

DISS. ETH NO. 20110

Peptide Purification by Reversed-Phase Chromatography

A dissertation submitted to
ETH ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

David Gétaz

Master of Science, ETH Zürich
Born May 15, 1985
citizen of
Château d'Oex (VD)

accepted on the recommendation of
Prof. Massimo Morbidelli, examiner
Prof. Pérez-Ramírez, co-examiner

Zürich 2011

Abstract

In this thesis, the major development steps of a peptide purification process were studied in detail, from the selection of the purification system, to the detailed process modeling. The development challenges were approached from a fundamental point of view, by describing the interaction of the mobile and stationary phases with the peptide and by implementing detailed modeling of peptide separation processes.

In a first step, the effect of the stationary phase on the separation efficiency was evaluated. Particular attention was placed on the influence of the material pore size on the adsorption and diffusion of peptides. It was shown that the intraparticle lumped mass transfer coefficient increases linearly with the average pore size. Moreover, it was found that the peptide adsorption strength was proportional to the surface area available for adsorption. A surface-specific adsorption isotherm was therefore developed for the adsorption modeling. Two peptide purification case studies were selected to study the influence of the pore size on the separation performances. Based on the results, it was concluded that the mass transfer limitations found in preparative RP-chromatography of peptides are not a limiting factor. The key factor in the selection of the stationary phase lies in the choice of the appropriate surface properties for a given purification problem.

Another important factor influencing the efficiency of peptide purification processes is the mobile phase composition. The effect of the mobile phase counter-ion type and concentration on the elution of peptides was investigated. It was found that the porosity accessible to the peptide increases with the local concentration of negative charges. This can induce the formation of anti-Langmuirian peaks in non-adsorbing conditions since the local increase of the ionic strength due to the peptide concentration increases the porosity accessible to the peptide. This behavior was well reproduced by the ideal model of chromatography assuming non-constant porosity. The acetonitrile adsorption isotherm was also measured on all the considered reversed-phase stationary phases. A comparison between the stationary phases shows a correlation between the amount of acetonitrile accumulated in the pores and the reduced pore accessibility for the peptide.

The effect of the counter-ion type and concentration in adsorbing conditions was also studied. It was found that the neutralization of the peptide charges by the counterions strongly increases the adsorption of the peptide on the stationary phase. A 2-parameter retention model based on the counterion binding to the peptide charges was proposed. The model was verified by two sets of experiments: peptide retention factor measurements and counterion binding measurements. It

was found that the peptide adsorption is highly dependent on the affinity of the counter-ion towards the peptide and that the latter increases with the counter-ion hydrophobicity (i.e. $AcO^- < H_2PO_4^- < TFA^- < PFPA^-$). Finally, the effect of the counter-ion concentration on the peptide saturation capacity was studied in various conditions. It was found that the peptide saturation capacity increases with increasing peptide-surface interactions (i.e. increasing Henry coefficient) and decreasing peptide-peptide repulsions (i.e. increasing mobile phase ionic strength).

Once the mobile and stationary phases have been selected, it is important to optimize the organic modifier gradient and the loading conditions used for the peptide purification step. A general procedure that can be followed to design peptide purification processes using a model based approach was developed. A peptide exhibiting very strong peptide-peptide interactions was used as an example to prove that modeling can be beneficial to optimize complex chromatographic processes. The target peptide elution profile was modeled with a two sites adsorption isotherm exhibiting two inflection points. The variation of the isotherm parameters with the modifier concentration was accounted for. The adsorption isotherm parameters of the target peptide were obtained by the inverse method. The elution of the impurities was approximated by lumping them into pseudo-impurities and by regressing their adsorption isotherm parameters directly as a function of the corresponding parameters of the target peptide. After model calibration and validation by comparison with suitable experimental data, Pareto optimizations of the process were carried out so as to select the optimal batch process.

Once a process has been developed, it is important to ensure its stability on the long term. Sometimes, a decrease in performance might be observed after repeated injections of the crude compound due to irreversibly adsorbed impurities. In this case, caustic regeneration procedures are often used to regenerate the column. It was found that the limited pH stability of conventional silica based materials is limiting the efficient implementation of caustic wash steps. Dissolution of the base material and creation of significant amount of residual silanol groups were observed. Despite the very strong impact of residual silanol activity on the peptide separation efficiency, the impact of stationary phase damages created by repeated cleaning-in-place cycles could be reduced by performing the peptide purification at low pH where the silanol activity is reduced.

Résumé

Dans cette thèse, la purification de peptides par chromatographie a été étudiée en détail. Les challenges rencontrés pendant le développement ont été abordés d'une façon fondamentale en décrivant les interactions entre la phase mobile, la phase stationnaire et le peptide et en implémentant une modélisation détaillée du procédé de purification.

Dans un premier temps, l'impacte de la phase stationnaire sur l'efficacité de la séparation a été évalué. L'accent a été mis sur l'influence de la taille des pores sur l'adsorption et la diffusion des peptides. Il a été prouvé que le coefficient de transfert de masse augmente linéairement avec la taille moyenne des pores. De plus, il a été observé que l'intensité d'adsorption des peptides sur la phase stationnaire était proportionnelle à la surface disponible pour l'adsorption. Un isotherme d'adsorption incluant la surface disponible a donc été utilisé lors de la modélisation. Deux exemples de purification de peptide ont été utilisés pour étudier l'effet de la taille des pores sur l'efficacité de la purification. Il en a été conclu que la limitation du transfert de masse rencontrée en chromatographie préparative de peptides n'est pas un facteur limitant l'efficacité de purification. En effet, les facteurs clés à considérer lors de la sélection d'une phase stationnaire sont les propriétés de la surface requise pour une purification donnée.

Un autre aspect important influençant l'efficacité des procédés de purification de peptides est la composition de la phase mobile. Dans le cadre de cette thèse, l'effet du contre-ion présent dans la phase mobile sur l'élution des peptides a été étudié. Il a été montré que la porosité accessible au peptide augmente avec la concentration locale de charge négative. Cet effet peut induire la formation de pics de type anti-Langmuirien en l'absence d'adsorption, étant donné que l'augmentation locale de la force ionique due à la concentration de peptide augmente la porosité accessible au peptide. Cet effet a été facilement reproduit par le model idéal de la chromatographie en assumant une porosité non constante. L'isotherme d'adsorption de l'acetonitrile a également été mesuré sur toutes les colonnes de chromatographie inverse utilisées dans ce travail. Une comparaison entre les colonnes montre une corrélation entre la quantité d'acetonitrile accumulée dans les pores et l'accessibilité réduite des peptides dans les pores.

L'impact du contre-ion sur l'adsorption des peptides a également été étudié. Il a été montré que la neutralisation de la charge du peptide par les contre-ions augmente fortement l'adsorption du peptide sur la phase stationnaire. Un modèle de rétention basé sur la liaison des contre-ions avec les charges du peptide a

été proposé. Le modèle a été vérifié par deux différents sets d'expériences: des mesures de facteur de rétention et des mesures de l'interaction entre le peptide et le contre-ion. Il a été montré que l'adsorption du peptide est fortement dépendante de l'affinité du contre-ion avec le peptide et que ce dernier augmente fortement avec l'hydrophobicité du contre-ion ($AcO^- < H_2PO_4^- < TFA^- < PFPA^-$). Finalement, l'effet de la concentration du contre-ion sur la capacité de saturation du peptide a été étudié. Il a été découvert que la capacité de saturation augmente quand les interactions peptide-surface augmentent (augmentation du coefficient d'Henry) et quand les répulsions peptide-peptide diminuent (augmentation de la force ionique de la phase mobile).

Une fois que la phase mobile et la phase stationnaire ont été sélectionnées, il est important d'optimiser le gradient de solvant organique et la quantité injectée dans la colonne. Une marche à suivre pour le design de procédé de purification par modélisation a été développée. Un peptide présentant des fortes interactions peptide-peptide a été utilisé pour montrer que l'utilisation de modèles computationnels peut être bénéfique pour l'optimisation des procédés chromatographiques complexes. L'élution du peptide a été modélisée avec un isotherme d'adsorption présentant deux points d'inflexion. La variation des paramètres de l'isotherme avec la concentration du solvant organique a été prise en compte dans le modèle. Les paramètres de l'isotherme du peptide ont été obtenus par la méthode inverse. L'élution des impuretés a été approximée en les regroupant en pseudo-impuretés et en régressant les paramètres de leur isotherme directement à partir des paramètres obtenus pour le peptide principal. Après la calibration du modèle et la vérification expérimentale, des optimisations de type Pareto ont été effectuées afin de sélectionner le procédé optimal.

Une fois qu'un procédé a été développé, il est important d'assurer sa stabilité à long terme. Parfois, une diminution de performance peut être observée après des injections répétées du mélange à purifier. Cela est typiquement dû à l'adsorption irréversible de certaines impuretés. Dans ce cas, une régénération caustique de la phase stationnaire est souvent nécessaire. Il a été montré que la stabilité limitée à pH élevé des colonnes fabriquées à partir de silice limite l'efficacité de ce type de procédure de régénération. La dissolution du noyau de silice, ainsi que la création de quantité significative de groupes silanol ont été observées. Malgré le fort impacte que l'activité des groupes silanol résiduels ont sur l'efficacité de la purification du peptide, l'impact des dommages créés ont pu être réduits en effectuant la purification à bas pH où l'activité des groupes silanol est réduite.