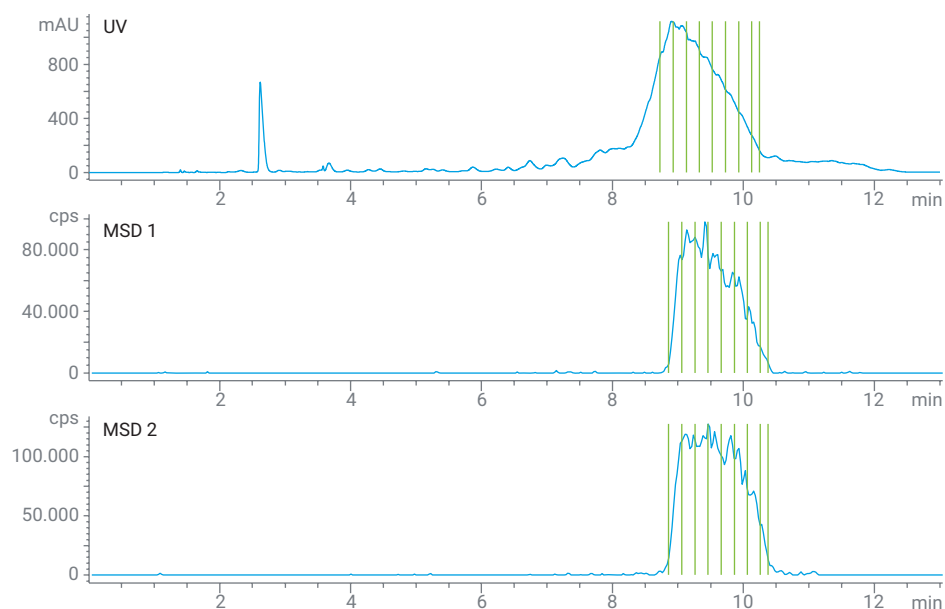


Purificazione rapida e selettiva di oligonucleotidi mediante HPLC/MS preparativa e supporto software



Autore

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Gli oligonucleotidi sintetici con meno di 100 nucleotidi vengono tipicamente analizzati e purificati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Per una maggiore selettività, spesso si preferisce la rivelazione a selezione di massa (MSD, mass-selective detection), sebbene questa tecnica richieda costosi reagenti ad alta purezza come l'esafluoroisopropanolo (HFIP). In questa nota applicativa viene descritto un metodo di purificazione che è basato su dibutilammina (DBA) e tris(idrossimetil)amminometano (TRIS) e consente comunque la raccolta di frazioni comandata da un segnale MSD. Grazie al supporto software e alle colonne per oligonucleotidi Agilent AdvanceBio con particelle a superficie porosa, i composti target sono stati raccolti più rapidamente e con maggiore purezza rispetto ai metodi convenzionali.

Introduzione

Negli ultimi anni, gli oligonucleotidi (ON) sintetici, come gli aptameri, l'RNA guida, gli RNA interferenti brevi e gli ON antisense, hanno guadagnato l'attenzione delle scienze naturali e della ricerca diagnostica. Queste molecole tipicamente presentano catene di lunghezza inferiore a 100 nucleotidi e pertanto possono essere analizzate mediante la tecnica HPLC a coppia ionica a fase inversa (IP-RP, ion pair-reversed phase). Questa tecnica è stata applicata con successo anche per la purificazione di ON.¹ Per una maggiore sensibilità in analisi con MSD, la trietilammina (TEA) e l'HFIP sono considerati i reagenti di coppia ionica standard. Lo scale-up dei metodi per condizioni preparative, tuttavia, richiede grandi quantità di costoso HFIP, che può rappresentare un fattore limitante.

In questa nota applicativa viene presentato un metodo di purificazione che impiega DBA e TRIS per accoppiamento ionico e regolazione del pH. È già stato mostrato che il DBA offre una maggiore risoluzione rispetto alla TEA con ON a catena corta², mentre il TRIS serve a sostituire il costoso HFIP.

Condizioni sperimentali

Strumentazione

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con un sistema LC/MSD preparativo con taratura automatica Agilent 1290 Infinity II che include i seguenti moduli:

- pompa binaria preparativa Agilent 1290 Infinity II (G7161B).
- pompa quaternaria Agilent 1260 Infinity II (G7111B) con lavaggio attivo delle guarnizioni e valvole di ingresso attive (opzioni 030 e 032).

- campionatore/raccogliatore open-bed preparativo Agilent 1290 Infinity II (G7158B) con loop di campionamento preparativo da 5 mL (opzione 241).
- rivelatore a lunghezza d'onda multipla Agilent 1260 Infinity II (G7165A), con cella a flusso preparativa da 0,3 mm (opzione 084).
- rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity II WR (G7115A), con cella a flusso standard da 10 mm (opzione 018).
- raccogliatore di frazioni preparativo a valvola Agilent 1260 Infinity II (G7166A).
- modulatore di flusso MS Agilent 1290 Infinity II (G7170B).
- driver valvola Agilent 1290 Infinity (G1170A) con valvola a 2 posizioni/14 porte (G4738A).
- comparto colonna preparativo Agilent 1290 Infinity II (G7163B).
- organizzatore per serpentine di ritardo Agilent 1260 Infinity II (G9324A) con serpentine di ritardo a maglia per valori tra 15 e 40 mL/min (210).
- LC/MSD XT Agilent (G6135B).

Colonne

- Colonna analitica: Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3×100 mm, 2,7 µm (codice 695975-502).
- Colonna preparativa: Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 21,2 × 150 mm, 4 µm (codice 671150-702).

Software

- Agilent OpenLab CDS ChemStation edition per sistemi LC ed LC/MS, versione C.01.10 [287] o successive.
- Software automatizzato di purificazione Agilent per OpenLab ChemStation, versione A.01.08 [043] o successive.

Prodotti chimici e solventi

Acetonitrile (ACN) di grado per HPLC, tris(idrossimetil)amminometano (TRIS) >99,9%, acido cloridrico di grado analitico (37%), dibutilammina (DBA) di grado per HPLC ed esilammina (HA) sono stati acquistati presso VWR (Darmstadt, Germania). Lesafluoroisopropanolo (HFIP) di grado analitico è stato acquistato presso Merck (Darmstadt, Germania). L'acqua ultra pura fresca è stata ottenuta da un sistema Milli-Q Integral equipaggiato con una cartuccia per punto d'uso (Millipore Sigma, Darmstadt, Germania) con membrana da 0,22 µm.

Campioni

Due campioni di ON di DNA con lunghezza di 30 e 50 basi sono stati forniti da un cliente. Le concentrazioni di campione erano 3,1 mM in 20 mM di PBS per l'ON corto e 1,6 mM in acqua per l'ON lungo. Entrambi i campioni sono stati iniettati senza diluizione o preparazione del campione.

Prima di essere sottoposti alla purificazione, entrambi i campioni sono stati analizzati usando un metodo di separazione mediante HPLC/MS (metodo HA/HFIP, si veda la Tabella 1). Questo metodo costituisce una tipica procedura di controllo qualità che fornisce la purezza del prodotto sintetizzato e la massa target da usare per la purificazione. Per consentire uno scale-up ottimizzato da parte del software Automated Purification, il metodo analitico e quello preparativo devono utilizzare la stessa fase mobile e lo stesso riempimento della colonna. A questo scopo è stato applicato un altro metodo (metodo DBA-TRIS, si veda la Tabella 2), che non richiede l'uso del costoso reagente HFIP al flusso elevato usato per la purificazione. Il secondo metodo non è compatibile con la spettrometria di massa, in quanto il tampone TRIS non è volatile. Ciononostante, è possibile utilizzare la raccolta di frazioni basata sulla massa, in quanto solo una parte minore del flusso viene trasportata fino al sistema MSD usando uno splitter attivo e un solvente di make-up volatile.

La scelta ideale per l'analisi di ON che contengono fino a 100 nucleotidi è una colonna della serie Agilent AdvanceBio Oligonucleotide. Queste colonne sono basate sulla tecnologia Agilent InfinityLab Poroshell e presentano particelle a superficie porosa (SPP, superficially porous particles) con rivestimento a pH elevato (HPH, high

pH). Oltre alla compatibilità con pH e temperatura elevati, ogni lotto di colonne per oligonucleotidi Agilent AdvanceBio viene sottoposto a un controllo della qualità per verificare che la separazione dei nucleotidi raggiunga il livello $n/(n-1)$. Con l'ingresso nella famiglia AdvanceBio Oligonucleotide di colonne scalari analitiche e preparative con

diametro interno di 21,2 mm, ora è possibile trasferire più facilmente a condizioni preparative metodi analitici ad alta risoluzione. L'uso della stessa fase stazionaria sia per la scala analitica che per quella preparativa riduce la necessità di aggiustamenti dei metodi e aumenta l'affidabilità nel loro trasferimento.

Configurazione del metodo

Tabella 1. Condizioni cromatografiche per i cicli analitici, metodo con HA/HFIP.

Parametro	Cicli analitici
Fase mobile	A) Esilammina 15 mM + HFIP 200 mM in H ₂ O (pH ca. 8,3) B) Metanolo
Flusso	0,8 mL/min
Gradiente	Tempo (min) %B 0 50 7 71 8 100 9 100 9,5 50
Tempo finale	11 min
Volume di iniezione	2 µL
Metodo preimpostato per il campionatore	Preimpostazione 1: matrice del campione polare solvente per loop 180 µL
Temperatura	Ambiente
Rivelazione UV	260 nm campionamento a 10 Hz
Rivelazione MS	scansione negativa m/z da 500 a 3.000

Tabella 2. Condizioni cromatografiche per cicli analitici e preparativi, metodo con DBA-TRIS.

Parametro	Cicli analitici	Cicli preparativi
Fase mobile	A) TRIS-HCl, pH 8,3, 75 mM DBA in ACN 7,5% B) TRIS-HCl, pH 8,3, 75 mM DBA in ACN 80%	
Flusso	0,8 mL/min	25 mL/min
Gradiente	Gradienti di esplorazione e focalizzati calcolati dal software	
Volume di iniezione	2 µL	1.000 µL
Metodo preimpostato per il campionatore	Preimpostazione 1: matrice del campione polare solvente per loop 180 µL	Preimpostazione 1: matrice del campione polare solvente per loop 800 µL
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Rivelazione UV	260 nm campionamento a 10 Hz	
Rivelazione MS	Scansione negativa m/z da 500 a 3.000	Scansione negativa m/z da 500 a 3.000 EIC scelto dal software in base alla massa target
Rapporto di splittaggio verso l'MSD	Flusso completo	500:1 (modalità M1) Attivo tra 12 e 24 min
Raccolta di frazioni	Non pertinente	Modalità di frazionamento basata sui picchi, UV in combinazione con segnale MSD mediante soglia logica di tipo AND Soglia UV: 10 mAU Tratto ascendente UV: 2 mAU/s Tratto discendente UV: 1 mAU/s Soglia MSD: 2.000 cps

Tabella 3. Impostazioni per camera di nebulizzazione MSD e raccolta di frazioni.

Parametro	Valore
Solvente di make-up	0,1% di acido formico in metanolo/acqua (70/30)
Flusso di make-up	1,5 mL/min
Sorgente di ionizzazione	Sorgente ESI (elettrospray) Agilent
Pressione del nebulizzatore	40 psig
Temperatura del Drying Gas	350 °C
Flusso del Drying Gas	13,0 L/min
Tensione capillare	-3.000 V
Intervallo di scansione	Da 500 a 3.000 m/z
Massa target (m/z)	On corto: 2.674,7; 2.139,8 ON lungo: 2.718,0; 2.264,1
Specie ioniche	[M-H] ⁻ , [M-2H] ²⁻ , [M-3H] ³⁻

Risultati e discussione

Entrambi i campioni di ON sono stati separati con successo su scala analitica utilizzando un metodo HPLC/MS e il percorso analitico del sistema LC preparativo con taratura automatica 1290 Infinity II. Il gradiente ottimizzato da 50 a 71 %B ha separato il prodotto a lunghezza completa (FLP, full-length product) dai frammenti di ON incompleti. La Figura 1 mostra un cromatogramma UV e la TIC della separazione dell'ON corto. La separazione dell'ON lungo è visualizzata nella Figura 2. L'ON lungo sembra essere meno puro dell'ON corto. Ciononostante, entrambi i campioni sono stati separati a un livello sufficiente a identificare i rispettivi FLP. Sulla base di queste separazioni analitiche sono stati estratti gli spettri di massa al momento dell'eluizione degli FLP. Lo strumento di deconvoluzione integrato in OpenLab ChemStation ha calcolato il peso molecolare degli FLP e ha messo in relazione i segnali dello spettro con un numero di carica (Figuras 3 e 4). È stato quindi possibile utilizzare gli ioni multicarica identificati per innescare la raccolta di frazioni nei cicli preparativi.

Per purificare i due ON, il metodo è stato modificato in modo da usare le fasi mobili contenenti DBA come reagente di coppia ionica e il TRIS come tampone. Sebbene il TRIS non sia compatibile con la tecnica MS, gli ON target sono stati rilevati e raccolti mediante segnali del MSD nel ciclo preparativo. Ciò è stato ottenuto effettuando lo splitting dell'intero flusso e fornendo il flusso al sistema MS insieme a un solvente di make-up compatibile. Il flusso è stato regolato a 25 mL/min, per riflettere l'aumento del diametro interno e della dimensione delle particelle della colonna preparativa. Anche il gradiente è stato modificato: un gradiente lineare per l'esplorazione analitica è stato creato dal software per la purificazione. Analogamente, il software ha calcolato un gradiente preparativo focalizzato per una separazione ottimale, in base a un picco target selezionato dai risultati analitici.

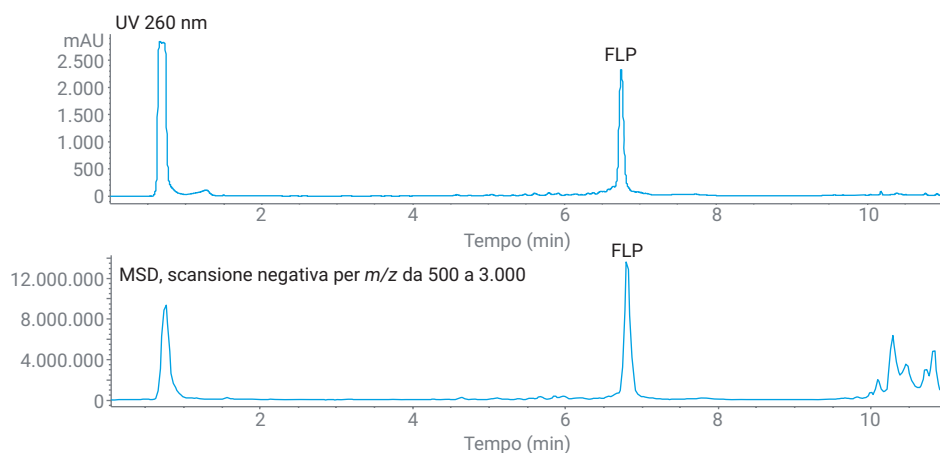


Figura 1. Separazione dell'ON corto usando HA/HFIP e un gradiente ottimizzato.

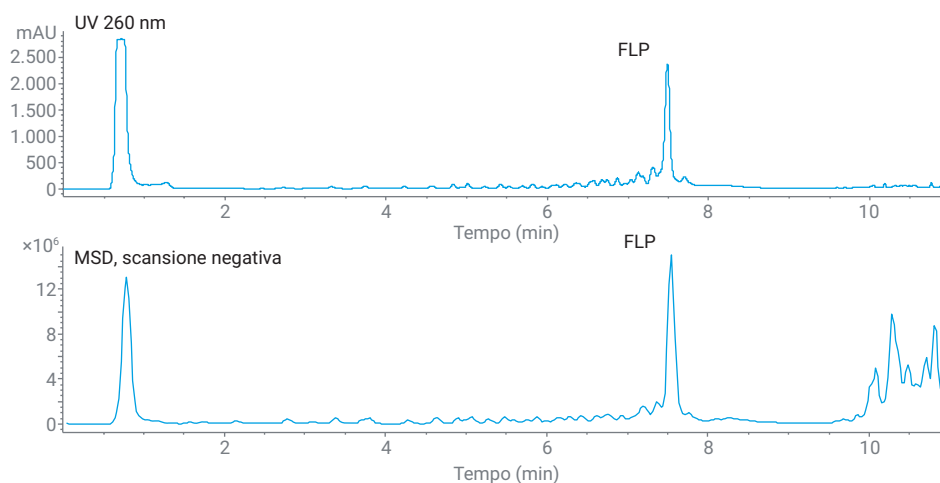


Figura 2. Separazione dell'ON lungo usando HA/HFIP e un gradiente ottimizzato.

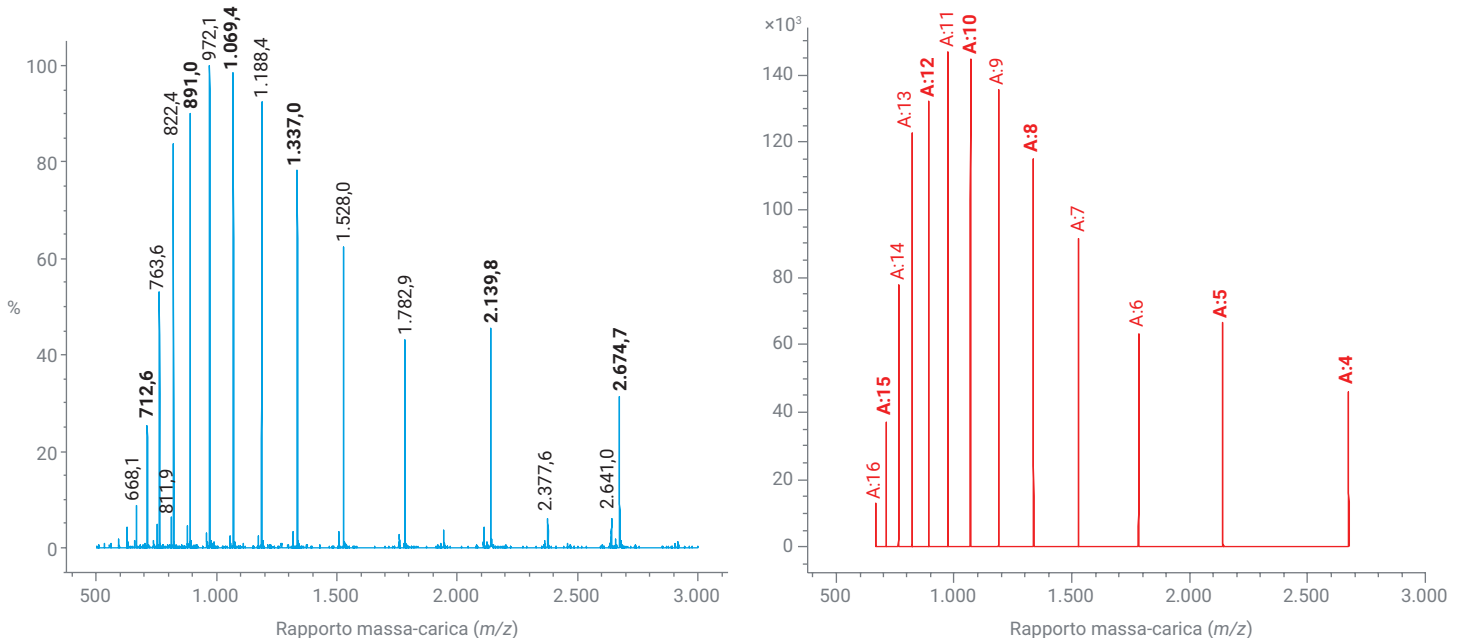


Figura 3. Spettro e ioni multicarica (A: numero di cariche) dell'ON corto, calcolati mediante deconvoluzione. Il peso molecolare dell'FLP calcolato è di 10.704 Da. Gli ioni usati come innesco per la raccolta di frazioni sono evidenziati in grassetto.

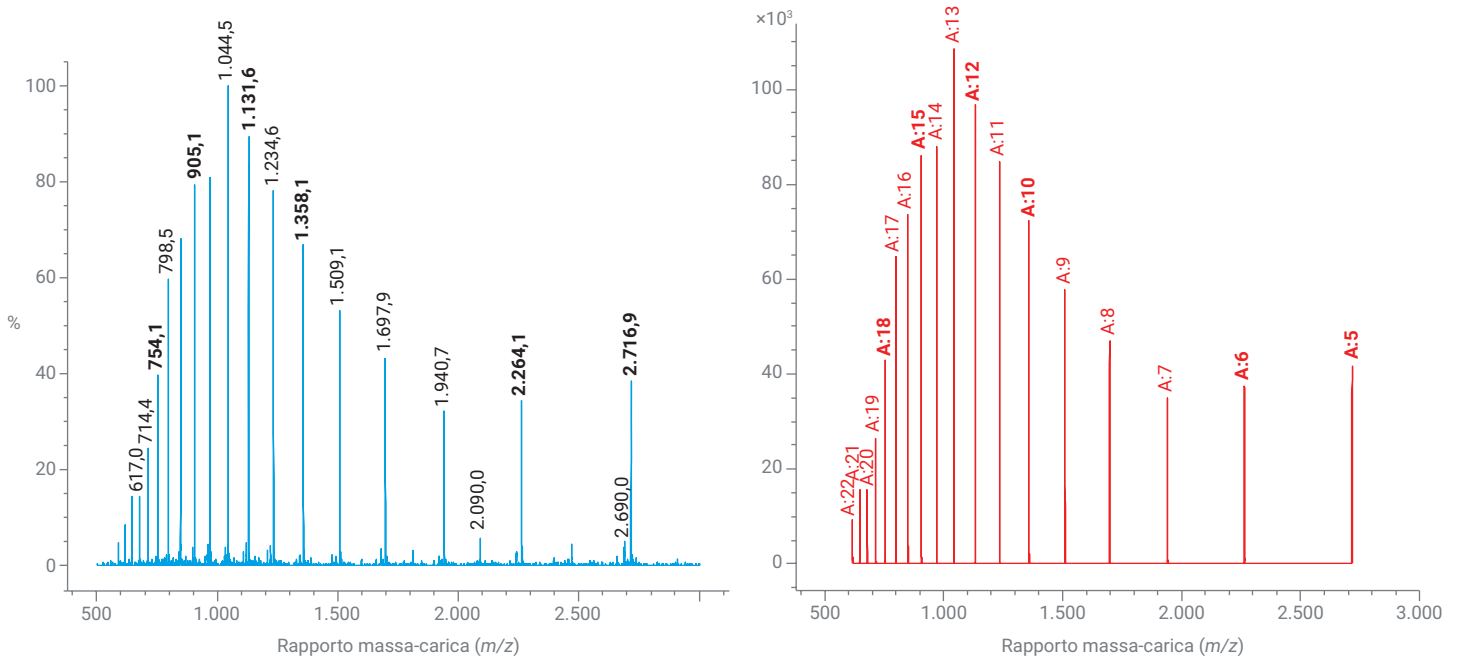


Figura 4. Spettro e ioni multicarica (A: numero di cariche) dell'ON lungo, calcolati mediante deconvoluzione. Il peso molecolare dell'FLP calcolato è di 13.592 Da. Gli ioni usati come innesco per la raccolta di frazioni sono evidenziati in grassetto.

I cromatogrammi analitici della separazione con DBA/TRIS sono illustrati nelle Figure 5 e 6. Si noti che lo scopo del gradiente analitico non è fornire la massima risoluzione, ma piuttosto determinare le condizioni del solvente in corrispondenza del tempo di ritenzione del picco target. Per avviare questo calcolo, l'utilizzatore seleziona il picco nel cromatogramma e fa clic su **Assign As Target** (Assegna come target). Quindi il software per la purificazione non solo calcola il punto di eluizione del picco target, ma genera un intero gradiente per ottimizzare la separazione del target. Questo gradiente può essere sottoposto a calibrazione fine, ad es. per controllare se il target deve eluire al centro del gradiente focalizzato o piuttosto alla fine, per lasciare più tempo per le impurezze che eluiscono precocemente. Il gradiente che è stato applicato per purificare l'ON breve è raffigurato nella Figura 7.

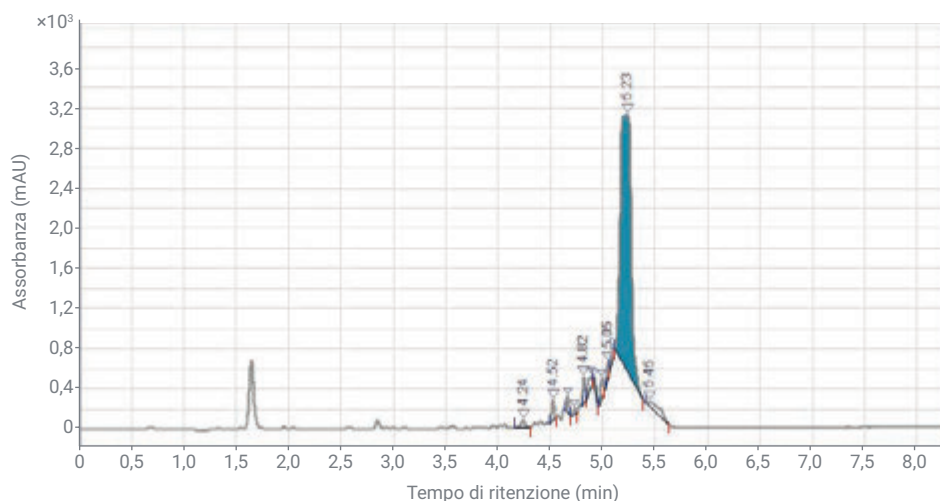


Figura 5. Separazione dell'ON corto usando DBA/TRIS e un gradiente generico. L'FLP è evidenziato in blu.

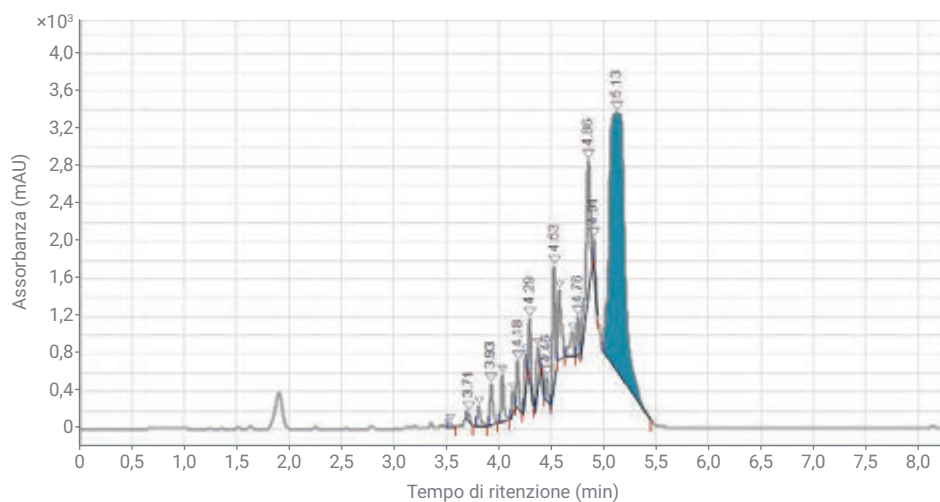


Figura 6. Separazione dell'ON lungo usando DBA/TRIS e un gradiente generico. L'FLP è evidenziato in blu.

Prima di avviare il ciclo di purificazione con il gradiente focalizzato, è necessario definire le masse target per l'innesco della raccolta di frazioni. Per ogni ON sono state scelte due masse target, che rappresentano $[M-4H]^{4-}$ ed $[M-5H]^{5-}$ per l'ON corto e $[M-5H]^{5-}$ ed $[M-6H]^{6-}$ per l'ON lungo (si vedano le Figure 3 e 4). Attivando l'innesco automatizzato su masse target a doppia e tripla carica, la raccolta di frazioni viene innescata anche su $[M-8H]^{8-}$, $[M-10H]^{10-}$, $[M-12H]^{12-}$ e $[M-15H]^{15-}$ per l'ON corto e su $[M-10H]^{10-}$, $[M-12H]^{12-}$, $[M-15H]^{15-}$ e $[M-18H]^{18-}$ per l'ON lungo. La Figura 8 mostra la separazione preparativa e la raccolta di frazioni dell'ON corto. Sono stati inseriti otto segmenti temporali e innescati con successo mediante il segnale MSD. La sovrapposizione con il segnale UV (marcature di frazione corrette per differenti tempi di ritardo) dimostra la selettività guadagnata dalla tecnica MSD. Se fosse stato usato solamente il segnale UV per innescare la raccolta delle frazioni, la raccolta sarebbe iniziata troppo presto e sarebbero state raccolte molte delle impurezze. L'innesco in base al segnale MSD riduce il numero di frazioni che è necessario vagliare, raccogliere e portare a secco, dando come risultato frazioni più pure e un processo di purificazione complessivamente più rapido. Il ciclo di purificazione per l'ON lungo ha dato risultati simili, con 10 frazioni raccolte (non mostrati). Separando la raccolta in frazioni di durata o volume predefiniti, è possibile ripetere l'analisi di singole frazioni e raccogliere quelle che contengono il prodotto e soddisfano i requisiti di purezza.³

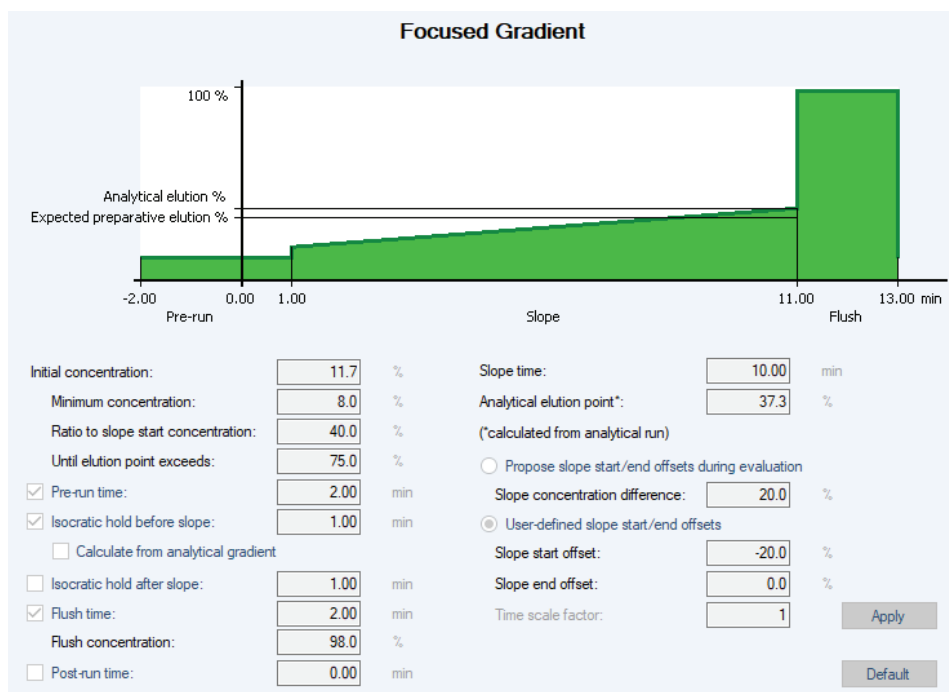


Figura 7. Profilo del gradiente focalizzato calcolato per l'ON corto, con opzioni per la calibrazione fine.

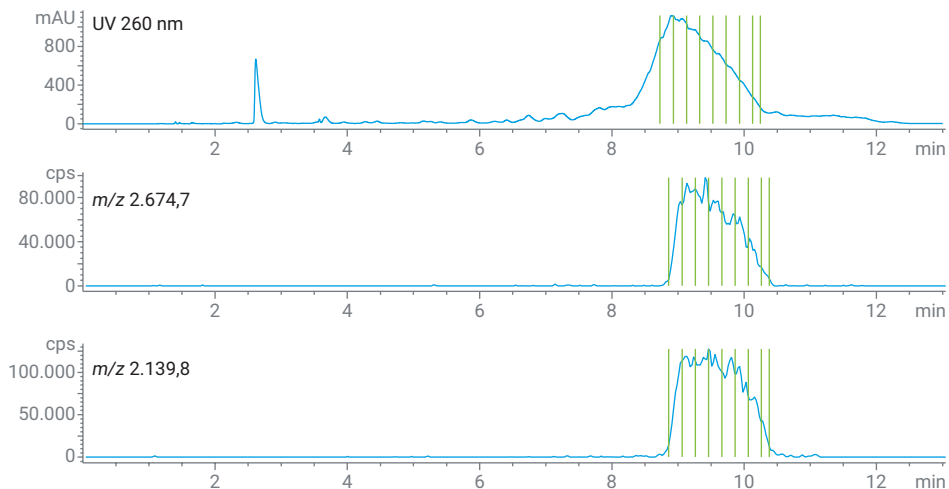


Figura 8. Ciclo di purificazione preparativa dell'ON corto usando DBA/TRIS e un gradiente focalizzato. Le barre verdi rappresentano le suddivisioni temporali per la raccolta delle frazioni.

I risultati della ripetizione dell'analisi delle frazioni delle otto raccolte durante il ciclo di purificazione dell'ON corto sono mostrati nella Figura 9. La prima suddivisione (traccia blu) contiene un'impurezza, che è visibile nel picco sdoppiato. Tutte le altre frazioni sono pure oltre il 99% e possono essere usate per la raccolta del prodotto finale. Anche per le 10 frazioni raccolte durante il ciclo di purificazione dell'ON lungo è stata ripetuta l'analisi con risultati simili: la prima era parzialmente contaminata da impurezze, mentre le altre erano pure oltre il 99% (non mostrati). Per ottenere il massimo recupero del prodotto, è possibile raccogliere più frazioni con intervalli più corti. Se per la ripetizione dell'analisi si usa un metodo quantitativo, è possibile creare una tabella di raccolta che riporta la purezza e il contenuto del prodotto e usarla per massimizzare la resa per un dato requisito di purezza.³

Conclusione

Due campioni di ON di 30 e 50 nucleotidi sono stati purificati con successo mediante HPLC preparativa con raccolta di frazioni innescata mediante segnali MSD. Entrambi i campioni sono stati analizzati usando un metodo compatibile con la tecnica MS (HA/HFIP), che ha fornito gli spettri di massa necessari per innescare la raccolta di frazioni in modo selettivo. Per la purificazione preparativa è stato usato un altro metodo che impiega DBA/TRIS, evitando il costoso reagente HFIP. Sebbene il TRIS non sia compatibile con la tecnica MS, un solvente di make-up idoneo nel flusso splittato verso il sistema MSD ha permesso la raccolta di frazioni basata sulla massa con selettività e affidabilità elevate. Il software

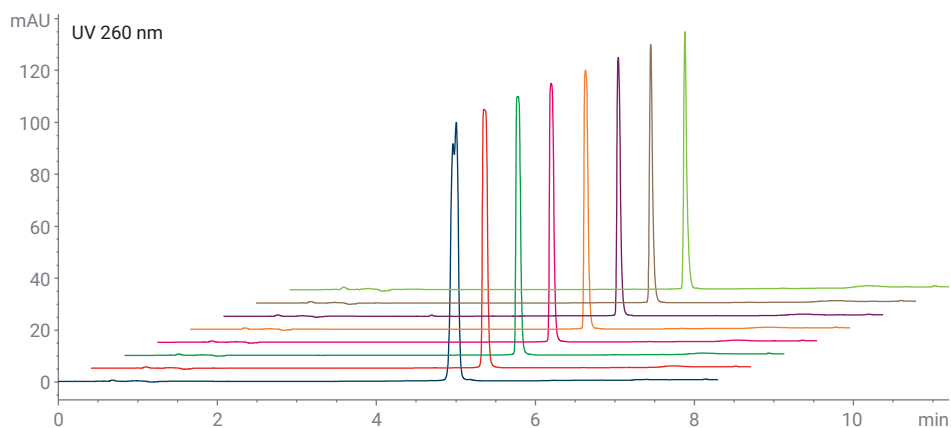


Figura 9. Sovrapposizione dei cromatogrammi di analisi delle otto frazioni raccolte nel ciclo di purificazione dell'ON corto.

per la purificazione ha trasformato un generico gradiente analitico in un gradiente focalizzato ottimizzato per velocizzare i cicli preparativi e ottenere più rapidamente i composti puri. Frazioni sono state raccolte per entrambi gli ON, consentendo la ripetizione dell'analisi e la raccolta selettiva delle frazioni che rispettavano i requisiti di purezza. Tutte le analisi sono state effettuate con colonne per oligonucleotidi Agilent AdvanceBio, che consentono uno scale-up semplice e rapido da applicazioni analitiche ad applicazioni preparative.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato sostenuto dalla Swedish Knowledge Foundation attraverso il progetto di KKS SYNERGY "Improved Methods for Process and Quality Controls using Digital Tools" (numero del finanziamento 20210021). L'autore ringrazia sentitamente Olle Ståhlberg, PhD, di Qiagen DNA Synthesis per aver fornito i campioni di oligonucleotidi.

Bibliografia

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. *Nota applicativa di Agilent Technologies*, numero di pubblicazione 5994-2957EN, **2021**.
3. Purification of Single-Stranded RNA Oligonucleotides Using High-Performance Liquid Chromatography. *Nota applicativa di Agilent Technologies*, numero di pubblicazione 5994-3514EN, **2021**.

www.agilent.com

DE68918377

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti, 6 dicembre 2022
5994-4877ITE