

寡核苷酸的药物分析研究现状与进展

乙 冉¹ 李永建² 张 利¹

1 江苏恒瑞医药股份有限公司

2 江苏暨明医药科技有限公司 江苏连云港 222000

摘要: 寡核苷酸是一类 20 个左右碱基的短链核苷酸总称。寡核苷酸极易与互补链融合,因此在临床上常用于确定 DNA 或 RNA 的结构。除此之外,寡核苷酸还能在 RNA 水平上对疾病基因转录和翻译过程造成影响,所以现阶段寡核苷酸药物也用于特殊疾病的治疗。寡核苷酸药物本身的结构相对复杂,导致治疗机制与作用的研究面临极大的阻碍。为了更好地开发药物,有效的药物分析十分关键。医疗行业的不断发展促使寡核苷酸药物分析技术呈现多元化,不同的分析技术优缺点也存在明显的差异性。本文从寡核苷酸药物分类以及寡核苷酸药物分析技术两个方面进行综述,以期为相关研究学者提供借鉴和参考。

关键词: 寡核苷酸; 色谱技术; 反相离子对色谱法

Current status and progress in drug analysis of oligonucleotides

Ran Yi¹ Yongjian Li² Li Zhang¹

1 Jiangsu Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.

2 Jiangsu Jiming Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Lianyungang, Jiangsu 222000

Abstract: Oligonucleotides are a general term for short-chain nucleotides of about 20 bases. Oligonucleotides are very easy to fuse with complementary chains, so they are often used in clinical settings to determine the structure of DNA or RNA. In addition, oligonucleotides can also affect the transcription and translation of disease genes at the RNA level, so oligonucleotide drugs are also used to treat special diseases. The relatively complex structure of oligonucleotide drugs poses a great obstacle to the study of their therapeutic mechanisms and effects. Effective drug analysis is crucial for better drug development. The continuous development of the medical industry has led to a diversification of oligonucleotide drug analysis technologies, and different analysis technologies have significant differences in advantages and disadvantages. This article reviews oligonucleotide drug classification and oligonucleotide drug analysis technology, in order to provide reference and guidance for relevant researchers.

Keywords: oligonucleotide; Chromatographic technology; Reversed phase ion pair chromatography

前言

现今临床治疗中常常用人工合成的寡核苷酸对某些疾病进行治疗。人工合成的寡核苷酸不容易被降解,并且具有极高的特异性,能够对基因表达过程进行直接调控,治疗效果十分理想。和其他的治疗药物相比,寡核苷酸根据靶基因的一级序列就可以快速筛选出候选对象,并且在此基础上设计出具有更高特异性的先导化合物,强化治疗针对性,以此达到预期治疗效果。现阶段研究领域对寡核苷酸药物的研究还需要进一步加深,在这个研究过程中,药物分析技术发挥极大的作用,药物分析技术促使研究人员对寡核苷酸药物有更加透彻的了解,这就对药物开发提供了有效的依据。

一、寡核苷酸药物分类

寡核苷酸药物作为治疗药物候选的研究已经有三十多年,这期间研究领域开展了大量的临床试验。现阶段寡核苷酸药物主要被分为八类,分别是反义寡核苷酸、小分子干扰核糖核酸、核酶、脱氧核酶、反基因、转录因子、转录因子诱导以及核酸适配体。八个类型中,反义寡核苷酸和小分子干扰核糖核酸的应用最为广泛,并且已经被开发为基因治疗药物。截至 2021 年,临床上已经有 14 种寡核苷酸药物被正式使用, FDA 批准的寡核苷酸药物分别是 fomivirsen (Vitravene)、pegaplamb (Macugen)、mipomersen (Kynamro)、defibrotide (Defiteelio)、eleplinsen (Exondlysi)、musinersen (Spinraza)、patisiran (Onoattro)、nolersen (Tegsedi)、givosiran (Givlaari)、golodirsen (Vyondlysi 53)、viltolarsen (Viltepso)、umasiran (Oxluno)、inelisiran

(Leavio TM) 以及 casimersen (Amondys 45), 其中 8 种药物为反义寡核苷酸, 4 种药物为小分子干扰核糖核酸。Hudspeth Michelle 等人 (2022) 在研究中对 14 种寡核苷酸药物进行分析, 认为这 14 种寡核苷酸药物在临床得到非常广泛的应用, 主要用于遗传性疾病以及特殊罕见疾病的治疗。寡核苷酸药物还处于研发阶段, 未来有极大的发展前景^[1]。

二、寡核苷酸药物分析技术

(一) 反相离子对色谱法

寡核苷酸药物的负电性较为强烈, 反相离子对色谱法可以更为有效地进行药物分析。Liu Aowen 等人 (2022) 在研究中就离子对试剂作用展开探究, 经研究认为反相离子对色谱法在寡核苷酸药物分析中得到广泛应用, 想要达到更为理想的分析效果, 就需要注重离子对试剂的选择以及试剂在流动相中的浓度。现阶段应用较为广泛的离子对试剂是三乙胺和六氟-2-丙醇, 两种试剂可以联合使用, 不仅可以减少试剂用量, 同时还能在更短的时间内完成药物分析^[2]。Becette Owen B 等人 (2022) 在研究中以反义寡核苷酸为研究对象探究药物分析技术, 最终认为反相离子对色谱法是寡核苷酸药物分析时一种非常有效的技术, 在实际操作中可以通过色谱柱来进行分析, 最常用的色谱柱是 C₁₈ 柱, 该色谱柱的分离效果较好, 受到离子对试剂种类和浓度的影响较小。Harikai Naoki 等人 (2022) 在研究中对 fomivirsen 进行相应药物分析, 认为反相离子对色谱法分析寡核苷酸药物时会受到柱温和流速的影响。温度会影响到生物大分子的传质速率, 进而影响到柱效, 对分离效果产生影响。

(二) 离子交换色谱法

一般情况下, 离子交换色谱法会应用于单链和双链寡核苷酸药物分析中。Li Pei 等人 (2022) 在研究中对反义寡核苷酸进行药物分析, 经研究发现离子交换色谱法可以用于寡核苷酸药物分析, 但是因为该分析技术流动相中往往会包含不挥发的盐, 所以无法与质谱兼容, 这就在一定程度上影响了该方法的推广和发展^[3]。Nagornov Konstantin O 等人 (2021) 在研究中利用离子交换色谱法对寡核苷酸药物进行分析, 认为离子交换色谱法分析寡核苷酸药物时可以利用阴离子交换柱对杂质进行相应的降解, 然而降解效果也会受到其他因素的影响, 例如柱温、缓冲盐种类及浓度、PH 值等等, 因此在实际应用时要注重这些因素的控制。Sablotsky Julia 等人 (2021) 在研究中探究色谱柱对反义寡核苷酸药物的影响, 基于研究认为离子交换色谱法在分析寡核苷酸药物时依靠电荷差异性实现分离, 如果主要成分与杂质电荷没有差异或者差异较小时则无法实现分离, 因此要选择更为合适的色谱柱, 以保证电荷差异, 确保分离效果更为理想。

(三) 亲水相互作用色谱法

亲水相互作用色谱法是一种用于分离极性或者电离

分析物的液相色谱技术。Kotapati Srikanth (2021) 在研究中探究亲水相互作用色谱法在寡核苷酸治疗药物分析中的作用, 认为亲水相互作用色谱法是一种替代反相离子对色谱法的寡核苷酸药物分析方法, 该分析技术弥补了离子对试剂电离抑制导致 MS 信号强度降低的缺点。Rong Liu 等人 (2020) 在研究中对亲水相互作用色谱法在低聚核苷酸药物分析中的应用, 得出结论亲水相互作用色谱法对寡核苷酸药物进行分析时, HILIC-MS 可以在 DNA 寡聚体、修饰和未修饰的寡核糖核苷酸以及取代 PS-DNA 寡聚体分析时进行相应的应用, 并且 HILIC-MS 灵敏性和可靠性更高, 整体实用性更强, 同时也可以用于寡核苷酸定性和定量分析^[4]。Li Pei 等人 (2020) 对亲水相互作用色谱法分析寡核苷酸药物展开研究, 认为亲水相互作用色谱法在分析寡核苷酸药物时可以与紫外线联合使用, 可以得到更为理想的分析效果。和其他的分析技术相比, 亲水相互作用色谱法具有更强的优势, 并且还可以与质谱兼容, 应用较为广泛^[5]。

(四) 混合模式液相色谱法

混合模式液相色谱法是一种应用多种作用力使溶质在固定相上进行保留和分离的色谱方法。Sutton James Michael 等人 (2020) 在研究中利用混合模式液相色谱法分析寡核苷酸药物, 得出结论在寡核苷酸药物分析中, 混合模式液相色谱法较单一模式色谱具有更强的优势, 具有高选择性、高负载量等优点。然而分离效果也会受到一定的影响, 在实际操作时要注重影响因素的控制, 以保证最佳的分离效果。Ji Yuhuan 等人 (2019) 在研究中探究寡核苷酸药物分析技术, 认为在混合模式液相色谱法中, 烷胺和氟醇流动相与带电杂化颗粒的固定相并不相容, 进而在药物分析时会导致固定相被水解, 最终分离效果受到影响。基于此, 混合模式液相色谱法分析寡核苷酸药物时要合理选择流动相, 以保证峰形稳定。Fandozzi Christine 等人 (2019) 在研究中梳理寡核苷酸药物分析技术, 认为混合模式液相色谱法分析寡核苷酸药物时可以使用反相/弱阴离子交换剂固定相, 该固定相的功能相对较多, 可用于更多类型药物的分析。和反相离子对色谱法相比, 混合模式液相色谱法固定相提高了对结构相近寡核苷酸药物的分离。

(五) 二维液相色谱法

二维液相色谱法在反相离子对色谱法无法达到理想分离效果时使用, 因此该分析方法通过正交分离改善整体分离效果。Langsted Anne 等人 (2019) 在研究中对反义寡核苷酸药物展开研究, 认为二维体系是亲水相互作用色谱柱的二维液相色谱, 在分析寡核苷酸药物时可以通过与高分辨质谱串联对寡核苷酸药物杂质进行定量和高灵敏度鉴别。该方法可以进一步分离其他杂质, 进而保证最佳的分析效果。Fogacci Federica 等人 (2019) 在研究中采用二维液相色谱法分析 Mipomersen, 认为反相离子对色谱法属于第一维方法, 而毛细管电泳属于第二

维方法, 二维液相色谱法在分析寡核苷酸药物时可以分离出长达 35 个碱基的寡核苷酸^[6]。Ioanna Gouni Berthold 等人(2017)在研究对 Mipomersen 展开分析, 认为大多数寡核苷酸药物经过一维色谱就可以达到理想的分析效果, 但是极个别较为复杂的寡核苷酸药物仍旧需要采用二维液相色谱法, 可以保证杂质被更为有效地分离。

三、结语

寡核苷酸药物在疾病治疗中有极高的应用价值。现有研究成果均显示该药物具有特异性干扰基因表达的能力, 这种效果促使许多疾病的治疗成为可能, 目前临床上对药物的开发还需要进一步地深入。寡核苷酸药物结构复杂导致药物分析困难, 然而随着各种技术的出现, 寡核苷酸药物分析现状得到改善。不同的药物分析技术优缺点存在明显的差异性, 并且在实际运用过程中, 操作人员也需要注重技术的各种注意事项, 才能保证更为有效地分析结果, 促使分析结果为药物研发提供更为准确的依据。

参考文献:

[1]Hudspeth Michelle、Mori Shahram、Nachbaur David

等人. 在异基因造血细胞移植后预防急性移植物抗宿主病的标准护理预防中加入降纤肽的 2 期前瞻性、随机、开放标签研究 [J]. 血液学, 2022,18(13):114-115.

[2] 刘奥文, 程明, 周一璇等. 寡核苷酸的 LC-MS 生物分析: 离子对试剂的作用和无离子对分析策略的最新进展 [J]. 国际分子科学杂志, 2022,23(14):169-170.

[3] 李佩, 杜普斯·让弗朗索瓦、维罗尼斯·瓦莱丽等. 杂交液相色谱 - 串联质谱法用于反义寡核苷酸定量生物分析的验证和应用 [J]. 生物分析, 2022,10(10):166.

[4] 刘蓉, 罗青, 刘仲秋等. 通过液相色谱 - 串联质谱法优化寡核苷酸生物分析的样品制备工作流程 [J]. 色谱杂志 A, 2020,12(08):129.

[5] 李佩、龚玉清、金在赫等. 杂交液相色谱 - 串联质谱: 血浆和组织样品中反义寡核苷酸定量的另一种生物分析方法 [J]. 分析化学, 2020,92(15):133-134.

[6]Fogasci Federica, Ferri Nicola, Toth Peter P 等人. Mipomersen 的疗效和安全性: 随机临床试验的系统回顾和荟萃分析 [J]. 药物, 2019,79(7):177.