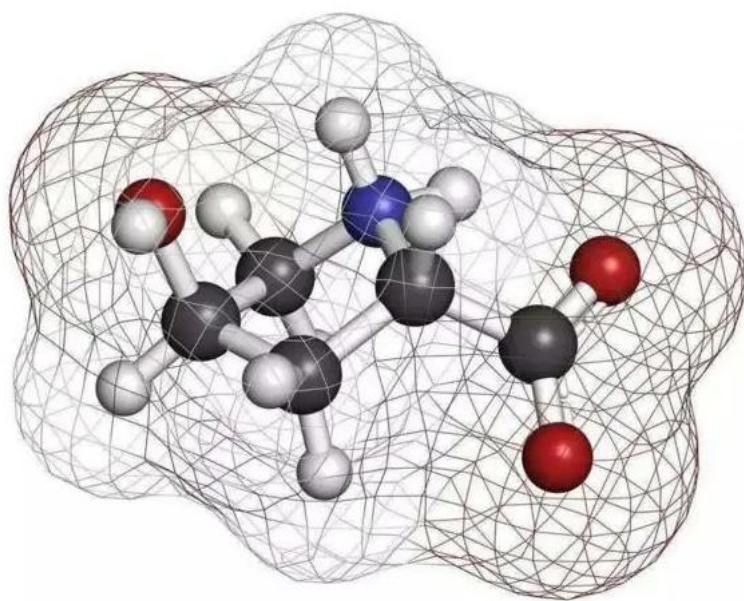


慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

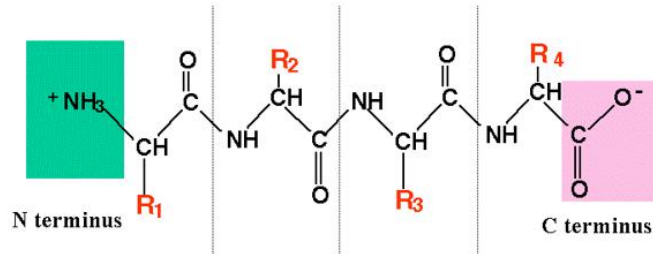
第 164 期 多肽的纯化



2024 年 4 月

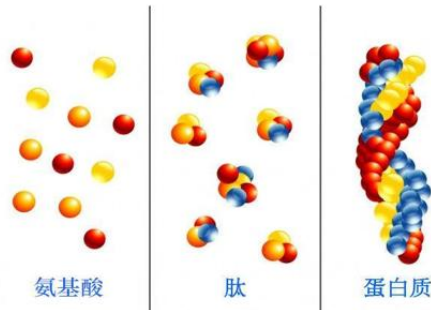
多肽药物介绍

肽（Peptide）是氨基酸分子脱水缩合以肽键连接在一起而形成的化合物，根据组成氨基酸数量，肽分为二肽、三肽、四肽、五肽等等。



多肽药物介绍

通常低于100个氨基酸组成的肽称为多肽，更大的多肽因空间结构对活性的决定性作用而称为蛋白质。



风起云涌的GLP-1市场

GLP-1叫做胰高血糖素样肽-1，该药物作为降糖减肥的重要药物类别，近年来备受关注并取得了显著的发展。这些药物通过模拟人体胰岛素样多肽-1（GLP-1）的作用，有效地降低血糖水平，并改善患者生活质量和疾病管理方面发挥着关键作用。

随着礼来公司的替尔泊肽和诺和诺德的司美格鲁肽等GLP-1药物在过去几年中人气飙升，GLP-1药物将进一步震撼制药行业，并且据分析，GLP-1预计将在2024年取代PD-1抑制剂成为最畅销的药物类别。未来长效GLP-1药物市场规模将快速扩增，预计2025年全球GLP-1药物市场规模将增至282亿美元，2030年增至407亿美元。

司美格鲁肽VS替尔泊肽

司美格鲁肽主要成分为胰高血糖素样肽-1（GLP-1）受体激动剂。GLP-1受体激动剂可以刺激胰岛素分泌，抑制胃酸分泌，从而降低食欲，增加饱腹感，进而达到减肥的效果。

替尔泊肽，是一种创新的胰高血糖素样肽-1受体（GLP-1）和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽（GIP）双受体激动剂。这种药物的给药频率为每周一次，其独特的双重作用机制使其在治疗II型糖尿病方面显示出巨大的潜力。

在分子结构方面，由于独特的侧链修饰，司美格鲁肽以及替尔泊肽均可实现每周注射给药一次。司美格鲁肽是GLP-1的长效类似物，其26位赖氨酸残基的ε-氨基被侧链取代，进而可以增加分子与血液白蛋白的结合，从而延长药物半衰期，大约可达165-184小时，因此司美格鲁肽才可以实现每周注射一次或每日口服一次。

而替尔泊肽则是GIP/GLP-1双靶点激动剂，该分子由39个氨基酸的肽骨架和残基Lys20处的侧链组成，半衰期为116.7小时。

在有效性方面，由于替尔泊肽是双靶点激动剂，就减重效果而言，力压了司美格鲁肽一头。

在研管线

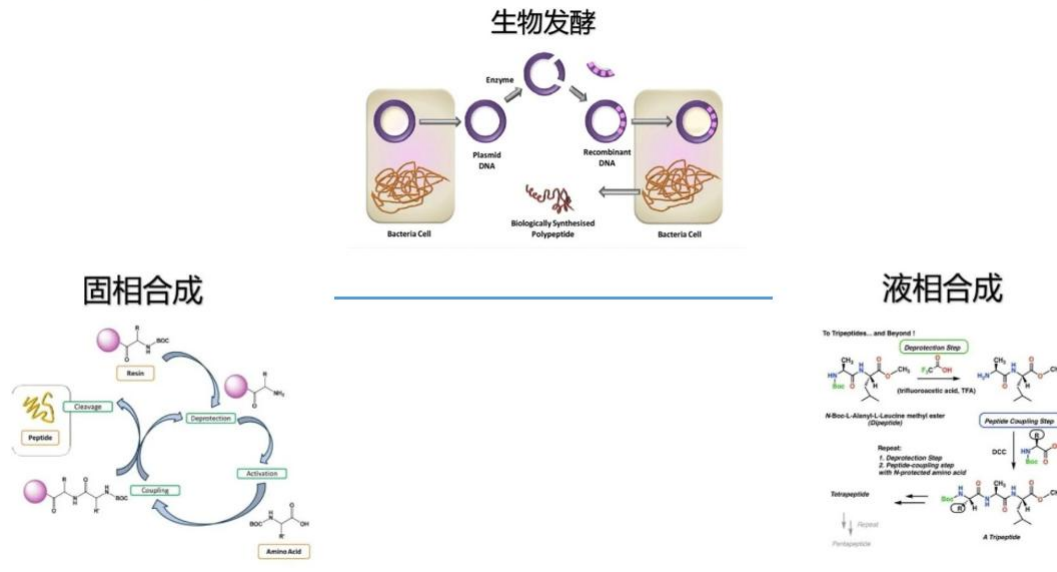
据药智数据显示，截止2024年2月18日，全球GLP-1靶点在研管线有220项，涉及企业154家，涵盖107个适应症，2023年管线数量增加48项。

表3 部分2023年新增GLP-1管线

药品名称	原研单位	全球最高阶段
THDBH-120	东宝紫星（杭州）生物医药有限公司	临床 I 期
DA-1726	NeuroBo Pharmaceuticals Inc; 东亚ST株式会社	临床申请
RAY-001	广东众生药业股份有限公司	临床前
THDBH110	东宝紫星（杭州）生物医药有限公司	临床 I 期
TERN-601	上海拓臻生物科技有限公司	临床 I 期
HDM-1002	杭州中美华东制药有限公司	临床 I 期
HZ012	浙江和泽医药科技股份有限公司	临床 I 期
ID110521156	Ildong Pharmaceutical Co Ltd	临床 I 期
MWN-101	上海民为生物技术有限公司	临床 I 期
RAY-1225	广东众生睿创生物科技有限公司	临床 I 期
CT-996	Carmot Therapeutics Inc;罗氏制药	临床 I 期
P29	浙江和泽医药科技股份有限公司	临床申请
THDBH-121	上海药明康德新药开发有限公司	临床申请

数据来源：药智数据

多肽药物生产过程



生物发酵多肽药物介绍

生物发酵：生物发酵是一种利用微生物（如细菌、酵母或哺乳动物细胞）生产药物的方法。在制备GLP-1受体激动剂时，可以通过基因工程技术将编码GLP-1类似物的基因插入到宿主细胞中，然后通过培养这些细胞使其表达目标肽。这些肽随后从细胞中提取并通过纯化过程得到最终产品。生物发酵的优点包括：

01 可以生产与人体内GLP-1结构相似的肽；

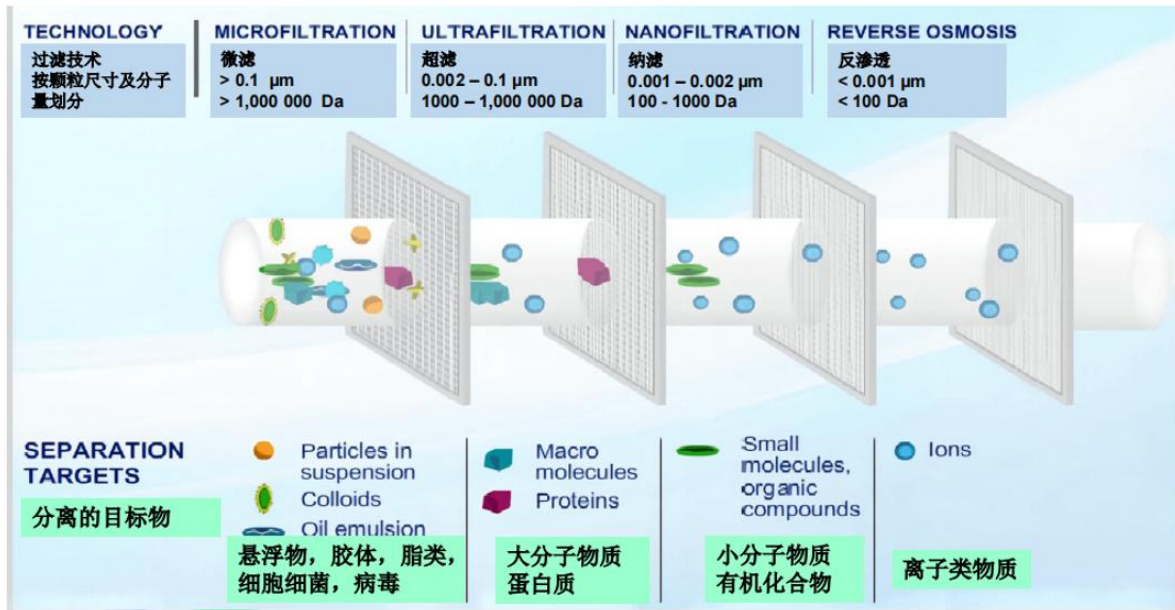
通过选择性表达特定基因，可以生产出具有改进特性（如更长的半衰期或增强的生物活性）的GLP-1类似物；

02

03 生物系统可以进行后翻译修饰，这对于肽类药物的稳定性和生物活性至关重要。

生物发酵多肽的纯化

第一步 超滤/纳滤浓缩



第一步 超滤/纳滤浓缩



第二步 离子交换纯化 QuikSep PSU-50Q/30Q

由于多肽分子具有末端羧基、氨基和侧链可解离基团，分子会随环境pH变化呈现不同带电状态，因此多数肽可通过离子交换纯化；同时，由于多肽主体结构肽键和疏水侧链的疏水性差异，加之缓冲液离子对效应对净电荷的屏蔽，可以通过反相色谱纯化，包括聚合物反相色谱和C18硅胶反相色谱。

传统工艺中，固相合成树脂水解下来的粗品先以大粒径反相硅胶（30-100 μm ）进行粗纯，但是由于粗品盐含量高，样品在反相硅胶的保留会大打折扣，导致制备上样量低，制备峰型变形，纯度提升效果差。

第二步 离子交换纯化 QuikSep PSU-50Q/30Q

慧德易科技选用高分辨率的小粒径离子交换色谱填料捕获肽粗品，可以通过使用100%水相流动相稀释样品的形式大量上样而不流穿，且可以通过梯度洗脱达到较好的纯化效果。



第三步 聚合物反相填料纯化 QuikSep PS30US10/15

粗品经捕获步骤后，纯度提升的同时含有一定量的缓冲盐，经精细（10~15 μm ）聚合物反相色谱填料纯化后可得到纯度90%以上的产品。聚合物反相填料最大的特点是化学稳定性好，可通过各种强清洗手段（强酸，强碱和有机溶剂等）对多肽尤其是长链多肽带来的色谱柱筛板和填料微孔的污染和堵塞进行清洗，使用寿命可达数年。

QuikSep PS30US10/15是以高交联度苯乙烯-二乙烯基苯为骨架的单分散聚合物反相色谱填料。制备型填料广泛应用于植提，多肽，造影剂，胰岛素等纯化领域。尤其在多肽纯化中具备类似C18硅胶的纯化性能，但耐酸碱等强再生条件，展现出超长的使用寿命。

第三步 聚合物反相填料纯化 QuikSep PS30US10/15



合成多肽药物介绍

化学合成法上游主要采用多肽固相或液相合成，即通过树脂载体或在液体溶液体系下进行氨基酸偶联合成多肽。这包括使用固相肽合成（SPPS）技术，其中氨基酸逐个添加到生长中的肽链上。化学合成的优点包括：

01 精确控制肽的序列和修饰，可以实现高度定制化的药物设计；

可以快速合成大量肽，适合大规模生产；

03 合成过程中可以引入非天然的氨基酸或化学修饰，以改善药物的稳定性、溶解性或生物利用度。

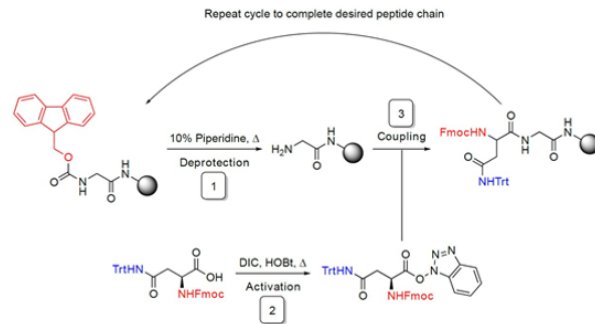
合成多肽药物介绍

多肽的最初来源为动植物组织提取或蛋白质水解（或酶切），随着技术和相关设备的进步，基因工程和固相合成成为多肽来源的主流，尤其是3-50个氨基酸组成的多肽，基本全部依赖固相合成获得。

合成多肽主要应用于药物领域和化妆品领域等。常见的合成多肽原料药如胸腺五肽、谷胱甘肽、胸腺法新、奥曲肽、生长抑素和亮丙瑞林等。应用于化妆品添加的多肽如蓝铜胜肽、乙酰四肽-5、乙酰基六肽-3、棕榈酰四肽-7和棕榈酰五肽-3等。

多肽纯化难点

合成多肽的工艺路线主要包括有机合成、水解、色谱纯化、转盐，最后获得正确盐形式的高纯度产品。由于固相合成多肽涉及的底物（20种氨基酸的保护态）原料种类多，合成步骤（每延长一个氨基酸涉及两次反应）多，合成条件苛刻（如水解），因此最终拿到的粗品纯度很低（20%~40%不等），盐含量高，且关键杂质多（水解、脱氨杂质等）。



传统合成多肽纯化路线

合成多肽，尤其是大于5肽的合成多肽的纯化，主要依赖制备液相色谱纯化。传统的多肽纯化选用以C18反相硅胶搭配三氟乙酸-乙腈的流动相的纯化体系，反复多步纯化以达到最终获得高纯度产品的目的，使多肽纯化的成本较高。

合成多肽纯化新思路

由于多肽分子具有末端羧基、氨基和侧链可解离基团，分子会随环境pH变化呈现不同带电状态，因此多数合成肽可通过离子交换纯化；同时，由于多肽主体结构肽键和疏水侧链的疏水性差异，加之缓冲液离子对效应对净电荷的屏蔽，可以通过反相色谱纯化，包括聚合物反相色谱和C18硅胶反相色谱。

合成多肽的纯化

第一步 离子交换纯化 QuikSep PSU-50Q/30Q

第二步 聚合物反相填料纯化 QuikSep PS30US10/15

第三步 多肽的反相硅胶纯化 (QuikSep C18S15A9)



多肽的反相硅胶纯化 (QuikSep C18S15A9)

在离子交换或反相聚合物纯化的基础上，多肽纯度得到大幅提升且不能满足要求的情况下，C18反相硅胶可以作为最后精纯的选择。此时因产品纯度已经很高，无关杂质的污染少，且盐含量低，此时再选用反相硅胶纯化时，工艺载量高，满足纯化要求的同时填料寿命也有大幅提升。

QuikSep C18系列反相硅胶填料是基于慧德易科技独特的高纯度多孔硅胶基球生产的单分散色谱填料，具有多种键合相、粒径和孔径选择。在胰岛素、GLP-1、合成多肽和小分子纯化领域应用广泛。

总结

综合对比多肽纯化的几种潜在纯化方式，C18反相硅胶纯化因填料寿命低，使用高比例有机溶剂，使用昂贵高压设备而使得纯化成本最高；聚合物反相纯化有机溶剂消耗有所下降，填料寿命较长，成本占比很低，设备可采用高压或中压，成本居中；离子交换纯化基本不使用有机溶剂，流动相成本最低，填料寿命相较硅胶大幅提升，设备采用中低压，成本最低。因此对于合成多肽的纯化原则是优选离子交换，其次是聚合物反相，最后是C18硅胶反相纯化；在单步不能满足要求时，尽量以离子交换和聚合物反相纯化替换C18硅胶反相纯化步骤，而C18硅胶反相纯化仅作为最后精纯。

*如需更详细的资料，请联系我们！



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话：010-59812370/1/2/3

公司官网：www.prep-hplc.com

邮 箱：sales@prep-hplc.com

微信公众号：北京慧德易