPPS 樹脂は、高純度ペプチドのためのより優れた合成性能を提供します。
- 固相担体樹脂はプロセスに関連する不純物と副産物を簡単にクリーンアップでき、粗生成物の複雑さを簡素化します。

## クロマトグラフィー分離 – UV 検出

- ワークフローにおける UV 検出の選択により、移動相添加物として TFA を使用することが可能です。TFA (pKa 約 0.23) は pH を下げることによりペプチドのカルボキシル基とシリカ表面の残存シラノールをプロトン化し、ピークの広がりやテーリングの原因となる不要な二次的反応を低減します。
- PLRP-S カラムのポートフォリオでは、粒子サイズとポアサイズを柔軟に選択することが可能です。合成ペプチドの連鎖長に応じて、異なるポアサイズ (100Å または 300Å) を評価します。
- 5 ~ 95 % mobile phase B (MPB) の初期汎用スカウティンググラジエントにより分析メソッドの最適化<sup>2</sup>を開始し、ターゲットプロダクトの溶出プロファイルと、粗生成物に残っている不純物を確認します。
- 高度なフォーカスグラジエントを開発することで、全般的な分析時間を短縮し、全長ターゲットプロダクトと関連性の高い不純物との間の分離能を最適化することが可能です。
- 分析スケールで最適化された分離メソッドの開発が完了すれば、簡単に分取メソッドにスケールアップできます。
- 分取スケールで精製できる純度とサンプルサイズは分離能により決定されるため、分取へスケールアップする前に、分析カラム寸法でグラジエントを最適化することが非常に重要です。

## クロマトグラフィー分離 – MS 検出

- ワークフローにおける MS 検出の選択により、移動相添加物としての TFA の使用が制限されます。TFA はサンプルのイオン化効率に影響を及ぼすほか、感度低下により低含量の不純物の検出と特性解析が妨げられる可能性があります。ギ酸は MS 検出により適した酸性添加剤ですが、高い pKa (約 3.7) では、TFA と比較し、固定相に対するサンプルの反応 (表面シラノールとの二次的反応) の仕方に影響する可能性があります。
- 2.7  $\mu\text{m}$  Poroshell 粒子担体が充填された AdvanceBio ペプチドマッピングと AdvanceBio ペプチドプラスのカラムケミストリ<sup>3,4</sup> は、高分離能分離を実現します。
- 5 ~ 95 % MPB の初期汎用スカウティンググラジエントにより分析メソッドの最適化を開始し、ターゲットプロダクトの溶出プロファイルと、未精製のサンプルに残っている不純物を確認します。
- ペプチド配列に高いレベルの正電荷官能基があり、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムによる分離でピークの広がりやテーリングが示される場合、サンプルと残存表面シラノールとの相互反応が原因となっている可能性があります。この場合は、ギ酸添加の移動相条件で優れた保持分離を示す AdvanceBio ペプチドプラスカラムを利用します。
- カラムケミストリを決定した後に、高度なフォーカスグラジエントを開発することで、全般的な分析時間を短縮し、全長ターゲットプロダクトと関連性の高い不純物との間の分離能を最適化することが可能です。

## 質量分析

- MS 検出で TFA またはリン酸を含む緩衝液を使用しないでください。
- 目的のリテンションタイム外で LC ストリームを廃液側に分岐させます。これは特に、メソッドの最後の高有機洗浄中や、可能な場合はボイドボリュームが溶出している間に適用します。
- HPLC グレード以上の溶媒を使用します。
- MS イオン源の定期的なクリーニング手順を確立します。



各メソッドのサンプルメソッドとクロマトグラム

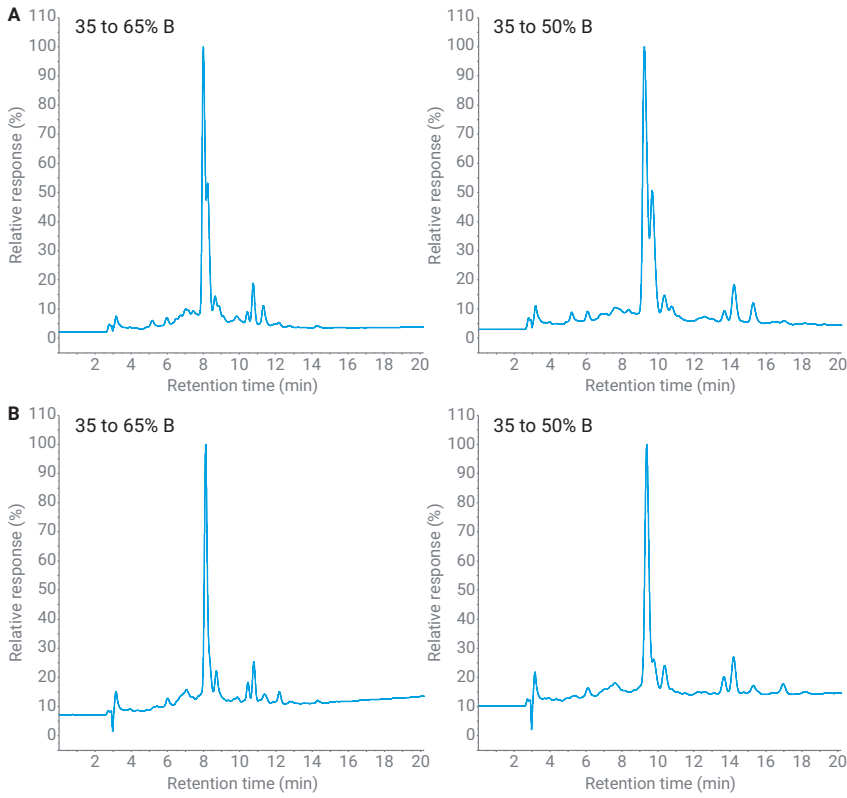


図 2.2 (A) Agilent PLRP-S 300 Å カラムでのペプチド 1A のグラジエントの最適化。  
(B) Agilent PLRP-S 300 Å カラムでのペプチド 1B のグラジエントの最適化

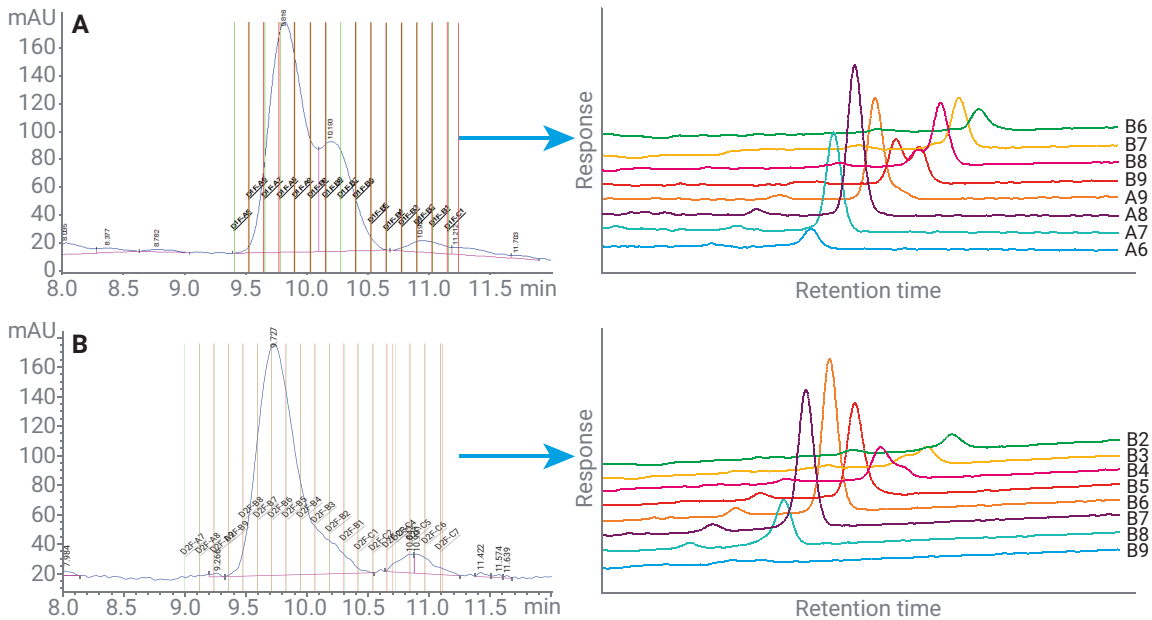


図 3.2 (A) フラクション再分析を示す、Agilent PLRP-S 100 Å カラムでのペプチド 1A (右側)。  
(B) フラクション再分析を示す、Agilent PLRP-S 100 Å カラムでのペプチド 1B (右側)

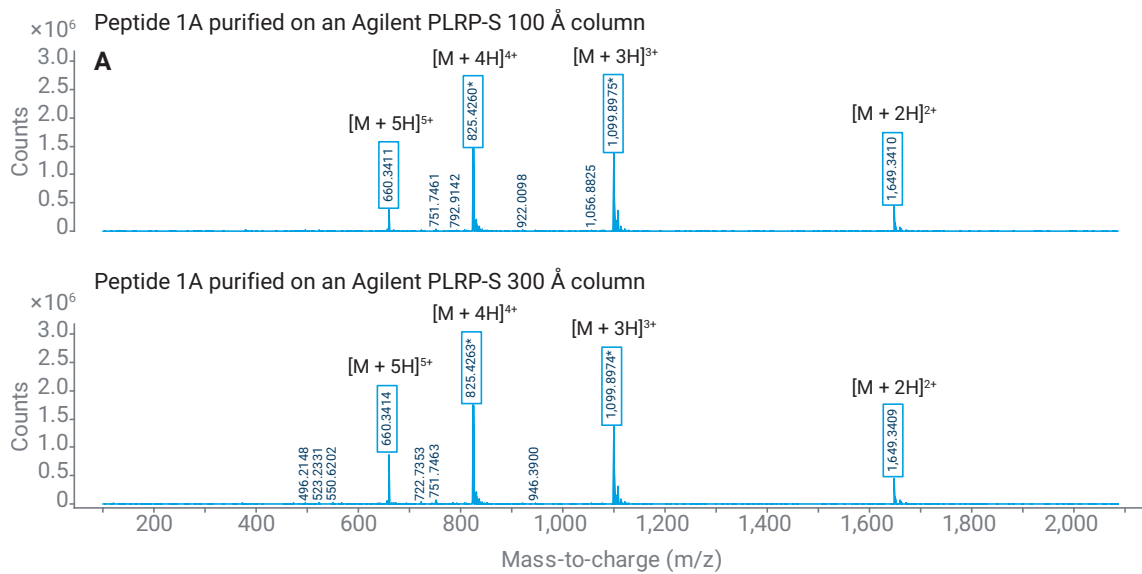


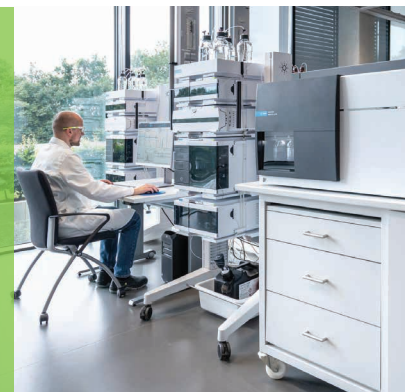
図 4. Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムで LC/MS により分析された、精製ペプチドの質量スペクトルの結果（メソッド条件については、参考文献 2 を参照）

## 参考文献

1. 生産規模のペプチド合成 Agilent StratoSpheres 合成担体樹脂を用いた合成, [5991-1485JAJP](#)
2. 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, [5994-6087JAJP](#)
3. 合成ペプチドとその不純物の分析, [5994-2760JAJP](#)
4. Agilent AdvanceBio ペプチドプラス 2.7 μm カラムによるペプチドの特性解析, [5994-3508JAJP](#)



# 標準品、カラム、消耗品などの 情報



## リスト 1: ペプチド合成のための固相担体

| 説明  | 部品番号        |
|---|-------------|
| <b>固相ペプチド合成</b>   |             |
| AmphiSpheres 40RAM, 0.4 mmol/g, 75 ~ 150 $\mu$ m, 100 g | PL3867-4764 |
| PL-Rink 樹脂 (1 % DVB) 0.3 mmol/g 75 ~ 150 $\mu$ m, 100 g | PL1467-4749 |

## リスト 2: ペプチド精製のための HPLC カラム

| 説明  | 部品番号        |
|---|-------------|
| <b>PLRP-S カラム</b>                                     |             |
| PLRP-S 100 Å, 8 $\mu$ m, 2.1 x 150 mm                 | PL1512-3800 |
| PLRP-S 100 Å, 8 $\mu$ m, 2.1 x 250 mm                 | PL1512-5800 |
| PLRP-S 100 Å, 8 $\mu$ m, 25 x 150 mm                  | PL1212-3800 |
| PLRP-S 300 Å, 8 $\mu$ m, 2.1 x 150 mm                 | PL1912-3801 |
| PLRP-S 300 Å, 8 $\mu$ m, 2.1 x 250 mm                 | PL1912-5801 |
| PLRP-S 300 Å, 8 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm                 | PL1512-3801 |
| PLRP-S 300 Å, 8 $\mu$ m, 4.6 x 250 mm                 | PL1512-5801 |
| PLRP-S 300 Å, 8 $\mu$ m, 25 x 150 mm                  | PL1212-3801 |
| PLRP-S 300 Å, 8 $\mu$ m, 50 x 150 mm                  | PL1712-3801 |
| <b>AdvanceBio ペプチドマッピングカラム</b>                        |             |
| AdvanceBio ペプチドマッピング 120 Å, 2.7 $\mu$ m, 2.1 x 100 mm | 655750-902  |
| AdvanceBio ペプチドマッピング 120 Å, 2.7 $\mu$ m, 2.1 x 150 mm | 653750-902  |
| <b>AdvanceBio ペプチドプラスカラム</b>                          |             |
| AdvanceBio ペプチド Plus 100 Å, 2.7 $\mu$ m, 2.1 x 150 mm | 695775-949  |

### リスト 3: 合成ペプチドの HPLC 精製のための消耗品と溶媒

| 説明   | 部品番号        |
|--|-------------|
| <b>超低拡散キット<sup>†</sup></b>   |             |
| Agilent 1290 Infinity II 用超低拡散チューブキット                                | 5067-5963   |
| Agilent 1290 Infinity II Bio 用超低拡散チューブキット                            | 5004-0007   |
| <b>サンプル容器消耗品</b>   |             |
| A-Line スクリューバイアル、2 mL、12 x 32 mm (12 mm キャップ) 茶色、ラベル付、100 個          | 5190-9590   |
| スクリューキャップ、12 mm、圧着、青色、PTFE/白色シリコンセプタム、100 個                          | 5190-7021   |
| バイアルインサート、250 µL、5.6 x 30 mm、不活性化ガラス、樹脂足付、100 個                      | 5181-8872   |
| InfinityLab ウェルプレート 96/0.5 mL、30 枚                                   | 5043-9310   |
| InfinityLab ウェルプレートシリコンクロージングマット、96 ウェルプレート用 50 個                    | 5042-1389   |
| <b>溶媒と添加物</b>  |             |
| InfinityLab Ultrapure LC/MS グレード水、1 L                                | 5191-4498   |
| InfinityLab Ultrapure LC/MS グレード MeOH、1 L                            | 5191-4497   |
| ギ酸、純度 99.5 %、5 mL  | G2453-85060 |
| <b>溶媒ろ過消耗品<sup>‡</sup></b>   |             |
| InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ  | 5191-6776   |
| InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L   | 5191-6781   |
| メンブレンフィルタ、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個                              | 5191-4341   |
| メンブレンフィルタ、再生セルロース 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個                           | 5191-4340   |
| 溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm   | 5041-2168   |
| <b>溶媒関連の消耗品</b>  |             |
| InfinityLab セーフティキャップスターターキット  | 5043-1222   |
| InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L   | 9301-6524   |
| InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L   | 9301-6526   |
| 溶媒ボトル、透明、2 L   | 9301-6342   |
| 溶媒ボトル、茶色、2 L   | 9301-6341   |
| InfinityLab セーフティパージボトル  | 5043-1339   |
| InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き (活性炭フィルタ 5043-1193 は含まれていません) | 5043-1221   |
| InfinityLab 活性炭フィルタ、タイムストリップ付き、58 g (5043-1221 で使用)                  | 5043-1193   |

<sup>†</sup> 1290 Infinity II Bio システムを使用している場合は、Agilent 1290 Infinity II Bio 用超低拡散チューブキットを推奨します。

<sup>‡</sup> この表に掲載されていない溶媒を使用する場合は、分析前に InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリを使用してください。

## Agilent CrossLab サービス

Agilent CrossLab は、サービスと消耗品を統合してワークフローをサポートし、お客様の生産性の向上や運用の効率化などの重要な成果を実現するための機能です。アジレントは CrossLab を通じてあらゆる場面で「見えない価値」を提供し、お客様の目標達成を支援します。CrossLab は、メソッドの最適化、柔軟なサービスプラン、あらゆるスキルレベル向けのトレーニングを提供します。またお客様が機器やラボを管理して最高の性能を実現できるように、その他の製品やサービスも多数ご用意しています。

Agilent CrossLab の詳細と、見えない価値から優れた成果を生み出す例については、ホームページをご覧ください。



ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

DE58592975

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2023  
Printed in Japan, August 31, 2023  
5994-6704JAJP

