



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 398 767 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1380/88

(51) Int.Cl.⁶ : **C07K 1/14**
C07K 1/04

(22) Anmeldetag: 26. 5.1988

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1994

(45) Ausgabetag: 25. 1.1995

(56) Entgegenhaltungen:

DE-OS3124818 DE-OS3317092 US-PS4623716
CHEMICAL ABSTRACTS 99, 64410K (1983)
CHEMICAL ABSTRACTS 101, 51009W (1984)

(73) Patentinhaber:

GEBRO BROSCHEK GESELLSCHAFT M.B.H.
A-6391 FIEBERBRUNN, TIROL (AT).

(72) Erfinder:

SCHÄFER DORIS DR.
ARISDORF (CH).

(54) VERFAHREN ZUR REINIGUNG EINES ROHPEPTIDS MITTELS PRÄPARATIVER
MITTELDRUCKFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE

(57) Zur Reinigung eines Rohpeptids mittels präparativer Mitteldruckflüssigkeitschromatographie trägt man das zu reinigende Peptid in möglichst konzentrierter Form auf eine Chromatographie-Säule auf, die alkylierte hochkondensierte Polykieselsäure mit einer Korngröße von 20 bis 90 Mikrometer und mit einer Porengröße von 6 bis 30 Nanometer als stationäre Phase enthält. Dann wird bei einem Druck von 0 bis 40 bar mit einer mobilen Phase eluiert, und zwar unter Zusatz wenigstens eines Chelierungsmittels in geringer Konzentration und wenigstens einer stark polaren organischen Verbindung in geringer Konzentration. Das Gemisch wird so aufgetrennt, und das erhaltene Eluat wird fraktioniert.

Es können Peptidverbindungen mit einer Reinheit von über 99% erhalten werden.

AT 398 767 B

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung eines Rohpeptids mittels präparativer Mitteldruckflüssigkeitschromatographie, wobei man das zu reinigende Peptid auf eine Chromatographie-Säule aufträgt, die Umkehrphasen-Silica-Material d.h. alkylierte hochkondensierte Polykieselsäure mit einer Korngröße von 20 bis 90 Mikrometer und mit einer Porengröße von 6 bis 30 Nanometern als stationäre Phase enthält, bei einem Druck von 0 bis 40 bar mit einer mobilen Phase entweder isokratisch oder mit einem Gradienten eluiert, so das Gemisch auftrennt und das auf diese Weise erhaltene Eluat fraktioniert, und wobei das zu reinigende Peptid in möglichst konzentrierter Form auf die Säule aufgetragen wird und die mobile Phase aus

- (a) einem Gemisch aus wenigstens einem organischen Lösungsmittel und Wasser, oder
- (b) einem Gemisch aus wenigstens einem organischen Lösungsmittel und einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10, oder
- (c) einer rein wässrigen Pufferlösung mit einem pH-Bereich von 2 bis 10, besteht.

Das Prinzip der Festphasensynthese von Peptiden ist von R.B.Merrifield zum Beispiel in "Angewandte Chemie", Band 97, (1985), Seiten 801 bis 812, beschrieben. Im "International Journal of Peptide and Protein Research", Band 25, (1985), Seiten 449 bis 474 beschreibt M.Bodanszky das Prinzip der Peptidsynthese in Flüssigphase.

Die EP-A 37 516 beschreibt eine Festphasensynthese eines Vasopressinderivates nach Merrifield mittels Reinigung auf Molekularsieben (Trennung nach Molekulargewicht). Eine ähnliche Reinigung wird auch in der US-PS 4 148 787 und in "Collection Czechoslov.Chem.Comm.", Vol.31, (1966), Seiten 4581 bis 4591, beschrieben.

In der US-PS 4 093 610 wird im Zusammenhang mit einer Flüssigphasensynthese eine Reinigung auf Ionenaustauschern oder auf Molekularsieben beschrieben.

Weitere Reinigungsmethoden werden in der DE-OS 27 23 453 und der DE-PS 1 643 273 beschrieben, wobei die letztere Methode nur für Mengen im mg-Bereich durchführbar ist.

Auf die Problematik der Peptid-Reinigung ist auch von G.Flouret et al. in "Int.J.Peptide Protein Res.", 13, (1979), Seiten 137 bis 141, hingewiesen worden.

Im übrigen sei auch auf folgende, zum Stand der Technik gehörende Literaturstellen verwiesen:

K.Noda in "Int.J.Peptide Protein Res.", 19, (1982), Seiten 413-419;

"Collection of Czechoslov.Chem.Comm.", Vol.32, (1967), Seiten 1250-1257;

EP-A 112 809, worin die nicht ökonomische HPLC zur Anwendung kommt;

US-PS 4 495 097;

V.du Vigneaud et al., (1960), J.Biol.Chem. Vol.235, Nr.12, Seiten 64-66.

Ausführlicher werden bestimmte Reinigungsmethoden beschrieben in J.Chromatog., 38, (1968), Seiten 396-398, und

M.Zaoral et al., Collection Czechoslov.Chem.Comm., Vol.43, (1978), Seiten 511-522.

Mit allen diesen bekannten Reinigungsverfahren können im allgemeinen ökonomisch vertretbare Reinheitsgrade von 92 bis 94 % erreicht werden. Das hat zur Folge, daß bei einer medizinischen Verwendung einer Peptidverbindung stets nachgewiesen werden mußte, daß die sie begleitenden Nebenprodukte keine nachteiligen Folgen, Auswirkungen und Nachteile haben, was nicht leicht war, da man oft nicht wußte, aus was für Verbindungen die Nebenprodukte bestanden. Dieser Zustand ist unbefriedigend, zumal in der Medizin immer mehr Peptidverbindungen eingesetzt werden.

Ferner ist es aus der DE-OS 31 24 818 bekannt, die Reinigung einer Peptidverbindung durch Chromatographie in einer Säule mit umgekehrter Phase in einem Methanoltrifluoracetat-Puffer-Gemisch durchzuführen. Dies ergibt nur geringe Ausbeuten. Ähnliche Nachteile bestehen für ein Verfahren nach der DE-OS 33 17 092, bei welchem eine Peptidverbindung in einem Gemisch aus Methanol und Wasser gelöst und auf eine Säule von mit Octadecylketten modifiziertem Silicagel aufgegeben wird und die Elution mit einem Gemisch aus Methanol und wässriger Trifluoressigsäure durchgeführt wird.

Schließlich ist es bekannt (US-PS 4,623,716), zur Reinigung einer Peptidverbindung ein Hochdruckflüssigkeitschromatographieverfahren einzusetzen, bei welchem mit einem Gradient von 10-40 % Äthanol in zwei Mol wässriger Essigsäure mit einem Zusatz von Ammoniumhydroxidlösung eluiert wird. Auch hier ergeben sich geringe Ausbeuten.

Die Erfindung setzt sich zur Aufgabe, ein ökonomisches Reinigungsverfahren für Peptidverbindungen zu schaffen, mit welchem Reinheiten von über 99 % erreicht werden können, wobei ein solches Reinigungsverfahren mit hohen Ausbeuten im industriellen Maßstab, d.h. mit einer Möglichkeit zum Arbeiten im Gramm-Bereich, durchführbar sein soll. An Hand der bekannten Literatur mußte man annehmen, daß es nicht möglich ist, ein solches Verfahren zu finden, welches die angestrebte Reinheit auf ökonomische Art erreicht.

Völlig überraschend wurde nun doch ein solches Verfahren gefunden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht hiebei darin, daß, ausgehend von dem eingangs beschriebenen Verfahren, bei welchem die mobile Phase aus einem Gemisch bzw. einer Pufferlösung gemäß einer der Varianten (a), (b) oder (c) besteht, die mobile Phase in allen diesen drei Fällen (a) bis (c) zusätzlich noch

- 5 1. als Chelierungsmittel wenigstens eine Aminocarbonsäure oder Nitrilocarbonsäure in einer Menge von 0,01 bis 0,1 Vol.-%, insbesondere 0,05 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen der mobilen Phase, und
2. wenigstens eine stark polare organische Verbindung, nämlich Hexamethylenphosphortriamid, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF) und N-Methylpyrrolidon (NMP) in einer Menge von 0,05
10 bis 1 Vol.-%, insbesondere 0,5 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen der mobilen Phase in Kombination enthält.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat den Vorteil, daß es äußerst ökonomisch ist. Es ist weiters sehr vorteilhaft, daß das erfindungsgemäße Verfahren in einem niedrigen Druckbereich durchgeführt werden kann. Ebenso ist das Säulenfüllmaterial relativ billig, weil im erfindungsgemäßen Verfahren irreguläre statt
15 sphärische Partikel verwendbar sind. Im Vergleich zu entsprechendem HPLC-Material ist das erfindungsgemäß eingesetzte Säulenfüllmaterial gegenwärtig etwa 20 mal billiger. Während der Reinigung werden die Peptidverbindungen weder denaturiert noch weisen sie einen Aktivitätsverlust auf; das erfindungsgemäße Verfahren ist also für die Peptidverbindungen äußerst schonend. Durch geeignete Wahl des Fließmittels können die Peptidverbindungen rasch und selektiv getrennt werden. Die erfindungsgemäß aufgetrennten,
20 gereinigten Peptidverbindungen weisen erstaunlicherweise eine Reinheit von über 99% auf, was auf den kombinierten Zusatz des erwähnten Chelierungsmittels und der erwähnten, stark polaren, organischen Verbindungen zurückzuführen ist. Weiters können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren große Mengen an Lösungsmitteln eingespart werden.

Völlig überraschend ist, daß sich bei hohen Beladungen der Säulen signifikante Verbesserungen in der
25 Ausbeute ergeben, und zwar nicht nur im Vergleich zu einer Verfahrensführung ohne Chelator und ohne stark polare organische Verbindung, sondern auch im Vergleich zu einer Verfahrensführung, bei welcher entweder nur die stark polare organische Verbindung als Zusatz eingesetzt wird oder nur das Chelierungsmittel allein.

Aus der Literaturstelle "Chemical Abstracts" 99, 64410k (1983) ist zwar die Verwendung von EDTA und
30 von DMF im Zusammenhang mit einem Flüssigkeitschromatographieverfahren bekannt, jedoch werden diese beiden Substanzen nicht der mobilen Phase zugesetzt, sondern für die Waschung der Säule verwendet, also für die stationäre Phase, und auch nicht in Kombination, sondern alternativ. Es handelt sich also bei diesem Stand der Technik um eine Vorbehandlung der Säule mit DMF oder EDTA, bevor Leukotrien mittels eines konventionellen Fließmittels gereinigt wird.

35 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält die mobile Phase als Chelierungsmittel Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA). Dadurch ergeben sich besonders günstige Ergebnisse:

Der Nachweis der Peptidverbindungen in den Fraktionen erfolgt z.B. im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 232 nm oder 275 nm.

40 Zur Kontrolle der Reinheit und der Struktur des Peptides in den Fraktionen können die bekannten Methoden angewendet werden: beispielsweise HPLC, DC, Aminosäurenanalyse, Sequenzanalyse.

Falls ein Puffer im Fließmittel verwendet wird, so werden die entsprechenden Fraktionen vorteilhaft noch vor der Lyophilisation entsalzt, z.B. an Ionenaustauschern oder mittels Molekularsieben.

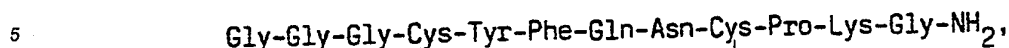
Um das fraktionierte, erfindungsgemäß gereinigte Peptid als Festkörper zu erhalten, wird die entsprechende Fraktion beispielsweise lyophilisiert.
45

Mit dem erfindungsgemäßen Reinigungsverfahren ist es möglich, beispielsweise 20-50 g Rohpeptid innerhalb von 3 Stunden zu reinigen.

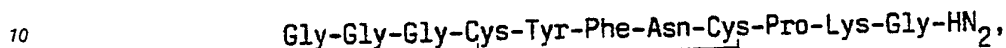
Für das erfindungsgemäße Reinigungsverfahren können Peptidverbindungen verwendet werden, die entweder mittels Festphasensynthese nach Merrifield ("Angewandte Chemie", Band 97, (1985), Seiten 810
50 bis 812) oder in der Flüssigphasensynthese ("Int.J.Peptide Protein Res.", 25, (1985), Seiten 449 bis 474) synthetisiert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können insbesondere folgende Peptide gereinigt werden: Disulfid-Verbindungen, welche gemäß einem neuen Verfahren hergestellt worden sind, das im wesentlichen dadurch gekennzeichnet ist, daß man wenigstens ein Oxidationsmittel, welches kovalent oder elektrostatisch
55 an eine feste Phase gebunden ist und welches - SH-Gruppen zu Disulfidbrücken zu oxidieren vermag, in Wasser unter Rühren vorlegt, dann eine wässrige Lösung der zu oxidierenden Peptidverbindung langsam dosiert derart zugibt, daß die Konzentration des zu oxidierenden Peptids so gering ist, daß die Wahrscheinlichkeit einer intermolekularen Reaktion der Peptidmoleküle vernachlässigbar klein ist, und die Reaktionsteil-

nehmer miteinander unter intensivem Rühren reagieren läßt, und anschließend die rohe, eine Disulfidbrücke aufweisende Peptidverbindung aufarbeitet. Es können aber auch mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Peptide gereinigt werden wie Terlipressin der Formel



CIS-Pressin der Formel



Hamburger-Peptid der Formel Asp-Ser-Asp-Pro-Arg, Vasopressin und deren Derivate, Calcitonin, Somatostatins und Insulin. Es ist bevorzugt, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Terlipressin zu reinigen; das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigte Terlipressin ist extrem sauber und hat andere Charakteristiken als ein im Handel erhältliches, herkömmliches Terlipressin, was auf das Fehlen von Verunreinigungen zurückzuführen ist.

Entsprechende Strukturformeln sind beschrieben in:

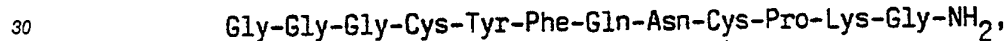
"Handbook of Biochemistry" C-164 bis C-188 - Amino Acid Sequences of Proteins, C-265 (Handbook of Biochemistry selected data for Molecular Biology, 2nd edition (1970), Editor: Herbert A. SOBER, PhD, veröffentlicht von (The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 44 128), und

"Int.J.Peptide Protein Res.", 15, (1980), Seiten 342 bis 354.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung erläutern.

25 Beispiel 1: Terlipressin

10 g Terlipressin (Rohpeptid) der Formel



gelöst in 750 ml destilliertem Wasser, wurde mittels einer MPLC-Anlage der Firma Labomatic AG auf eine 45 x 880 mm Säule unter einem Druck von 15 bar aufgetragen. Packung: Umkehrphasenmaterial (C₁₈-60) Das Peptid wurde dann mit einem Fließmittelgemisch von 26 % Methanol und 74% 0,1 M Triethylammoniumphosphat (TEAP) pH 2,45, 0,4% DMSO und 0,05% EDTA mit einem Durchfluß von 60 ml/Min. eluiert und fraktioniert. Die Detektion des Peptides erfolgte bei 210 nm im Durchfluß. Das Peptid wurde dann mittels HPLC-Analyse in den Fraktionen nachgewiesen und die entsprechenden Fraktionen nach Zusammenschütten nach bekannten Methoden auf einem Ionenaustauscher entsalzt und lyophilisiert.

Die Reinheit des somit erhaltenen Peptides wurde mittels HPLC-, Aminosäuren- und Sequenzanalyse bestimmt. Ausbeute: 83%, Reinheit 99,8%. Die analytische HPLC wurde wie folgt durchgeführt:

45	Säulengröße:	4,6 mm x 250 mm
	Stationäre Phase:	(alkalische hochkondensierte Poly-Kieselsäure)
	Mobile Phase:	74% 0,1 molares Triethylammoniumphosphat, pH 2,25, 26% Methanol
	Temperatur:	20 °C
	Druck:	148 bar
	Fluß:	1,5 ml/Minute
50	Detektion:	210 nm

In Fig.1 ist das entsprechende Chromatogramm abgebildet. Die Ordinate entspricht der optischen Dichte bei 210 nm, und die Abszisse entspricht der Retentionszeit in Minuten.

Beispiel 2: CIS-Pressin

Es wird im wesentlichen wie in Beispiel 1 vorgegangen, jedoch mit folgenden Abweichungen:

5	Säule:	52 x 480 mm
	Packung:	Umkehrphasenmaterial (C ₁₈ 200-100)
	Fließmittel:	18% Acetonitril / 82% 0,12 M TEAP pH 2,9 0,52% DMF, 0,05% NTA
	Durchfluß:	18 ml/min.
10	Druck:	20 bar
	Detektion:	232 nm
	Probemenge:	5 g gelöst in 200 ml dest. Wasser
	Ausbeute:	78%
	Reinheit:	99,5%

15

Beispiel 3: Asp-Ser-Asp-Pro-Arg Hamburger Peptid

Es wird im wesentlichen wie in Beispiel 1 vorgegangen, jedoch ist keine Entsalzung nötig, sondern eine
20 direkte Lyophilisation der gesammelten Fraktionen. Weitere Abweichungen waren:

25	Säule:	37 x 1083 mm
	Packung:	Umkehrphasenmaterial (C ₁₈ 30-60)
	Fließmittel:	10% Methanol / 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in dest. Wasser, 0,3% NMP, 0,045% EDTA
	Druck:	17 bar
	Durchfluß:	25 ml/Min.
	Detektion:	210 nm,
	Probemenge:	3 g gelöst in 70 ml dest. Wasser
30	Ausbeute:	85%
	Reinheit:	99,7%

Patentansprüche

35

- Verfahren zur Reinigung eines Rohpeptids mittels präparativer Mitteldruckflüssigkeitschromatographie, wobei man das zu reinigende Peptid auf eine Chromatographie-Säule aufträgt, die Umkehrphasenmaterial-Silica-Material, d.h. alkylierte hochkondensierte Polykieselsäure mit einer Korngröße von 20 bis 90 Mikrometer und mit einer Porengröße von 6 bis 30 Nanometer, als stationäre Phase enthält, bei einem
40 Druck von C bis 40 bar mit einer mobilen Phase entweder isokratisch oder mit einem Gradienten eluiert, so das Gemisch auftrennt und das auf diese Weise erhaltene Eluat fraktioniert, und wobei das zu reinigende Peptid in möglichst konzentrierter Form auf die Säule aufgetragen wird und die mobile Phase aus
 - einem Gemisch aus wenigstens einem organischen Lösungsmittel und Wasser, oder
 - einem Gemisch aus wenigstens einem organischen Lösungsmittel und einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 2 bis 10, oder
 - einer rein wässrigen Pufferlösung mit einem pH-Bereich von 2 bis 10, besteht,**dadurch gekennzeichnet**, daß die mobile Phase in allen drei obigen Fällen (a) bis (c) zusätzlich noch
 - als Chelierungsmittel wenigstens eine Aminocarbonsäure oder eine Nitrilocarbonsäure in einer
50 Menge von 0,01 bis 0,1 Vol.-%, insbesondere 0,05 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen der mobilen Phase, und
 - wenigstens eine stark polare organische Verbindung, nämlich Hexamethylenphosphortriamid, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF) und N-Methylpyrrolidon (NMP) in einer Menge von 0,05 bis 1 Vol.-%, insbesondere 0,5 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen der mobilen
55 Phase, in Kombination enthält.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die mobile Phase als Chelierungsmittel Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) enthält.

AT 398 767 B

Hiezu 1 Blatt Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Patentschrift Nr. AT 398 767 B

Ausgegeben

25. 1.1995

Int. Cl.⁶: C07K 1/14
C07K 1/04

Blatt 1

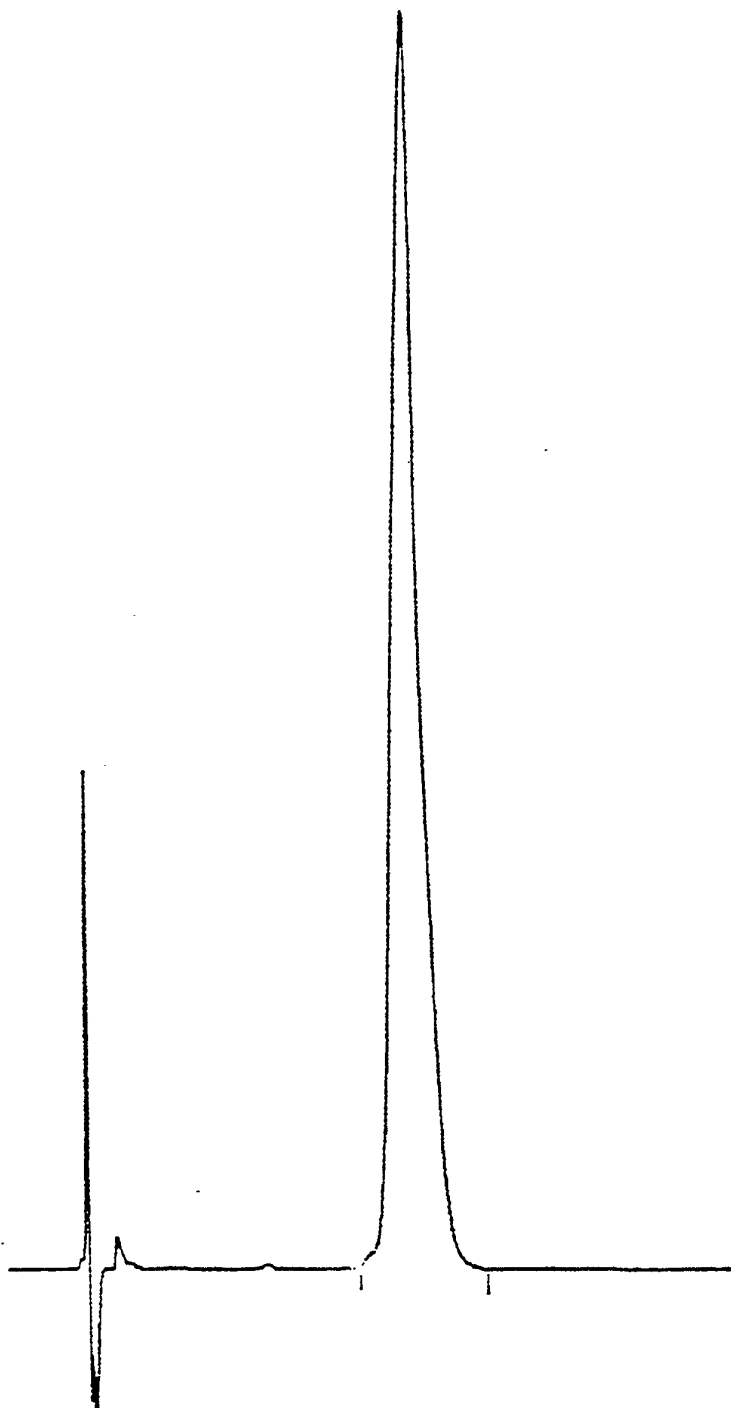


Fig. 1