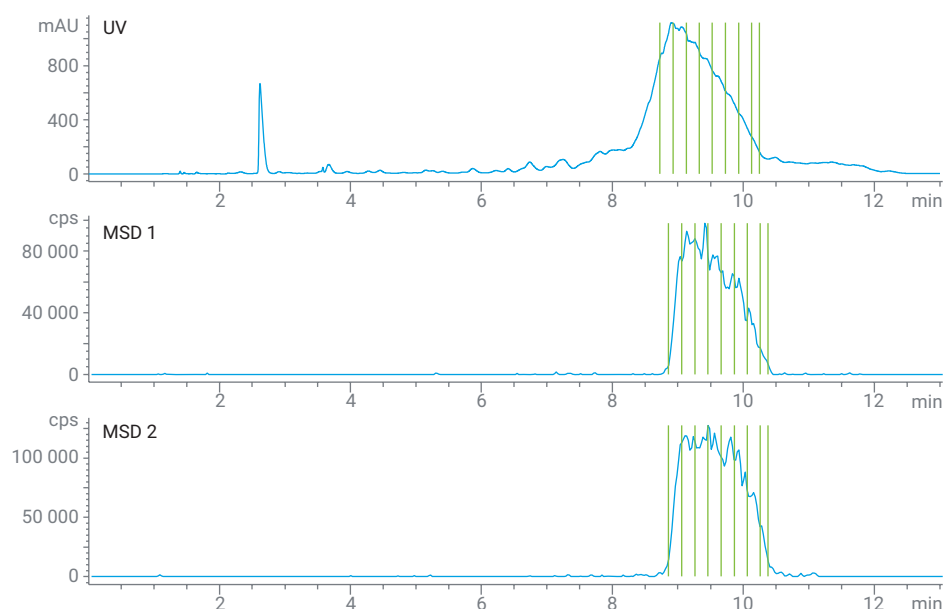


Schnelle und selektive Aufreinigung von Oligonukleotiden mittels präparativer HPLC/MS mit Software-Unterstützung



Autor

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Synthetische Oligonukleotide mit weniger als 100 Nukleotiden werden in der Regel mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert und aufgereinigt. Um eine höhere Selektivität zu erreichen, ist häufig die massenselektive Detektion (MSD) erwünscht, obwohl diese Methode hochreine, teure Reagenzien wie Hexafluorisopropanol (HFIP) erfordert. Diese Application Note beschreibt eine Methode zur Aufreinigung, die Dibutylamin (DBA) und Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) verwendet und trotzdem eine Fraktionssammlung ermöglicht, die durch ein MSD-Signal ausgelöst wird. Mit der Software-Unterstützung und den Agilent AdvanceBio Oligonucleotide-Säulen mit oberflächenporösen Partikeln wurden die Zielsubstanzen im Vergleich zu herkömmlichen Methoden schneller und mit höherer Reinheit gesammelt.

Einleitung

In den vergangenen Jahren sind synthetische Oligonukleotide wie Aptamere, Guide-RNA, small interfering RNA und Antisense-Oligonukleotide in den Fokus von biowissenschaftlicher und diagnostischer Forschung getreten. Diese Moleküle haben typischerweise eine Kettenlänge von weniger als 100 Nucleotiden und können daher mittels Ionenpaar-Umkehrphasen(IP-RP)-HPLC analysiert werden. Diese Methode wurde auch bereits für die Aufreinigung von Oligonukleotiden erfolgreich angewendet.¹ Um in Analysen mit MSD eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen, werden die Ionenpaarreagenzien Triethylamin (TEA) und HFIP als Standard angesehen. Die Aufskalierung von Methoden auf präparative Bedingungen erfordert allerdings große Mengen des teuren HFIP, was die Anwendung limitieren kann.

Diese Application Note stellt eine Methode zur präparativen Aufreinigung unter Verwendung von DBA und TRIS als Ionenpaarreagenz und zur Einstellung des pH-Werts vor. Für DBA wurde in der Literatur² bereits gezeigt, dass dieses Ionenpaarreagens bei kurzkettingen Oligonukleotiden eine höhere Auflösung erzielt als TEA, während TRIS das teure HFIP ersetzt.

Experimentelles

Geräte

Alle Experimente wurden auf einem Agilent 1290 Infinity II autoskalierenden, präparativen LC/MSD-System ausgeführt, das aus den folgenden Modulen bestand:

- Agilent 1290 Infinity II präparative binäre Pumpe (G7161B).
- Agilent 1260 Infinity II quaternäre Pumpe (G7111B) mit aktiver Kolbenhinterspülung und Aktiveinlassventilen (Optionen 030 und 032).

- Agilent 1290 Infinity II präparativer Open-Bed-Probengeber/-Sammeler (G7158B) mit präparativer 5-ml-Probenschleife (Option 241).
- Agilent 1260 Infinity II Multiwellenlängendetektor (G7165A) mit präparativer Durchflusszelle (0,3 mm) (Option 084).
- Agilent 1260 Infinity II Diodenarray-Detektor WR (G7115A) mit Standarddurchflusszelle (10 mm) (Option 018).
- Agilent 1260 Infinity II präparativer Ventil-Fraktionssammeler (G7166A).
- Agilent 1290 Infinity II MS-Flussmodulator (G7170B).
- Agilent 1290 Infinity Ventiltrieb (G1170A) mit 2-Positionen-/14-Anschlüsse-Ventil (G4738A).
- Agilent 1290 Infinity II Modul für präparative Säulen (G7163B).
- Agilent 1260 Infinity II Organizer für Verzögerungsschleifen (G9324A) mit Knitted Delay Coils für 15 bis 40 ml/min (210).
- Agilent LC/MSD XT-System (G6135B).

Säulen

- Analytische Säule: Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3 × 100 mm, 2,7 µm (Bestellnummer 695975-502).
- Präparative Säule: Agilent AdvanceBio Oligonucleotide-Säule, 21,2 × 150 mm, 4 µm (Bestellnummer 671150-702).

Software

- Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition für LC- und LC/MS-Systeme, Version C.01.10 [287] oder spätere Versionen.
- Agilent Software für die automatisierte Aufreinigung für OpenLab ChemStation, Version A.01.08 [043] oder spätere Versionen.

Chemikalien und Lösemittel

Acetonitril (ACN) mit Reinheitsgrad für HPLC-Gradienten, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) > 99,9 %, analysenreine Salzsäure (37 %), HPLC-reines Butylamin (DBA) und Hexylamin (HA) wurden von VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Analysenreines Hexafluorisopropanol (HFIP) wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Frisches Reinstwasser wurde einem Milli-Q Integral-System entnommen, das mit einer Entnahmeeinheit mit 0,22-µm-Membran (Millipore Sigma, Darmstadt, Deutschland) ausgestattet war.

Proben

Zwei Proben von DNA-Oligonukleotiden mit einer Länge von 30 bis 50 Basen wurden von einem Kunden zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen der Proben betragen 3,1 mM in 20 mM PBS für das kurze Oligonukleotid bzw. 1,6 mM in Wasser für das lange Oligonukleotid. Beide Proben wurden ohne Verdünnung oder Probenvorbereitung injiziert.

Vor der Aufreinigung wurden beide Proben mittels HPLC/MS-Trennmethode (HA/HFIP-Methode, vgl. Tabelle 1) analysiert. Diese Methode ist eine typische Qualitätskontrollmethode, die die Reinheit des synthetisierten Produkts sowie die Zielsubstanzmasse, die für die Aufreinigung verwendet werden soll, liefert. Um eine optimierte Aufskalierung durch die Agilent Software für die automatisierte Aufreinigung zu ermöglichen, müssen die analytische und die präparative Methode jeweils die gleiche mobile Phase und die gleiche Säulenchemie verwenden. Aus diesem Grund wurde eine andere Methode angewandt (DBA-TRIS-Methode, vgl. Tabelle 2), die bei der hohen, für die Aufreinigung verwendeten Flussrate nicht das teure Reagens HFIP erfordert. Diese zweite Methode ist nicht mit der Massenspektrometrie kompatibel, da der TRIS-Puffer nicht flüchtig ist. Dennoch kann eine massenbasierende Fraktionssammlung durchgeführt werden, da unter Verwendung eines aktiven Splitters und eines flüchtigen Make-up-Lösemittels nur ein geringer Teil des Flusses zum massenselektiven Detektor transportiert wird.

Die beste Wahl für die Analyse von Oligonukleotiden mit bis zu 100 Nukleotiden ist eine Säule der Reihe Agilent AdvanceBio Oligonucleotide-Serie. Diese Säulen basieren auf der Agilent InfinityLab Poroshell-Technologie. Sie enthalten oberflächenporöse Partikel mit einer bei hohen pH-Werten stabilen Beschichtung (HPH). Abgesehen von

der Kompatibilität mit hohen pH-Werten und Temperaturen wird jede Charge der AdvanceBio Oligonucleotide-Säulen einer Qualitätskontrolle unterzogen, sodass die Trennung von Oligonukleotiden mit n Nukleotiden von solchen mit n-1 Nukleotiden erzielt wird. Mit der Aufnahme von analytischen Scalar- und präparativen Säulen mit 21,2 mm

Innendurchmesser in die Produktfamilie der AdvanceBio Oligonucleotide-Säulen können hochauflösende analytische Methoden jetzt einfacher auf präparative Bedingungen übertragen werden. Die Verwendung der gleichen stationären Phase sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab reduziert erforderliche Methodenanpassungen und erhöht die Zuverlässigkeit des Methodentransfers.

Methodeneinstellungen

Tabelle 1: Chromatographiebedingungen für analytische Läufe, HA/HFIP-Methode.

Parameter	Analytische Läufe
Mobile Phase	A) Hexylamin 15 mM + HFIP 200 mM in H ₂ O (pH ca. 8,3) B) Methanol
Flussrate	0,8 ml/min
Gradient	Zeit (min) %B 0 50 7 71 8 100 9 100 9,5 50
Stoppzeit	11 min
Injektionsvolumen	2 µl
Methodenvoreinstellung Probengeber	Voreinstellung 1: Polare Probenmatrix 180 µl Schleifenlösemittel
Temperatur	Umgebungstemperatur
UV-Detektion	260 nm 10 Hz Datenrate
MS-Detektion	Negativer Scan m/z 500 bis 3 000

Tabelle 2: Chromatographiebedingungen der analytischen und präparativen Läufe, DBA-TRIS-Methode.

Parameter	Analytische Läufe	Präparative Läufe
Mobile Phase	A) TRIS-HCl, pH 8,3, 75 mM DBA in 7,5 % ACN B) TRIS-HCl, pH 8,3, 75 mM DBA in 80 % ACN	
Flussrate	0,8 ml/min	25 ml/min
Gradient	Von der Software berechnete Scouting-Gradienten und fokussierte Gradienten	
Injektionsvolumen	2 µl	1 000 µl
Methodenvoreinstellung Probengeber	Voreinstellung 1: Polare Probenmatrix 180 µl Schleifenlösemittel	Voreinstellung 1: Polare Probenmatrix 800 µl Schleifenlösemittel
Temperatur	Umgebungstemperatur	Umgebungstemperatur
UV-Detektion	260 nm 10 Hz Datenrate	
MS-Detektion	Negativer Scan m/z 500 bis 3 000	Negativer Scan m/z 500 bis 3 000 EIC von der Software auf der Basis der Zielsubstanzmasse ausgewählt
Splitverhältnis zum MSD	Kompletter Fluss	500:1 (Modus M1) Aktiv von 12 bis 24 min
Fraktionssammlung	Nicht zutreffend	Peakbasierender Fraktionierungsmodus, UV-kombiniert mit MSD-Signal durch logische Verknüpfung UND UV-Schwellenwert: 10 mAU UV-Aufwärtssteigung: 2 mAU/s UV-Abwärtssteigung: 1 mAU/s MSD-Schwellenwert: 2 000 cps

Tabelle 3: Einstellungen der MSD-Zerstäuberkammer und der Fraktionssammlung.

Parameter	Wert
Makeup-Lösemittel	0,1 % Ameisensäure in Methanol/Wasser (70/30)
Makeup-Fluss	1,5 ml/min
Ionenquelle	Agilent Elektrospray-Ionenquelle (ESI)
Zerstäubendruck	40 psig
Trocknungsgas-temperatur	350 °C
Trocknungsgasstrom	13,0 l/min
Kapillarspannung	-3 000 V
Scanbereich	500 bis 3 000 m/z
Zielsubstanzmasse (m/z)	Kurzes Oligonukleotid: 2 674,7; 2 139,8 Langes Oligonukleotid: 2 718,0; 2 264,1
Ionische Spezies	[M-H] ⁻ , [M-2H] ²⁻ , [M-3H] ³⁻

Ergebnisse und Diskussion

Beide Oligonukleotidproben wurden im analytischen Maßstab erfolgreich unter Verwendung einer HPLC/MS-Methode und dem analytischen Pfad des 1290 Infinity II autoskalierenden, präparativen LC-Systems analysiert. Der optimierte Gradient von 50 bis 71 % B trennte das Produkt in voller Länge (full-length product, FLP) von unvollständigen Oligonukleotid-Fragmenten. Abbildung 1 zeigt ein UV-Chromatogramm und das Totalionen-Chromatogramm der Trennung des kurzen Oligonukleotids von seinen Fragmenten. Die Trennung des langen Oligonukleotids von seinen Fragmenten ist in Abbildung 2 gezeigt. Das lange Oligonukleotid scheint weniger rein zu sein als das kurze.

Unabhängig davon wurden beide Proben gut genug aufgetrennt, um das jeweilige Produkt in voller Länge zu identifizieren. Auf der Grundlage dieser analytischen Trennungen wurde das Massenspektrum bei der Elutionszeit des FLP extrahiert. Das in OpenLab ChemStation integrierte Dekonvolutionstool berechnete das Molekulargewicht der Produkte in voller Länge und verband die Signale im Spektrum mit der Anzahl der Ladungen (Abbildung 3 und 4). Die identifizierten, mehrfach geladenen Ionen konnten dann in präparativen Läufen zum Auslösen der Fraktionssammlung verwendet werden.

Für die Aufreinigung der beiden Oligonukleotide wurde die Methode so geändert, dass mobile Phasen verwendet wurden, die DBA als Ionenpaarreagens und TRIS als Puffersubstanz enthielten. Obwohl TRIS nicht MS-kompatibel ist, wurden die Ziel-Oligonukleotide detektiert, und im präparativen Lauf wurden auf der Basis der MSD-Signale Fraktionen gesammelt. Dies wurde durch das aktive Splitting des Gesamtflusses und das Zuführen des Splitflusses in das MS zusammen mit einem kompatiblen Makeup-Lösemittel erreicht. Die Flussrate wurde auf 25 ml/min angepasst, um dem größeren Innendurchmesser und der Partikelgröße der präparativen Säule Rechnung zu tragen. Der Gradient wurde ebenfalls geändert: Von der Agilent Software für die automatisierte Aufreinigung wurde ein linearer Gradient für die analytische Erprobung erstellt. Analog dazu wurde von der Software ein auf der Auswahl des Zielpeaks in den analytischen Ergebnissen basierender, fokussierter Gradient für die optimierte präparative Trennung berechnet.

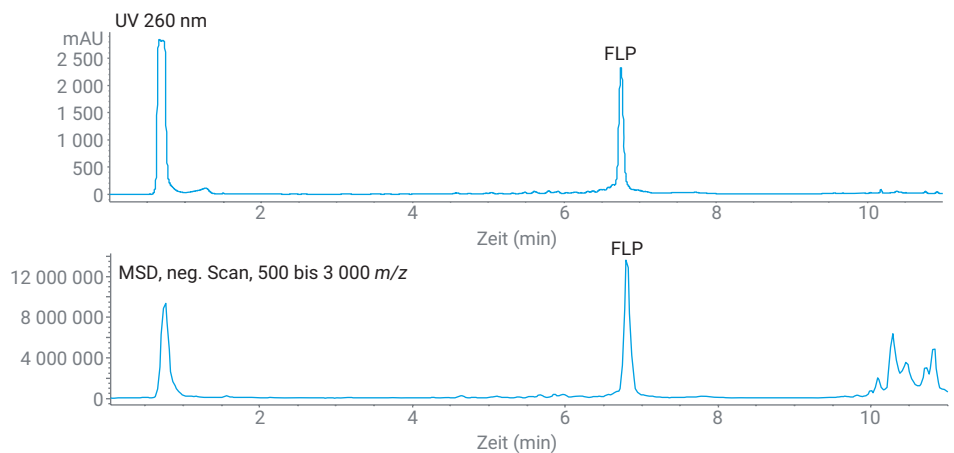


Abbildung 1: Trennung des kurzen Oligonukleotids mit HA/HFIP und einem optimierten Gradienten.

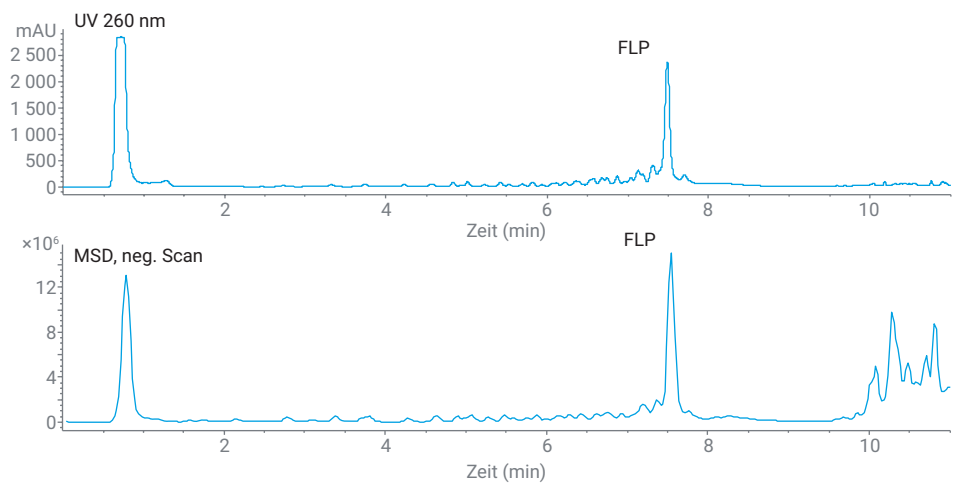


Abbildung 2: Trennung des langen Oligonukleotids mit HA/HFIP und einem optimierten Gradienten.

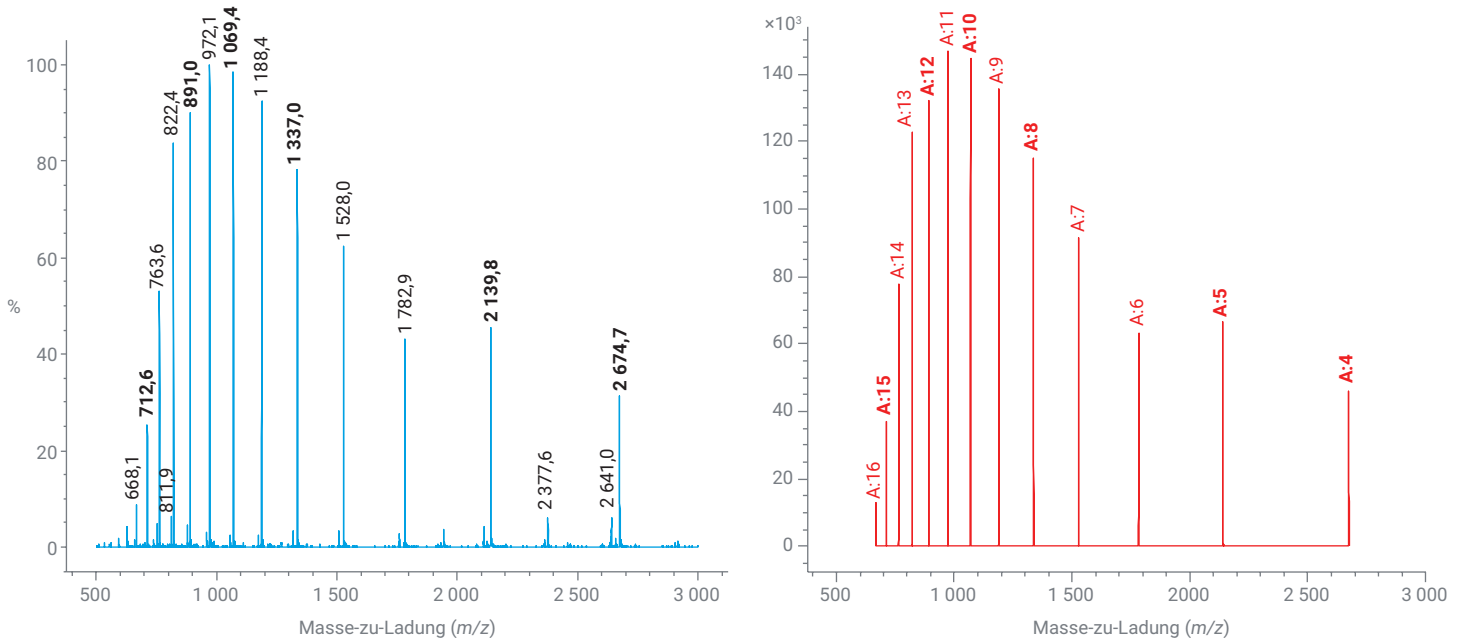


Abbildung 3: Spektrum und mehrfach geladene Ionen (A: Anzahl der Ladungen) des kurzen Oligonucleotids, durch Dekonvolution berechnet. Das berechnete Molekulargewicht des Produkts in voller Länge (full-length product, FLP) betrug 10 704 Da. Ionen, die als Fraktionsauslöser verwendet wurden, sind fett gedruckt.

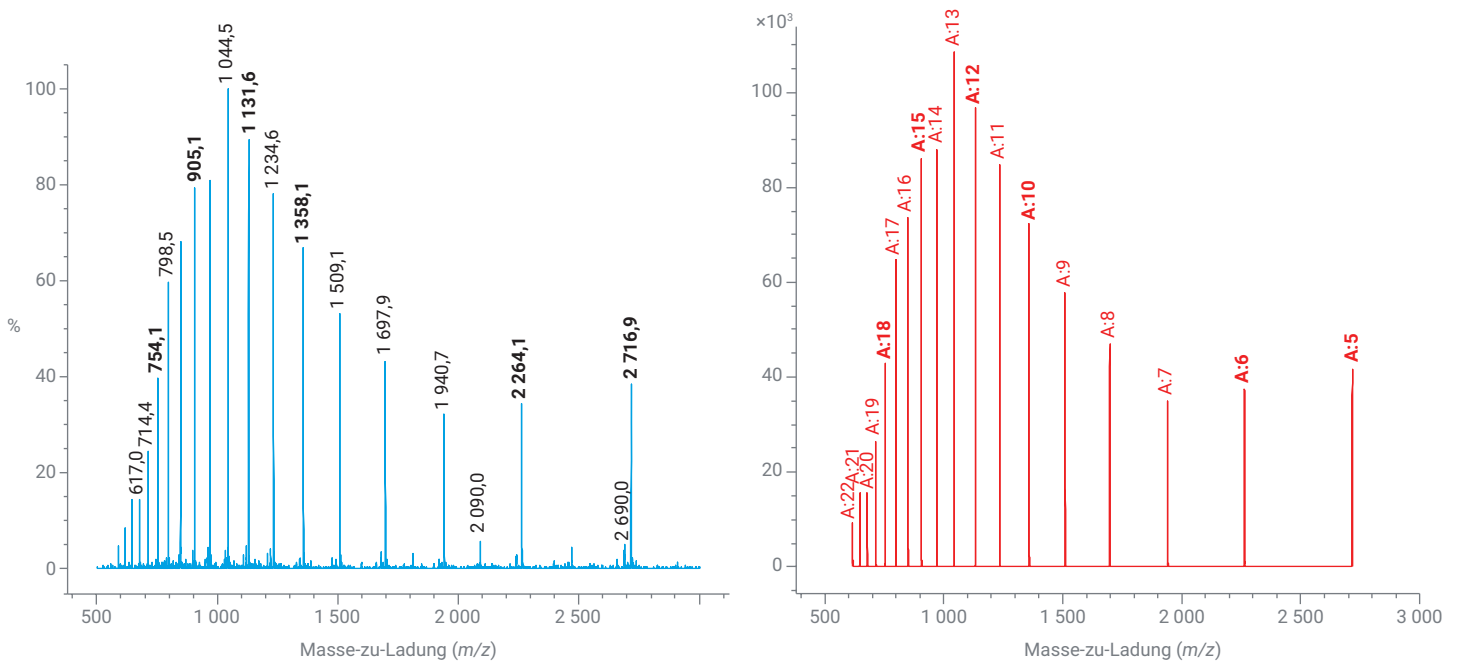


Abbildung 4: Spektrum und mehrfach geladene Ionen (A: Anzahl der Ladungen) des langen Oligonucleotids, durch Dekonvolution berechnet. Das berechnete Molekulargewicht des Produkts in voller Länge (full-length product, FLP) betrug 13 592 Da. Ionen, die als Fraktionsauslöser verwendet wurden, sind fett gedruckt.

Die Chromatogramme der analytischen Trennungen mit DBA/TRIS sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass es nicht das Ziel des analytischen Gradienten war, eine möglichst hohe Auflösung zu erzielen, sondern die Lösemittelbedingungen bei der Retentionszeit des Zielpeaks zu bestimmen. Um diese Berechnung zu starten, wählt der Benutzer den Peak im Chromatogramm aus und klickt auf **Assign As Target** (Als Ziel zuweisen). Die Agilent Software für die automatisierte Aufreinigung berechnet dann nicht nur den Elutionspunkt des Zielpeaks, sondern erstellt einen gesamten Gradienten zur Optimierung der Trennung der Zielsubstanz von den Fragmenten. Für diesen Gradienten kann eine Feinabstimmung vorgenommen werden, z. B. um zu steuern, ob die Zielsubstanz im Zentrum des fokussierten Gradienten oder eher an seinem Ende eluieren soll, um früh eluierenden Verunreinigungen mehr Zeit zur Elution zu verschaffen. Der Gradient, der zur Aufreinigung des kurzen Oligonukleotids verwendet wurde, ist in Abbildung 7 dargestellt.

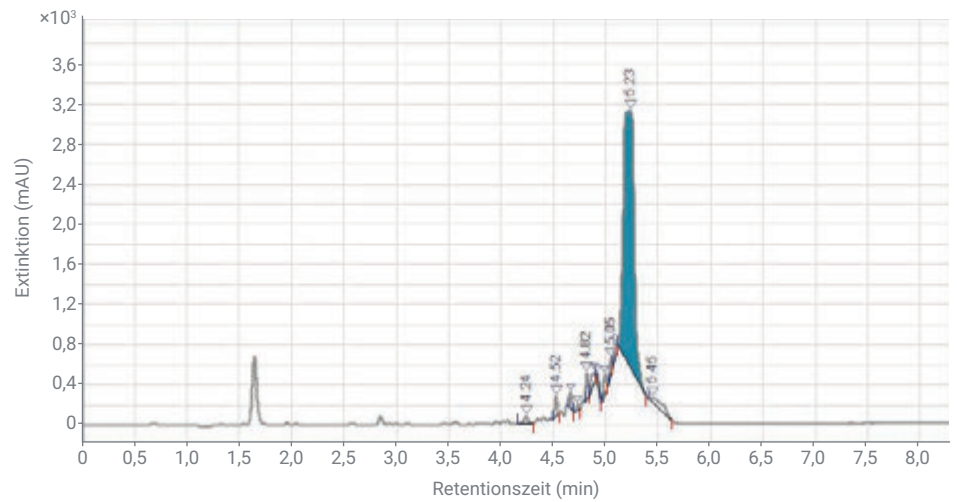


Abbildung 5: Trennung des kurzen Oligonukleotids mit DBA/TRIS und einem generischen Gradienten. Das FLP ist blau markiert.

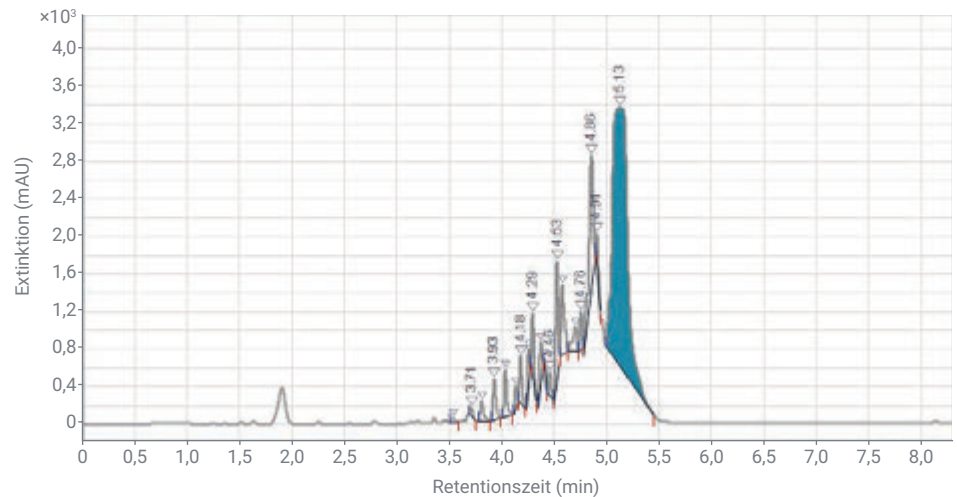


Abbildung 6: Trennung des langen Oligonukleotids mit DBA/TRIS und einem generischen Gradienten. Das FLP ist blau markiert.

Vor dem Start der Aufreinigung mit dem fokussierten Gradienten müssen die Zielsubstanzmassen, die die Fraktionssammlung auslösen sollen, definiert werden. Für jedes Oligonukleotid wurden zwei Zielsubstanzmassen ausgewählt, die für das kurze Oligonukleotid $[M-4H]^{4-}$ und $[M-5H]^{5-}$ und für das lange Oligonukleotid $[M-5H]^{5-}$ und $[M-6H]^{6-}$ entsprechen (vgl. Abbildung 3 und 4). Mit der Aktivierung der automatisierten Auslösung durch doppelt oder dreifach geladene Zielsubstanzmassen würde die Fraktionssammlung für das kurze Oligonukleotid auch durch $[M-8H]^{8-}$, $[M-10H]^{10-}$, $[M-12H]^{12-}$ und $[M-15H]^{15-}$ und für das lange Oligonukleotid auch durch $[M-10H]^{10-}$, $[M-12H]^{12-}$, $[M-15H]^{15-}$ und $[M-18H]^{18-}$ ausgelöst werden. Abbildung 8 zeigt die präparative Trennung und die Fraktionssammlung für das kurze Oligonukleotid. Es wurden Fraktionen von acht Zeitintervallen gesammelt; sie wurden erfolgreich durch das MSD-Signal ausgelöst. Die obere Darstellung mit dem UV-Signal (Fraktionsmarkierungen sind für die unterschiedlichen Verzögerungszeiten korrigiert) zeigt die verbesserte Selektivität durch die MS-Detektion. Wäre nur das UV-Signal für die Auslösung der Fraktionssammlung verwendet worden, hätte die Sammlung zu früh begonnen und viele der Verunreinigungen wären ebenfalls gesammelt worden. Das Auslösen auf Basis des MSD-Signals reduziert die Anzahl an Fraktionen, die untersucht, vereint und getrocknet werden müssen. Dies führt zu Fraktionen mit größerer Reinheit und zu einem insgesamt schnelleren Aufreinigungsverfahren. Der Aufreinigungslauf für das lange Oligonukleotid ergab ähnliche Ergebnisse mit gesammelten Fraktionen aus 10 Zeitintervallen (nicht gezeigt). Durch die Aufteilung der Fraktionssammlung in Intervalle mit vordefinierter Dauer oder vordefiniertem Volumen ist es möglich, einzelne Fraktionen erneut zu analysieren und diejenigen, die das Produkt enthalten und die Reinheitsanforderungen erfüllen, zu poolen.³

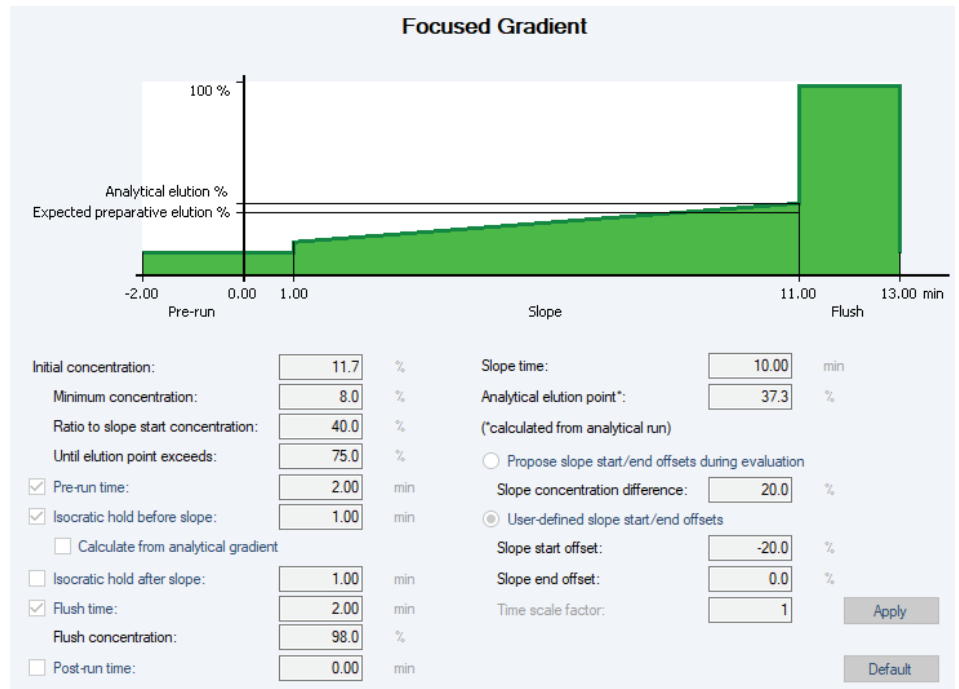


Abbildung 7: Profil des für das kurze Oligonukleotid fokussierten Gradienten, mit Optionen für eine Feinabstimmung.

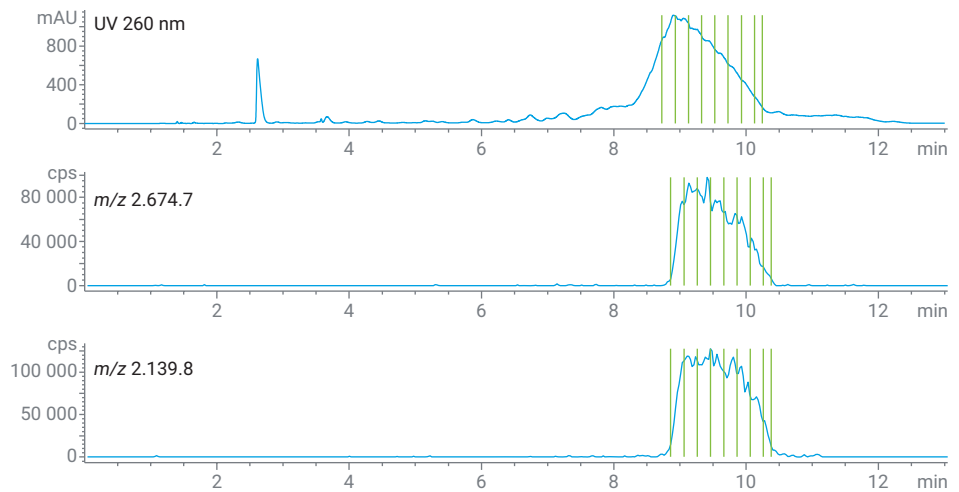


Abbildung 8: Präparative Aufreinigung des kurzen Oligonukleotids mit DBA/TRIS und einem fokussierten Gradienten. Die grünen Linien markieren die Zeitintervalle für die Fraktionssammlung.

Die Ergebnisse der Wiederholungsanalyse der in den acht Zeitintervallen gesammelten Fraktionen der Aufreinigung des kurzen Oligonukleotids sind in Abbildung 9 gezeigt. Die erste Fraktion (blaues Chromatogramm) enthält eine Verunreinigung, die durch den gesplitteten Peak erkennbar ist. Alle anderen Fraktionen sind zu > 99 % rein und können für den endgültigen Produktpool verwendet werden. Die 10 Fraktionen, die bei der Aufreinigung des langen Oligonukleotids gesammelt wurden, wurden ebenfalls erneut analysiert und zeigten ein ähnliches Muster: Die erste Fraktion war teilweise mit Verunreinigungen kontaminiert, während die anderen Fraktionen eine Reinheit von > 99 % aufwiesen (nicht gezeigt). Um eine höhere Produktausbeute zu erzielen, könnten mehr Zeitintervalle mit kürzerer Dauer für die Fraktionssammlung festgelegt werden. Wird eine quantitative Methode für die Wiederholungsanalyse verwendet, kann eine Pooling-Tabelle, die die Reinheit und die Produktmenge enthält, erstellt und verwendet werden, um die Ausbeute für eine gegebene Reinheitsanforderung zu maximieren.³

Schlussfolgerung

Zwei Oligonukleotidproben mit 30 bis 50 Nukleotiden wurden erfolgreich mittels präparativer HPLC mit Fraktionssammlung, die durch MSD-Signale ausgelöst wurde, aufgereinigt. Beide Proben wurden mit einer MS-kompatiblen Methode (HA/HFIP) analysiert. Dies lieferte das für die selektive Auslösung der Fraktionssammlung erforderliche Massenspektrum. Für die präparative Aufreinigung wurde eine andere Methode mit DBA/TRIS verwendet, um das teure Reagens HFIP zu vermeiden. Obwohl TRIS nicht MS-kompatibel ist, ermöglichte ein geeignetes Makeup-Lösemittel im Splitfluss zum MSD eine massenbasierende Fraktionssammlung mit hoher Selektivität und Zuverlässigkeit.

www.agilent.com

DE68918377

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Gedruckt in den USA, 6. Dezember 2022
5994-4877DEE

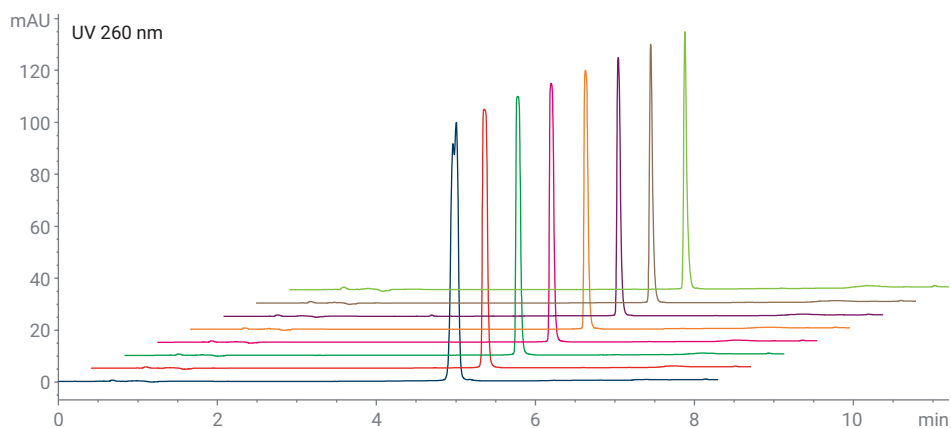


Abbildung 9: Überlagerung der Chromatogramme der Analysen der acht gesammelten Fraktionen der Aufreinigung des kurzen Oligonukleotids.

Die Agilent Software für die automatisierte Aufreinigung verwandelte einen generischen analytischen Gradienten in einen optimierten fokussierten Gradienten, um die präparativen Läufe zu verkürzen und die reinen Verbindungen schneller zu erhalten. Von beiden Oligonukleotiden wurden erfolgreich Fraktionen aus definierten Zeitintervallen gesammelt. Dies ermöglichte die Wiederholungsanalyse und ein selektives Pooling der Fraktionen, die die Reinheitsanforderungen erfüllten. Alle Analysen wurden unter Verwendung von Agilent AdvanceBio Oligonucleotide-Säulen durchgeführt, die eine schnelle und einfache Aufskalierung vom analytischen zum präparativen Maßstab erlauben.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Swedish Knowledge Foundation im Rahmen des KKS-SYNERGY-Projekts „Improved Methods for Process and Quality Controls using Digital Tools“ (Bewilligungsnummer 20210021) unterstützt. Der Autor dankt Olle Ståhlberg, PhD, von Qiagen DNA Synthesis für die zur Verfügung gestellten Oligonukleotidproben.

Literatur

1. Catani, M. *et al.* Oligonucleotides: Current Trends and Innovative Applications in the Synthesis, Characterization, and Purification. *Biotechnology Journal* **2020**, 15, 8.
2. Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis of Oligonucleotides. *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5994-2957EN, **2021**.
3. Purification of Single-Stranded RNA Oligonucleotides Using High-Performance Liquid Chromatography. *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5994-3514EN, **2021**.