



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103694338 B

(45)授权公告日 2018.04.06

(21)申请号 201310717379.3

(22)申请日 2013.12.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103694338 A

(43)申请公布日 2014.04.02

(73)专利权人 深圳翰宇药业股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术工业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层

(72)发明人 赵忠卫 潘俊锋 马亚平 袁建成

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 孙占华 张广育

(51)Int.Cl.

C07K 14/605(2006.01)

C07K 1/36(2006.01)

C07K 1/30(2006.01)

C07K 1/20(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

(56)对比文件

CN 102993293 A, 2013.03.27,

CN 102875664 A, 2013.01.16,

CN 102174100 A, 2011.09.07,

CN 102731625 A, 2012.10.17,

审查员 王航

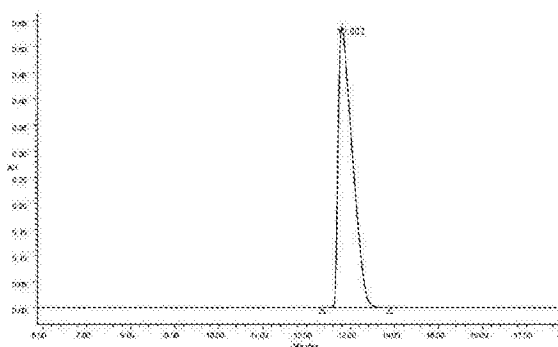
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种盐酸高血糖素的纯化方法

(57)摘要

本发明涉及一种盐酸高血糖素的纯化方法。具体而言,所述方法包括:以体积比30%—60%的醋酸和5%—20%的乙腈水溶液溶解粗肽,得到粗肽溶液;将所得粗肽溶液采用色谱法梯度洗脱纯化,以体积比0.1%—0.4%的硫酸和体积比0.1%—0.4%高氯酸的水溶液用氨水调pH值2.5—3.5后的溶液为A相,乙腈为B相,梯度:B%:20%—45%洗脱;盐析;在十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱上采用色谱法将盐析后的样品转盐和脱盐,以体积比为0.1—0.8%的醋酸铵水溶液为A相,乙腈为B相,梯度:B%:3%—10%梯度冲洗15—30分钟后,再用盐酸水溶液—乙腈体系转盐洗脱。



1. 一种盐酸高血糖素的纯化方法,包括以下步骤:

1) 前处理:以体积比30%—60%的醋酸和5%—20%的乙腈水溶液按照浓度20g/L—50g/L溶解粗肽,用水将粗肽溶液中的醋酸与乙腈二者的总体积百分数稀释到10%—30%;

2) 纯化:将步骤1)所得粗肽溶液进行色谱法梯度洗脱纯化,以体积比0.1%—0.4%的硫酸和体积比0.1%—0.4%高氯酸的水溶液用氨水调pH值2.5—3.5后的溶液为A相,乙腈为B相,梯度:B%:20%—40%洗脱,收集纯化的高血糖素硫酸盐溶液;

3) 使所得高血糖素硫酸盐溶液盐析;

4) 转盐:用反相高效液相色谱法将步骤3)所得高血糖素的硫酸盐样品转盐,将步骤3)所得的高血糖素样品上样,然后以质量/体积比0.1%—0.8%的醋酸铵水溶液为A相,乙腈为B相,梯度:B%为3%—10%梯度或等度冲洗15—30分钟;用盐酸水溶液乙腈体系洗脱,所述盐酸水溶液的浓度为0.1%—0.4%,该洗脱步骤所采用的乙腈浓度为40%以上,收集盐酸高血糖素溶液;

其中所述步骤2)和4)中的色谱法使用十八烷基硅烷键合硅胶为固定相;

其中所述步骤3)的盐析包括:

通过常温旋蒸的方法将步骤2)所得溶液中乙腈的比例降至15%以下,

将所得溶液的pH值用稀氨水调至6.0~7.0后放置到2~8摄氏度2~20小时,得到其中高血糖素样品析出的浑浊液,

将所得浑浊液进行离心处理,上清液作为废液处理,下层固体用60%~100%的高氯酸水溶液将其溶解后,再用注射用水稀释一倍后转入步骤4)即可。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述步骤2)中A相的pH为3.0。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述步骤2)中的色谱法使用色谱柱,其直径和长度为5cm×25cm,10cm×25cm或15cm×25cm。

4. 权利要求1所述的方法,其中所述稀氨水浓度为20%。

5. 权利要求1、2或4中任一项所述的方法,其中所述步骤4)中的色谱法使用色谱柱,其直径和长度为5cm×25cm,10cm×25cm或30cm×25cm。

6. 权利要求3所述的方法,其中所述步骤4)中的色谱法使用色谱柱,其直径和长度为5cm×25cm,10cm×25cm或30cm×25cm。

7. 权利要求1、2或4中任一项所述的方法,其中所述步骤4)中醋酸铵水溶液的质量/体积比为0.3%。

8. 权利要求3所述的方法,其中所述步骤4)中醋酸铵水溶液的质量/体积比为0.3%。

9. 权利要求1、2或4任一项所述的方法,其中所述步骤4)中所述盐酸水溶液的浓度为0.2%。

10. 权利要求3所述的方法,其中所述步骤4)中所述盐酸水溶液的浓度为0.2%。

一种盐酸高血糖素的纯化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种盐酸高血糖素的纯化方法。具体而言,本发明涉及一种操作简单、高收率、纯度高、有利于实现产业化的盐酸高血糖素的纯化方法。

背景技术

[0002] 高血糖素(glucagon)亦称增血糖素或抗胰岛素或胰岛素B。它是伴随胰岛素由脊椎动物胰脏的胰岛 α 细胞分泌的一种激素。与胰岛素相对抗,起着增加血糖的作用。高血糖素是由29个氨基酸组成的直链多肽,分子量为3485,它是由一个大分子的前体裂解而来。目前国内有两家产品上市,分别是丹麦诺和诺德公司的注射用生物合成高血糖素和深圳翰宇的注射用盐酸高血糖素。其在盐酸盐的条件下具有较高的生物活性。

[0003] 目前高血糖素的生产主要采用生物重组方法,其收率不高,纯度也较低,一般在90%左右。关于高血糖素人工合成方法方面的文献很少,关于纯化的文献几乎没有。

[0004] 本发明的目的是提供一种操作简单、高收率、纯度高、有利于实现产业化的盐酸高血糖素的纯化方法。

发明内容

[0005] 为实现上述目的,综合考虑盐酸高血糖素本身的性质,本发明提供了一种盐酸高血糖素的纯化方法,包括以下步骤:

[0006] 一以体积比30%—60%的醋酸和5%—20%的乙腈的水溶液溶解粗肽,得到粗肽溶液;

[0007] 一将所得粗肽溶液采用色谱法梯度洗脱纯化,以体积比0.1%—0.4%的硫酸和体积比0.1%—0.4%高氯酸的水溶液用氨水调pH值2.5—3.5后的溶液为A相,乙腈为B相,梯度:B%:20%—45%,优选20%—40%洗脱,收集洗脱得到的高血糖素硫酸盐溶液;

[0008] 一使所得高血糖素硫酸盐溶液盐析;

[0009] 一在十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱上采用反相高效液相色谱法将盐析后的样品转盐和脱盐,以0.1~0.8%(w/v)的醋酸铵水溶液为A相,乙腈为B相,梯度:B%:3%~10%梯度或等度冲洗15~30分钟后,再用盐酸水溶液—乙腈体系脱盐处理。

[0010] 具体而言,本发明提出了一种盐酸高血糖素的纯化方法,该方法获得的产品纯度高且收率好,能够达到产业化要求。

[0011] 在一个实施方案中,本发明提供的一种高血糖素盐酸盐的纯化方法包括以下步骤:

[0012] 步骤1):以体积比30%—60%的醋酸和5%—20%的乙腈的水溶液按照浓度20g/L—50g/L溶解粗肽,用水将所得粗肽溶液中的醋酸与乙腈二者的总体积百分数稀释到10%—30%。步骤1)下文也表述为“前处理”。

[0013] 所述“粗肽”是指采用液相合成法或固相合成法得到的,尚未经过精制处理的盐酸高血糖素粗肽或者纯度不能满足药用的盐酸高血糖素,粗肽中盐酸高血糖素的纯度在20%以上。

[0014] 所述“粗肽溶液”是指粗肽经过前处理后所得到的溶液,所使用的水为纯净水,并符合注射用水标准,优选超纯水;所使用的醋酸为分析纯的冰醋酸,本发明的“乙腈”的纯度级别优选色谱纯。

[0015] 选择体积比30%—60%的醋酸和5%—20%的乙腈的水溶液混合溶剂系统是通过对比试验并考虑实际生产过程的操作方便得出的,不在该浓度范围内的溶剂的溶解能力会变低,导致溶解样品所需的溶解体积过大,不利于反相色谱的处理(会导致体积过载,纯化效率低)。

[0016] 将制备的粗肽的浓度控制在20g/L—50g/L有利于纯化效率,高于50g/L会导致后续的反相色谱纯化时不挂色谱柱,低于20g/L会使纯化效率低下。

[0017] 用水将所得粗肽溶液中的醋酸与乙腈二者的总体积百分数稀释到10%—30%,当醋酸和乙腈的总体积百分数高于30%此范围的溶剂会导致后续的反相色谱纯化时不挂色谱柱,当醋酸和乙腈的总体积百分数低于10%会使样品析出,导致后续的反相色谱纯化无法进行。

[0018] 步骤2):将所得粗肽溶液进行色谱法梯度洗脱纯化,以0.1%—0.4%的硫酸和0.1%—0.4%高氯酸的水溶液(体积比,用氨水调pH值2.5—3.5)为A相,乙腈为B相,梯度:B%:20%—45%,优选20%—40%,收集纯化的高血糖素硫酸盐溶液;步骤2)下文也表述为“纯化”。在一个优选的实施方案中,所述pH为3.0。

[0019] 选择0.1%—0.4%的硫酸和0.1%—0.4%高氯酸两种酸用氨水调节后生成两种缓冲盐的A相是优化选择的结果。流动相A中缓冲盐的浓度低于所限定的范围使流动相缓冲能力变弱,导致样品不能完全洗脱且谱图变形达不到分离的要求。大于此范围,流动相A中缓冲盐的浓度过高对色谱系统损伤较大,甚至会部分产生盐析,导致无法纯化。另外,流动相A的pH值也非常重要,不在2.5—3.5范围达不到分离效果。

[0020] 洗脱系统中A相和B相的比例是通过大量实验筛选得到的,B%低于20%样品不能冲洗下色谱柱,B%大于45%样品会提前冲出,都不能进行纯化。采用该溶剂系统纯化,分离效果较现有技术会大幅提高,本步的收率90%左右,所得样品的纯度在98%以上,大大提高收率和纯度,降低了生产成本。

[0021] 所述步骤2)中使用以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱。在一个优选的实施方案中,所述色谱柱的柱子直径和长度优选为:5cm×25cm,10cm×25cm或15cm×25cm。

[0022] 步骤3)采用盐析的方法对高血糖素样品进行进一步的纯化,使其纯度达到99%以上。所述步骤3)下文也表述为“盐析”。

[0023] 所述“盐析”是指通过控制步骤2)所得合格溶液中乙腈浓度和溶液的pH值,使高血糖素样品析出的过程,所述合格溶液是指样品纯度大于95%的溶液。在一个优选的实施方案中,所述盐析包括:通过常温旋蒸的方法将步骤2)所得合格溶液中乙腈的比例降至15%以下,再将其pH值用20%的稀氨水调至6.0~7.0后放置到2—8摄氏度2~20小时,使其析出。再将浑浊液进行离心处理,上清液作为废液处理;下层固体用60%~100%的高氯酸的水溶液将其溶解后,再用注射用水稀释一倍后转入步骤4)即可。

[0024] 该步骤提高高血糖素样品的纯度,将高血糖素样品的纯度从大于95%到大于99.0%。另外,使用盐析方法具有很大的成本优势,盐析的成本远远低于反相色谱处理的成本,特别是在规模化生产时尤为明显。

[0025] 步骤4)采用反相高效液相色谱法将高血糖素的硫酸盐转成盐酸盐。步骤4)下文也表述为“转盐”。

[0026] 所述“反相高效液相色谱法”的固定相为十八烷基硅烷键合硅胶。在一个优选的实施方案中,所述转盐方法包括:将步骤3)所得的高血糖素样品上样,然后以0.1~0.8%(w/v)的醋酸铵水溶液为A相,乙腈为B相,梯度:B%:3%~10%梯度或等度冲洗15~30分钟;然后用盐酸水溶液乙腈体系洗脱,其中所使用的所述盐酸水溶液的浓度为0.1%—0.4%(w/v),优选为0.2%(w/v)。该洗脱步骤所采用的乙腈浓度为40~80%,收集盐酸高血糖素溶液,浓缩,冷冻干燥后得盐酸高血糖素。

[0027] 所述步骤4)中使用以八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱。在一个优选的实施方案中,所述色谱柱的柱子直径和长度为:5cm×25cm,10cm×25cm或30cm×25cm。

[0028] 本发明提供的纯化盐酸高血糖素的方法操作可行、纯度高(可达99.0%以上且最大任一杂质不大于0.1%)、收率高(纯化收率可达80%以上),达到产业化要求(一批次可获得200克以上的精肽)。

[0029] 本发明采用反相色谱和盐析结合的办法进行纯化处理,适用于纯度在20%以上的粗肽样品的纯化,且具有很大的成本优势,特别是在规模化生产时尤为明显。另外,本发明得到的盐酸高血糖素纯度较高可达99.0%以上,较生物合成具有较高纯度。本发明的纯化方法较现有技术大幅提高了产品的质量,且纯化成本也没有升高,收率也大幅较高。

[0030] 采用本发明方法所获得的产品的纯度可达99.0%以上,纯化收率可达80%以上。且可以实现规模化生产,单批次产量可达200克以上。可大幅提高产品的质量和降低成本。

附图说明

[0031] 图1为示出了盐酸高血糖素纯度的纯化色谱图。

具体实施方式

[0032] 参照以下实施例可以更好地理解本发明。但是,应理解,以下实施例仅用于举例说明目的,而不应被理解为以任何方式限制本发明的保护范围。

[0033] 实施例

[0034] 实施例1

[0035] 1)前处理:用体积比30%的醋酸和5%的乙腈水溶液按照20g/L的浓度溶解化学合成法得到的粗肽,搅拌使样品完全溶解后用Φ0.45μm的偏氟滤膜过滤,收集滤液。用纯化水将粗肽溶液中的醋酸和乙腈二者的总体积百分数稀释到30%备用。其中所述粗肽是采用常规的固相合成法得到。

[0036] 2)纯化:

[0037] 纯化条件:色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱,柱子直径和长度为:5cm×25cm。流动相:A相:0.1%硫酸和0.4%高氯酸(v/v)的水溶液,用氨水调pH值2.5;B相:乙腈,流速:50-100ml/分钟,梯度:B%:20%~40%(每3分钟升高1%),60分钟,检测波长:280nm。进样量为1.0-2.5g。

[0038] 纯化过程:将色谱柱用体积比40~60%的乙腈冲洗干净后平衡上样,上样量为1.0-2.5g。线性梯度洗脱60分钟,收集目的峰(为最大峰30~35分钟),检测其色谱纯度,将纯度

大于95%以上的样品合并后于水温35℃的条件下于旋转蒸发仪上减压旋蒸浓缩,浓缩至剩余约一半的体积后转入盐析纯化步骤。

[0039] 3) 盐析纯化

[0040] 将浓缩后的溶液用氨水调pH值到6.0后,放置到2~8摄氏度下5小时。再将浑浊液进行离心处理,离心条件:2500转/分,5分钟,室温。上清液作为废液处理;下层固体用60体积%的高氯酸水溶液将其溶解后,用注射用水稀释一倍后转入转盐步骤。

[0041] 4) 转盐:色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱,柱子直径和长度为:5cm×25cm。将色谱柱用体积比50%以上的乙腈的醋酸溶液冲洗干净后上样,上样量1.0-2.5g,用B相为乙腈,A相为0.1%(w/v)的醋酸铵水溶液的色谱条件,按照B%为3%(体积比)的条件冲洗25-35分钟,然后用B相为乙腈,A相为0.1%的盐酸水溶液色谱条件,按照B%为5%的条件洗脱10分钟后,换用B%为40%的条件洗脱,收集目的峰,将收集的高血糖素溶液于水温不超过35℃条件下于旋转蒸发仪上减压旋蒸浓缩至约50-200mg/mL,然后转至合适大小西林瓶。冷冻干燥后即可得到纯度大于99.0%的盐酸高血糖素。

[0042] 实施例2

[0043] 1) 前处理:用体积比40%的醋酸和10%的乙腈水溶液按照30g/L的浓度溶解化学合成法得到的粗肽,搅拌使样品完全溶解后用Φ0.45μm的偏氟滤膜过滤,收集滤液。用水将粗肽溶液中的醋酸和乙腈的体积比例之和稀释到10%备用。

[0044] 2) 纯化:

[0045] 纯化条件:色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱,柱子直径和长度为:10cm×25cm。流动相:A相:0.2%硫酸和0.3%高氯酸水溶液(v/v),用氨水调pH值3.0;B相:乙腈,流速:150-300mL/分钟,梯度:B%:20%~40%(每3分钟升高1%),60分钟,检测波长:280nm。进样量为10-25g。

[0046] 纯化过程:将色谱柱用体积比50%以上的乙腈冲洗干净后平衡上样,上样量为5-15g。线性梯度洗脱60分钟,收集目的峰(为最大峰30-35分钟),检测其色谱纯度,将纯度大于95%以上的合并后于水温不超过35℃的条件下减压旋蒸浓缩,浓缩至剩余约一半的体积后转入盐析纯化步骤。

[0047] 3) 盐析纯化

[0048] 将浓缩后的溶液用氨水调pH值到6.5,后,放置到2~8摄氏度下6小时。再将浑浊液进行离心处理,离心条件:2500转/分,5分钟,室温。上清液作为废液处理;下层固体用80%高氯酸水溶液将其溶解后,用注射用水稀释一倍后转入转盐步骤。

[0049] 4) 转盐:色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱,柱子直径和长度为:10cm×25cm。将色谱柱用体积比50%以上的乙腈醋酸溶液冲洗干净后上样,上样量10-25g,用B相为乙腈,A相为0.3%的醋酸铵水溶液的色谱条件,按照B%为5%的条件冲洗25-35分钟,然后用B相为乙腈,A相为0.2%的盐酸水溶液的色谱条件,按照B%为5%的条件洗脱10分钟后,换用B%为40%的条件洗脱,收集目的峰,将收集的高血糖素溶液于水温不超过35℃条件下减压旋蒸浓缩至约50-200mg/mL后转至合适大小西林瓶。冷冻干燥后即可得到纯度大于99.0%的盐酸高血糖素。

[0050] 实施例3

[0051] 1) 前处理:用体积比60%的醋酸和20%的乙腈水溶液按照50g/L的浓度溶解化学合

成法得到的粗肽,搅拌使样品完全溶解后用 $\Phi 0.45\mu$ 的偏氟滤膜过滤,收集滤液。用水将粗肽溶液中的醋酸和乙腈的体积比例之和稀释到20%备用。

[0052] 2) 纯化:

[0053] 纯化条件:色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱,柱子直径和长度为:10cm $\times$ 25cm。流动相:A相:0.4%硫酸和0.1%高氯酸水溶液(v/v),用氨水调pH值3.5;B相:乙腈,流速:300-600ml/分钟,梯度:B%:20%~40%(每3分钟升高1%),检测波长:280nm。进样量为10-25g。

[0054] 纯化过程:将色谱柱用体积比50%以上的乙腈冲洗干净后平衡上样,上样量为10-25g。线性梯度洗脱60分钟,收集目的峰(为最大峰30-35分钟),检测其色谱纯度,将纯度大于95%以上的合并后于水温不超过35 $^{\circ}$ C的条件下减压旋蒸浓缩,浓缩至剩余约一半的体积后转入盐析纯化步骤。

[0055] 3) 盐析纯化

[0056] 将浓缩后的溶液用氨水调pH值到7.0,后,放置到2~8摄氏度下6小时。再将浑浊液进行离心处理,离心条件:2500转/分,5分钟,室温。上清液作为废液处理;下层固体用100%高氯酸水溶液将其溶解后,用注射用水稀释一倍后转入转盐步骤。

[0057] 4) 转盐:色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的色谱柱,柱子直径和长度为:15cm $\times$ 25cm。将色谱柱用体积比50%以上的乙腈醋酸溶液冲洗干净后上样,上样量10-25g,用B相为乙腈,A相为0.8%的醋酸铵水溶液的色谱条件,按照B%为10%的条件冲洗25-35分钟,然后用B相为乙腈,A相为0.4%的盐酸水溶液的色谱条件,按照B%为5%的条件洗脱10分钟后,换用B%为50%的条件洗脱,收集目的峰,将收集的高血糖素溶液于水温不超过35 $^{\circ}$ C条件下减压旋蒸浓缩至约50-200mg/mL后转至合适大小西林瓶。冷冻干燥后即可得到纯度大于99.0%的盐酸高血糖素。

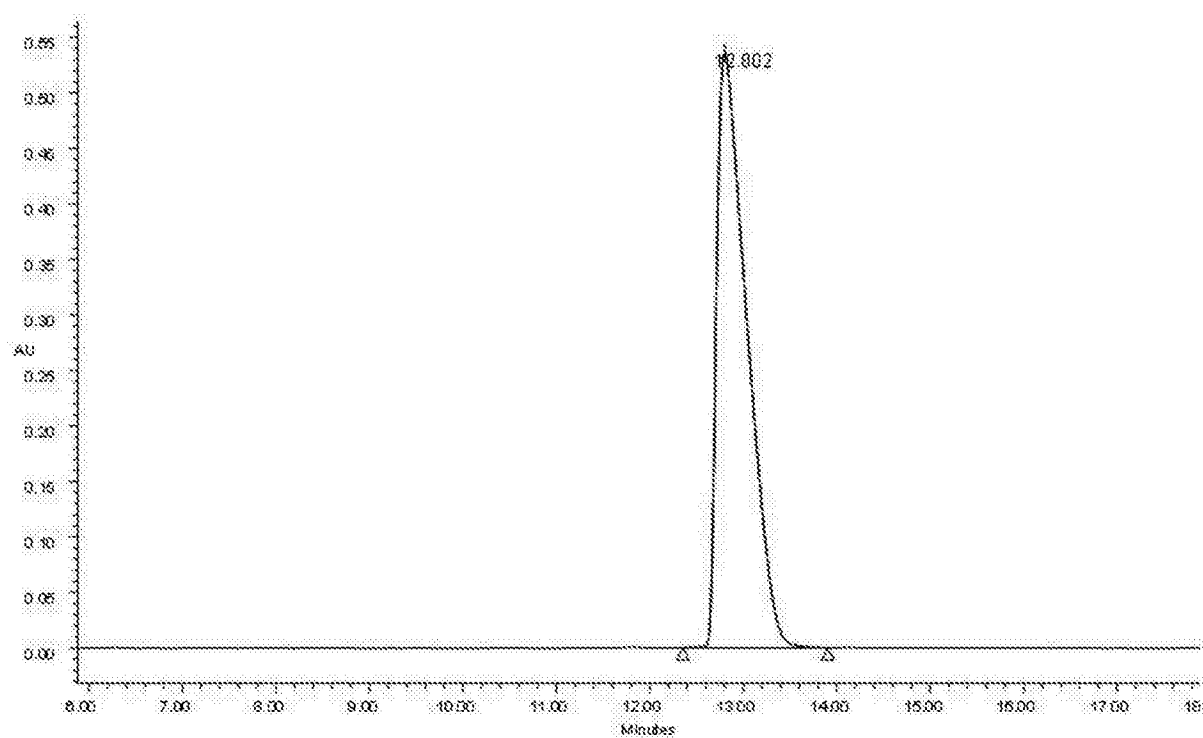


图1