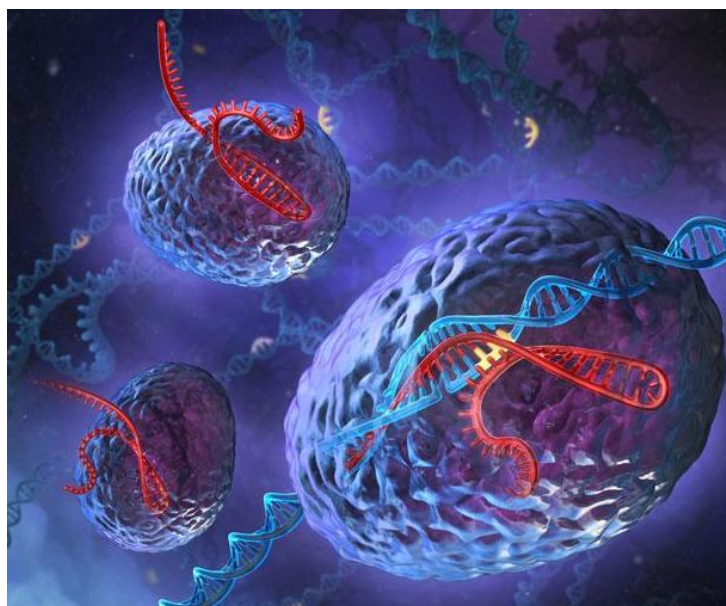


慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 142 期

东曹液相色谱技术在核酸药物纯化工艺中的应用



2021年7月

第 142 期 东曹液相色谱技术在核酸药物纯化工艺中的应用

核酸药物是生物医药发展的前沿领域，包括反义核酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（miRNA）、小激活 RNA（saRNA）、信使 RNA（mRNA）适配体（aptamer）、核酶（ribozyme）、抗体核酸偶联药物（ARC）等，是基因治疗的一种形式，也是继小分子药物、蛋白药物、抗体药物之后的新一代制药技术。

先来说说最近核酸药物领域的标志性事件：

※ 2020 年 4 月 14 日，Alnylam 公司获得黑石集团 20 亿美元的投资来支持其 RNAi 疗法 vutrisiran 和 ALN-AGT 等在研药物的开发，黑石将获得 inclisiran（一款靶向 PCSK9 的治疗高胆固醇血症的 RNAi 疗法）未来销售额分成的 50%，截至目前 Alnylam 公司市值 148.92 亿美元。同时黑石集团联合创始人苏世民与红杉资本沈南鹏的抖音对话使其被圈内外所熟知，其大手笔的投资也正式助推核酸药物步入黄金时代。

※ 2020 年 4 月 3 日，瑞博生物宣布获得 4.7 亿元人民币的 C2 轮融资支持，本轮融资由中国国有资本风险投资基金领投，中金启德基金、高瓴创投联合领投，恒旭资本、朗玛峰创投、国药中金基金、深圳众汇、上海自贸区基金和弘陶资本等知名投资机构共同跟投。瑞博生物董事长梁子才博士表示：“随着两个国际小核酸药物的接连面市，小核酸制药经过近二十年的卧薪尝胆，开始进入产业收获期。”

※ 随着新冠疫情的爆发，mRNA 疫苗相信大家已经不再陌生，而这一领域的研究在美国早已步入快速商业化。2020 年 4 月 16 日，Moderna 与美国生物学高级研究与开发局（BARDA）达成协议，将获得最高 4.83 亿美元的资金支持，用于支持测试和生产 mRNA-1273 疫苗；也正是这家公司在 2018 年底以 6.04 亿美元的募资创下了生物科技公司规模最大的 IPO 纪录，截至目前市值 151.31 亿美元。另一家 mRNA 疗法公司 BioNTech 也于 2019 年 10 月 10 日正式在纳斯达克，截至目前市值 107.68 亿美元。

FDA与EC批准上市的核酸类药物

表 1 FDA 与 EC 批准上市的核酸类药物
Tab 1 Nucleic Acid Drugs Approved by FDA and EC

类别	药品名称	商品名	生产厂家	获批时间	适应症	给药途径	载体及药物作用形式 ¹⁾
在体 (in vivo) 基因导入途径	重组人 p53 腺病毒注射液 (recombinant human adenovirus p53 injection)	GeneDicine	Shenzhen Sibiono GeneTech	2003	头颈部鳞状细胞癌	瘤内注射; 腔内或血管内注射	Ad5-p53, DNA
	重组人 5 型腺病毒注射液 (recombinant human adenovirus 5 injection)	Onconite	Shanghai Sunway BioTech Co.	2005	晚期鼻咽癌	瘤内注射	ΔE1B ΔE2 Ad5, DNA
	alipogene tiparvovec	Glybera	UroCure Inc.	2012	脂蛋白脂肪酶缺乏症	肌内注射	AAV1-LPL, DNA
	talimogene laherparepvec	Imlygic	Amgen Inc.	2015	黑色素瘤	瘤内注射	HSV-GM-CSF, DNA
	voretigene neparvovec-rzyl	Luxturna	Spark Therapeutic Inc.	2017	双等位基因 RPE65 相关性视网膜营养不良	视网膜下注射	AAV2-RPE65, DNA
	onasemnogene Apeparvovec-xioi	Zolgensma	Novartis AveXis Inc.	2019	2 岁以下脊髓性肌萎缩症患者	静脉注射	AAV-SMN1, DNA
	patisiran	Onpatro	Alnylam Pharmaceuticals, Inc.	2018	遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的多发性周围神经疾病	静脉输注	LNP, siRNA
	givosiran	Givlaar	Alnylam Pharmaceuticals, Inc.	2019	患有急性肝卟啉病的成年患者	皮下注射	GaINAc, siRNA
	autologous CD34 ⁺ enriched cell fraction that contains CD34 ⁺ cells transduced with retroviral vector that encodes for the human ADA cDNA sequence	Strimvelis	Glaxo Smith Kline Plc.	2016	腺苷脱氨酶缺失导致的重联合免疫缺陷	自体基因修饰 CD34 ⁺ 造血干细胞的移植	γRV-ADA, 细胞
	allogeneic T cells genetically modified with a retroviral vector encoding for a truncated form of the human low affinity nerve growth factor receptor (ΔLNGFR) and the herpes simplex 1 virus thymidine kinase (HSV-TK Mut2)	Zalmaxis	MolMed S.p.A.	2016	部分白血病和淋巴瘤	静脉输注自体基因修饰 T 细胞	γRV-HSV TK Mut2-ΔLNGFR, 细胞
离体 (ex vivo) 基因导入途径	tisagenlecleucel	Kymriah	Novartis International AG	2017	25 岁以下复发或难治性 B 细胞急性淋巴细胞白血病患者	静脉注射自体基因修饰 T 细胞	LV-CD19, 细胞
	axicabtagene ciloleucel	Yescarta	Gilead	2017	非霍奇金淋巴瘤	静脉注射自体基因修饰 T 细胞	RV-CD19, 细胞
	autologous CD34 ⁺ cells encoding βA-TS7Q-globin gene	Zynteglo	BloodBio	2019	12 岁以上非 β0/β0 基因型输血依赖性 β 地中海贫血患者	自体基因修饰 CD34 ⁺ 造血干细胞的移植	LV-β 球蛋白, 细胞

注: ¹⁾Ad: 腺病毒; AAV1 和 AAV2: 腺相关病毒 1 和腺相关病毒 2; HSV: 单纯疱疹病毒; RV: 逆转录病毒; LV: 慢病毒; ΔE1B ΔE2: 腺病毒 E1B 与 E2 基因缺失; LPL: 脂蛋白脂肪酶; GM-CSF: 免疫激活蛋白白细胞-巨噬细胞集落刺激因子; RPE65: 视黄醇异构体水解酶视网膜色素上皮 65 基因; SMN1: 运动神经元存活基因 1; LNP: 脂质纳米颗粒; GaINAc: N-乙酰半乳糖胺; γRV-ADA: 携带腺苷脱氨酶基因的逆转录病毒; γRV-HSV TK Mut2-ΔLNGFR: 携带单纯疱疹病毒开胸酶 (HSV TK) 自杀基因的逆转录病毒; LV-CD19: 携带嵌合抗原受体基因的慢病毒; RV-CD19: 携带嵌合抗原受体基因的逆转录病毒; LV-β 球蛋白: 携带正常 β 球蛋白功能的 βA-TS7Q 球蛋白基因的慢病毒

6月23日，复星凯特生物CAR-T细胞治疗产品奕凯达（阿基仑赛注射液）的新药上市

已批准上市的14种治疗性寡核苷酸药物

Oligonucleotide Therapeutics [*]	Origin	Type	Approved Year	Size and Property	Indication
Vitravene® (Fomivirsen)	Synthetic	Antisense	1998 (discontinued)	DNA 21mer	Cytomegalovirus infection
Macugen® (Pegaptanib)	Synthetic	Aptamer	2004	RNA 28mer+PEGylated	Age-related macular degeneration (AMD)
Kynamro® (Mipomersen)	Synthetic	Antisense	2013	RNA/DNA 20mer, Gapmer	Homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH)
Exondys 51® (Eteplirsen)	Synthetic	Antisense	2016	DNA 30mer	Duchenne muscular dystrophy (DMD)
Spinraza® (Nusinersen)	Synthetic	Antisense	2016	DNA 18mer	Spinal muscular atrophy (SMA)
Defitelio® (Defibrotide)	Natural	Oligonucleotide	2016	Porcine testine derived	Hepatic veno-occlusive disease (VOD)
Tegsedi® (Inotersen)	Synthetic	Antisense	2018	DNA 20mer	Hereditary transthyretin-mediated amyloidosis (hATTR)
Onpatro® (Patisiran)	Synthetic	siRNA	2018	RNA 21mer, double stranded	Hereditary transthyretin-mediated amyloidosis (hATTR)
Hepilisav-B® (HepB-CpG)	Synthetic	CpG Oligo	2018	RNA 18mer, HBV adjuvant	Hepatitis B virus infection
Waylivra® (Volanesorsen)	Synthetic	Antisense	2019	DNA 20mer, Gapmer	Familial chylomicronemia syndrome (FCS) and familial partial lipodystrophy (FPL)
GIVLAAR® (Givosiran)	Synthetic	siRNA	2019	RNA 21/23mer, double stranded	Acute hepatic porphyria (AHP)
VYONDYS 53® (Golodirsen)	Synthetic	Antisense	2019	DNA 25mer	Duchenne muscular dystrophy (DMD)
Viltepso® (Viltolarsen)	Synthetic	Antisense	2020	DNA 21mer	Duchenne muscular dystrophy (DMD)
Milasen	Synthetic	Antisense	2018	DNA 22mer (personalized)	Blatten disease, neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs)

^{*}Registered trademark; "Vitravene" by ISIS Pharmaceuticals, "Macugen" by Pfizer, "Kynamro" by Sanofi Genzyme, "Exondys 51" by Sarepta Therapeutics, "Spinraza" by Biogen, "Defitelio" by Jazz Pharmaceuticals, "Tegsedi" by Ionis Pharmaceuticals, "Onpatro" by Alnylam Pharmaceuticals, "Hepilisav-B" by Dynavax Technologies, "Waylivra" by Ionis Pharmaceuticals, "GIVLAAR" by Alnylam Pharmaceuticals, "VYONDYS 53" by Sarepta Therapeutics, "Viltepso" by Nippon Shinyaku Co. Ltd.

平均每年上市3~4种寡核苷酸药物

全球核酸药物市场

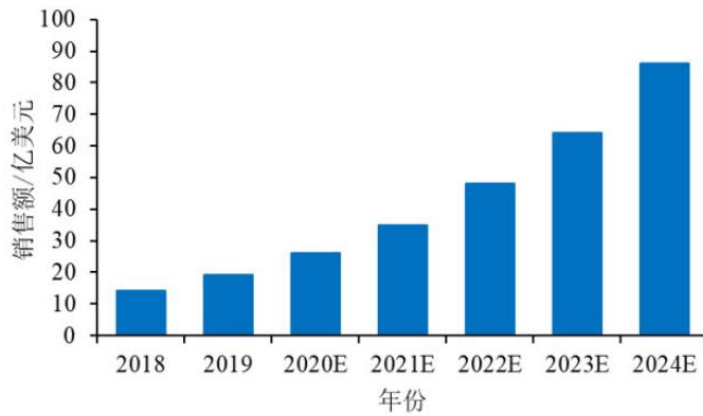


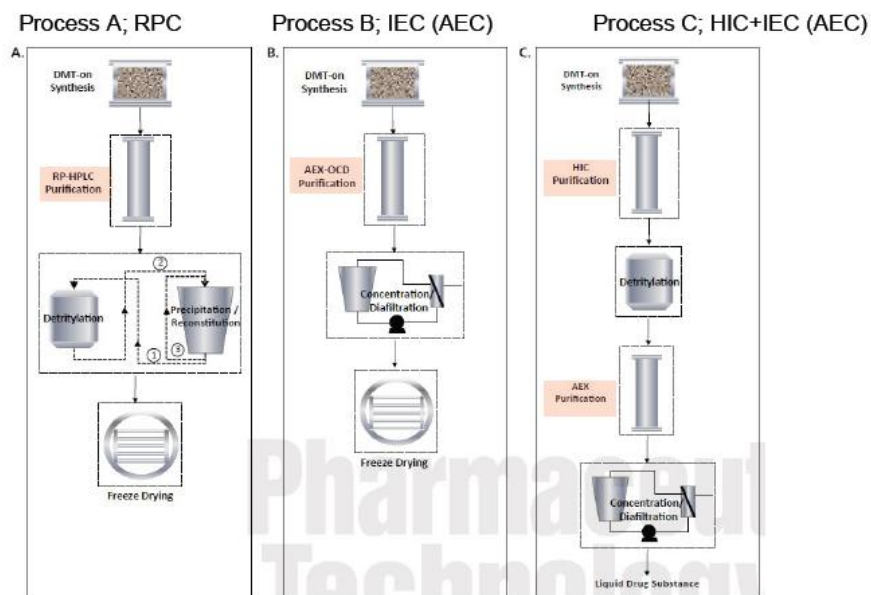
图 1 2018-2024 年全球核酸药物市场规模及预测

Fig.1 Market size and forecast of global nucleic acid drug between 2018 and 2024

Source: Evaluate Pharma/ Boston Consulting Group/ China Galaxy Securities

目前，核酸药物纯化的工艺，有以下几种模式，会分别介绍：

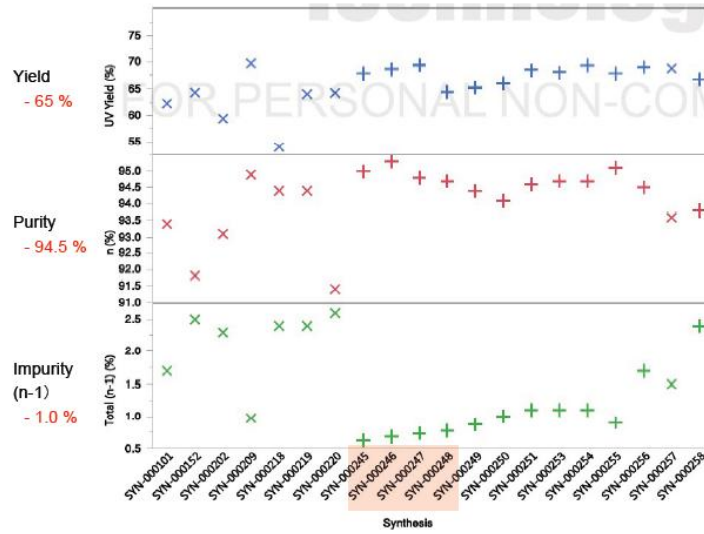
治疗性寡核苷酸规模制备



Ref.; Pharmaceutical Technology, February 2020, p 30-34, <https://www.pharmtech.com/view/designing-commercial-scale-oligonucleotide-synthesis>

一、反相 (RPC)

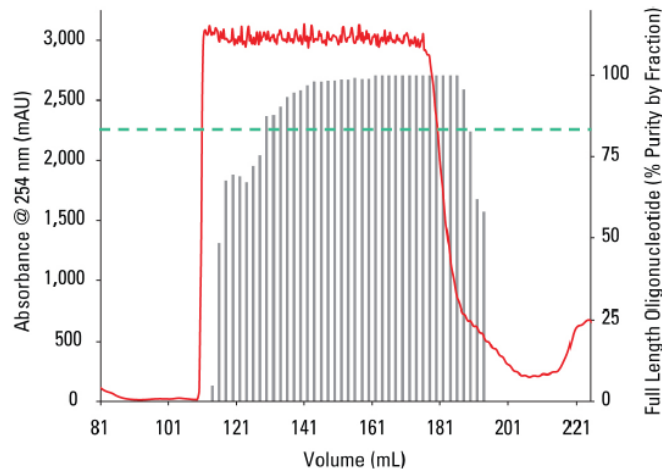
反相工艺; **IONIS**
产率, 纯度及杂质 大批量生产 (11.5 kg)



Ref.; Pharmaceutical Technology, February 2020, p 30-34
<https://www.pharmtech.com/view/designing-commercial-scale-oligonucleotide-synthesis>

二、离子交换 (IEC)

采用IEC工艺TSKgel SuperQ-5PW(20) 填料纯化硫代寡核苷酸 (24mer) 上样量为80%DBC



The elution profile for the TSKgel SuperQ-5PW (20) resin went off scale at 254 nm. The enlarged image of the main oligonucleotide peak, when overlaid with a histogram showing the AIEC HPLC results for fraction purity, highlights the chromatographic separation of the full length oligonucleotide that could not be determined by examining the elution profile alone. Note: This figure highlights just the area in full length oligonucleotide elutes.

IEC工艺；NaOH流动相条件下寡聚核酸纯化结果的整理

Resin	Crude Loaded	Crude Purity (AEX)	Crude Purity (RPC)	Total Recovered (OD 260)	% Full Length Oligo (AEX)	% Full Length Oligo (RPC)	% Yield of FLO (AEX)	% Yield of FLO (RPC)
TSKgel SuperQ-5PW (20)	37.1 mg/mL	66.5%	62.96%	118.8 mg	97.3%	86.3%	74.3%	69.6%
TOYOPEARL SuperQ-650S	45.0 mg/ mL	66.5%	62.96%	142.7 mg	95.6%	82.8%	74.1%	67.7%
TOYOPEARL GigaCap Q-650S	30.0 mg/ mL	66.5%	62.96%	95.3 mg	96.5%	85.5%	75.0%	70.0%

Sample purity was determined by pooling the highest purity fractions (>85% full length oligonucleotide - FLO) from each column and analyzing them on a TSKgel DNA-STAT HPLC column. The pooled fractions were also analyzed using a Waters Acquity OST C18 1.7 μ m (2.1 mm ID x 10 cm) RP UPLC column. Recovery was determined by comparing the amount of full length oligonucleotide present in the crude sample loaded onto the column with the amount of full length oligonucleotide present in the pool of high purity fractions.

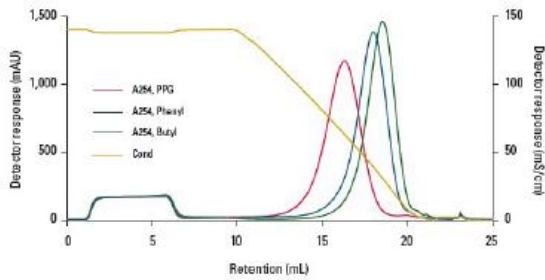
- TSKgel SuperQ-5PW (20) showed slightly better results on yield and recovery than TOYOPEARL GigaCap Q-650S.
- TOYOPEARL SuperQ-650S showed higher dynamic binding capacity, while the yield and recovery were slightly low among the three anion-exchangers examined.
- TOYOPEARL GigaCap Q-650S showed 30 % lower volume for elution pool of the sample compared with other anion-exchangers..

三、疏水作用（HIC）

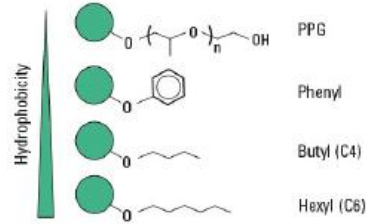
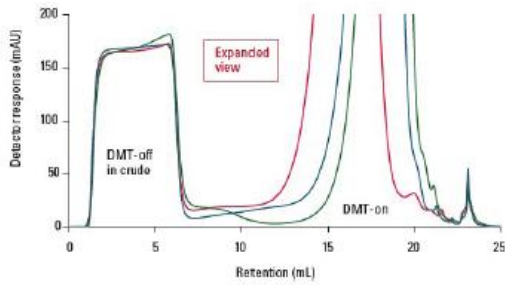
HIC: 影响寡核苷酸分离和选择性的因素

- 盐的种类
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 Na_2SO_4 相比 NaCl 对寡聚核苷酸有更强的保留
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 线性洗脱下有更好的线性。
 - 寡聚核苷酸 1.5 mol/L盐浓度以下溶解性没问题。
- 缓冲液 pH及有机溶剂
 - pH影响不大，一般采用中性缓冲。
 - 适用用0.1-0.5 mol/L NaOH和30%的乙腈或异丙醇CIP清洗
- 样品载量
 - 10 – 40 g/L (30 – 80 % 动态吸附载量；DBC: ca. 20 - 50 g/L) 以获得寡聚核苷酸更好的杂质去除效果
- HIC 填料疏水性
 - TOYOPEARL PPG-600M < Phenyl-650M < Butyl-650M < Hexyl-650C
 - 根据寡聚核苷酸的疏水性选择HIC填料
- HIC 工艺优势
 - 几乎不用有机溶剂，但分离效果类似RPC。
 - 更好去除低分子量化合物。如： $\text{N}\pm 1$ 型寡聚核苷酸、DMT-off 型及部分N-1型和P=O 型
 - 耐碱性

HIC 工艺; 分离DMT-on 20mer 寡聚核苷酸



Sample;
crude DMT-oligonucleotide (20mer),
5'-GAA TTC ATC GGT TCA GAG AC-
(AEX-HPLC purified, purity ca. 55 %)



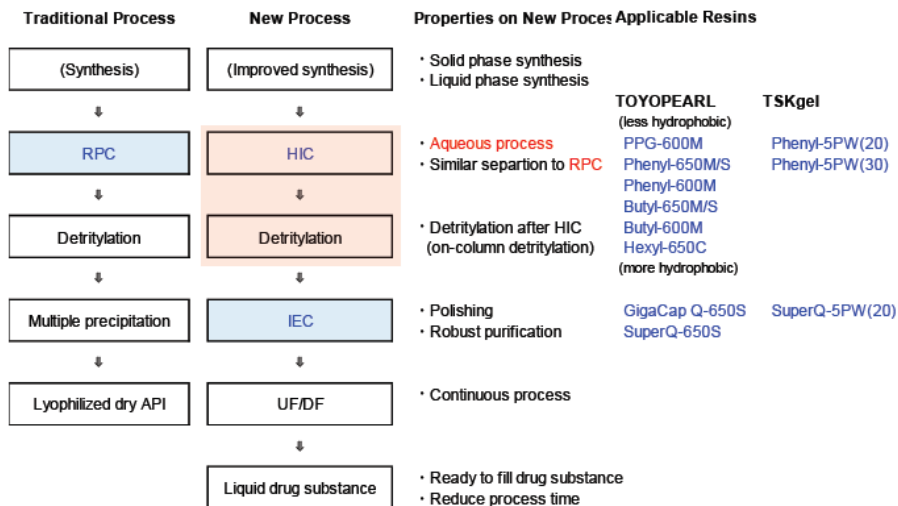
- 三种填料都可获得超过 89 % 回收率和 98.7 % 纯度
- TOYOPEARL Phenyl-650M 效果更好

Ref.; Tosoh Bioscience LLC Application Note No. 117

W. E. Evans et al., TIDES 2020, poster

四、 疏水-离子交换 (HIC-IEC)

HIC-IEC 工艺; 采用水相体系替代RPC工艺



Reference

Hybridon Inc., Patent WO 98/01288 (1996)

K. Ruanjajkaen et al., presentation by BioProcess International West (2017), San Francisco, USA

Biogen MA Inc., Patent WO 2017/218454 A1 (2017)

小结:

- 离子对反相色谱 (IP)-(RPC)法广泛应用于纯化治疗性寡聚核苷酸。
- 然而，由于需要使用有机溶剂，除了成本高以外，RPC 工艺在安全性和环保方面也有问题。
- 近年来，由于载量更高和杂质去除较好的优点，阴离子交换法 (AIEC) 被广泛采用。
- 最近，使用水相溶剂和仅使用少量有机溶剂的疏水色谱模式 (HIC) 的应用已有报道，其原理类似反相色谱。
- HIC-IEC 工艺已有报道可有效纯化治疗性寡聚核苷酸。
- AEC 模式中的 TSKgel SuperQ-5PW(20) 和 TOYOPEARL GigaCap Q-650S/SuperQ-650S 填料可有效纯化治疗性寡聚核苷酸。
- HIC 模式中的 TOYOPEARL Phenyl-650S 及其他级别填料也可有效纯化治疗性寡聚核苷酸。

下一次，会给大家介绍核酸药物的色谱分析。

如果您有任何问题，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