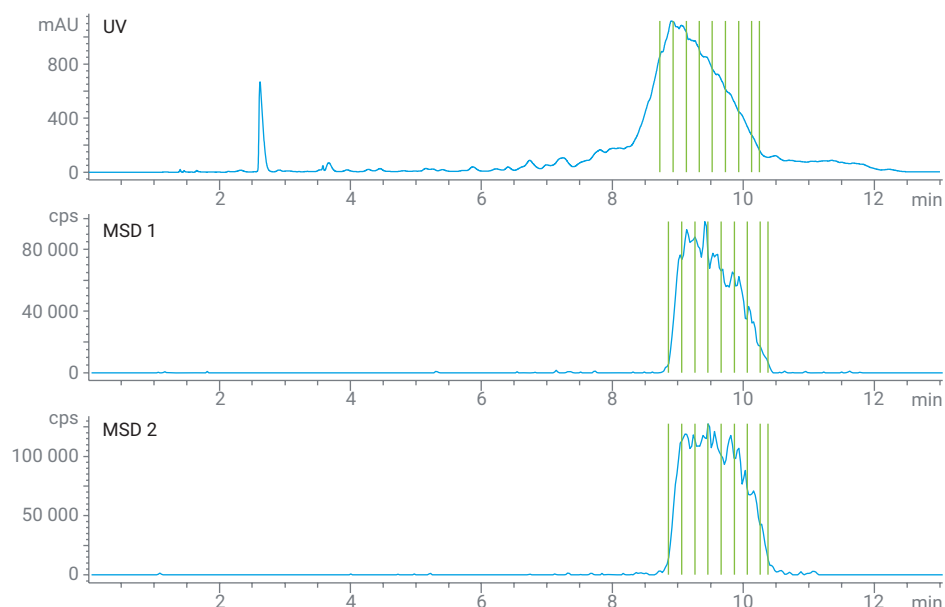


Purification rapide et sélective d'oligonucléotides à l'aide d'un couplage HPLC préparative/spectrométrie de masse et d'une assistance logicielle



Auteur

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Les oligonucléotides de synthèse comprenant moins de 100 nucléotides sont généralement analysés et purifiés à l'aide de la chromatographie liquide haute performance (HPLC). La détection de masse (MSD) est souvent utilisée pour améliorer la sélectivité, bien que cette technique nécessite des réactifs coûteux, de pureté élevée, tels que l'hexafluoroisopropanol (HFIP). Cette note d'application décrit une méthode de purification qui est basée sur la dibutylamine (DBA) et sur le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) et permet tout de même une collecte de fractions déclenchée par un signal de MSD. Grâce à l'assistance logicielle et à l'utilisation des colonnes à particules superficiellement poreuses Agilent AdvanceBio pour oligonucléotides, les composés cibles sont collectés avec une rapidité et une pureté supérieures par comparaison aux méthodes conventionnelles.

Introduction

Au cours des dernières années, la recherche en diagnostic et en sciences de la vie s'est concentrée sur des oligonucléotides (ON) de synthèse tels que les aptamères, les ARN guides, les petits ARN interférents (pARNi) et les ON antisens. Ces molécules présentent typiquement des longueurs de chaînes de moins de 100 nucléotides et peuvent donc être analysées à l'aide de la HPLC en phase inverse d'appariement d'ions (IP-RP). Cette technique a pu également être appliquée pour la purification d'ON¹. La triéthylamine (TEA) et le HFIP sont des réactifs d'appariement d'ions couramment utilisés pour augmenter la sensibilité des analyses par MSD. La transposition de méthodes à l'échelle préparative nécessite toutefois de grandes quantités de HFIP, un solvant coûteux, ce qui peut constituer un facteur limitant.

Cette note d'application présente une méthode de purification préparative faisant appel à la DBA et au TRIS pour l'appariement d'ions et l'ajustement du pH. Il a déjà été démontré qu'une résolution supérieure à celle obtenue avec la TEA pouvait être obtenue avec la DBA pour les ON à chaînes courtes², le TRIS servant de substitut au HFIP coûteux.

Méthode expérimentale

Instrument

Toutes les expériences ont été réalisées sur un LC/MSD préparative Agilent 1290 Infinity II avec mise à l'échelle automatisée comprenant les modules suivants :

- Pompe binaire préparative Agilent 1290 Infinity II (G7161B) ;
- Pompe quaternaire Agilent 1260 Infinity II (G7111B) avec rinçage actif des joints et vannes d'entrée actives (options 030 et 032) ;

- Passeur automatique d'échantillons et collecteur de fractions planaire préparative Agilent 1290 Infinity II (G7158B) avec boucle d'échantillonnage préparative de 5 mL (option 241) ;
- Détecteur à longueur d'onde multiple Agilent 1260 Infinity II (G7165A) avec cellule préparative de 0,3 mm (option 084) ;
- Détecteur à barrette de diodes WR Agilent 1260 Infinity II (G7115A) avec cellule standard de 10 mm (option 018) ;
- Collecteur de fractions préparative à vanne Agilent 1260 Infinity II (G7166A) ;
- Modulateur de débit de MS Agilent 1290 Infinity II (G7170B) ;
- Commande de vanne Agilent 1290 Infinity (G1170A) avec vanne 2 positions/14 voies (G4738A) ;
- Compartiment colonne préparative Agilent 1290 Infinity II (G7163B) ;
- Module de délai Agilent 1260 Infinity II (G9324A) avec bobines retard tressées pour des débits de 15 à 40 mL/min (option 210) ;
- LC/MSD XT Agilent (G6135B).

Colonnes

- Colonne analytique : Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3 × 100 mm, 2,7 µm (réf. 695975-502).
- Colonne préparative : Agilent AdvanceBio pour oligonucléotides, 21,2 × 150 mm, 4 µm (réf. 671150-702).

Logiciels

- Agilent OpenLab CDS édition ChemStation pour LC et LC/MS, version C.01.10 [287] ou ultérieure.
- Logiciel de purification automatisée d'Agilent pour OpenLab ChemStation, version A.01.08 [043] ou ultérieure.

Produits chimiques et solvants

De l'acétonitrile (ACN) de qualité gradient pour HPLC, du tris(hydroxyméthyl) aminométhane (TRIS) > 99,9 %, de l'acide chlorhydrique de qualité analytique (37 %), de la dibutylamine (DBA) de qualité HPLC et de l'hexylamine (HA) ont été achetés auprès de VWR (Darmstadt, Allemagne). De l'hexafluoroisopropanol (HFIP) de qualité analytique a été acheté auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). De l'eau ultrapure a été fraîchement préparée à partir d'un système Milli-Q Integral équipé d'une cartouche avec une membrane de 0,22 µm (Millipore Sigma, Darmstadt, Allemagne).

Échantillons

Deux échantillons d'ON d'ADN ont été fournis par un client. La longueur maximale de ces ON était de 30 bases pour le premier échantillon et de 50 bases pour le second. Les concentrations des échantillons étaient de 3,1 mM dans du PBS 20 mM pour l'ON court et de 1,6 mM dans l'eau pour l'ON long. Les deux échantillons ont été injectés sans dilution ni préparation d'échantillon supplémentaire.

Avant l'étape de purification, les deux échantillons ont été analysés à l'aide d'une méthode de séparation par HPLC/MS (méthode HA/HFIP ; voir Table 1). Cette méthode est une procédure de contrôle qualité classique, permettant d'obtenir un produit de synthèse de pureté et de masse cible souhaitées pour la purification. Pour permettre une transposition d'échelle optimisée par le logiciel de purification automatisée d'Agilent, il est nécessaire d'utiliser la même phase stationnaire et la même phase mobile pour les méthodes analytique et préparative. À cette fin, une autre méthode (méthode DBA-TRIS ; voir Table 2) a été appliquée, parce qu'elle ne nécessite pas de recourir à du HFIP coûteux au débit élevé utilisé pour la purification. Cette seconde méthode n'est pas compatible avec la spectrométrie de masse, car le tampon TRIS n'est pas volatil. Néanmoins, une collecte de fractions basée sur la masse peut être utilisée puisque seule une petite partie du flux est transportée vers le MSD à l'aide d'un diviseur actif et d'un solvant d'appoint volatil.

Le choix privilégié pour les analyses d'ON comprenant jusqu'à 100 nucléotides est une colonne de la série Agilent AdvanceBio pour oligonucléotides. Ces colonnes sont basées sur la technologie Agilent InfinityLab Poroshell et comprennent des particules superficiellement poreuses (SPP) avec un revêtement stable à

pH élevé (HPH). Outre des tests de compatibilité à pH et température élevés, chaque lot de colonnes AdvanceBio pour oligonucléotides est soumis à un contrôle qualité pour la séparation des oligonucléotides afin d'obtenir une séparation $n/(n - 1)$. Grâce à l'ajout de colonnes préparatives et analytiques Scalar de 21,2 mm de diamètre interne à

la famille de colonnes Agilent AdvanceBio pour oligonucléotides, il est désormais plus simple de transférer des méthodes analytiques en haute résolution vers des conditions préparatives. L'utilisation de la même phase stationnaire à l'échelle analytique et préparative permet de réduire le besoin d'ajuster la méthode et accroît le degré de confiance dans le transfert de méthode.

Configuration des méthodes

Tableau 1. Conditions chromatographiques pour l'échelle analytique ; méthode HA/HFIP.

Paramètre	Échelle analytique
Phase mobile	A) Hexylamine 15 mM + HFIP 200 mM dans H ₂ O (pH d'environ 8,3) B) Méthanol
Débit	0,8 mL/min
Gradient	Temps (min) % de B 0 50 7 71 8 100 9 100 9,5 50
Fin d'analyse	11 min
Volume d'injection	2 µL
Préréglage de méthode d'échantillonneur	Préréglage 1 : Matrice d'échantillon polaire 180 µL de solvant de boucle
Température	Ambiante
Détection UV	260 nm Fréquence d'acquisition de 10 Hz
Détection MS	Balayage négatif m/z 500 à 3 000

Tableau 2. Conditions chromatographiques aux échelles analytique et préparative ; méthode DBA-TRIS.

Paramètre	Échelle analytique	Échelle préparative
Phase mobile	A) TRIS-HCl, pH 8,3, DBA 75 mM dans l'ACN à 7,5 % B) TRIS-HCl, pH 8,3, DBA 75 mM dans l'ACN à 80 %	
Débit	0,8 mL/min	25 mL/min
Gradient	Exploration et gradients ciblés calculés par le logiciel	
Volume d'injection	2 µL	1 000 µL
Préréglage de méthode d'échantillonneur	Préréglage 1 : Matrice d'échantillon polaire 180 µL de solvant de boucle	Préréglage 1 : Matrice d'échantillon polaire 800 µL de solvant de boucle
Température	Ambiante	Ambiante
Détection UV	260 nm Fréquence d'acquisition de 10 Hz	
Détection MS	Balayage négatif m/z 500 à 3 000	Balayage négatif m/z 500 à 3 000 Chromatogramme d'ions extraits choisis par le logiciel sur la base de la masse cible
Rapport de division vers la MSD	Débit total	500:1 (mode M1) Actif de 12 à 24 min
Collecte de fractions	Non applicable	Mode de collecte de fractions basée sur les pics, signal UV combiné au signal de MSD par le ET logique Seuil UV : 10 mAU Pente ascendante du spectre UV : 2 mAU/s Pente descendante du spectre UV : 1 mAU/s Seuil de MSD : 2 000 cps

Tableau 3. Configuration de la chambre de nébulisation MSD et de la collecte de fractions.

Paramètre	Valeur
Solvant d'appoint	Méthanol/eau (70/30) contenant 0,1 % d'acide formique
Débit d'appoint	1,5 mL/min
Source d'ionisation	Source d'ionisation electrospray (ESI) d'Agilent
Pression du nébuliseur	40 psig
Température du gaz de séchage	350 °C
Débit du gaz de séchage	13,0 L/min
Tension capillaire	-3 000 V
Gamme de balayage	m/z 500 à 3 000
Masse cible (m/z)	ON court : 2 674,7 ; 2 139,8 ON long : 2 718,0 ; 2 264,1
Espèces ioniques	[M-H] ⁻ , [M-2H] ²⁻ , [M-3H] ³⁻

Résultats et discussion

Les deux échantillons d'ON ont été séparés à l'échelle analytique à l'aide d'une méthode de HPLC/MS et du circuit analytique du LC 1290 Infinity II préparative avec mise à l'échelle automatisée. Le gradient optimisé allant de 50 à 71 % de solvant B a permis de séparer le produit de pleine longueur (FLP) des fragments d'ON incomplets. La Figure 1 présente un chromatogramme UV ainsi que le chromatogramme d'ions totaux (TIC) de la séparation de l'ON court. La séparation de l'ON long est présentée dans la Figure 2. L'ON long semble moins pur que l'ON court. Néanmoins, les deux échantillons étaient suffisamment séparés pour identifier le FLP correspondant. Les spectres de masse au temps d'élution du FLP ont été extraits en se basant sur ces séparations analytiques. L'outil de déconvolution intégré dans OpenLab ChemStation a permis de calculer la masse moléculaire des FLP et de relier les signaux dans le spectre à un nombre de charges (Figures 3 et 4). Les ions multichargés identifiés ont pu ensuite être utilisés pour déclencher la collecte de fraction au cours des analyses préparatives.

Pour purifier les deux ON, la méthode a été modifiée pour utiliser des phases mobiles contenant de la DBA comme réactif d'appariement d'ions et du tampon TRIS. Bien que le tampon TRIS ne soit pas compatible avec la MS, les ON cibles ont été détectés et collectés grâce aux signaux de MSD au cours de l'analyse préparative. Cela a été réalisé par division active du débit total et distribution du débit avec division vers la MS grâce à un solvant d'appoint compatible. Le débit a été ajusté à 25 mL/min, reflétant ainsi l'augmentation du diamètre interne et de la taille des particules de la colonne préparative. Le gradient a également été modifié : un gradient linéaire a été créé pour l'exploration analytique par le logiciel de purification automatisée d'Agilent. De même, un gradient ciblé a été calculé par le logiciel pour optimiser la séparation à l'échelle préparative, en se basant sur la sélection d'un pic cible dans les résultats analytiques.

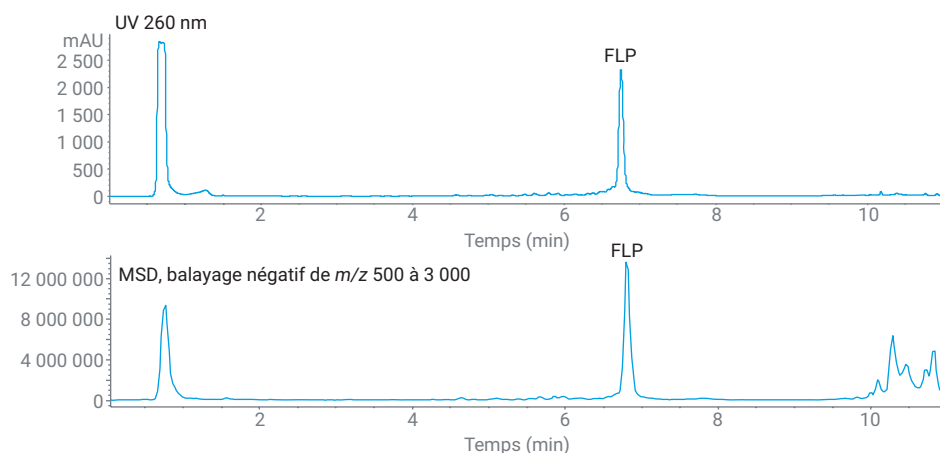


Figure 1. Séparation de l'ON court à l'aide de HA/HFIP et d'un gradient optimisé.

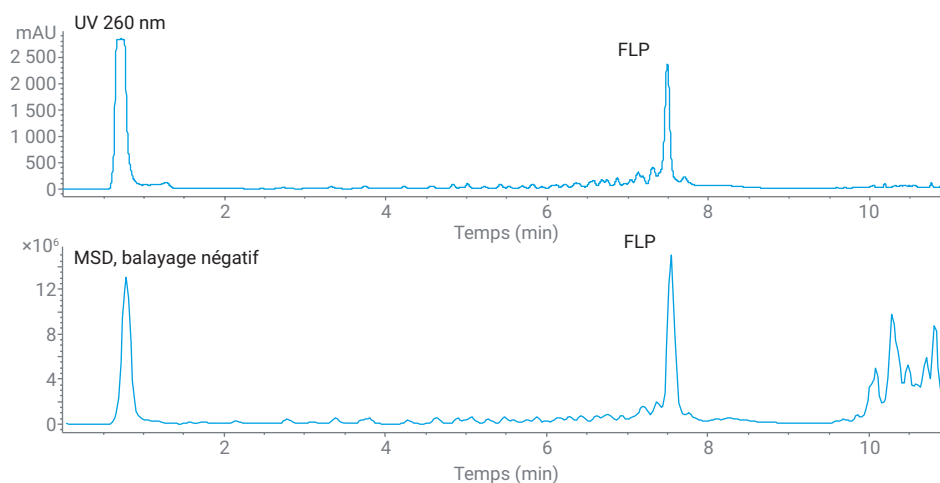


Figure 2. Séparation de l'ON long à l'aide de HA/HFIP et d'un gradient optimisé.

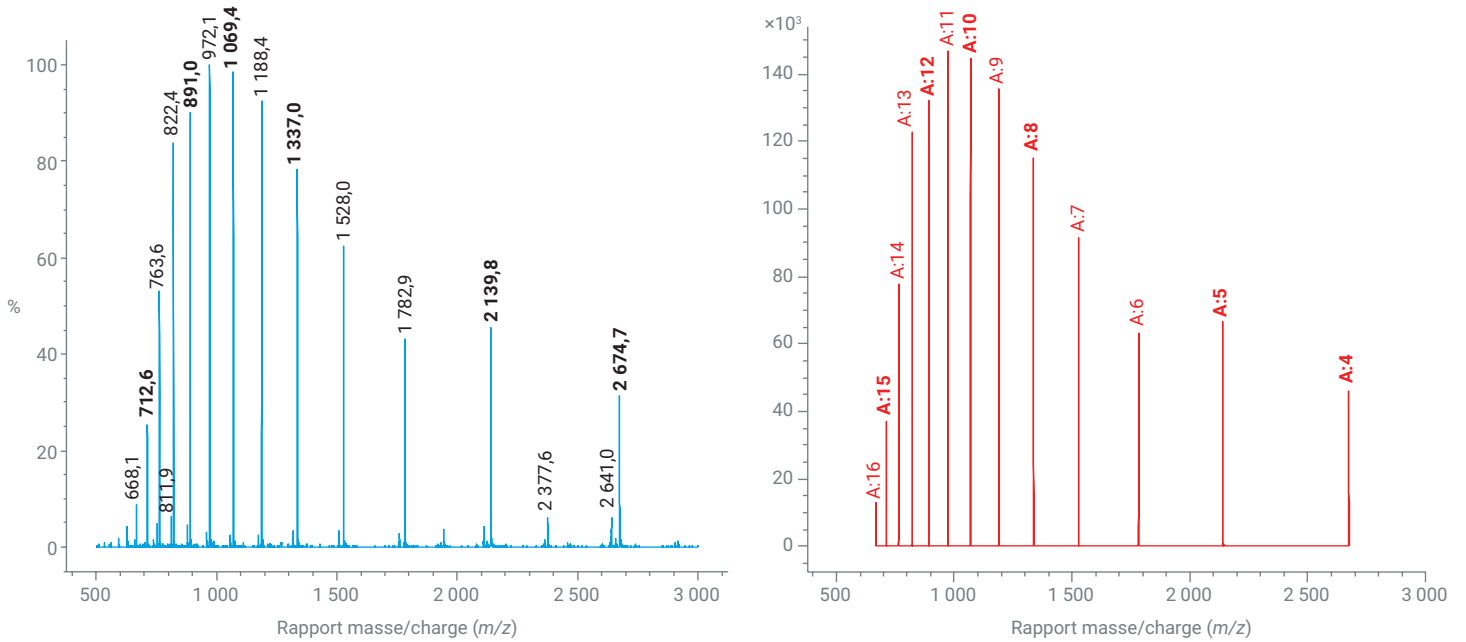


Figure 3. Spectre et ions multichargés (A : nombre de charges) de l'ON court calculés par déconvolution. La masse moléculaire du FLP calculée était de 10 704 Da. Les ions utilisés comme déclencheurs de la collecte de fractions sont indiqués en gras.

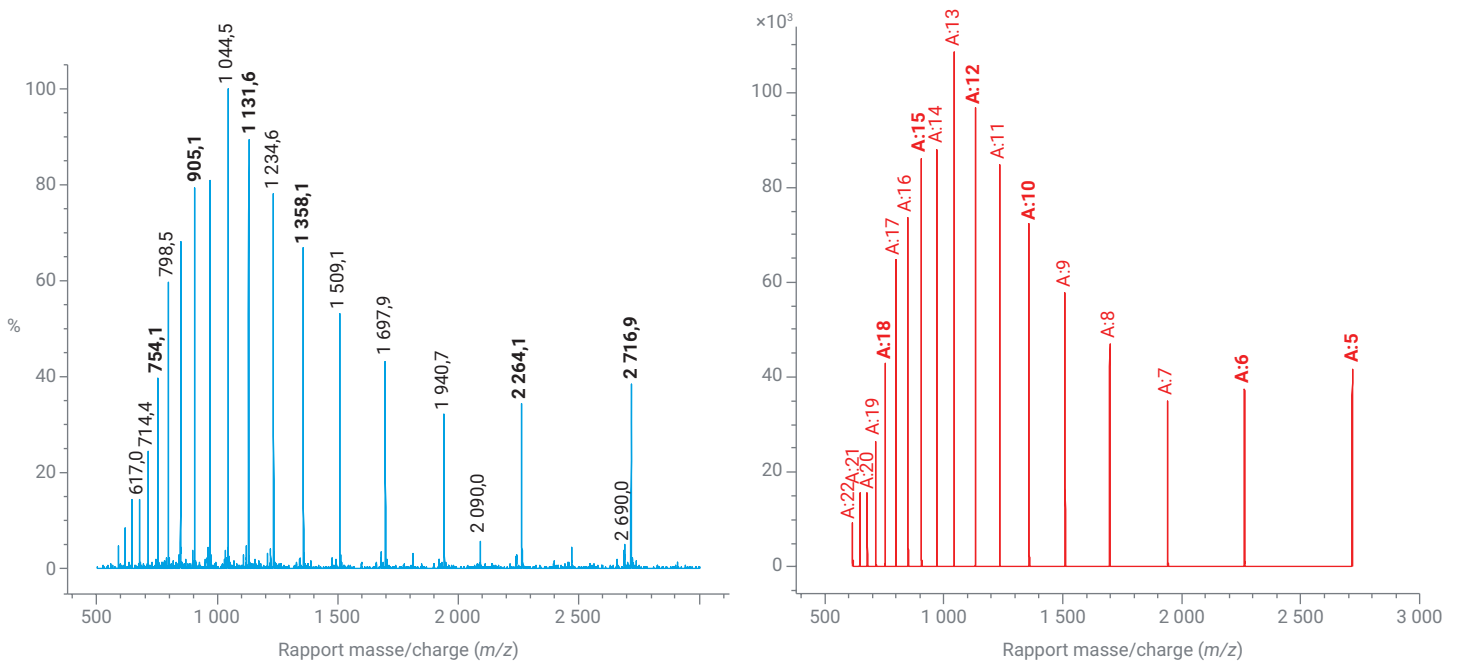


Figure 4. Spectre et ions multichargés (A : nombre de charges) de l'ON long calculés par déconvolution. La masse moléculaire du FLP calculée était de 13 592 Da. Les ions utilisés comme déclencheurs de la collecte de fractions sont indiqués en gras.

Les chromatogrammes analytiques de la séparation DBA/TRIS sont représentés dans les Figures 5 et 6. Notez que l'objectif du gradient analytique n'était pas de fournir la meilleure résolution possible, mais plutôt de déterminer les conditions de solvant au temps de rétention du pic cible. Pour démarrer ce calcul, l'utilisateur sélectionne le pic dans le chromatogramme et clique sur **Assign As Target** (Définir comme cible). Le logiciel de purification automatisée d'Agilent calcule ensuite le point d'élution du pic cible, et génère également un gradient complet pour optimiser la séparation de la cible. Ce gradient peut être finement réglé, par exemple pour contrôler si la cible doit être éluée au centre du gradient ou plutôt à la fin, afin de laisser plus de temps aux impuretés à élution précoce. Le gradient qui a été appliqué pour purifier l'ON court est indiqué dans la Figure 7.

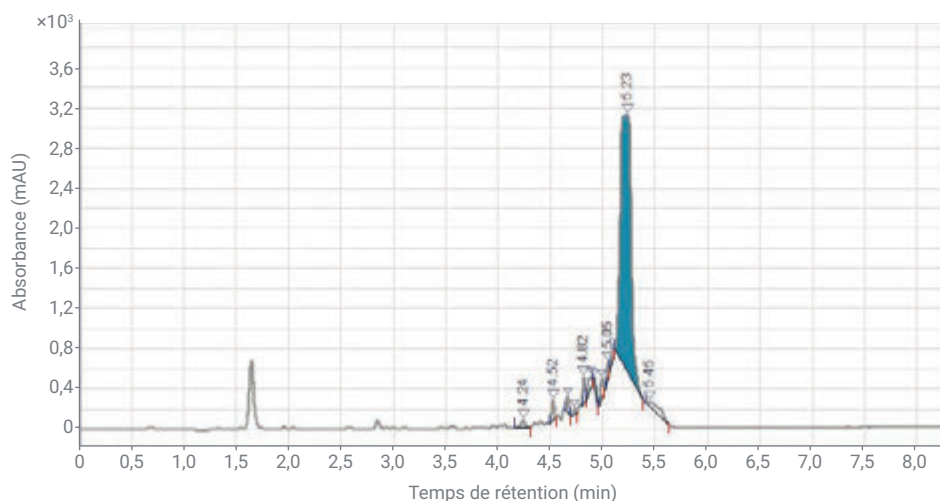


Figure 5. Séparation de l'ON court à l'aide de DBA/TRIS et d'un gradient générique. Le FLP est indiqué en bleu.

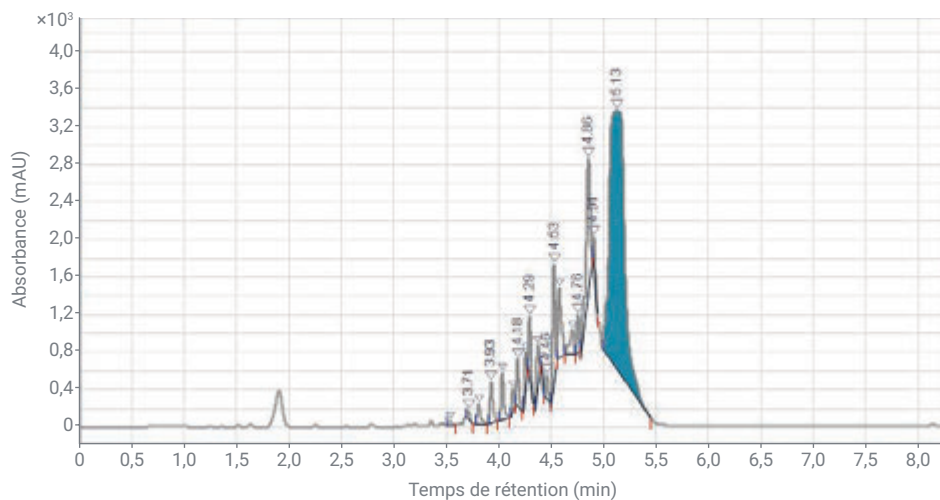


Figure 6. Séparation de l'ON long à l'aide de DBA/TRIS et d'un gradient générique. Le FLP est indiqué en bleu.

Avant de démarrer la purification avec le gradient ciblé, il est nécessaire de définir les masses cibles pour déclencher la collecte de fractions. Deux masses cibles ont été choisies pour chaque ON, lesquelles correspondent à $[M-4H]^{4-}$ et $[M-5H]^{5-}$ pour l'ON court et à $[M-5H]^{5-}$ et $[M-6H]^{6-}$ pour l'ON long (voir Figures 3 et 4). Le déclenchement automatisé ayant été activé pour des masses cibles à charges doubles et triples, la collecte pouvait également être déclenchée par $[M-8H]^{8-}$, $[M-10H]^{10-}$, $[M-12H]^{12-}$ et $[M-15H]^{15-}$ pour l'ON court et par $[M-10H]^{10-}$, $[M-12H]^{12-}$, $[M-15H]^{15-}$ et $[M-18H]^{18-}$ pour l'ON long. La Figure 8 présente la séparation préparative et la collecte de fractions de l'ON court. Huit fractions ont été collectées avec déclenchement de la collecte par le signal de MSD. La superposition avec le signal UV (correction des marques de fractions pour différents intervalles de temps) démontre le gain de sélectivité par MSD. Si le déclenchement de la collecte de fractions n'avait été effectué qu'à l'aide du signal UV, la collecte aurait démarré trop tôt et de nombreuses impuretés auraient été collectées. Le déclenchement basé sur le signal de MSD réduit le nombre de fractions à évaluer, à mélanger et à sécher, permettant ainsi d'obtenir des fractions plus pures et un processus de purification global plus rapide. Le cycle de purification pour l'ON long a conduit à des résultats similaires, avec 10 fractions collectées (non représentées). En séparant la collecte en fractions de durée ou de volume prédéfinis, il est possible de réanalyser des fractions individuelles et de mélanger celles qui contiennent le produit et remplissent les exigences de pureté³.

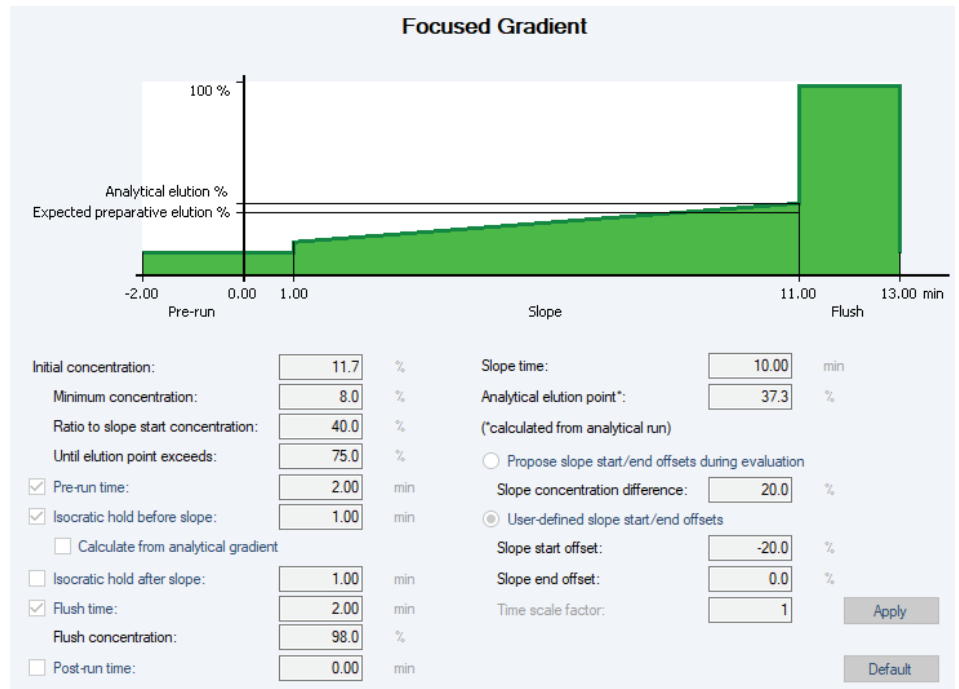


Figure 7. Profil de gradient ciblé calculé pour l'ON court, avec des options de réglage fin.

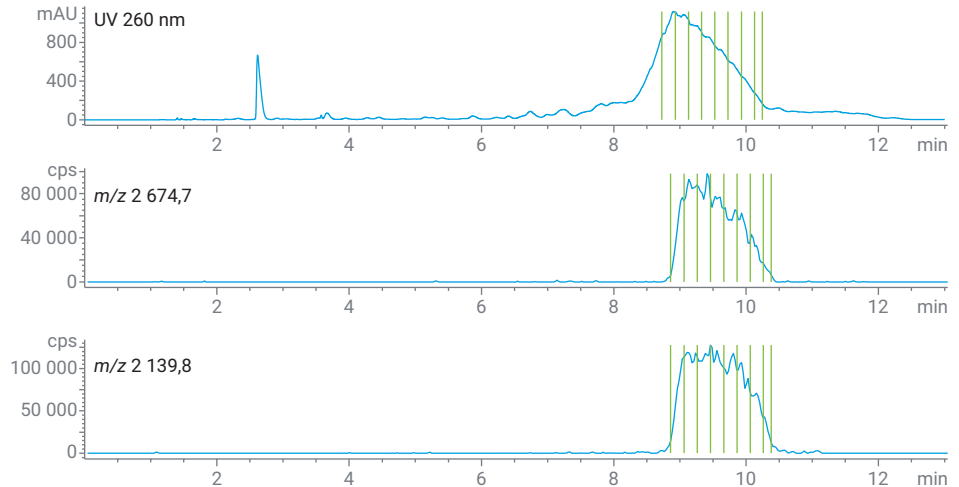


Figure 8. Purification préparative de l'ON court, à l'aide de DBA/TRIS et d'un gradient ciblé. Les barres vertes représentent les fractions collectées.

Les résultats de la réanalyse des huit fractions collectées pendant le cycle de purification de l'ON court sont présentés dans la Figure 9. La première fraction (trait bleu) contient une impureté, comme le révèle la division des pics. Toutes les autres fractions sont pures à > 99 % et peuvent être utilisées pour obtenir le pool de fractions contenant le produit. Les 10 fractions collectées pendant le cycle de purification de l'ON long ont également été réanalysées, conduisant à un résultat similaire : la première fraction était en partie contaminée par des impuretés, tandis que les autres étaient pures à > 99 % (non représenté). Pour obtenir le recouvrement du produit le plus élevé possible, davantage de fractions pourraient être collectées à des intervalles de temps plus courts. Si une méthode de réanalyse quantitative est appliquée, un tableau de mélange listant la pureté et la teneur en produit peut être créé et utilisé pour maximiser le rendement pour une exigence de pureté donnée³.

Conclusion

Deux échantillons d'ON de 30 et 50 nucléotides ont été purifiés à l'aide de la HPLC préparative avec collecte de fractions déclenchée par des signaux de MSD. Les deux échantillons ont été analysés à l'aide d'une méthode compatible avec la MS (HA/HFIP), qui a permis d'obtenir les spectres de masse requis pour déclencher une collecte de fractions de manière sélective. Une autre méthode faisant appel à DBA/TRIS a été utilisée pour la purification préparative, évitant ainsi de recourir au HFIP coûteux. Bien que le TRIS ne soit pas compatible avec la MS, l'utilisation d'un solvant d'appoint approprié dans le débit avec division vers la MSD a permis une collecte de fractions basée sur la masse avec une

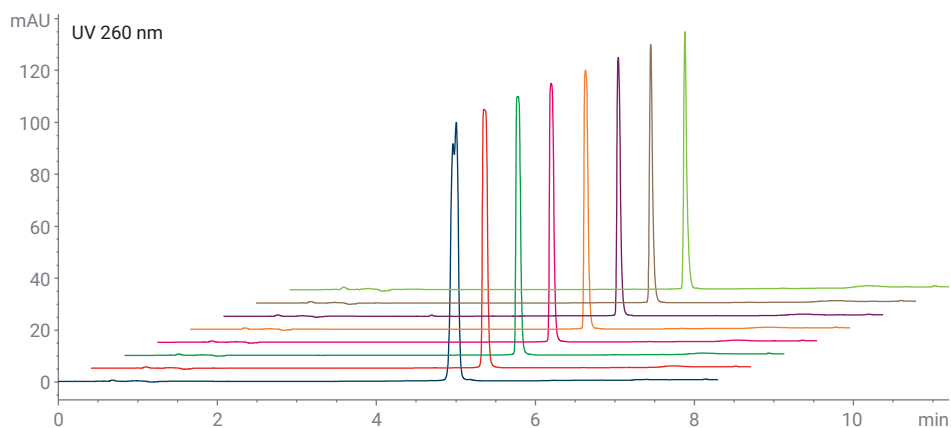


Figure 9. Superposition des chromatogrammes d'analyses des huit fractions collectées au cours de la purification de l'ON court.

sélectivité et un degré de confiance élevés.

Le logiciel de purification automatisée d'Agilent a transformé un gradient analytique générique en un gradient ciblé optimisé pour raccourcir les analyses préparatives et obtenir les composés purs plus rapidement. Les fractions des deux ON ont pu être collectées, permettant ainsi la réanalyse et le mélange sélectif des fractions qui répondent aux exigences de pureté. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de colonnes Agilent AdvanceBio pour oligonucléotides, qui permettent d'accélérer et de faciliter la transposition d'applications de l'échelle analytique à l'échelle préparative.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par la Swedish Knowledge Foundation par l'intermédiaire du projet KKS SYNERGY « Improved Methods for Process and Quality Controls using Digital Tools » (numéro de subvention 20210021). L'auteur remercie chaleureusement Olle Stålborg, PhD, de Qiagen DNA Synthesis pour la mise à disposition des échantillons d'oligonucléotides.

Références

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*, publication number 5994-2957EN, **2021**.
3. Purification of Single-Stranded RNA Oligonucleotides Using High-Performance Liquid Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3514EN, **2021**.

www.agilent.com

FR68918377

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 6 décembre 2022
5994-4877FR