



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102875663 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 11

(21) 申请号 201210363634. 4

(22) 申请日 2012. 09. 26

(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 覃亮政 刘建 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 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C07K 14/575(2006. 01)

C07K 1/20(2006. 01)

C07K 1/16(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2006041945 A2, 2006. 04. 20, 全文.

CN 1839155 A, 2006. 09. 27, 全文.

马义, 周天鸿, 黄秀梅等. 基因重组胰高血糖

素样肽-1 衍生物优化. 《中国公共卫生》. 2007, 全文.

白泉, 葛小娟, 耿信笃. 反相液相色谱对多肽
的分离、纯化与制备. 《分析化学》. 2002, 第 30 卷
(第 9 期), 全文.

审查员 易方方

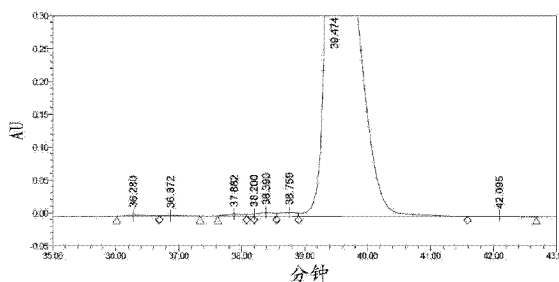
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

利西拉来的纯化方法

(57) 摘要

本发明涉及一种利西拉来的纯化方法, 其包
括以下步骤: 步骤 1: 采用高效液相色谱法对利西
拉来粗肽进行纯化, 所述高效液相色谱法以苯基
硅烷键合硅胶为固定相, 以 D- 酒石酸盐的甲醇/
磷酸盐缓冲溶液为流动相 A 相, 以乙腈为流动相 B
相进行梯度洗脱; 步骤 2: 采用高效液相色谱法对
步骤 1 所得到的馏分进行转盐纯化, 所述高效液
相色谱法以烷基硅烷键合硅胶为固定相, 以冰醋
酸溶液为流动相 A 相, 以乙腈为流动相 B 相进行梯
度洗脱; 步骤 3: 收集溶液冻干。



1. 一种利西拉来的纯化方法,其包括以下步骤:

步骤 1:采用高效液相色谱法对利西拉来粗肽进行纯化,所述高效液相色谱法以苯基硅烷键合硅胶为固定相,以 D- 酒石酸盐的甲醇 / 磷酸盐缓冲溶液为流动相 A 相,以乙腈为流动相 B 相进行梯度洗脱,流动相 A 相中的磷酸盐的摩尔浓度为 20mM ~ 50mM,且洗脱梯度为 **(75~85) %A** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **(55~65) %A**;

步骤 2:采用高效液相色谱法对步骤 1 所得到的馏分进行转盐纯化,所述高效液相色谱法以烷基硅烷键合硅胶为固定相,以冰醋酸溶液为流动相 A 相,以乙腈为流动相 B 相进行梯度洗脱,流动相 A 相中的冰醋酸溶液的体积百分浓度为 0.1 ~ 0.3%;步骤 3:收集溶液冻干。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述步骤 1 中高效液相色谱法的流动相 A 相中的 D- 酒石酸盐的摩尔浓度为 10mM ~ 50mM。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述步骤 1 中高效液相色谱法的流动相 A 相中的 D- 酒石酸盐为一种或多种选自 D- 酒石酸钠、D- 酒石酸钾、D- 酒石酸铵的 D- 酒石酸盐。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述步骤 1 中高效液相色谱法的流动相 A 相中的磷酸盐为一种或多种选自磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸铵或磷酸二氢铵的磷酸盐。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述步骤 1 中高效液相色谱法的流动相 A 相溶液的 pH 为 2.0 ~ 4.0。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述步骤 1 中高效液相色谱法的流动相 A 相中的甲醇占整个流动相 A 相的体积比为 10 ~ 20%。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述步骤 2 中高效液相色谱法的固定相为八烷基硅烷键合硅胶、六烷基硅烷键合硅胶或四烷基硅烷键合硅胶。

利西拉来的纯化方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物化学领域,具体涉及利西拉来的纯化方法。

背景技术

[0002] 糖尿病是一种全球性的高发病,其主要分为 I 型和 II 型,后者占糖尿病患者总数的 90% 以上。

[0003] 通过胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 受体拮抗剂利西拉来(Lixisenatide) 联合基础胰岛素来治疗 II 型糖尿病患者,可显著改善其血糖控制,并提高其餐后血糖 (PPG) 的控制。

[0004] 利西拉来是由 43 个氨基酸残基组成的长链多肽,而且肽序列中有如 Ser、His、Pro 等多肽固相化学合成过程中易异构化的氨基酸而导致利西拉来粗肽中含有很多异构体杂质。因此利西拉来的分离纯化成为该药品制备工艺中的技术难点,尤其是大规模制备的利西拉来的纯化已成为制约其产业化的瓶颈之一。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种利西拉来的纯化方法,尤其是通过多肽固相化学合成方法而大规模制备的利西拉来的纯化方法。

[0006] 本发明的利西拉来的纯化方法包括以下步骤:

[0007] 步骤 1:采用高效液相色谱(HPLC) 方法对利西拉来粗肽进行纯化,所述 HPLC 方法以苯基硅烷键合硅胶为固定相,以 D- 酒石酸盐的甲醇 / 磷酸盐缓冲溶液为流动相 A 相,以乙腈为流动相 B 相进行梯度洗脱;

[0008] 步骤 2:采用 HPLC 方法对步骤 1 所得到的馏分进行转盐纯化,所述 HPLC 方法以烷基硅烷键合硅胶为固定相,以冰醋酸溶液为流动相 A 相,以乙腈为流动相 B 相进行梯度洗脱;

[0009] 步骤 3:收集溶液冻干。

[0010] 本发明通过采用以苯基硅烷键合硅胶为固定相,在流动相中加入 D- 酒石酸盐和质子给予体甲醇的 HPLC 方法纯化,可以一次性将利西拉来粗肽中的异构体杂质和其他难分离杂质很好地分离而去除。然后利用反相 HPLC 方法转成醋酸盐 API,提高了产品的收率和纯度。此外,该纯化方法操作简便,有利于实现规模化制备的利西拉来的纯化。

附图说明

[0011] 图 1 实施例 1 中的利西拉来纯化后的色谱图。

具体实施方式

[0012] 本发明的利西拉来的纯化方法包括以下步骤:

[0013] 步骤 1:采用 HPLC 方法对利西拉来粗肽进行纯化,所述 HPLC 方法以苯基硅烷键合硅胶为固定相,以 D- 酒石酸盐的甲醇 / 磷酸盐缓冲溶液为流动相 A 相,以乙腈为流动相 B

相进行梯度洗脱；

[0014] 步骤 2:采用 HPLC 方法对步骤 1 所得到的馏分进行转盐纯化,所述 HPLC 方法以烷基硅烷键合硅胶为固定相,以冰醋酸溶液为流动相 A 相,以乙腈为流动相 B 相进行梯度洗脱；

[0015] 步骤 3:收集溶液冻干。

[0016] 所述步骤 1 中的 HPLC 方法的流动相 A 相中的 D- 酒石酸盐的摩尔浓度优选为 10mM~50mM。

[0017] 所述步骤 1 中的 HPLC 方法的流动相 A 相中的 D- 酒石酸盐优选为一种或多种选自 D- 酒石酸钠、D- 酒石酸钾、D- 酒石酸铵的 D- 酒石酸盐。

[0018] 所述步骤 1 中的 HPLC 方法的流动相 A 相中的磷酸盐的摩尔浓度优选为 20mM~50mM。

[0019] 所述步骤 1 中的 HPLC 方法的流动相 A 相中的磷酸盐优选为一种或多种选自磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸铵或磷酸二氢铵的磷酸盐。

[0020] 所述步骤 1 中的 HPLC 方法的流动相 A 相溶液的 pH 优选为 2.0~4.0。

[0021] 所述步骤 1 中的 HPLC 方法的流动相 A 相中的甲醇占整个流动相 A 相的体积比优选为 10~20% (v/v)。

[0022] 所述步骤 1 中的 HPLC 方法的梯度按照流动相 A 相的百分比为 **(75~85) %A** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **(55~65) %A**,根据保留时间可适当调整。

[0023] 所述步骤 2 中的 HPLC 方法的流动相 A 相中的冰醋酸水溶液的体积百分浓度优选为 0.1~0.3% (v/v)。

[0024] 所述步骤 2 中的 HPLC 方法的固定相优选为八烷基硅烷键合硅胶、六烷基硅烷键合硅胶或四烷基硅烷键合硅胶。

[0025] 所述步骤 2 中的 HPLC 方法的梯度为 **95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **65%A+35%B**,根据保留时间可适当调整。

[0026] 本发明的纯化方法操作简单,从而使得操作成本低。此外,本发明的纯化方法中的利西拉来收率高,从而适合于利西拉来大规模产业化生产,并且经纯化得到的利西拉来纯度高、杂质含量低,因此具有可观的经济实用价值和广泛的应用前景。

[0027] 实施例

[0028] 以下通过实施例对本发明进行详细说明。

[0029] 在以下实施例中,利西拉来含量的测定按照高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 V D)进行。

[0030] 色谱条件与系统适用性试验

[0031] 所用色谱柱以苯基硅烷键合硅胶作填充剂,色谱柱规格为 4.6*250mm,所填充的苯基硅烷键合硅胶的粒径为 5 μ m;以 0.1mol/L 磷酸铵缓冲液(取磷酸二氢铵 11.5g,加水至 1000ml,用磷酸调节 pH 为 2.5)为流动相 A 相,以色谱纯乙腈为流动相 B 相,按下表 1 进行梯度洗脱;流速为 1.0ml/分钟,检测波长为 220nm,柱温为 50℃;理论板数按利西拉来峰计算应不低于 5000。

[0032] 利西拉来含量的测定方法

[0033] 准确称取适量利西拉来粗品,加水制成含 2.0mg/ml 利西拉来粗品的溶液作为供试品溶液,另准确称取适量利西拉来对照品,加水制成含 1.0mg/ml 利西拉来对照品的溶液作为对照品溶液;取对照品溶液和供试品溶液各 20 μ l 分别注入液相色谱仪,记录色谱图,以峰面积按外标法计算,即得到利西拉来的含量。

[0034] 表 1 利西拉来含量测定的色谱法中的洗脱梯度

[0035]

时间(分钟)	流动相 A 相 (%)	流动相 B 相 (%)
0-40	80-60	20-40
40-45	60-30	40-70
45-54	30	70
54-55	30-80	70-20
55-60	80	20

[0036] 实施例 1

[0037] 将利西拉来粗肽 4.0g (含利西拉来 1.08g) 用纯化水 200ml 溶解,过滤,收集滤液备用。

[0038] 纯化色谱条件:

[0039] 高效液相色谱仪型号:Waters 2545

[0040] 色谱柱:50 \times 250mm,内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0041] 流速:80ml/分钟。

[0042] 检测波长:280nm。

[0043] 流动相 A 相:10mM D-酒石酸铵和 30mM 磷酸二氢铵的 20% 甲醇/80% 水溶液(v/v),用磷酸调 pH 为 2.0。

[0044] 流动相 A 相配制过程:称取 18.4g D-酒石酸铵和 34.5g 磷酸二氢铵,适量纯化水溶解后过 0.45 μ m 滤膜过滤,滤液全部收集到 10L 血清瓶,加入 2L 色谱纯甲醇后加纯化水至 10L 刻度,用磷酸调 pH 为 2.0。

[0045] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0046] 梯度: **82%A+18%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **62%A+38%B**

[0047] 上样量:2.0g(100ml)。

[0048] 纯化过程:使色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同,以面积归一化法进行测定),将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐;将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程,再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐;纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0049] 分两次进样,重复以上操作。

[0050] 转盐色谱条件:

- [0051] 高效液相色谱仪型号 :Waters 2545
 [0052] 色谱柱 :50×250mm, 内装反相 C8 色谱填料, 该填料的粒径为 10 μ m。
 [0053] 流速 :80ml/ 分钟。
 [0054] 检测波长 :280nm。
 [0055] 流动相 A 相 :0. 10% 冰醋酸(v/v) 溶液。
 [0056] 流动相 B 相 :色谱纯乙腈。
 [0057] 梯度 : **95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **65%A+35%B**

- [0058] 上样体积 :200ml。
 [0059] 纯化过程 :使色谱柱平衡 5 分钟后上样, 运行梯度纯化, 监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 20ml 后冻干。
 [0060] 冻干后得白色粉末状固体精肽 0. 66g。纯度 98. 47%, 各杂质含量均小于 0. 5%。纯化收率 61. 1% (以粗品中利西拉来含量计算), 总收率 16. 5%。结果见图 1, 其中横坐标代表以分钟计的运行时间, 纵坐标代表峰高。统计结果见表 2。

[0061] 表 2 利西拉来固体精肽的色谱检测结果

[0062]

峰编号	保留时间 (分钟)	面积	峰高	面积百分比 (%)
1	36.280	25612	1342	0.11
2	36.872	12625	831	0.06
3	37.882	48708	2705	0.22
4	38.200	16044	2747	0.07
5	38.390	95787	5510	0.43
6	38.759	106933	5823	0.48
7	39.474	21964810	742517	98.47
8	42.095	36213	1034	0.16

- [0063] 实施例 2
 [0064] 将利西拉来粗肽 6. 0g (含利西拉来 1. 62g) 用纯化水 300ml 溶解, 过滤, 收集滤液备用。
 [0065] 纯化色谱条件 :
 [0066] 高效液相色谱仪型号 :Waters 2545
 [0067] 色谱柱 :50×250mm, 内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料, 该填料的粒径为 10 μ m。
 [0068] 流速 :80ml/ 分钟。
 [0069] 检测波长 :280nm。
 [0070] 流动相 A 相 :40mM D- 酒石酸钠和 20mM 磷酸二氢铵的 15% 甲醇 /85% 水溶液(v/v),

用磷酸调 pH 为 3.0。

[0071] 流动相 A 相配制过程:称取 92.0g D-酒石酸钠和 23.0g 磷酸二氢铵,适量纯化水溶解后过 0.45 μm 滤膜过滤,滤液全部收集到 10L 血清瓶,加入 1.5L 色谱纯甲醇后加纯化水至 10L 刻度,用磷酸调 pH 为 3.0。

[0072] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0073] 梯度:**79%A+21%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **59%A+41%B**

[0074] 上样量:3.0g (150ml)。

[0075] 纯化过程:使色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同,以面积归一化法进行测定),将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐;将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程,再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐;纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0076] 分两次进样,重复以上操作。

[0077] 转盐色谱条件:

[0078] 高效液相色谱仪型号:Waters 2545

[0079] 色谱柱:50×250mm,内装反相 C8 色谱填料,该填料的粒径为 10 μm。

[0080] 流速:80ml/分钟。

[0081] 检测波长:280nm。

[0082] 流动相 A 相:0.15% 冰醋酸(v/v) 溶液。

[0083] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0084] 梯度:**95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **65%A+35%B**

[0085] 上样体积:200ml。

[0086] 纯化过程:将色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 20ml 后冻干。

[0087] 冻干后得白色粉末状固体精肽 0.93g。纯度 98.62%,各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 57.4% (以粗品中利西拉来含量计算),总收率 15.5%。

[0088] 实施例 3

[0089] 将利西拉来粗肽 6.0g (含利西拉来 1.62g) 用纯化水 300ml 溶解,过滤,收集滤液备用。

[0090] 纯化色谱条件:

[0091] 高效液相色谱仪型号:Waters 2545

[0092] 色谱柱:50×250mm,内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料,该填料的粒径为 10 μm。

[0093] 流速:80ml/分钟。

[0094] 检测波长:280nm。

[0095] 流动相 A 相:30mM D-酒石酸钾和 40mM 磷酸二氢钾的 10% 甲醇/90% 水溶液(v/v),用磷酸调 pH 为 2.5。

[0096] 流动相 A 相配制过程:称取 56.1g D-酒石酸钾和 54.4g 磷酸二氢钾,适量纯化水

溶解后过 0.45 μm 滤膜过滤,滤液全部收集到 10L 血清瓶,加入 1.0L 色谱纯甲醇后加纯化水至 10L 刻度,用磷酸调 pH 为 2.5。

[0097] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0098] 梯度: **80%A+20%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **60%A+40%B**

[0099] 上样量:3.0g (150ml)。

[0100] 纯化过程:使色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同,以面积归一化法进行测定),将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐;将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程,再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐;纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0101] 分两次进样,重复以上操作。

[0102] 转盐色谱条件:

[0103] 高效液相色谱仪型号:Waters 2545

[0104] 色谱柱:50×250mm,内装反相 C4 色谱填料,该填料的粒径为 10 μm。

[0105] 流速:80ml/分钟。

[0106] 检测波长:280nm。

[0107] 流动相 A 相:0.3% 冰醋酸(v/v) 溶液。

[0108] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0109] 梯度: **95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **70%A+30%B**

[0110] 上样体积:250ml。

[0111] 纯化过程:将色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 20ml 后冻干。

[0112] 冻干后得白色粉末状固体精肽 0.98g。纯度 98.52%,各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 60.5% (以粗品中利西拉来含量计算),总收率 16.3%。

[0113] 实施例 4

[0114] 将利西拉来粗肽 4.0g (含利西拉来 1.08g) 用纯化水 200ml 溶解,过滤,收集滤液备用。

[0115] 纯化色谱条件:

[0116] 高效液相色谱仪型号:Waters 2545

[0117] 色谱柱:50×250mm,内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料,该填料的粒径为 10 μm。

[0118] 流速:80ml/分钟。

[0119] 检测波长:280nm。

[0120] 流动相 A 相:50mM D-酒石酸钠和 50mM 磷酸氢二钠的 10% 甲醇/90% 水溶液(v/v),用磷酸调 pH 为 3.5。

[0121] 流动相 A 相配制过程:称取 115g D-酒石酸钠和 179g 磷酸氢二钠,适量纯化水溶解后过 0.45 μm 滤膜过滤,滤液全部收集到 10L 血清瓶,加入 1.0L 色谱纯甲醇后加纯化水

至 10L 刻度,用磷酸调 pH 为 3.5。

[0122] 流动相 B 相 :色谱纯乙腈。

[0123] 梯度 :**78%A+22%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **58%A+42%B**

[0124] 上样量 :2.0g(100ml)。

[0125] 纯化过程 :使色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同,以面积归一化法进行测定),将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐 ;将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程,再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐 ;纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0126] 分两次进样,重复以上操作。

[0127] 转盐色谱条件 :

[0128] 高效液相色谱仪型号 :Waters 2545

[0129] 色谱柱 :50×250mm,内装反相 C6 色谱填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0130] 流速 :80ml/ 分钟。

[0131] 检测波长 :280nm。

[0132] 流动相 A 相 :0.20% 冰醋酸(v/v) 溶液。

[0133] 流动相 B 相 :色谱纯乙腈。

[0134] 梯 度 : **95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **68%A+32%B**

[0135] 上样体积 :200ml。

[0136] 纯化过程 :将色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 20ml 后冻干。

[0137] 冻干后得白色粉末状固体精肽 0.67g。纯度 98.60%,各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 62.0% (以粗品中利西拉来含量计算),总收率 16.8%。

[0138] 实施例 5

[0139] 将利西拉来粗肽 4.0g (含利西拉来 1.08g) 用纯化水 200ml 溶解,过滤,收集滤液备用。

[0140] 纯化色谱条件 :

[0141] 高效液相色谱仪型号 :Waters 2545

[0142] 色谱柱 :50×250mm,内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0143] 流速 :80ml/ 分钟。

[0144] 检测波长 :280nm。

[0145] 流动相 A 相 :20mM D- 酒石酸钠和 30mM 磷酸氢二钠的 10% 甲醇 /90% 水溶液(v/v),用磷酸调 pH 为 4.0。

[0146] 流动相 A 相配制过程 :称取 46.0g D- 酒石酸钠和 42.6g 磷酸氢二钠,适量纯化水溶解后过 0.45 μ m 滤膜过滤,滤液全部收集到 10L 血清瓶,加入 1.0L 色谱纯甲醇后加纯化水至 10L 刻度,用磷酸调 pH 为 4.0。

[0147] 流动相 B 相 : 色谱纯乙腈。

[0148] 梯度 : $77\%A+23\%B \xrightarrow{35\text{min}} 57\%A+43\%B$

[0149] 上样量 : 2.0g (100ml)。

[0150] 纯化过程 : 使色谱柱平衡 5 分钟后上样, 运行梯度纯化, 监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测 (纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同, 以面积归一化法进行测定), 将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐; 将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程, 再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐; 纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0151] 分两次进样, 重复以上操作。

[0152] 转盐色谱条件 :

[0153] 高效液相色谱仪型号 : Waters 2545

[0154] 色谱柱 : 50×250mm, 内装反相 C4 色谱填料, 该填料的粒径为 10 μ m。

[0155] 流速 : 80ml/ 分钟。

[0156] 检测波长 : 280nm。

[0157] 流动相 A 相 : 0.20% 冰醋酸 (v/v) 溶液。

[0158] 流动相 B 相 : 色谱纯乙腈。

[0159] 梯度 : $95\%A+5\%B \xrightarrow{20\text{min}} 95\%A+5\%B \xrightarrow{2\text{min}} 85\%A+15\%B$
 $\xrightarrow{20\text{min}} 70\%A+30\%B$

[0160] 上样体积 : 200ml。

[0161] 纯化过程 : 将色谱柱平衡 5 分钟后上样, 运行梯度纯化, 监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 20ml 后冻干。

[0162] 冻干后得白色粉末状固体精肽 0.65g。纯度 98.52%, 各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 60.2% (以粗品中利西拉来含量计算), 总收率 16.3%。

[0163] 实施例 6

[0164] 将利西拉来粗肽 4.0g (含利西拉来 1.08g) 用纯化水 200ml 溶解, 过滤, 收集滤液备用。

[0165] 纯化色谱条件 :

[0166] 高效液相色谱仪型号 : Waters 2545

[0167] 色谱柱 : 50×250mm, 内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料, 该填料的粒径为 10 μ m。

[0168] 流速 : 80ml/ 分钟。

[0169] 检测波长 : 280nm。

[0170] 流动相 A 相 : 10mM D- 酒石酸钠、10mM D- 酒石酸铵和 10mM 磷酸二氢钠与 10mM 磷酸二氢铵的 10% 甲醇 /90% 水溶液 (v/v), 用磷酸调 pH 为 2.5。

[0171] 流动相 A 相配制过程 : 称取 23.0g D- 酒石酸钠、18.4g D- 酒石酸铵和 12.0g 磷酸二氢钠与 11.5g 磷酸二氢铵, 适量纯化水溶解后过 0.45 μ m 滤膜过滤, 滤液全部收集到 10L 血清瓶, 加入 1.0L 色谱纯甲醇后加纯化水至 10L 刻度, 用磷酸调 pH 为 2.5。

[0172] 流动相 B 相 : 色谱纯乙腈。

[0173] 梯度：**77%A+23%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **57%A+43%B**

[0174] 上样量：2.0g(100ml)。

[0175] 纯化过程：使色谱柱平衡 5 分钟后上样，运行梯度纯化，监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同，以面积归一化法进行测定)，将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐；将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程，再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐；纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0176] 分两次进样，重复以上操作。

[0177] 转盐色谱条件：

[0178] 高效液相色谱仪型号：Waters 2545

[0179] 色谱柱：50×250mm，内装反相 C4 色谱填料，该填料的粒径为 10 μ m。

[0180] 流速：80ml/ 分钟。

[0181] 检测波长：280nm。

[0182] 流动相 A 相：0.20% 冰醋酸(v/v) 溶液。

[0183] 流动相 B 相：色谱纯乙腈。

[0184] 梯度：**95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **70%A+30%B**

[0185] 上样体积：200ml。

[0186] 纯化过程：将色谱柱平衡 5 分钟后上样，运行梯度纯化，监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 20ml 后冻干。

[0187] 冻干后得白色粉末状固体精肽 0.65g。纯度 98.52%，各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 60.2% (以粗品中利西拉来含量计算)，总收率 16.3%。

[0188] 实施例 7

[0189] 将利西拉来粗肽 20g (含利西拉来 5.70g)用纯化水 500ml 溶解，过滤，收集滤液备用。

[0190] 纯化色谱条件：

[0191] 高效液相色谱仪型号：Novasep LC150

[0192] 色谱柱：100×250mm，内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料，该填料的粒径为 10 μ m。

[0193] 流速：250ml/ 分钟。

[0194] 检测波长：280nm。

[0195] 流动相 A 相：20mM D- 酒石酸钠和 20mM 磷酸二氢钠的 10% 甲醇 /90% 水溶液(v/v)，用磷酸调 pH 为 2.0。

[0196] 流动相 A 相配制过程：称取 92.0g D- 酒石酸钠和 48.0g 磷酸二氢钠，适量纯化水溶解后过 0.45 μ m 滤膜过滤，滤液全部收集到 20L 血清瓶，加入 2.0L 色谱纯甲醇后加纯化水至 20L 刻度，用磷酸调 pH 为 2.0。

[0197] 流动相 B 相：色谱纯乙腈。

[0198] 梯度：**82%A+18%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **62%A+38%B**

[0199] 上样量 :10.0g (250ml)。

[0200] 纯化过程 :使色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同,以面积归一化法进行测定),将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐;将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程,再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐;纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0201] 分两次进样,重复以上操作。

[0202] 转盐色谱条件:

[0203] 高效液相色谱仪型号 :Novasep LC150

[0204] 色谱柱 :100×250mm,内装反相 C8 色谱填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0205] 流速 :250ml/ 分钟。

[0206] 检测波长 :280nm。

[0207] 流动相 A 相 :0.1% 冰醋酸(v/v) 溶液。

[0208] 流动相 B 相 :色谱纯乙腈。

[0209] 梯度 : **95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **65%A+35%B**

[0210] 上样体积 :500ml。

[0211] 纯化过程 :将色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 50ml 后冻干。

[0212] 冻干后得白色粉末状固体精肽 3.31g。纯度 98.52%,各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 58.1% (以粗品中利西拉来含量计算),总收率 16.6%。

[0213] 实施例 8

[0214] 将利西拉来粗肽 200g (含利西拉来 57.0g)用纯化水 5000ml 溶解,过滤,收集滤液备用。

[0215] 纯化色谱条件:

[0216] 高效液相色谱仪型号 :Novasep LC300

[0217] 色谱柱 :300×250mm,内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0218] 流速 :2000ml/ 分钟。

[0219] 检测波长 :280nm。

[0220] 流动相 A 相 :30mM D-酒石酸钠和 30mM 磷酸氢二钠的 10% 甲醇 /90% 水溶液(v/v),用磷酸调 pH 为 2.5。

[0221] 流动相 A 相配制过程 :称取 1035g D-酒石酸钠和 639g 磷酸氢二钠,适量纯化水溶解后过 0.45 μ m 滤膜过滤,滤液全部收集到 150L 储液罐,加入 15L 色谱纯甲醇后加纯化水至 150L 刻度,用磷酸调 pH 为 2.5。

[0222] 流动相 B 相 :色谱纯乙腈。

[0223] 梯度 :**80%A+20%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **60%A+40%B**

[0224] 上样量 :100.0g (2500ml)。

[0225] 纯化过程:使色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并分段收集目的峰馏分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同,以面积归一化法进行测定),将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐;将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程,再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐;纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0226] 分两次进样,重复以上操作。

[0227] 转盐色谱条件:

[0228] 高效液相色谱仪型号:Novasep LC300

[0229] 色谱柱:300×250mm,内装反相 C8 色谱填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0230] 流速:2000ml/分钟。

[0231] 检测波长:280nm。

[0232] 流动相 A 相:0.2% 冰醋酸(v/v) 溶液。

[0233] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0234] 梯度: **95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **65%A+35%B**

[0235] 上样体积:500ml。

[0236] 纯化过程:将色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 450ml 后冻干。

[0237] 冻干后得白色粉末状固体精肽 35.3g。纯度 98.59%,各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 61.9% (以粗品中利西拉来含量计算),总收率 17.4%。

[0238] 实施例 9

[0239] 将利西拉来粗肽 4000g (含利西拉来 1139g) 用纯化水 100L 溶解,过滤,收集滤液备用。

[0240] 纯化色谱条件:

[0241] 高效液相色谱仪型号:Novasep LC450

[0242] 色谱柱:450×250mm,内装苯基硅烷键合硅胶为固定相填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0243] 流速:5000ml/分钟。

[0244] 检测波长:280nm。

[0245] 流动相 A 相:30mM D-酒石酸钠和 30mM 磷酸氢二钠的 10% 甲醇/90% 水溶液(v/v),用磷酸调 pH 为 2.5。

[0246] 流动相 A 相配制过程:称取 2070g D-酒石酸钠和 1280g 磷酸氢二钠,适量纯化水溶解后过 0.45 μ m 滤膜过滤,滤液全部收集到 300L 储液罐,加入 30L 色谱纯甲醇后加纯化水至 300L 刻度,用磷酸调 pH 为 2.5。用完重复配制。

[0247] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0248] 梯度: **80%A+20%B** $\xrightarrow{35\text{min}}$ **60%A+40%B**

[0249] 上样量:250.0g (6250ml)。

[0250] 纯化过程:使色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并分段收集目的峰馏

分。对所收集的馏分进行纯度检测(纯度检测的色谱条件与上述利西拉来含量测定的条件相同,以面积归一化法进行测定),将纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后用于转盐;将纯度大于等于 70% 小于 98% 的馏分除去大部分乙腈后回收并重复该纯化过程,再次收集纯度大于等于 98% 的馏分除去大部分乙腈后也用于转盐;纯度小于 70% 的馏分按废液处理。

[0251] 分 16 次进样,重复以上操作。

[0252] 转盐色谱条件:

[0253] 高效液相色谱仪型号:Novasep LC450

[0254] 色谱柱:450×250mm,内装反相 C8 色谱填料,该填料的粒径为 10 μ m。

[0255] 流速:5000ml/分钟。

[0256] 检测波长:280nm。

[0257] 流动相 A 相:0.2% 冰醋酸(v/v) 溶液。

[0258] 流动相 B 相:色谱纯乙腈。

[0259] 梯度: **95%A+5%B** $\xrightarrow{20\text{min}}$ **95%A+5%B** $\xrightarrow{2\text{min}}$ **85%A+15%B**
 $\xrightarrow{20\text{min}}$ **65%A+35%B**

[0260] 上样体积:2500ml。

[0261] 纯化过程:将色谱柱平衡 5 分钟后上样,运行梯度纯化,监测并收集目的峰馏分。将目的峰馏分减压旋蒸浓缩至 9000ml 后冻干。

[0262] 冻干后得白色粉末状固体精肽 704g。纯度 98.39%,各杂质含量均小于 0.5%。纯化收率 61.8% (以粗品中利西拉来含量计算),总收率 17.6%。

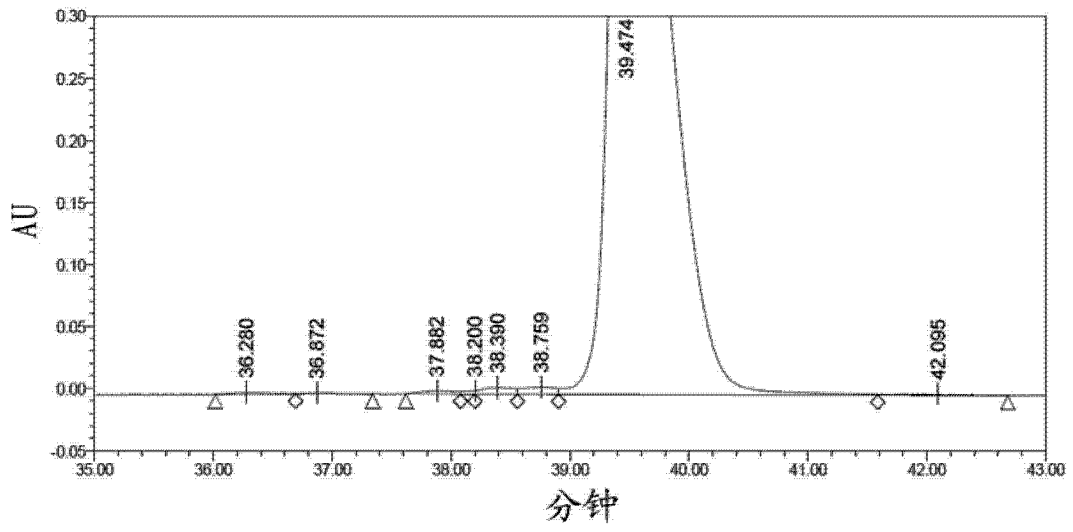


图 1