

HIGH QUALITY & EXPERT

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 125 期 双柱层析 (MCSGP) 在治疗性

寡核苷酸纯化的应用



2019 年 11 月

第一百二十五期 双柱层析 (MCSGP) 在治疗性寡核苷酸纯化的应用

本文讲述了如何将单柱层析转化为双柱层析 (MCSGP) 用于纯化治疗性寡核苷酸, 从而显著提高产品的收率以及生产效率。

采用 2 根相同的层析柱, 将第 1 根层析柱洗脱下的低纯度组分回收到第 2 根层析柱继续纯化, 可同时保证纯度和收率。在本例中, 单柱层析的收率仅为 60%, 而 MCSGP 在满足目标纯度要求前提下的收率则高达 94%, 显著优于单柱层析。MCSGP 工艺开发, 是通过 Contichrom HPLC 系统的 MCSGP 向导软件来实现的。

介绍

化学合成的寡核苷酸已广泛应用于 DNA 测序、聚合酶链反应 (PCR) 和分子克隆。寡核苷酸的未开发潜力在于其以靶向方式修饰基因表达的能力, 从而为人类疾病带来新的、有效的治疗效果。经过几十年的发展, 寡核苷酸已成为继小分子、多肽和蛋白质药物之后的主要开发药物之一, 预计寡核苷酸药物将很快应用于以往无法治疗的遗传疾病上。鉴于寡核苷酸的合成成本较高, 收率的增加将会对生产的经济性产生重大好处。

治疗性寡核苷酸的生产过程需要去除合成副产物, 以使药物纯度符合要求, 一般需采用层析方法进行精纯, 但这通常会使收率降低 40-60%。作为对策, 可以将纯度较低的产品单独收集, 并选择再次进行层析提纯, 但这会明显降低生产效率, 而且会增加分析检测的工作量。因此, 迫切需要有更先进的层析手段来提高收率, 并替代现有的层析方法。

MCSGP (Multi-column Counter-current Solvent Gradient Purification) 可同时保证高纯度和高收率, 有结果表明, 与单柱层析相比, MCSGP 可在满足目标纯度的前提下, 使产品收率提高至 90%。因此, MCSGP 克服了单柱层析时收率和纯度无法兼得的问题, 并且由于收率的提高, 通常还可保证更高的生产效率和更低的溶剂消耗量。

MCSGP 原理

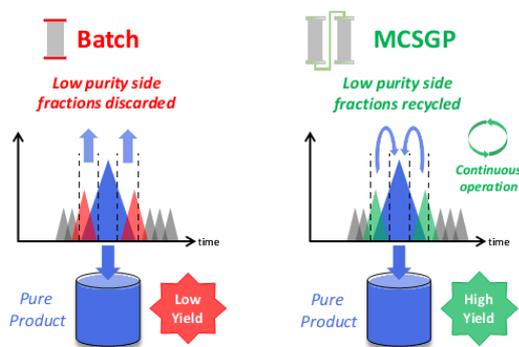


图 1. 传统单柱层析 (左): 重叠组分被舍弃或暂时保留以再次进行层析。

MCSGP (右): 将重叠组分进行循环回收, 不断去除杂质, 收集纯产品。

与单柱层析不同，MCSGP 是使用 2 根相同的层析柱进行连续层析（图 1）。然而 两者的分离原则是基本一致的，即在层析过程中，都将样品分离得到 3 部分：纯产物、杂质和产物的重叠组分、仅含杂质的部分。收集纯产物部分，舍弃或重新处理含有杂质的重叠组分。如果将重叠组分舍弃，会使有价值的产物发生损失。对重叠组分进行再处理会积累杂质，因此适用性受到限制。此外，将重叠组分暂时保留并再次进行层析会降低整体生产效率。MCSGP 通过内部回收（recycle）重叠组分，反复分离杂质和纯产物，从而同时保证纯度和收率。组分的回收过程是自动完成的，不需要进行离线分析。重叠组分从一个层析柱转移到另一个层析柱，并在每个 cycle 中会有新的样品再次上柱。这样可以确保连续操作，并在不影响纯度的情况下获得高收率的产品。

材料和方法

在 30% 氨水中制备治疗性寡核苷酸，最终浓度为 45 g/L，并通过反相 HPLC 测得纯度为 73.8%（图 2）。

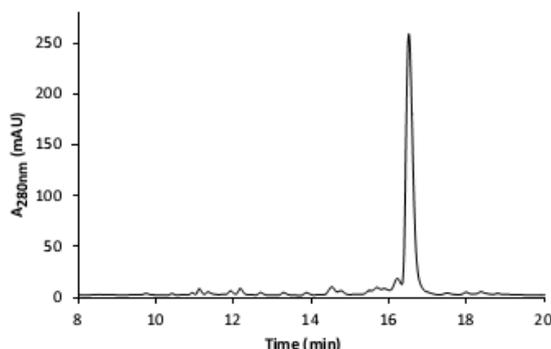


图 2. 上样样品反相层析分析图谱

反相层析方法：采用单柱层析和双柱 MCSGP 纯化寡核苷酸，两种模式均通过 Contichrom HPLC 30 层析系统进行操作，并记录 280 nm 处紫外吸收值。使用 2 个内径 0.77 cm、柱床高度 10 cm 的 Hiscreen Q Sepharose FF 柱（柱体积为 2×5 mL）。溶剂为 25 mm NaOH（A 相）和 25 mm NaOH+2 M NaCl（B 相）。对于单柱层析，每次上样量为每 mg 填料上样 1 mL。产品洗脱采用在线性梯度从 10%B 到 90%B 进行 24 CV（柱体积）。共进行 3 次单柱层析操作，1 次作为性能基准（Benchmark），2 次作为 MCSGP 设计的基础。

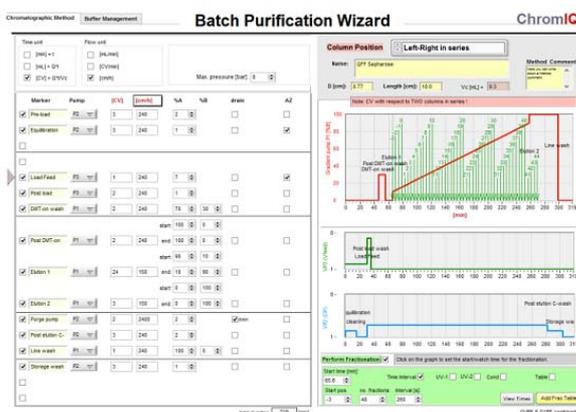


图 3. ChromIQ 软件 Batch 向导界面

单柱（Batch）方法是使用 Batch 向导创建的，如图 3 所示。表 1 为单柱层析参数。

表 1. 单柱层析参数比较。方法名称中的数字（150&300）对应洗脱流速。

		Benchmark	Batch Run 150	Batch Run 300
Bed height	[cm]	20	10	10
Loading Flow rate	[cm/h]	240	120	120
Elution flow rate	[cm/h]	150	150	300
Washing, cleaning flow rate	[cm/h]	240	480	480

Benchmark 使用 20cm 床高进行。运行 MCSGP 时，使用 10cm 床高的层析柱 2 根，以保证在 recycle 步骤中 2 柱串联时的总高度不超过 20cm。因此，仅运行单个 10 cm 层析柱的步骤（洗脱、清洗、CIP、再生）可以在 2 倍至 3 倍的线性流速下进行，而不超过层析柱的压力限制。这将会转化为更高的生产效率。采用 10cm 层析柱进行单柱层析，洗脱流速为 300cm/h（Batch Run 300），作为 MCSGP 设计的基础。分段收集，并采用 HPLC 对各分段组分进行分析检测，以生成准确的纯度曲线，从而快速实施 MCSGP。

单柱层析结果

图 4 和图 6 为单柱层析图谱。使用反相 HPLC 测定各洗脱组分的纯度，并用超微量分光光度计测定各洗脱组分的浓度（图 5 和图 7）。

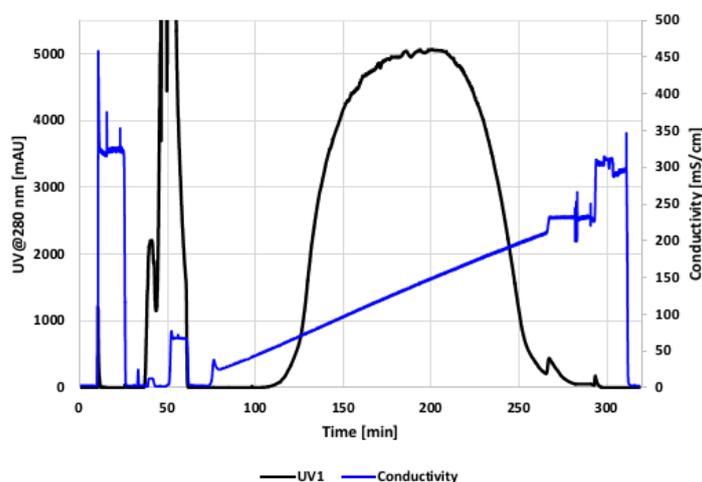


图 4. Benchmark: Contichrom 系统单柱层析图谱（黑色：A280nm；蓝色：电导率）

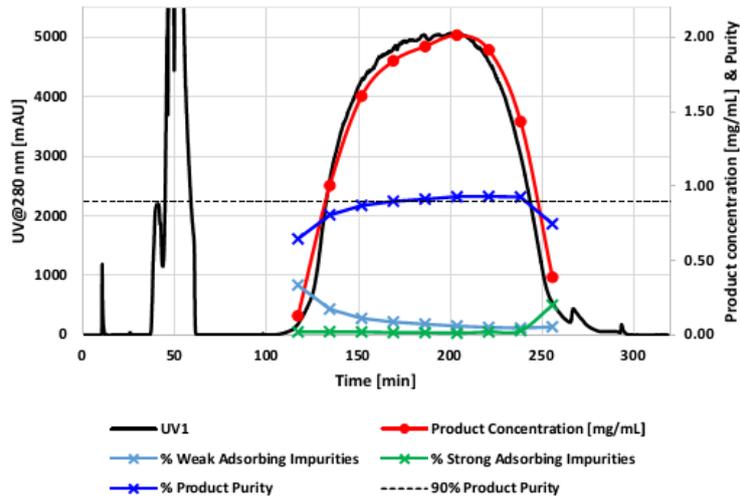


图 5. Benchmark: 洗脱组分检测结果

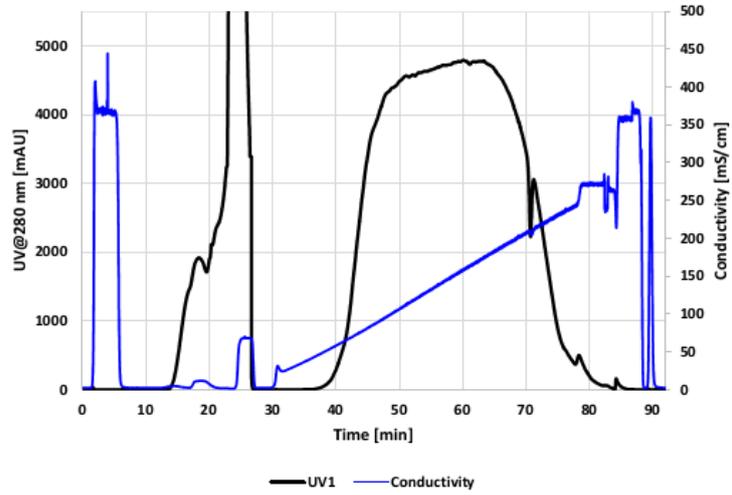


图 6. Batch Run 300 (用于 MCSGP 设计): Contichrom 系统单柱层析图谱 (黑色: A280nm; 蓝色: 电导率)

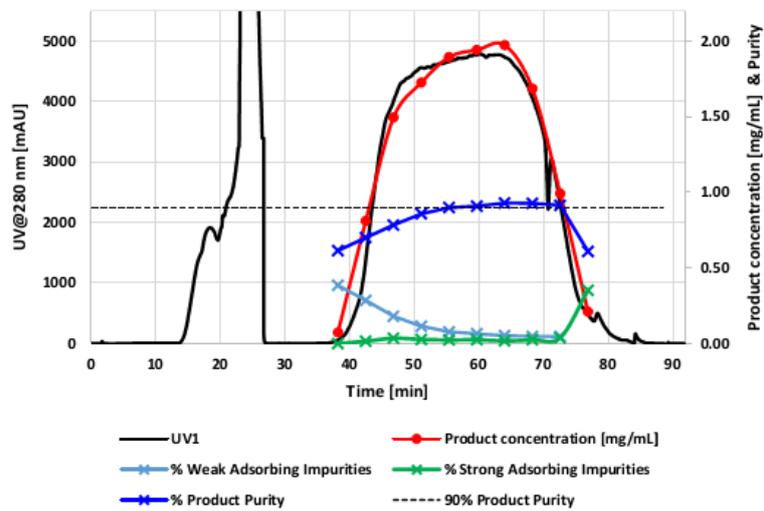


图 7. Batch Run 300: 洗脱组分检测结果

这两种单柱层析的详细过程参数比较见表 5。在要求目标纯度>91%的情况下，与 Benchmark 的 20cm 床高相比，采用 10cm 床高可产生更高的生产效率，这是因为 10cm 床高可使用更高的线性流速。然而，Batch Run 300 的收率会比 Benchmark 低 5%，这是因为满足纯度要求的收集范围较窄。

MCSGP 设计

可以单柱层析结果为基础，通过 MCSGP 向导生成双柱 MCSGP 方法（见图 8）。Contichrom 系统的 ChromIQ 软件可提供 MCSGP 向导功能。MCSGP 采用与单柱层析相同的层析柱、溶液体系和相同的层析方案。

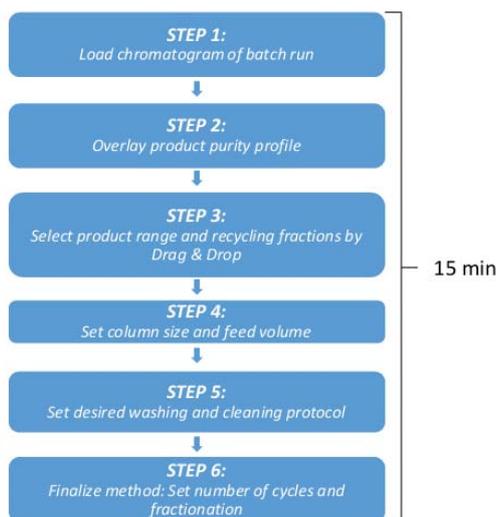


图 8. MCSGP 向导：以单柱层析图谱为基础，整个 MCSGP 设计过程可在 15 分钟内完成。

在 STEP1 中，需要将单柱层析图谱加载到 MCSGP 向导（图 9）。在 STEP2 中，需要将检测得到的各洗脱组分纯度和浓度结果与单柱层析图谱进行叠加。



图 9. MCSGP 向导界面

在 STEP3 中，通过拖动不同颜色区域的边界，将层析图谱划分为纯产物（Product）、重叠组分（Recycle）以及杂质（Waste）（图 9 和图 10）。可由系统软件模拟计算得到收集样品的纯度，并可根据区域划分的变化自动进行更新。

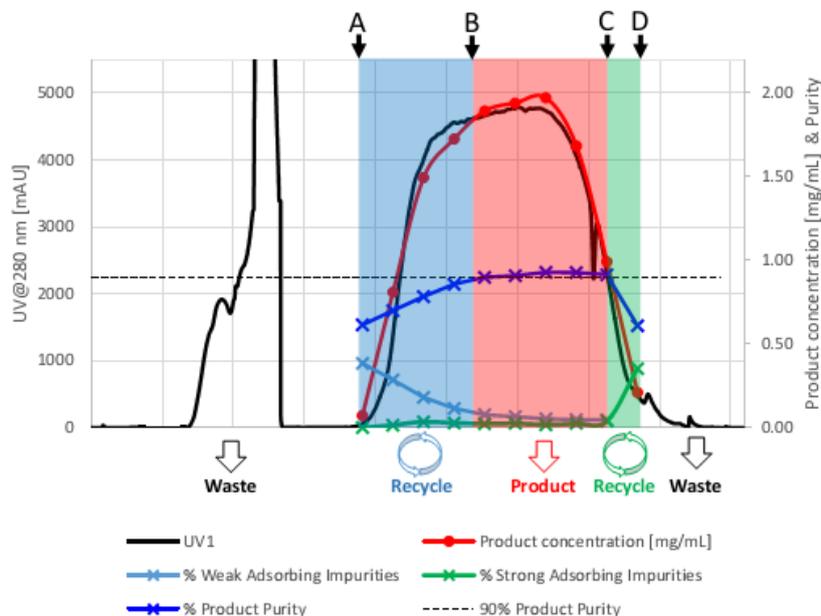


图 10. MCSGP 向导 STEP3 示意图，其中包括 Recycle 区域（A-B 为蓝色，C-D 为绿色）和 Product 区域（B-C 为红色）

图 9 和图 10 突出显示了三个区域，分别为 1 个 Product 区域（红色）和 2 个 Recycle 区域（蓝色和绿色）。

MCSGP 过程具体如下：

- A: 产品洗脱出峰时开始进行回收（Recycle）；
- B: 产品纯度达到 90% 时开始收集目标物（Product）；
- C: 产品纯度低于 90% 时结束收集目标物，并再次开始回收（Recycle）；
- D: 产品洗脱完毕，结束回收。

在 STEP4 中，可设定层析柱规格及上样体积。MCSGP 所使用的 2 根层析柱的规格型号、装填高度均与单柱层析时相同。MCSGP 向导会根据红色区域与蓝色、绿色区域的面积比例，自动调整上样量，确保工艺稳定。

在 STEP5 中，输入与单柱层析相同的层析工艺参数，MCSGP 向导会自动计算出稀释因子，从而保证回收组分被稀释后可与层析柱再次结合。

在 STEP6 中，MCSGP 向导可以模拟计算出相关工艺参数并进行显示，包括产品纯度、生产效率、上样量、溶液消耗量以及收集样品的浓度，并可设定 cycle 次数。此外，MCSGP 向导还可自动生成 start-up 和 shut-down 方法。整个 MCSGP 设计过程可在 15 分钟内完成。

分别以 150 cm/h、300 cm/h 和 450 cm/h 的洗脱流速进行了 3 次 MCSGP 运行，以保证在层析柱耐压范围内

进行工艺测试，见表 2。

表 2. MCSGP 方法参数比较。方法名称中的数字（150、300 和 450）对应洗脱流速。

		MCSGP Run 150	MCSGP Run 300	MCSGP Run 450
Bed height	[cm]	2x 10	2x 10	2x 10
Loading Flow rate	[cm/h]	150	150	150
Elution flow rate	[cm/h]	150	300	450
Washing & cleaning flow rate	[cm/h]	480	480	480

MCSGP 操作

图 11 为 MCSGP Run 150 层析图谱，此为 MCSGP 的典型图谱。层析图谱显示了 2 根层析柱可交替进行洗脱操作。2 根层析柱在每个 cycle 中各会完成一次洗脱。

ChromIQ 软件还可以将连续过程（如 MCSGP）的多个 cycle 进行叠加（图 12）。叠加图谱表明从 cycle2 开始进入稳态。

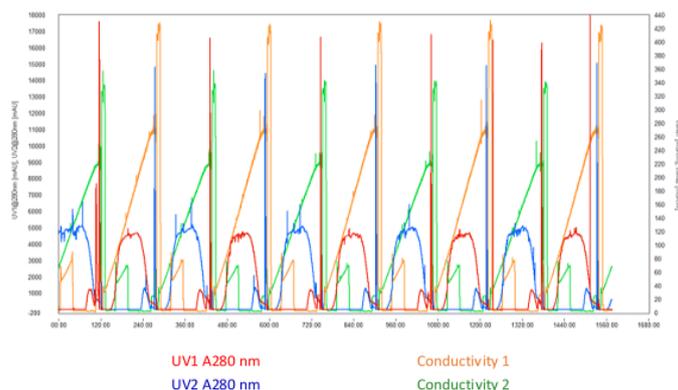


图 11. MCSGP Run 150 层析图谱，共显示 5 个 cycle

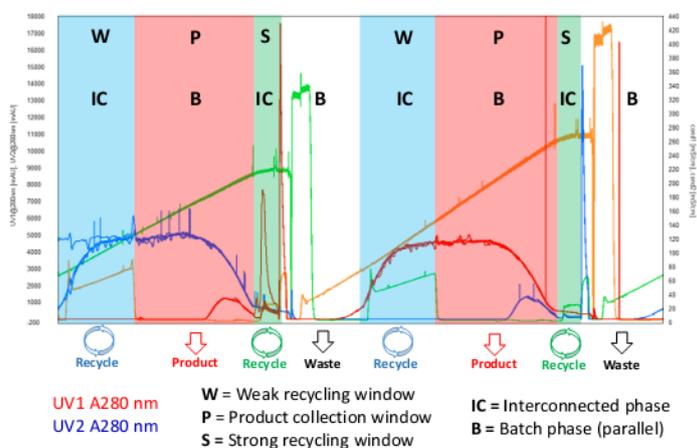


图 12. MCSGP 纯化寡核苷酸的叠加图谱，共 5 个 cycle。该图显示出洗脱曲线的变化很小，洗脱峰也很相似。第 1 组洗脱产物来自柱 2（蓝色曲线），第 2 组洗脱产物来自柱 1（红色曲线）。

每个 cycle 会进行 2 次收集，每柱各 1 次。检测表明，每个 cycle 的产量、浓度、纯度均一致。图 13 为 MCSGP 的 5 个 cycle 分析图谱叠加。HPLC 检测结果显示，三种不同洗脱流速的 MCSGP 产品纯度均高于 91% 的目标阈值，每次均运行 5 个 cycle，见表 4。

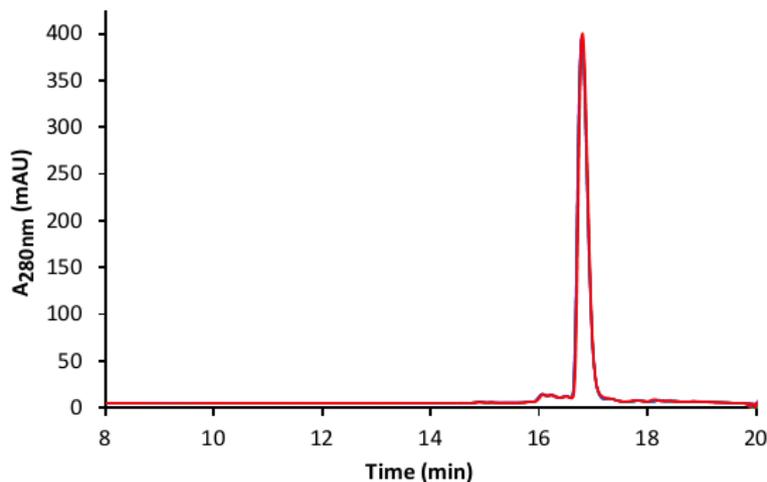


图 13.寡核苷酸反相分析图谱，5 个 cycle 的叠加显示出一致的产品质量。此图为 MCSGP Run 150 的结果，三种不同洗脱流速的 MCSGP 检测结果相似。

表 3 为 MCSGP Run 300 的 5 个 cycle 工艺参数与 MCSGP 向导模拟计算结果的对比。实测数据与模拟计算结果接近，说明可以在单柱层析结果的基础上，将 MCSGP 向导作为数据预测工具使用。

表 3. MCSGP Run 300 工艺参数与 MCSGP 向导模拟计算结果的对比

	C_{product} [mg/mL]	Purity [%]	Y_{cycle} [%]	Prod. [g/L/h]	B.C. [L/g]
Exp. Run	1.62	92.0%	91.2%	5.9	2.7
Prediction	1.84	90.5%	100%	6.6	3.0

单柱层析与 MCSGP 工艺对比

从收率、纯度、生产效率、产品浓度和溶液消耗等方面对单柱层析和双柱 MCSGP 进行了计算和比较，MCSGP 在各方面均表现出明显优势（表 5）。

将采用 20cm 床高的 Benchmark 与采用 10cm 床高的单柱模式 (Batch Run 150 和 Batch Run 300) 进行了对比，与预测情况相同，较短层析柱的收率会明显低于较长的层析柱，这是因为较短的层析柱分辨率较低。然而，如果不考虑收率，就生产效率而言，较短的层析柱优势更明显，尤其是在使用较高流速时。与采用 20cm 床高的 Benchmark 相比，采用 10cm 床高的单柱模式（共 2 根层析柱，累计床高 20 cm）收率会从 60% 降至 55%，但生

产效率会提高 3 倍。

MCSGP 的主要优点是在目标纯度大于 91%的前提下，与所有单柱模式相比，产品收率可显著提升。按照测试流速，在 92%纯度要求前提下，MCSGP 收率可比 Benchmark 单柱模式高出 50-57%，详见表 5、图 12 和图 14。MCSGP 收率也显著优于 10cm 床高的单柱模式。

在生产效率方面，MCSGP 的优点是在洗脱时可运行比 Benchmark 更高的流速，这是因为柱床高度降低了一半，层析柱反压更低。这意味着，与 Benchmark 相比，MCSGP 可使生产效率翻倍，而保证收率仍高于 90%（图 15）。将 MCSGP 直接与 10cm 床高的单柱模式进行比较，发现 10cm 床高的单柱模式生产效率更高。首先，与 MCSGP 相同，10cm 床高的单柱模式支持采用更高的流速。其次，与 MCSGP 不同，10cm 床高的单柱模式没有 2 柱串联的步骤，因此避免了采用较低流速的过程。最后，由于 MCSGP 的 recycle 功能，每 cycle 的新样品上样量都会受限，本例中，每 cycle 的新样品上样量约为单柱模式的 50%。实际上，对于许多大规模的寡核苷酸生产来讲，收率增加 5%比生产效率提高 3 倍更具有经济意义，这是因为寡核苷酸的合成成本很高（见表 5 Benchmark 与 Batch Run 300 对比）。事实上，由于 MCSGP 在提高收率方面优势明显，预计提高收率部分所产生的价值将迅速抵消购买连续流设备的成本投入（见文献 Müller-Späh, T., & Bavand, M. (2019). Purification of Synthetic Peptides by Countercurrent Chromatography (MCSGP)-Economic Evaluation. *Pharmaceutical Engineering*, 39(2), 68–77）。因此，应该把提高纯化收率作为本研究的主要目的。

表 4. 三种不同洗脱流速 MCSGP 结果对比

MCSGP RUN 150	Volume	Mass _{product}	Purity	Yield _{cycle}	Productivity	Load	Buffer Consumption
	[mL]	[mg]	[%]	[%]	[g/L/h]	[g/L]	[L/g]
Feed input (All cycles)	29.89	978.4	73.1%			20.57	
Cycle 1	106	184.0	92.0%	94.0%	3.76	4.20	0.23
Cycle 2	106	186.4	92.3%	95.2%	3.81	4.20	0.23
Cycle 3	106	185.5	91.8%	94.8%	3.80	4.20	0.23
Cycle 4	106	184.9	91.6%	94.5%	3.78	4.20	0.23
Cycle 5	106	183.1	91.8%	93.6%	3.75	4.20	0.24

MCSGP RUN 300	Volume	Mass _{product}	Purity	Yield _{cycle}	Productivity	Load	Buffer Consumption
	[mL]	[mg]	[%]	[%]	[g/L/h]	[g/L]	[L/g]
Feed input (All cycles)	27.16	889.0	73.1%			18.69	
Cycle 1	100	167.4	91.9%	94.2%	6.08	3.82	0.26
Cycle 2	100	156.5	91.9%	88.0%	5.68	3.82	0.28
Cycle 3	100	161.6	92.0%	90.9%	5.86	3.82	0.27
Cycle 4	100	161.5	92.0%	90.8%	5.86	3.82	0.27
Cycle 5	100	163.8	92.0%	92.1%	5.94	3.82	0.27

MCSGP RUN 450	Volume	Mass _{product}	Purity	Yield _{cycle}	Productivity	Load	Buffer Consumption
	[mL]	[mg]	[%]	[%]	[g/L/h]	[g/L]	[L/g]
Feed input (All cycles)	27.11	887.4	73.1%			18.66	
Cycle 1	100	156.5	91.7%	88.2%	8.14	3.81	0.28
Cycle 2	100	159.4	91.5%	89.8%	8.29	3.81	0.27
Cycle 3	100	161.6	91.7%	91.0%	8.40	3.81	0.27
Cycle 4	100	161.1	91.8%	90.8%	8.37	3.81	0.27
Cycle 5	100	161.3	91.9%	90.9%	8.38	3.81	0.27

表 5. 单柱层析与 MCSGP 运行过程对比

		Benchmark	Batch Run 300	MCSGP Run 150	MCSGP Run 300	MCSGP Run 450
Bed height	[cm]	20	10	2x 10	2x 10	2x 10
Loading Flow rate	[cm/h]	240	120	150	150	150
Elution flow rate	[cm/h]	150	300	150	300	450
Washing, cleaning flow rate	[cm/h]	240	480	480	480	480
Pool Purity	[%]	91.9%	91.6%	91.9%	91.9%	91.7%
Pool Yield	[%]	60.2%	55.7%	94.4%	91.2%	90.1%
Pool Conc	g/L	1.81	1.70	1.7	1.6	1.6
Mass balance	[%]	80.8%	84.0%	94.4%	91.2%	90.1%
Productivity	[g/L/h]	3.7	11.9	3.78	5.89	8.32
Load	[g/L]	32.3	32.8	20.6	18.7	18.7
Buffer cons.	[L/g]	2.4	2.6	2.3	2.7	2.7

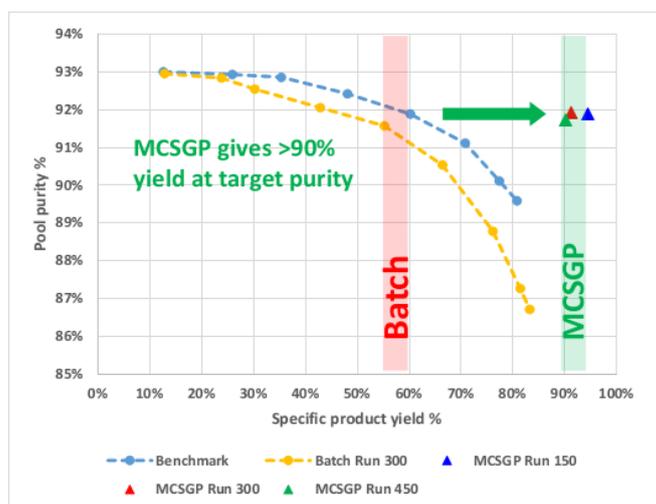


图 14. MCSGP（三角形）和单柱层析（圆形）帕累托曲线。

该图表明，MCSGP 有效克服了单柱层析时收率和纯度无法兼得的问题。

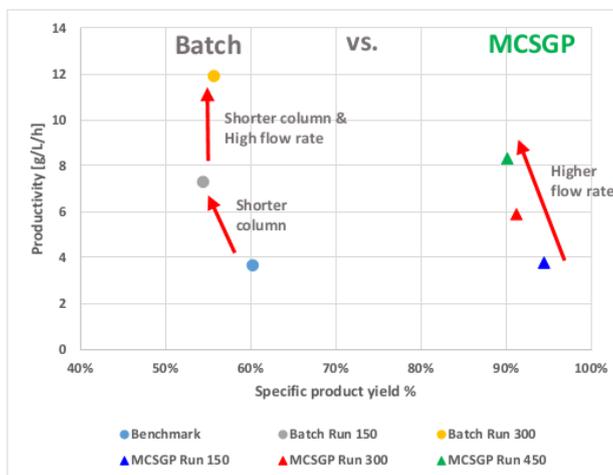


图 15. MCSGP（三角形）和单柱层析（圆形）收率-生产效率对比图

总结

与单柱层析相比，MCSGP 在寡核苷酸纯化方面具有明显优势。主要包括：

1. MCSGP 可使寡核苷酸收率提高 50% 以上。在要求产品纯度为 92% 时（目标纯度大于 91%），单柱层析的收率为 60%，而 MCSGP 的收率可高达 90%。
2. 寡核苷酸收率的提高可显著降低上游寡核苷酸合成的工作量及成本投入。
3. 与 Benchmark 相比，MCSGP 可使生产效率翻倍。
4. 大幅度减少了送检样品数量。（MCSGP 每 cycle 需要上样 2 次，但仅产生 1 个送检样品，而单柱层析每次上样都会产生多个送检样品。）
5. 其它工艺参数与单柱层析接近。

通过 MCSGP 提高生产效率，可应用于多种生产方式：

1. 可采用更小规格的层析柱，在相同的时间内，完成与单柱层析相同的生产任务；
2. 可采用与单柱层析相同规格的层析柱，在更短的时间内完成生产任务；
3. 层析填料体积相同时，可在相同时间内获得更多的产品。

层析系统介绍

Contichrom HPLC: Contichrom HPLC 是一套多用途的制备型实验室级层析系统，可运行多种单柱和双柱层析。

ChromIQ 是 Contichrom 系统的操作软件，其中包括 MCSGP 向导功能。



Contichrom® HPLC 30/100 System Specifications	
Flow rate range	0.1 – 36 / 0.1 – 100 mL/min
Pressure rating	100 bar (1450 psi)
Number of columns	1-2
Number of buffers / solvents	Up to 18
Fractionation	3 fractions (valve), optional fraction collector
UV Detectors	Fixed wavelength A280, A254, detection behind each column Optional external variable wavelength detectors with 190-500 nm wavelength
Conductivity / pH detectors	1 conductivity behind each column 1 pH included in system

EcoPrime Twin HPLC : EcoPrime Twin HPLC 为生产型连续流层析系统，可在 GMP 条件下运行 MCSGP 功能，满足 MCSGP 工艺的有效线性放大。



北京慧德易专注于层析领域十余年，已将世界领先的 Contichrom 双柱连续流层析技术引进中国，并已于 2017 年在北京昌平生命科学园蛋白质药物国家工程研究中心成立慧德易实验室&培训中心，现已成功举办多期连续流技术培训班。



北京慧德易实验室&培训中心可为广大客户提供工艺开发、产品展示及培训服务，欢迎广大客户莅临指导！

PRESS RELEASES | EVENTS



October 27, 2017 | ChromaCon and its partner H&E open a training center in Beijing

Press release. The center will provide courses on automated and continuous chromatography with Contichrom FPLC equipment.



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