

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРЕПАРАТИВНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ: ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ФЛЭШ-ХРОМАТОГРАФИЯ

УДК 543.544
БАК 02.00.10

Василевич Н.И., к.х.н., ООО "Лабпро Медиа", nvasile2003@yahoo.com

Количественное выделение пептидов и других природных соединений и их синтетических аналогов представляет собой непростую задачу. Традиционно для ее решения используют препаративную ВЭЖХ. Однако, наряду с высокой эффективностью, у этого метода имеется и ряд существенных недостатков: низкая производительность, высокая стоимость колонок, большие объемы используемых растворителей и трудность удаления водной фазы, длительность разделения. Альтернативным методом выделения пептидов служит несколько менее эффективный, но зато быстрый и недорогой метод флэш-хроматографии в обращенной фазе. В некоторых случаях флэш-хроматография позволяет получить чистый пептид, в других – максимально обогатить смесь перед финальным ВЭЖХ-разделением. Рациональное сочетание ВЭЖХ и флэш-хроматографии дает возможность получать граммовые количества индивидуальных пептидов при минимальных затратах.

Любой химик-синтетик согласится, что синтезировать целевое вещество – это только часть задачи. Процесс выделения вещества из реакционной смеси зачастую бывает более долгим и трудоемким, чем сам синтез. Для выделения малых органических молекул наиболее часто используют колоночную хроматографию на силикагеле. Систему для выделения и очистки подбирают с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), а затем переносят на колонку. Обычно подвижной фазой служит смесь гексан–этилацетат, реже – хлороформ–метанол. Значительно сложнее выделять полярные органические соединения, такие как пептиды, олигосахариды и другие природные вещества, и их синтетические аналоги. На пластине ТСХ в стандартных системах такие соединения едва отрываются от старта. Чтобы придать им хоть какую-то подвижность, приходится использовать более полярные и тяжелые системы: изопропанол–аммиак или бутанол–уксусная кислота–вода. Эти системы обеспечивают разделение, однако движение растворителя по пластине происходит чрезвычайно медленно, на получение одной хроматограммы на ТСХ-пластинке уходит не менее получаса. Проводить препаративную колоночную хроматографию в таких условиях практически невозможно.

Золотым стандартом для разделения пептидов служит препаративная ВЭЖХ на колонках C18. Тем не менее такие колонки достаточно дороги, а за один цикл можно разделить лишь очень небольшое количество вещества: от 5 мг до нескольких десятков. Для исследовательских задач такого количества обычно хватает, но

если речь идет о доклинических и клинических испытаниях, подобной производительности недостаточно. Для наработки необходимого количества соединения требуется провести ВЭЖХ-разделение несколько раз, что существенно удлинит время очистки продукта. Другая проблема при использовании препаративной ВЭЖХ связана с необходимостью упаривания большого количества водного растворителя. На роторном испарителе он отгоняется плохо, поэтому после длительного упаривания на роторе приходится использовать лиофильную сушку.

Отгонка больших количеств растворителя может вызывать ряд дополнительных проблем в случае низкой устойчивости вещества к нагреванию или воздействию водной среды с добавками кислоты. С такой проблемой столкнулась автор статьи, работая над проектом по синтетическим аналогам цефалоспоринов [1]. Цефалоспорины содержат β -лактамный цикл, который раскрывается при температуре выше 40°C, поэтому длительное упаривание водных фракций после ВЭЖХ-разделения на роторном испарителе приводило к потере вещества и повторному загрязнению продуктами деградации. В то же время объемы растворителя были слишком велики для лиофильного высушивания. Мы попробовали проводить очистку колоночной хроматографией на обращенно-фазовом сорбенте C18 (Fluka). В качестве подвижной фазы использовали систему вода–ацетонитрил с небольшим добавлением трифторуксусной кислоты, контроль фракции осуществляли на обращенно-фазовых

ТСХ-пластинах. Однако и такой вариант очистки был далек от идеального, поскольку использование высокополярных растворителей приводило к тому, что скорость выхода фракций с колонки оказывалась чрезвычайно низкой, и вследствие длительного нахождения цефалоспорины на колонке наблюдалось частичное раскрытие цикла. Чтобы как-то ускорить очистку, приходилось периодически подключать к приемнику фракций водоструйный насос, но это делало процесс трудно контролируемым.

Таким образом, препаративное выделение полярных природных соединений и синтетических аналогов часто является наиболее проблематичной стадией при их получении. Для облегчения этой задачи может быть использована флэш-хроматография в обращенной фазе.

РАЗВИТИЕ МЕТОДА ФЛЭШ-ХРОМАТОГРАФИИ В ОБРАЩЕННОЙ ФАЗЕ

В 1978 году Кларк Стилл (Clark Still) и его коллеги из Колумбийского университета опубликовали работу, положившую начало новому виду препаративной хроматографии, который они называли флэш-хроматографией [2]. Разработанная методика позволяла очищать образцы от 10 мг до 10 г за 10–15 мин. Флэш-хроматография, также известная как хроматография среднего давления, стала альтернативой медленной и часто неэффективной гравитационной хроматографии. Новый метод имел два основных отличия от классической колоночной гравитационной хроматографии: во-первых, размер силикагеля составлял 40–63 мкм (250–400 меш) по сравнению со стандартным силикагелем для колоночной хроматографии с размером частиц 200–500 мкм (35–60 меш), а во-вторых, для обеспечения движения растворителя через колонку с сорбентом применялось давление около 10–15 psi (фунтов на квадратный дюйм).

Метод флэш-хроматографии быстро завоевал популярность среди химиков. В конце 1990-х годов несколько компаний в разных странах (Biotage в Швеции, Buchi в Швейцарии, Grace в США и др.) начали выпуск флэш-хроматографов, позволяющих в значительной степени оптимизировать процесс: задать градиент растворителей, автоматизировать сбор и анализ фракций, тем самым не только значительно ускоряя разделение, но и делая его более эффективным. Наряду с традиционными стеклянными колонками, которые химики-синтики заполняли самостоятельно, стали выпускаться одноразовые пластиковые колонки, заполненные сорбентом. Повышение эффективности отразилось в названиях методов, которые компании

предлагали использовать для разделения, например, Interchim – Ultra-Performance Flash Purification (UPFP, ультрапроизводительная флэш-очистка), Biotage – High performance flash chromatography (HPFC, высокопроизводительная флэш-хроматография) и др.

Сегодня оборудование для флэш-хроматографии выпускают компании Biotage, Buchi, Gilson, Grace, Agilent Technologies, Teledyne ISCO, Interchim, Santai Technologies, SiliCycle, Analogix, Amgen, Moritex и др.

Вслед за работами по разделению реакционных смесей флэш-хроматографией на силикагеле стали появляться работы по очистке полярных соединений на колонках с обращенной фазой. Одной из первых подобных работ (1987) стало разделение экстрактов морских беспозвоночных животных, обитающих у берегов Новой Зеландии. Эти экстракты содержали полярные соединения, обладающие высокой противовирусной и противоопухолевой активностью. Авторы искали недорогой метод их выделения в количествах от нескольких граммов до килограммов [3]. Таким методом стала флэш-хроматография при умеренном давлении (не указаны точные значения) на стеклянной колонке с силикагелем, который авторы предварительно самостоятельно модифицировали *n*-октадецилтрихлорсиланом. Разделение вели в градиенте метанола в системе вода–метанол, последние фракции вымывались хлористым метиленом.

На первый взгляд, препаративное разделение смесей в обращенной фазе кажется дорогостоящим. Действительно, 250 г обращенно-фазового сорбента C18 для колоночной хроматографии (Merck, 0756-250G) стоят 1160 долларов, в то время как 1 кг нормально-фазового силикагеля (236799-1KG) – всего 352 доллара, т.е. в 13 раз дешевле. Однако, в отличие от обычного силикагеля, обращенно-фазовый сорбент можно промывать и повторно использовать много раз, поэтому, несмотря на внушительные первоначальные затраты, стоимость одного разделения сравнима с разделением в нормально-фазовом режиме.

РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ: ВЭЖХ ИЛИ ФЛЭШ-ХРОМАТОГРАФИЯ?

Обширный класс терапевтических препаратов включает природные и синтетические пептиды. К настоящему времени в США, Европе и Японии одобрены к применению свыше 60 пептидных препаратов, более 150 препаратов находятся в активной клинической разработке, а еще 260 – проходят разные стадии клинических исследований [4]. Основная доля этих препаратов приходится на синтетические пептиды. Поиск "кандидатов" среди этого класса соединений продолжа-

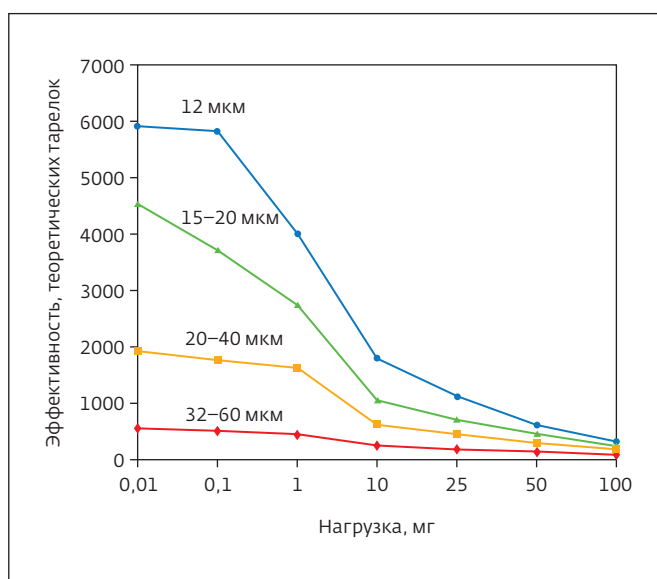


Рис.1. Эффективность разделения на обращенно-фазовых колонках в зависимости от величины нагрузки

ется, поэтому актуальна проблема очистки пептидов в граммовых и килограммовых количествах.

Обычно синтез пептидов осуществляют твердо-фазным методом на специальных смолах, поэтому чистота получаемых продуктов достаточно высока. В то же время примеси, образующиеся в результате такого подхода, имеют близкие свойства с целевым продуктом, поскольку возникают из-за неполного прохождения какой-либо из стадий наращивания пептидной цепи. Это обуславливает характерный вид хроматограммы реакционной смеси после отщепления со смолы: незначительное количество примесей, время удерживания которых близко ко времени удерживания целевого пептида.

Выбирая метод очистки, необходимо учитывать задачи, стоящие перед исследователем, а также преимущества и недостатки каждого из методов: препаративной ВЭЖХ и обращенно-фазовой флэш-хроматографии (табл.1). Размер частиц в стационарной фазе для флэш-хроматографии больше по сравнению с размером частиц в ВЭЖХ-колонке, что приводит к ухудшению разрешения. Однако для препаративного разделения этот фактор может быть не столь важен. Зависимость между нагрузкой образца, эффективностью (числом теоретических тарелок) и размером частиц может быть представлена графиком, изображенным на рис.1 [5]. Видно, что при малой нагрузке (аналитическое разделение) эффективность колонки с размером частиц 12 мкм более чем в 6 раз выше эффективности колонки с размером частиц 32–63 мкм,

Табл.1. Основные отличия флэш-хроматографии от ВЭЖХ

	Флэш-хроматография	ВЭЖХ
Основная задача	Быстрая очистка больших количеств пептида	Максимальная чистота конечного продукта
Размер частиц, мкм	25	от 7 до 15
Давление, psi	От низкого до умеренного, <100	Высокое, 400–2000
Цена колонки/картриджа	Умеренная	Высокая

но при увеличении нагрузки (препаративное разделение) эффективность колонки практически одинакова для любой размерности частиц. В то же время использование более крупных частиц позволяет значительно увеличить нагрузку образца и сократить время прохождения подвижной фазы через колонку. К безусловным преимуществам флэш-хроматографии относится стоимость картриджа, которая существенно ниже стоимости препаративной ВЭЖХ-колонки. Кроме того, объем применяемых растворителей значительно меньше, что облегчает упаривание и уменьшает экологический вред.

Таким образом, каждый из методов имеет свои преимущества и ограничения, и флэш-хроматография не может полностью заменить препаративную ВЭЖХ. В некоторых случаях после проведения твердофазного синтеза пептид отщепляется от смолы с достаточно высокой степенью чистоты, и флэш-хроматография позволяет получить индивидуальный продукт. В других случаях, особенно при выделении пептидов из природного сырья, флэш-хроматография не может обеспечить необходимую степень чистоты, но позволяет значительно обогатить образец перед финальной ВЭЖХ-очисткой.

Для сравнения двух методов авторы [6] синтезировали антипараллельный суперспиральный пептид, состоящий из 44 аминокислотных остатков: H-K RKKQKRKRKRAKQLRKRLQALEWQLAQIRKELQAAEKEEA QIE-NH₂. По данным аналитической ВЭЖХ, чистота этого пептида составляла около 35%. Два образца

по 150 мг неочищенного пептида растворили в 2 мл 50% водного ацетонитрила, один образец очищали с помощью флэш-хроматографии (рис.2), а другой образец – с помощью ВЭЖХ. В качестве мобильной фазы в обоих случаях использовали градиентное элюирование: буфер А – вода (0,1% муравьиной кислоты), буфер В – ацетонитрил (0,1% муравьиной кислоты). Сравнительные результаты препаративного разделения обоими методами приведены в табл.2.

Исследование показало, что флэш-хроматографическая очистка не уступала ВЭЖХ по суммарному выходу и чистоте продукта, но требовала меньших времени и расхода растворителей.

УЛУЧШЕНИЕ РАЗДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ

Боковые цепи пептида могут содержать основные или кислотные группы, которые в растворе могут находиться в протонированном или депротонированном состояниях. В случае, если эти группы находятся в равновесии, может происходить уширение или даже расщепление пика пептида. Для того чтобы избежать подобных сложностей и перевести соединение в еди-

ную протонированную или депротонированную форму, используют рН-модификатор. В большинстве случаев при разделении пептидов в качестве рН-модификатора выступает трифторуксусная или муравьиная кислота, а рН подвижной фазы составляет 2–2,5. Однако иногда для лучшего разделения применяют альтернативные добавки, такие как фосфат натрия, формиат аммония, пентафторпропионовая кислота, гептафтормасляная кислота и др. Эти добавки не только контролируют рН, но и образуют ионные пары с анализируемым веществом. Кислотные добавки дополнительно подавляют диссоциацию остаточных силанольных групп. Показано, что изменение содержания и концентрации модифицирующих добавок может оказывать значительное влияние на эффективность разделения. На рис.3а приведена хроматограмма модельной смеси положительно заряженных пептидов на ВЭЖХ-колонке C18 в присутствии 10мМ фосфорной, трифторуксусной, пентафторпропионовой и гептафтормасляной кислот, а на рис.3б – зависимость эффективности разделения тех же пептидов от концентрации трифторуксусной кислоты [7].

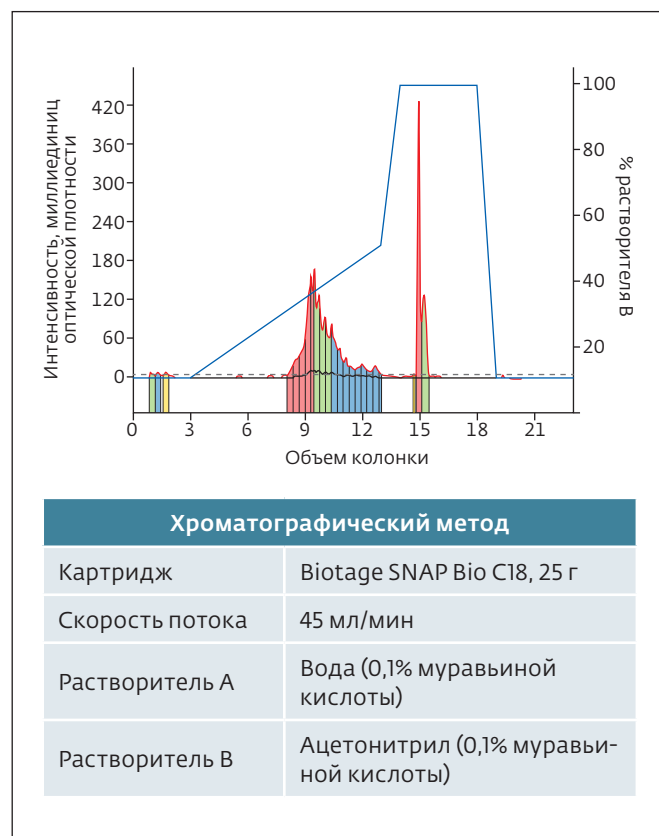


Рис.2. Флэш-хроматограмма очистки 44-членного антипараллельного суперспирального пептида

Табл.2. Сравнительные результаты препаративного разделения 150 мг 44-членного антипараллельного суперспирального пептида методами флэш-хроматографии и ВЭЖХ

Метод очистки	ВЭЖХ	Флэш-хроматография
Колонка/картридж	Phenomenex Gemini 5 um NX-C18 110A, 100×21.2 mm	Biotage SNAP Bio C18, 25 g
Общее количество пептида, мг	150	150
Количество циклов очистки	4	1
Количество очищенного пептида, мг	33	30
Общий объем буфера А, мл	1777	1041
Общий объем буфера В, мл	1514	477
Общее время очистки, мин	160 (каждый цикл – по 40)	27

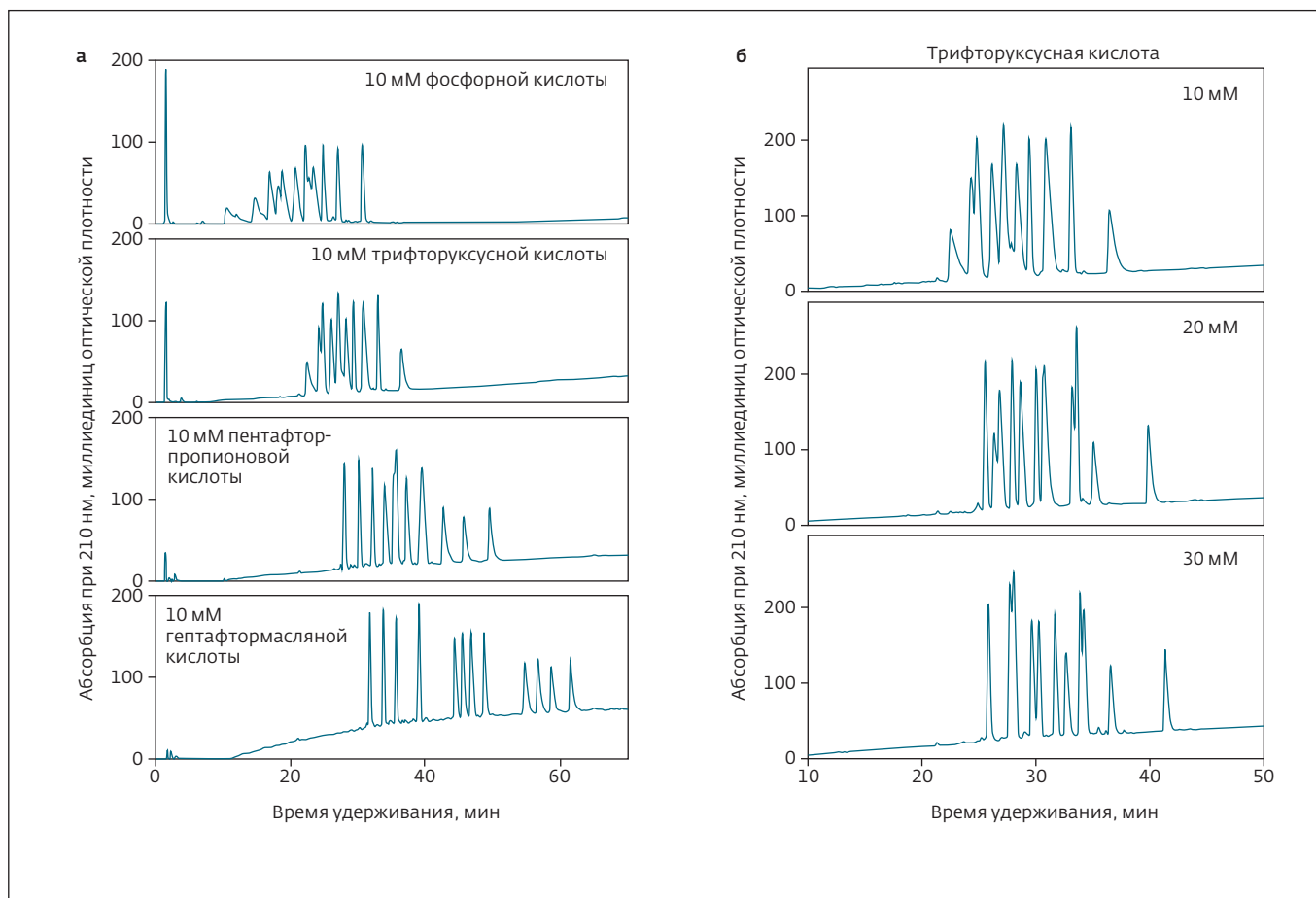


Рис.3. Разделение модельной смеси пептидов в присутствии 10мМ фосфорной, трифторуксусной, пентафторпропионовой и гептафтормасляной кислот (а) и различных концентраций трифторуксусной кислоты (б) [7]

Описанные закономерности с успехом могут быть использованы и для препаративного разделения смесей пептидов.

В работе [5] описывается применение pH-модификатора для разделения окисленной и восстановленной форм девятичленного пептида – окситоцина. В стандартных условиях при pH 2–2,5 в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты боковые тиольные группы цистеина находятся в протонированной форме, при этом разница в гидрофобности для линейного и циклического полипептида невелика. Хотя на аналитической ВЭЖХ-хроматограмме пики соединений разделяются (рис.4а), увеличение нагрузки на флэш-колонку приводит к слиянию этих пиков и невозможности разделения (рис.4б). Авторы заметили, что pKa цистеиновых SH-групп составляет около 8,34, и использовали возможность депротонирования этих групп при повышении pH выше указанного значения. Замена модификатора на 0,1% гидроксид аммония позволила достичь pH 10, при этом пики циклической и линейной форм окситоцина оказались разделенными более чем десятью объемами колонки (рис.4в).

ПРИМЕРЫ УСПЕШНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ СМЕСЕЙ

Авторы работы [8] синтезировали ряд пептидов, содержащих от 10 до 16 аминокислотных остатков (TAT-10, TAT-14, TAT-14Sc, TAT-14mer и TAT-16). Эти соединения ингибируют разложение ядерного фактора Nrf2 и таким образом могут оказывать противовоспалительное действие. Синтез осуществляли на синтезаторе, используя коммерческую смолу Wang и стандартную Fmoc-химию. После отщепления со смолы смесью трифторуксусная кислота–вода–триизопропилсилан (95:2,5:2,5), раствор упаривали, пептид высаживали диэтиловым эфиром, растворяли в уксусной кислоте и лиофилизировали. Основную очистку проводили методом обращенно-фазовой флэш-хроматографии на C18 картридже весом 12 г с помощью флэш-системы Biotage Isolera. Градиентное элюирование проводили в системе метанол–вода, используя в качестве модификатора 0,05% трифторуксусную кислоту, УФ-детектирование осуществляли при длинах волн 214 и 254 нм.

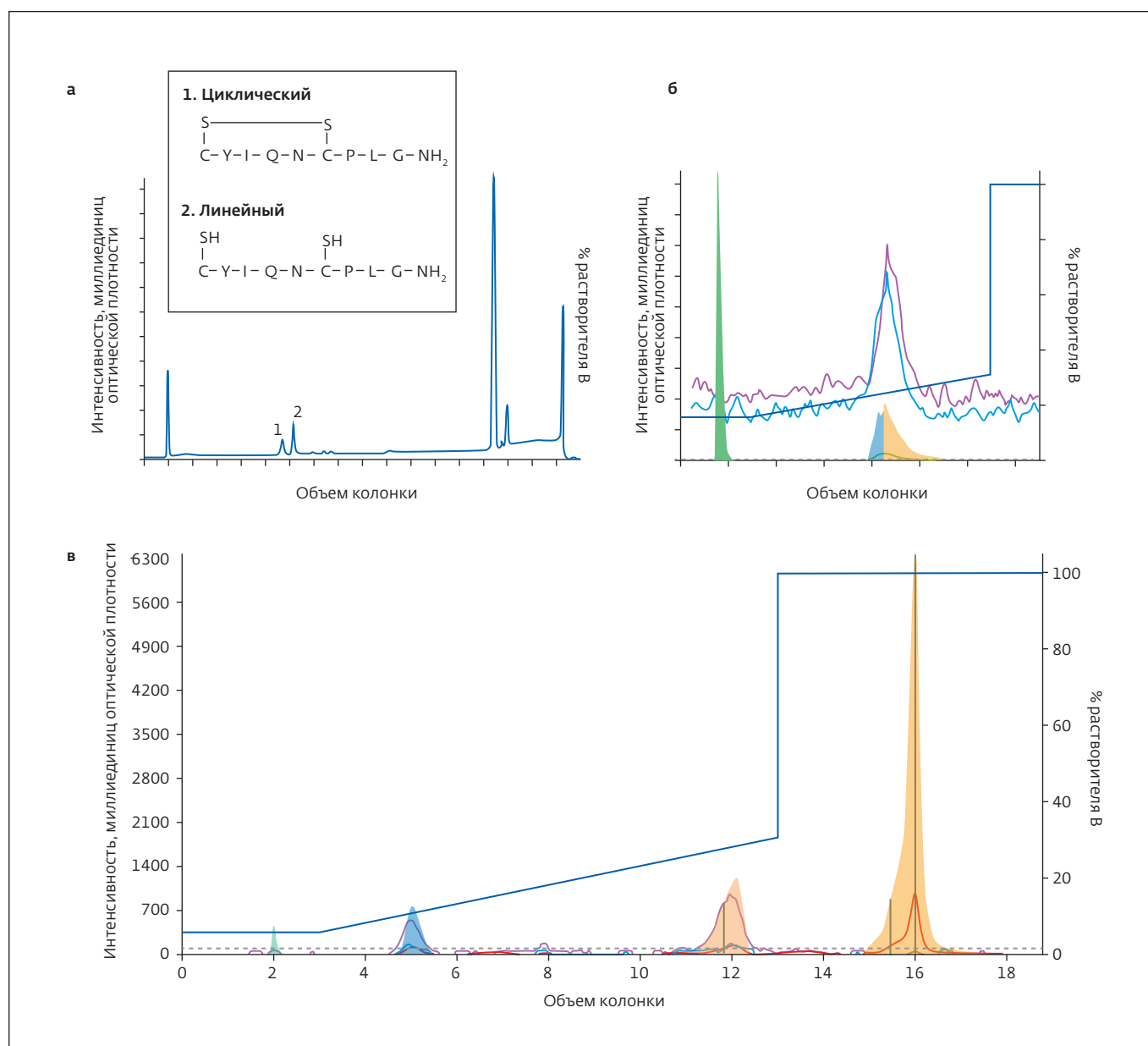


Рис.4. Аналитическая ВЭЖХ-хроматограмма смеси окисленного и восстановленного окситоцина (а); попытка разделения на флэш-колонке при pH 2,5 (б); разделение на флэш-колонке при pH 10 (в)

После флэш-очистки пептид TAT-10 не содержал никаких примесей, остальные пептиды дополнительно очищали препаративной ВЭЖХ в той же системе на колонке Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 мкм, 9,4×250 мм).

В работе [9] сравнивали возможности двух картриджей Biotage SNAP Ultra C18 30 g и Biotage SNAP Bio C18 300 Å 25 g для препаративной очистки 34-членного пептида YY3-36 – гормона из семейства панкреатического полипептида. Картриджи имеют сравнимый размер сферических частиц (25 и 20 мкм соответственно),

однако в последнем размер пор существенно больше и достигает 300 Å. Пептид YY3-36 синтезировали на автоматическом микроволновом пептидном синтезаторе с использованием Fmoc-защищенных аминокислот, чистота после отщепления со смолы составила 65%. Вещество (500 мг) растворили в 15 мл 50% водного ацетонитрила, а затем провели сравнительное разделение 5 мл аликвот раствора на двух стационарных фазах (рис.5). В обоих случаях использовалось градиентное элюирование водным ацетонитрилом, содержащим 0,1% муравьиной кислоты, скорость потока

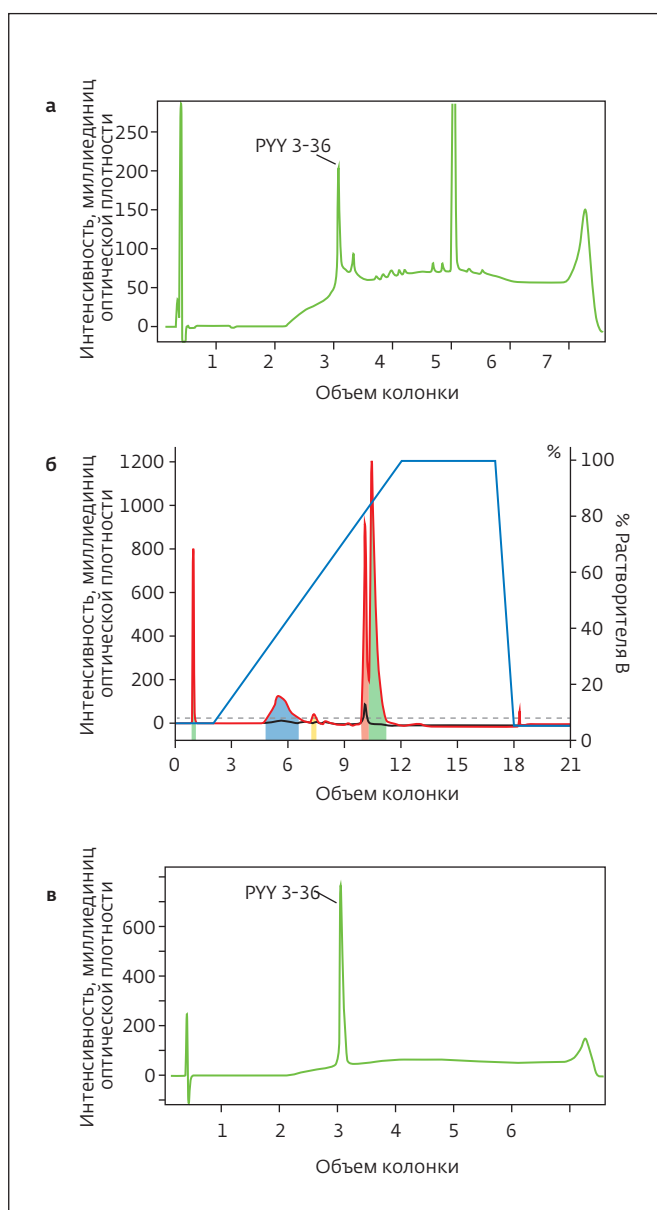


Рис.5. а – пептид до очистки; б – препаративная очистка на колонке Biotage SNAP Bio; в – пептид после флэш-очистки

45 мл/мин. В результате в обоих картриджах был получен пептид с чистотой выше 95%, однако выход пептида в первом случае был меньшим, чем во втором (15 и 20 мг соответственно).

* * * *

Таким образом, флэш-хроматография в обращенной фазе может служить недорогим и удобным методом быстрого и эффективного разделения пептидов и других полярных природных соединений. В зависимости от исходной чистоты и природы примесей

этот метод может использоваться как в качестве единственной стадии очистки, так и для предварительного обогащения и удаления большинства нежелательных примесей перед финальной очисткой (полировкой) с помощью ВЭЖХ.

Флэш-хроматография позволяет быстро получить значительное количество пептида за один цикл, что выгодно отличает ее от дорогостоящего и длительного выделения методом ВЭЖХ. В то же время недостаточная эффективность разделения не позволяет полностью отказаться от последнего метода. Для оптимальной работы необходимо грамотно и вдумчиво сочетать оба метода, добиваясь наилучших результатов при минимальных затратах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pohlmann J., Vasilevich N.I., Glushkov A.I., Kellenberger L., Shapiro S., Caspers P., Page M.G.P., Danel F. Propenylamide and propenylsulfonamide cephalosporins as a novel class of anti-MRSA β -lactams // Bioorg.&Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. P. 4635–4638.
2. Still W.C., Kahn M., Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution // J. Org. Chem. 1978. V. 43. No. 14. P. 2923–2925.
3. Blunt J.W., Calder V.L., Fenwick G.R., Lake R.J., McCombs J.D., Munro M.H.G., Perry N.B. Reverse phase flash chromatography: a method for the rapid partitioning of natural product extracts // Journal of Natural Products. 1987. V. 50. No. 2. P. 290–292.
4. Lau J.L., Dunn M.K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2018. V. 26. P. 2700–2707.
5. Achieve Highly Pure Peptides white paper // Biotage, Application notes. PPS510.
6. Mehrotra A., Denton E., Sørensen K.K., Jensen K.J., Duggan A.R. High Performance Flash Chromatography. An Alternative Technique to Rapidly and Efficiently Purify Crude Synthetic Peptides // 6th Solid Phase Peptide Synthesis Symposium & 12th Australian Peptide Conference, Queensland, Australia, Oct. 2017. P. 172.
7. Shibue M., Mant C.T., Hodges R.S. Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography // J Chromatogr A. 2005. V. 1080. No. 1. P. 68–75.
8. Steel R., Cowan J., Payerne E., O'Connell M.A., Searcey M. Anti-inflammatory Effect of a Cell-Penetrating Peptide Targeting the Nrf2/Keap 1 Interaction // ACS Med. Chem. Lett. 2012. V. 3. P. 407–410.
9. Flash Chromatography for Purification of Peptides Part 1 // Biotage, Application note. 2016. AN112.

В ПОМОЩЬ ХИМИКУ-СИНТЕТИКУ

Фирма Biotage предлагает продуманные решения
для всех ключевых стадий синтеза

Синтез ➡ Выделение и очистка ➡ Удаление растворителя

Микроволновые реакторы Initiator+ позволяют в разы ускорить проведение синтеза

Автоматическая замена реакционных виал в модели Initiator+ Sixty обеспечивает автономное проведение до шестидесяти индивидуальных синтезов.

Уникальная технология контроля температуры и давления позволяет безопасно исследовать синтетические процессы при температурах до 300°C и давлениях до 30 бар, используя виалы объемом от 0,2 до 20 мл.

Программное обеспечение в микроволновых пептидных синтезаторах Initiator+ Alstra обеспечивает синтез сложных по структуре пептидов (циклических, разветвленных и т. д.) с высоким выходом и производительностью.



Новый модельный ряд флэш-хроматографов Biotage® Selekt

новые возможности в разделении синтетических смесей

Повышенное давление в хроматографах Selekt (до 30 бар) в сочетании с новой линией картриджей Sfär, заполненных сферическими сорбентами зернением 20-25 мкм приближают разрешение при разделении органических смесей к эффективности препаративной ВЭЖХ, сохраняя при этом преимущества флэш-хроматографии.

Обновленное программное обеспечение еще больше облегчает работу химика-синтетика, сохраняя его время для реализации новых революционных идей!

Упариватель V-10 Touch

контролируемое удаление растворителей, в том числе высококипящих
ДМСО и ДМФА

Специальная технология, реализованная в упаривателе V-10 Touch, обеспечивает защиту от перегрева и остановку процесса в момент завершения упаривания.

Дополнительный насос позволяет упаривать большие объемы растворителя, добавляя в автоматическом режиме новые порции в систему для удаления растворителя.

