

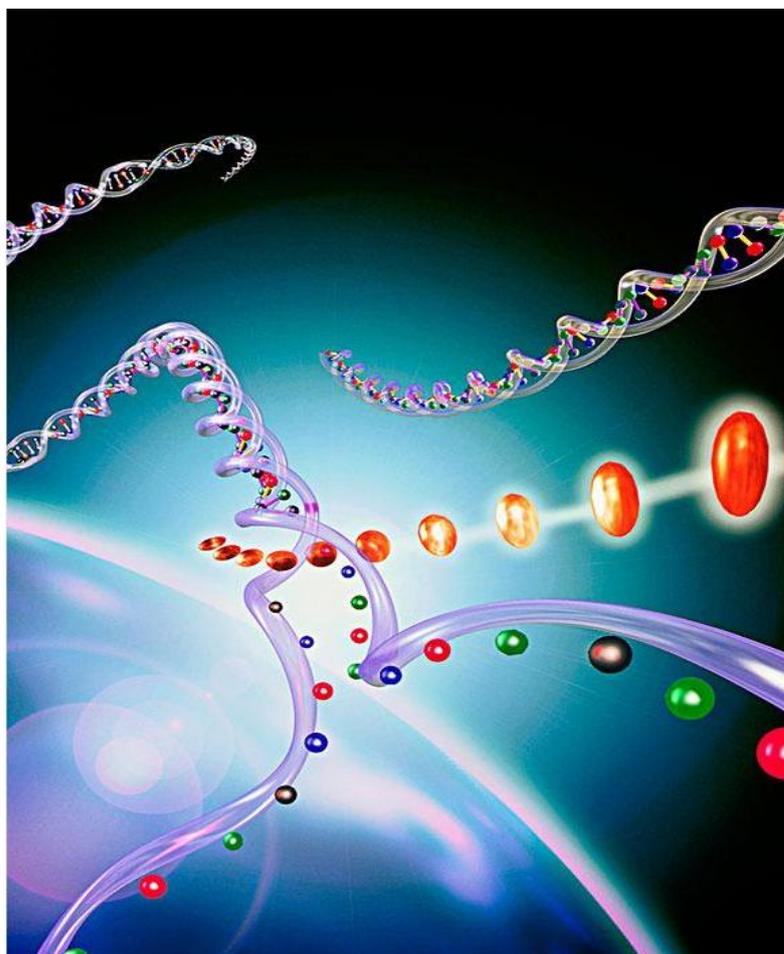
慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 139 期

核酸类药物层析纯化的新选择

----疏水层析的应用



2021年3月

第 137 期 核酸类药物层析纯化的新选择----疏水层析的应用

核酸 (Nucleic Acids) 是一种生物大分子, 包括脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。这两类分子在生物体内的主要作用是携带和传递遗传信息。这两类分子能够用于疾病的预防、诊断和治疗的, 就是核酸药物。

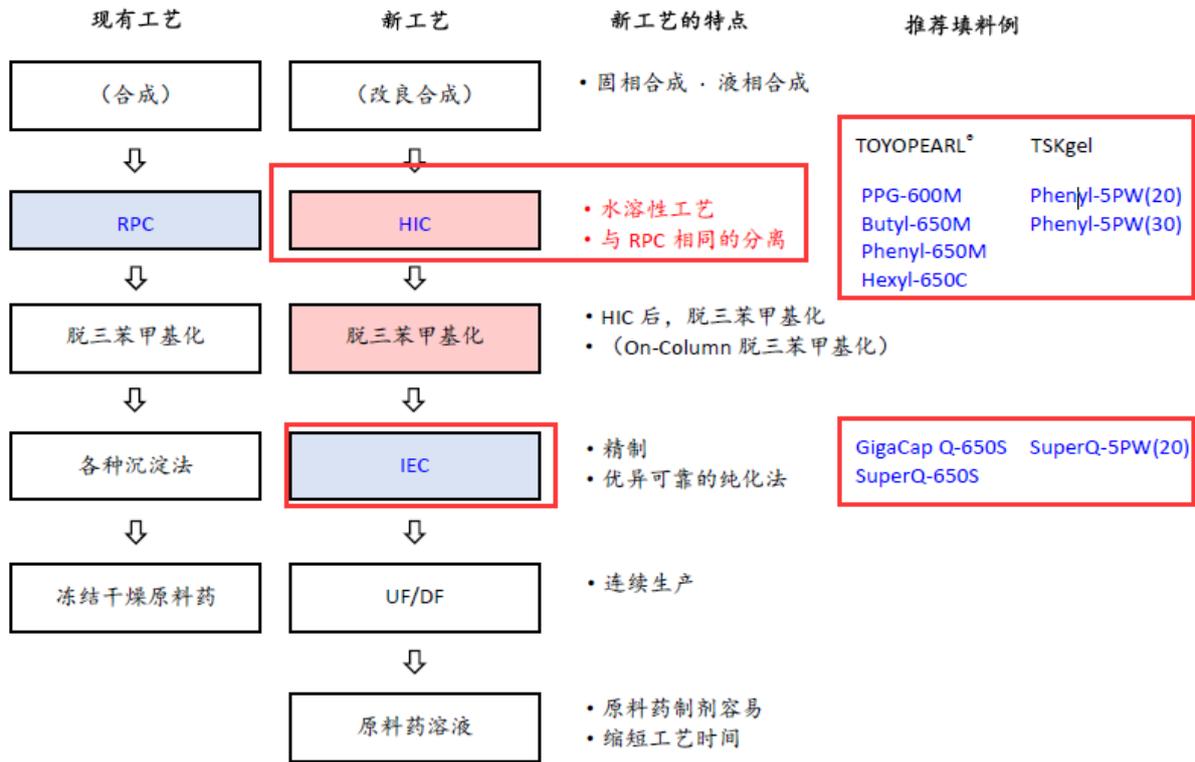
传统的药物以化学小分子为主, 近二十年来以抗体和细胞药物为代表的生物药物也得到了广泛的认可, 而区别于这两类药物的新一代核酸药物即将成为药物研发的主流。核酸药物能够以化学药物或抗体药物无法靶向 (例如 mRNA 和 miRNA) 的分子作为作用靶点, 有望对传统药物疗效不佳的疾病产生突破性的进展, 特别是难以治疗的遗传疾病、癌症以及某些病毒感染 (例如 SARS-CoV-2)。诺华、默沙东、辉瑞制药、药明康德等多家药企在该领域进行了重要的布局。

目前, 全球已经有 12 种核酸药物获批上市, 预计今后每年也将有 3~4 种核酸药物获批。另外, 预计到 2025 年, 核酸药物的市场规模将达到 1 百亿美元。作为主流核酸药物的合成寡核苷酸, 在经过固相法或液相法的化学合成工艺后, 通过反相层析 (RPC) 或离子交换层析 (IEC) 等方法进行分离和纯化。但是, 普通 RPC 工艺无法完全去除目标产物中的相关杂质, 而且由于大量使用有机溶剂, 需要进行废液处理、配备防爆设备等, 会产生对成本控制不利等因素。因此, 相关人员正在研究使用可代替 RPC 的层析工艺 —— 疏水层析 (HIC)。

一、疏水层析的优势 (与 RPC 相比)

1. 可以去除固相合成时从固相导出的样品溶液中含有的氢氧化铵等低分子。
2. 合成过程中, 保护基二甲氧三苯甲基 (DMT) 与目标物质结合的 DMT-on 目标物, 与保护基脱落生成的 DMT-off 杂质更容易被分离。
3. 可以分离目标产物相关杂质, 即 N-1 杂质、N+1 杂质、P=O 杂质、氰乙基化 (CNEt) 杂质、无碱基杂质等。
4. 使用酸性洗脱液, 可在柱内完成目标产物的脱三苯甲基化 (DMT 基团的脱保护)。
5. 聚合物基质的填料可使用碱性溶液 (pH13 以下), 还可用 NaOH 溶液对层析柱进行 CIP 清洗。
6. 由于洗脱液几乎不使用有机溶剂, 所以无需配备防爆设备, 还可减少废液处理的费用。

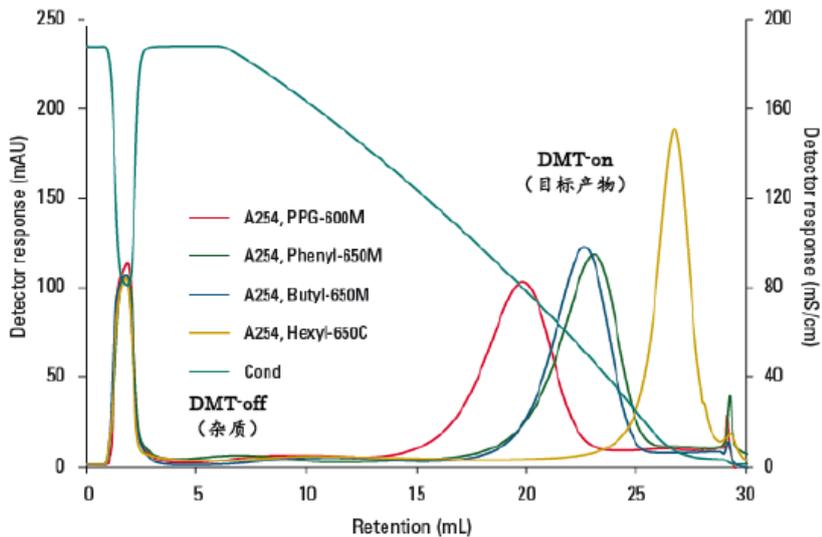
二、使用 HIC 填料进行合成寡核苷酸的纯化精制工艺示例



Ref.:

- 1) Hybridon Inc., Patent WO 96/01268 (1996)
- 2) K. Ruanjaikaen et al., presentation by BioProcess International West (2017), San Francisco, USA
- 3) Biogen MA Inc., Patent WO 2017/218454 A1 (2017)

三、使用 HIC 层析填料分离合成寡核苷酸的实例



Column; TOYOPEARL PPG-600M, Phenyl-650M, Butyl-650M, Hexyl-650C
 Column size; 5 mm I.D. x 5 cm (1 mL)
 Elution; Buffer A: 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1.5 mol/L ammonium sulfate (pH 7.5)
 Buffer B: 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA (pH 7.5)
 Linear gradient from Buffer A to Buffer B (20 CV)
 Washing; Buffer B (4 CV), 30 % isopropyl alcohol (5 CV)
 Flow rate; 1.0 mL/min (1 min residence time)
 Detection; UV (254 nm), conductivity (mS/cm)
 Temperature; ambient
 Sample; crude DMT-oligonucleotide (20 mer), 5'-GAA TTC ATC GGT TCA GAG AC-3'
 (AEX-HPLC purified, purity ca. 55 % from TriLink Biotechnologies)
 Sample loading; 1 mL (0.1 mg/mL)

从上述各种类型的 HIC 填料分离粗纯的寡核苷酸的结果来看，DMT-off 杂质在所有的 HIC 填料上均无法被吸附，而是直接流穿。另外，从目标产物的洗脱位置、与杂质的分辨率（分离度）来看，TOYOPEARL Phenyl-650M 和 Butyl-650M 更适用于寡核苷酸的纯化。

如果需要更详细的资料，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