

关于合成多肽药物中非对映异构体杂质的研究

康建磊¹, 徐冰珠², 李建宇³ (1.国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038; 2.清华大学医院, 北京 100850; 3.解放军 302 医院, 北京 100039)

摘要: 目的 探讨多肽合成中非对映异构体杂质的研究和控制。方法 介绍多肽合成中氨基酸消旋的机制, 从合成原料质量控制、工艺过程控制和检测方法选择等方面提供有益建议。结果 部分氨基酸消旋产生的非对映异构体杂质是合成多肽药物有关物质研究的重要内容之一。结论 应重视非对映异构体杂质的研究和控制。

关键词: 合成多肽; 消旋; 非对映异构体

中图分类号: R916.41 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2010)05-0387-03

Control of the Diastereoisomeric Impurities in Synthetic Peptide Drugs

KANG Jianlei¹, XU Bingzhu², LI Jianyu³ (1.Center for Drug Evaluation, SFDA, Beijing 100038, China; 2.Tsinghua University Hospital, Beijing 100084, China; 3.302 Hospital PLA, Beijing 100039, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discuss the research and control of diastereoisomeric impurities in synthetic peptide drugs development. **METHODS** The racemic mechanisms during a peptide-bond-forming reaction were introduced, recommendations were provided on quality control of synthetic materials, control of manufacturing process, and choice of analytical methods. **RESULTS** Diastereoisomers are important part of related substances in synthetic peptide drugs development. **CONCLUSION** More attention should be paid to the research and control of diastereoisomeric impurities.

KEY WORDS: synthetic peptides; racemization; diastereoisomers

1963 年, 美国著名生物化学家 Bruce Merrifield 发明了多肽固相合成法, 经过四十多年的发展, 固相合成法已广泛应用于多肽和蛋白质的研究领域。固相合成法的基本原理是以连接于固相载体的第一个氨基酸为起点, 经活化、耦合、脱保护的循环过程, 将保护氨基酸逐一“组装”形成目标肽。由于氨基酸多为手性分子(甘氨酸除外), 在肽合成的过程中不可避免的存在消旋化的可能, 这可能导致肽分子部分甚至全部立体化学信息的丢失。由于肽类药物的生物活性与其立体构型密切相关, 因此应对多肽合成中的氨基酸消旋化以及非对映异构体杂质进行研究和控制, 而非对映异构体杂质(特别是差向异构体杂质)的色谱行为多与主成分非常接近, 常规的有关物质检查方法通常并不能将其良好检出, 国内研究人员常常忽视此类杂质的研究, 笔者将介绍多肽合成中氨基酸消旋化的机制, 并对非对映异构体杂质的控制和研究中应注意的问题进行探讨。

1 肽合成中氨基酸消旋化的机制

多肽合成中氨基酸的消旋化主要有以下两种机制^[1]:

1.1 直接烯醇化机制

直接烯醇化机制见图 1。在肽缩合条件下, 碱催化的烯醇化机制(A)起重要作用, 消旋速率依赖于活化羧基 α 位质子的酸性、溶剂、温度及碱的化学性质, 氨基酸 α 位质子的酸性取决于取代基的性质。

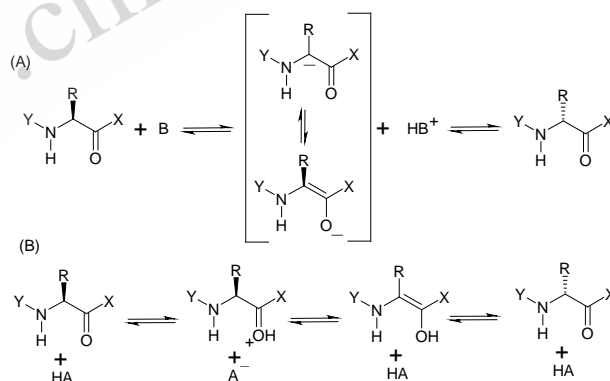


图 1 活化的氨基酸和肽的碱催化消旋机制(A)和酸催化消旋机制(B)

X—活化基; Y—肽链中的 Nⁿ 保护基; B—碱; HA—酸; R—氨基酸侧链
Fig 1 Mechanisms of base-catalyzed (A) and acid-catalyzed epimerization (B) of activated amino acid and peptide derivatives

X—activating group; Y—Nⁿ-protecting group of peptide chain; B—base; HA—acid; R—amino acid side chain

作者简介: 康建磊, 男, 博士, 主管药师 Tel: (010)68585566-536 E-mail: kangjl@cde.org.cn

1.2 5(4H)-噁唑酮机制

5(4H)-噁唑酮机制见图 2。5(4H)-噁唑酮(D/L-4)是由氨基酸活化产生，是多肽合成的重要活性中间体，同时，由于其立体化学不稳定，也是氨基酸消旋化的主要原因。形成噁唑酮的倾向与化合物 1 中

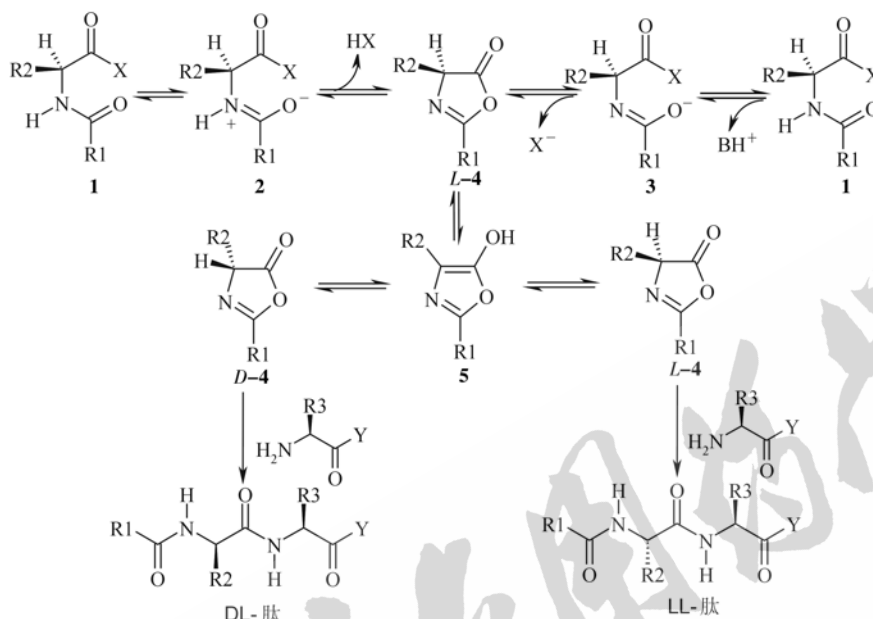


图 2 经由 5(4H)-噁唑酮的消旋机制

R1-烷基, 芳基和烷氧基; R2, R3-氨基酸侧链; B-碱; X-活化基

Fig 2 Racemization via 5(4H)-oxazolone formation

R1-alkyl, aryl or alkoxy residue; R2, R3-amino acid side chain; B-base; X-activating group

2 非对映异构体杂质的控制和研究中应注意的问题

2.1 加强起始物料的质控

合成多肽的各手性中心直接来源于合成起始原料——各种保护氨基酸，因此应注意对合成起始原料光学纯度的质控^[2-3]，从源头进行控制。目前国内注册申请人通常在起始原料的内控标准中仅对比旋度进行控制，由于比旋度检查方法在专属性、灵敏度方面的限制，此项指标并不能有效的控制氨基酸的光学纯度，对于比旋度数值较小的保护氨基酸更是如此，如 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 为 +1.2° (±0.5°) (C=1, 乙酸乙酯)、Fmoc-Gln(Trt)-OH 为 -1.0° (±0.8°) (C=1, 甲醇)。因此，建议采用专属性强的手性 HPLC 对起始原料的光学纯度进行控制。

2.2 注意工艺过程的控制

多肽合成中肽键的形成与消旋是相互竞争的，因此应结合消旋的机制，注意氨基酸侧链保护基、缩合试剂的选择，以及投料比、反应条件的考察，尽量降低消旋的程度。

活化基 X 的活化能力及 N-酰基 R1-CO- 的电子特征密切相关。在此过程中，从 L-型氨基酸形成的噁唑酮 L-4 处于 L-4, 5 和 D-4 的互变平衡之中。肽缩合反应的消旋程度取决于噁唑酮的形成能力和它的氨解速度，氨基组分的亲核能力/碱性也是一个重要因素。

当肽链中含有 His, Cys, Phe 等易消旋的氨基酸时，更应注意对合成工艺进行研究，可考虑在此易消旋氨基酸的缩合步骤，另采用 D-构型的氨基酸制备差向异构体对照品，通过适宜的色谱条件检验目前工艺条件下此氨基酸的消旋程度，以指引此步骤氨基酸缩合工艺的优化改进。曾有申报单位对一个 4 肽片断 (NH₂-His-Gly-Glu-Gly-COOH) 固相合成中 His 缩合步骤的消旋情况进行了研究，通过采用高效的缩合试剂、增加 Fmoc-His(Trt)-OH 的投料量的方式，加快肽键缩合的速度，降低 His 消旋的风险，实测结果显示可将 His 的消旋程度降低一半左右。

2.3 选择合适的检测方法

与其他合成药物的有关物质研究相同，合成多肽中非对映异构体杂质也可采用 HPLC 进行检查，最常用的是反相色谱 (RP-HPLC) 系统，采用 C₁₈, C₈ 或 C₄ 柱等。齐威等^[4]采用 C₁₈ 柱、水 (0.1% TFA) 和乙腈 (0.1% TFA) 梯度洗脱的色谱系统对使用 HBTU/Fmoc 固相法合成的七肽 H₂N-PFNSLAI-

COOH 进行了研究, 通过色谱条件的优化, 可将 4 种非对映异构体良好分离, 并经 MS 进行了初步的鉴定研究。

但随着肽链的增长, 少数氨基酸消旋产生的非对映异构体杂质采用反相色谱系统常常无法有效检出, 建议可根据产品的性质尝试考察其他不同原理的色谱系统, 如离子交换色谱、毛细管电泳法 (HPCE) 等。某多肽创新药物(30 肽以上)在研发的早期, 采用 RP-HPLC 测定样品纯度为 97.8%, 而采用强阳离子交换色谱法(SCX-HPLC)测定纯度仅 88.0%, 其中 His 差向异构体杂质(相对于主峰的保留时间为 1.03)高达 9.8%, 后经制备工艺的改进优化, His 差向异构体杂质得到了良好的控制。非对映异构体杂质通常较难分离, 因此有关物质方法研究中也可作为色谱系统專屬性验证的内容之一。

Goodlett 等^[5]采用 HPLC-MS 对多肽的光学纯度进行测定。首先, 多肽在 DCI/CD₃COOD 中进行水解, 再采用 N-a-(2,4-二硝基-5-氟苯基)-L-丙氨酸酰胺(FDAA, Marfey's 试剂)对水解后的氨基酸进行衍生化, 使用普通的 RP-HPLC 或 GC 即可将衍生化后的 D 和 L-构型的氨基酸良好分离, 从而可检测多肽中消旋氨基酸的含量。使用氘(D)代试剂进行水解是非常必要的, 因为水解过程中产生的消旋氨基酸的 α 位质子为 D, 通过 ESI-MS 检测可将多肽中原本的消旋氨基酸与水解过程中产生的消旋很好的进行区分。研究者以胸腺五肽及其有关物质为例对检查方法进行了详细说明。此方法的优点在于專屬性良好, 且应用范围广泛, 方法建立后可对各种肽类药物进行检测。审评中已常

见国外研发机构使用类似方法控制合成多肽药物的光学纯度^[6], 并且可以此为考察指标指引制备工艺的优化改进。

3 小结

部分氨基酸消旋产生的非对映异构体杂质是合成多肽药物中有关物质的重要组成部分, 目前国内研发人员多忽视此类杂质的研究和控制, 希望通过本研究引起同业人员对多肽合成中氨基酸消旋问题的重视, 加强源头(起始原料质控)和工艺过程的控制, 并采用适宜检查方法对非对映异构体杂质(多肽光学纯度)进行研究。

REFERENCES

- [1] SEWALD N, JAKUBKE H D. Peptides: Chemistry and Biology [M]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.
- [2] SFDA. Guidance on Chemistry, Manufacturing, and Controls Studies for Synthetic Peptide Drugs. (国家食品药品监督管理局. 合成多肽药物药学研究技术指导原则) [S]. 2005.
- [3] FDA. Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing, and Controls Information for Synthetic Peptide Substances [S]. 1994.
- [4] QI W, JIA C X, HE Z M, et al. Analysis of racemization products of synthetic heptapeptide by reversed phase high performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2006, 34(9): 1244-1248.
- [5] GOODLETT D R, ABUAF P A, CROWTHER J B, et al. Peptide chiral purity determination: hydrolysis in deuterated acid, derivatization with Marfey's reagent and analysis using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1995, 707(2): 233-244.
- [6] ERMER J, GERHARDT J, SIEWERT M. Quality control of peptide drugs. Chiral amino acid analysis versus standard for icatibant acetate [J]. Arch Pharm, 1995, 328(9): 635-639.

收稿日期: 2009-12-08