

LC-QTOF를 이용한 변형 올리고 뉴클레오타이드의 서열 확인

저자

류수민, 정종목
한국애질런트테크놀로지스 (주)

개요

바이오 제약 분야에서는 유전자 발현 수준에서 질병을 예방 및 치료하기 위한 목적으로 올리고뉴클레오타이드에 대한 연구개발이 진행되고 있습니다. 더불어 약물의 체내 안정성 및 유효성을 향상시키기 위한 변형 올리고뉴클레오타이드가 지속적으로 개발됨에 따라 변형 올리고뉴클레오타이드를 포함한 전반적인 올리고뉴클레오타이드의 제조 프로세스 관리를 위한 분석법 마련이 함께 수반되어야 합니다. 따라서 본 응용자료에서는 LC-QTOF 및 Agilent MassHunter BioConfirm12.0 소프트웨어를 이용하여 자연상태 및 변형 올리고뉴클레오타이드에 대한 분자량 및 서열 확인과 같은 정성 분석법을 제안하였습니다.

서론

의약품으로서 올리고뉴클레오타이드는 유전정보 수준에서 진단 및 치료제의 기능을 하며, 목적하는 서열로 합성된 20-30mer (약 6000-10000Da) 내외의 짧은 가닥의 DNA/RNA 분자를 의미합니다. 올리고뉴클레오타이드가 의약품으로서 약효를 띠기 위해서는 체내 원하는 타겟 부위까지 안정적으로 전달 및 결합되어야 합니다. 이러한 체내 안정성, 결합 특이성 및 친화도 등의 약물 유효성을 향상시키는 방법 중 하나로 핵산 및 인산기의 화학적 변형 등이 적용된 변형 올리고뉴클레오타이드를 합성할 수 있습니다¹. 또한 합성 올리고뉴클레오타이드에 의해 발생하는 부수적인 문제점 등을 완화하기 위해 지속적으로 차세대 변형 올리고뉴클레오타이드에 대한 연구개발이 진행되고 있습니다². 이와 같은 합성 의약품은 제조 단계에서 해당하는 서열에 맞게 합성이 되었는지, 특정 위치에서 목적하는 변형이 일어났는지 등에 대한 검토를 위해 분자량 확인 및 서열 확인 과정이 필수적으로 진행되어야 합니다.

이를 위해 본 응용자료에서는 자연상태뿐만 아니라 변형된 올리고뉴클레오타이드에도 적용 가능한 정성분석 및 서열 확인 방법을 제안하였으며, 모든 분석은 LC-QTOF 및 Agilent MassHunter BioConfirm12.0을 이용하였습니다.

실험

시료 정보

분석에 사용한 시료는 총 6종으로, 올리고뉴클레오타이드 20, 25, 30mer 및 변형 올리고뉴클레오타이드 20, 25, 30mer를 사용하였습니다. 그 중 변형 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 당(sugar) 부분 및 인산기(phosphate group)를 선택적으로 변형시킨 것으로, 자세한 서열 정보는 표 3에서 확인할 수 있습니다. 실험에 사용한 용매는 모두 LC-MS급을 사용하였습니다.

시료 조제방법

정성분석 및 서열 확인을 위하여 동결건조된 올리고뉴클레오타이드를 0.1mM 농도의 원액으로 조제하였으며, 이를 최대 10배 희석하여 분석하였습니다.

분석 기기 및 조건

Agilent 1290 Infinity II UHPLC와 Agilent 6545 XT Q-TOF가 본 분석을 위해 사용되었습니다. UHPLC 분석 조건은 표 1에서 확인할 수 있습니다. MS 분석에 대한 조건은 표 2에서 확인할 수 있습니다.

표 1. UHPLC 분석법 파라미터.

파라미터	값		
장비	<ul style="list-style-type: none"> - Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A) - Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B) - Agilent 1290 Infinity II Integrated Column Compartment(G7116B) - Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(G7117B) 		
자동 시료 주입기 온도	4°C		
주입 부피	2~5µL		
DAD 파장	260nm		
컬럼	Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1x150mm, 2.7µm		
컬럼 온도	65°C		
이동상 A	15mM Hexylamine and 25mM HFIP in water (LC-MS급)		
이동상 B	100% ACN (LC-MS급)		
유속	0.4mL/min		
그라디언트	시간(min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
	0.0	90	10
	0.5	90	10
	15.0	75	25
	15.1	5	95
	17.0	5	95
	17.1	90	10
	17.6	90	10
	18.0	5	95
	21.0	5	95
	21.1	90	10
	25.0	90	10

표 2. Agilent 6545XT QTOF 분석법 파라미터.

파라미터	값
장비	Agilent 6545XT LC-QTOF
이온 소스	Electrospray Ionization(ESI)
스캔 모드	MS & MSMS
극성	Negative
건조 기체 온도	300°C
건조 기체 유속	8L/min
네블라이저 압력	40psi
Sheath gas 온도	350°C
Sheath gas 유속	8L/min
캐필러리 전압	5500V
노즐 전압	2000V
Fragmentor 전압	250V
스키머 전압	65V
MS & MSMS 질량 범위	400~3200m/z, 100~3200m/z
MS & MSMS 스캔 속도	0.5~4spectra/sec
충돌 에너지	10, 20, 40V

결과

본 응용자료는 LC-QTOF로 얻은 데이터를 기반으로 하며, Agilent MassHunter BioConfirm12.0 소프트웨어를 이용하여 얻은 올리고뉴클레오타이드의 정성 분석 및 서열 확인 결과를 수록하였습니다. LC 분석법은 이온페어링-역상 분석법을 적용하였으며, 자사의 응용자료³를 바탕으로 시스템 세척(washing)을 포함한 그레디언트 조건을 최적화 하였습니다.

표 3. 올리고뉴클레오타이드 서열 정보.

구분	서열 (5' → 3')	분자식	Accurate mass(Da)
20mer	rAprUprAprCprGprUprCprUprAprAprUprCprGprAprCprUprAprGprUprC	C ₁₉₉ H ₁₂₃₅ N ₇₂ O ₁₃₈ P ₁₉	6308.8600
25mer	rAprCprUprAprCprCprCprGprUprCprGprUprAprCprGprUprUprUprAprUprCprGprAprG	C ₂₃₆ H ₂₉₄ N ₉₀ O ₁₇₅ P ₂₄	7931.0576
30mer	rUprAprUprCprGprGprAprGprCprUprAprCprUprAprGprCprCprCprGprUprCprGprUprAprCprGprUprU	C ₂₈₂ H ₃₅₂ N ₁₀₅ O ₂₁₂ P ₂₉	9498.2382
변형 20mer	fA*fU*fA*mC*mG*mUprCprUprAprAprUpmC*mG*mA*fC*fU*fA*mG*mU*mC	C ₁₉₈ H ₂₄₇ F ₆ N ₇₂ O ₁₁₉ P ₁₉ S ₁₃	6654.6778
변형 25mer	fA*fC*fU*rAprCpmCpmCpmGprUprCprG*mU*mA*mC*fG*fU*fU*fU*fA*fU*rC*rG*rG*mApmG	C ₂₄₄ H ₃₀₁ F ₉ N ₉₀ O ₁₅₀ P ₂₄ S ₁₆	8316.7783
변형 30mer	fU*fA*fU*rC*rG*rG*mApmGpmCprUprAprCpfUfA*fG*rC*rU*rCpmCpmCpmGprUprCprG*mU*mA*mC*fG*fU*fU	C ₂₉₁ H ₃₆₁ F ₉ N ₁₀₅ O ₁₈₇ P ₂₉ S ₁₆	9897.9746

그림 1은 10μM 농도의 올리고뉴클레오타이드에 대한 MS 모드 분석 결과로, 각 단일물질에 대한 TIC(Total Ion Chromatogram)를 확인할 수 있습니다.

그림 2는 각 올리고뉴클레오타이드의 개별 피크로부터 추출된 질량 스펙트럼을 의미하며, 전자분무이온화(ESI)의 특성에 의해 다중

표 3은 각 올리고뉴클레오타이드에 대한 서열 정보, 분자식 및 분자량에 대한 정보를 제공합니다. 올리고뉴클레오타이드는 자연상태인 임의의 RNA 구조로 합성되었습니다. 변형 올리고뉴클레오타이드는 당의 2' 탄소에 결합한 수산화기(hydroxyl, 'r')를 불소(fluoro, 'f') 또는 메틸기(methyl, 'm')로 치환하거나, 인산디에스터(phosphate diester) 결합 내 PO(phosphate, 'p') 결합을 PS(phosphorothioate, '*') 결합으로 치환한 구조로 합성되었습니다. 올리고뉴클레오타이드의 분자량(accurate mass)은 단일동위원소(monoisotopic) 질량을 기준으로 합니다.

전하 이온의 분포를 보이는 올리고뉴클레오타이드를 확인할 수 있습니다⁴. 하나의 시료에서 다중 전하 스펙트럼 내 질량 대 전하비(m/z, mass-to-charge) 값이 낮을 수록 해당 이온은 높은 전하수(charge state)를 갖습니다. 올리고뉴클레오타이드의 분자량이 달라짐에 따라 MS 스펙트럼 내 다중 전하의 분포에도 차이가 발생합니다.

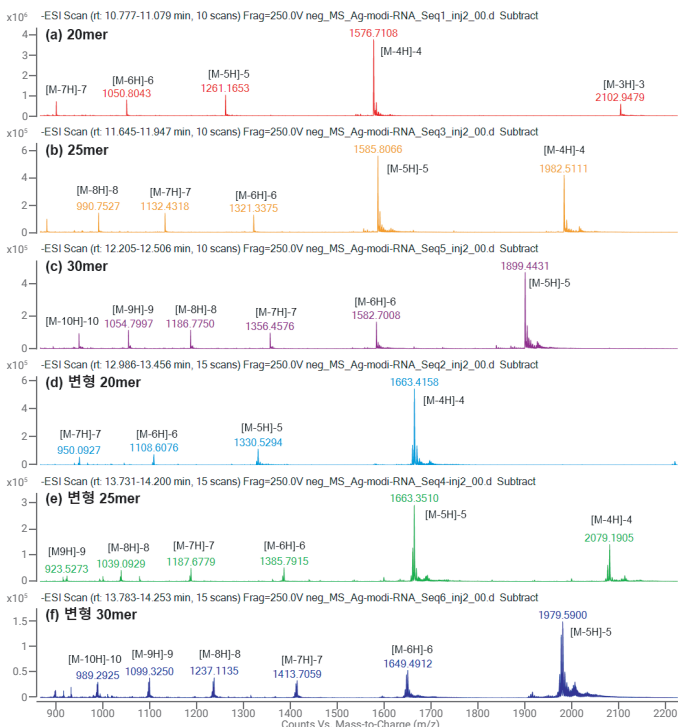


그림 1. 올리고뉴클레오타이드에 대한 TIC(Total Ion Chromatogram) 및 질량 스펙트럼.

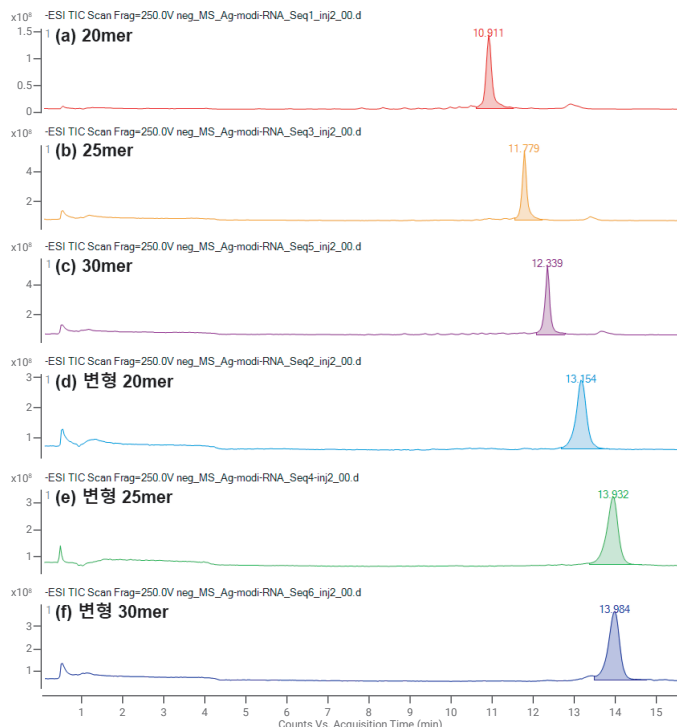


그림 2. 올리고뉴클레오타이드의 질량 스펙트럼 분포.

MS 모드 결과, 1가 이온과 같은 단일 이온이 아닌 다중 전하 이온을 형성함에 따라 MS 스펙트럼 상에서 올리고뉴클레오타이드의 전구체 이온은 전반적으로 분산된 분포를 보입니다.

이에 대해 'Deconvolution'을 적용하여 다중 전하 이온으로 나뉘어진 MS 스펙트럼을 하나로 병합하고 중성(neutral)

상태의 원형(intact) 분자량을 계산하였습니다. 표 4와 5에 각 올리고뉴클레오타이드에 대한 deconvolution 결과에서 환산된 원형 분자량인 deconvoluted 질량 및 동위체 패턴을 확인할 수 있습니다. 6종에 대한 deconvoluted 질량은 각 올리고뉴클레오타이드의 accurate mass 대비 2ppm 이내의 정확도를 만족하였습니다.

표 4. 올리고뉴클레오타이드에 대한 Deconvolution 결과.

구분	올리고뉴클레오타이드		
	20mer	25mer	30mer
Deconvoluted MS 스펙트럼			
Deconvoluted 질량	6308.8681	7931.0676	9498.2413
Accurate mass	6308.8600	7931.0576	9498.2382
정확도(ppm)	-1.284	-1.261	-0.326

표 5. 변형 올리고뉴클레오타이드에 대한 Deconvolution 결과.

구분	변형 올리고뉴클레오타이드		
	20mer	25mer	30mer
Deconvoluted MS 스펙트럼			
Deconvoluted 질량	6654.6871	8316.7912	9897.9867
Accurate mass	6654.6778	8316.7783	9897.9746
정확도(ppm)	-1.398	-1.551	-1.222

올리고뉴클레오타이드의 서열 확인은 top-down 방식을 이용하며, 자연 상태의 올리고뉴클레오타이드에 충돌 에너지(collision energy)를 가해 생성된 조각 이온들의 정보를 바탕으로 서열을 구성하는 방식으로 진행됩니다.

이 때 targeted MSMS 모드를 적용하며, 다중 전하를 띠고 있는 전구체 이온에 충돌 유도 해리(CID, Collision Induced Dissociation)를 일으켜 조각화를 유도합니다. 이 때 올리고뉴클레오타이드는 특정한 패턴을 가지고 조각화되어 그림 3과 같은 조각 이온을 생성합니다⁵. 각 조각 이온은 결합이 끊어진 위치에 따라 a, a-B, b, c, d 이온 및 w, x, y, z 이온으로 표기됩니다.

a, b, c, d 이온은 결합이 끊어지는 지점을 기준으로 좌측에 위치하는 이온을 의미하며, w, x, y, z 이온은 우측에 위치하는 이온을 의미합니다. 또한 a-B 이온은 a 이온에서 염기(Base)가 떨어진 구조를 의미합니다⁶. 각 조각 이온은 a-w, b-x, c-y, d-z 이온 간 쌍을 이루어 하나의 올리고뉴클레오타이드를 구성합니다.

올리고뉴클레오타이드는 질량분석기 내에서 다중 전하 이온으로 분산됨에 따라 전구체 이온의 감응이 상대적으로 낮아질 수 있어 MSMS 모드에서는 100µM의 올리고뉴클레오타이드를 사용하였습니다.

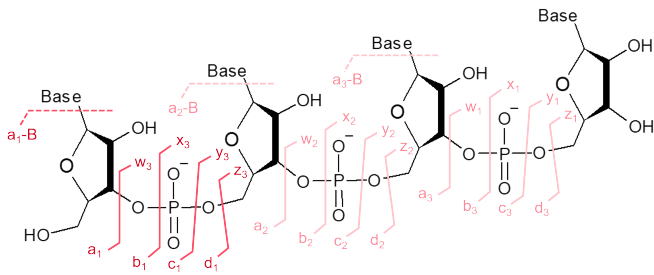


그림 3. 올리고뉴클레오타이드의 조각화 패턴.

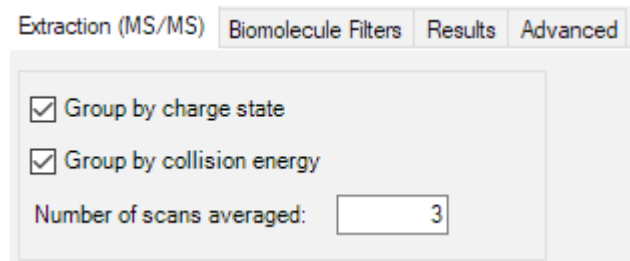


그림 4. BioConfirm12.0의 MSMS 스펙트럼 추출 조건.

올리고뉴클레오타이드는 MSMS 모드에서 지정하는 전구체 이온의 전하수 및 충돌 에너지 값에 따라 조각화 패턴에 차이가 발생합니다. 생성된 조각 이온의 종류는 서열 확인 결과에 영향을 주기에 MSMS 모드에서 가능한 다양하게 조각화를 유도하는 과정이 필요합니다. 이에 따라 전구체 이온의 전하수(Z=3~8) 및 충돌 에너지(CE=10, 20, 40V)값을 다양하게 적용하여 서열 확인이 용이하도록 하였습니다.

BioConfirm12.0 소프트웨어에서는 올리고뉴클레오타이드 및 서열 정보로부터 형성될 수 있는 조각 이온의 이론 값을 계산합니다. 이후 MSMS 질량 스펙트럼 결과와의 비교(질량 정확도, 동위체 패턴 등)를 통해 의 유무를 확인하고 점수화(scoring)합니다.

서열 확인에 사용하는 질량 스펙트럼은 MSMS 모드에서 1개 이상의 스펙트럼(n, 스캔수)을 추출한 '평균 스펙트럼'을 기준으로 합니다. 그림 4와 같이 전하수(group by charge state) 및 충돌 에너지(group by collision energy)를 기준으로 그룹화할 경우, 그룹 별로 n개씩 추출된 MSMS 스펙트럼에 대한 평균 스펙트럼을 계산합니다.

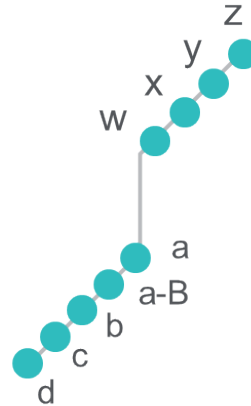


그림 5. BioConfirm12.0에서의 조각 이온 구분.

본 분석에서는 각 올리고뉴클레오타이드마다 4개의 전하수 및 3개 충돌 에너지를 적용하여 MSMS 분석을 진행하였습니다. 각 파라미터별 그룹화를 통해 총 12(=4x3)개의 평균 스펙트럼을 얻고, 각 스펙트럼에 대한 조각 이온 분포를 토대로 서열 확인을 진행하였습니다. 이 때의 평균 스캔수(n)는 3으로, 3개의 MSMS 스펙트럼에 대한 평균 스펙트럼을 사용하였습니다. 전하수 및 충돌 에너지를 기준으로 그룹화하지 않을 경우, 모든 대화상자에 'v' 표시를 해제하며, 결과적으로 1개의 평균 스펙트럼만이 얻어지게 됩니다.

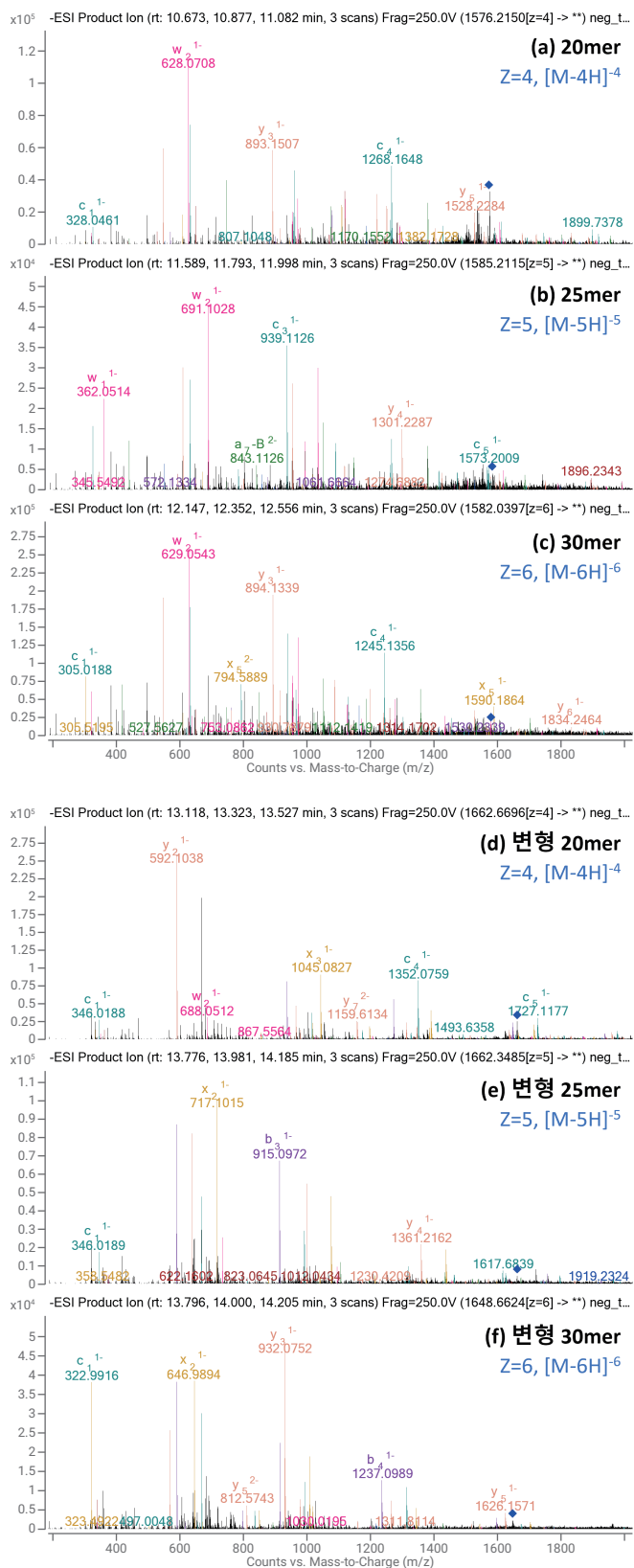


그림 6. MSMS 스펙트럼에서의 조각 이온 분포. (전하수(Z) = 4~6, 충돌 에너지(CE)=40V).

서열 확인이 완료된 조각 이온은 도식화되며(그림 5), 스펙트럼 상에서의 조각 이온 정보를 확인할 수 있습니다(그림 6). 추출된 평균 MSMS 스펙트럼상 조각 이온에 해당하는 m/z 값에는 y52-와 같이 조각 이온의 종류, 위치 및 전하수에 대한 정보를 확인할 수 있습니다.

또한 BioConfirm12.0의 서열 확인 기능은 시각화된 서열 확인 결과를 자동으로 제시합니다(그림 7). 각 시료의 서열정보를 토대로 조각 이온의 유무를 파악하기 용이하며, 이를 토대로 세부적인 MSMS 결과를 조회할 수 있습니다. 이때 각 조각 이온의 위치별 마크의 색상은 데이터 파일의 종류 혹은 ‘Multiple fragments’를 의미합니다. ‘Multiple fragments’는 각 조각 이온을 정의하는데 사용된 MSMS 결과가 둘 이상인 경우를 의미합니다.

결과적으로 MSMS 모드로부터 수집된 조각 이온을 조합하여 올리고뉴클레오타이드 서열 확인(sequence confirmation) 및 커버리지(coverage)를 계산하였으며, 변형 올리고뉴클레오타이드를 포함한 모든 올리고뉴클레오타이드에 대해서 100% 커버리지를 만족하였습니다.

결론 및 고찰

Agilent의 고분해능 질량분석기인 LC-QTOF(6545XT)와 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 그리고 BioConfirm12.0 소프트웨어를 사용하여 변형 올리고뉴클레오타이드에 대한 정성분석 및 서열 확인을 진행하였습니다.

올리고뉴클레오타이드는 deconvolution 작업을 통해 원형 분자량으로 환산되었습니다. 그 결과, 예상 분자량 기준 2ppm 이내의 정확도를 확인하였습니다. 또한 변형 올리고뉴클레오타이드를 포함한 모든 시료에서 각 서열에 대한 100% 커버리지를 확인하였습니다. 이는 상기 분석법에 사용된 합성 올리고뉴클레오타이드가 목적하는 서열에 부합하게 합성되었음을 의미합니다.

본 분석법을 통해 자연상태의 올리고뉴클레오타이드 외에도 복잡한 구조의 변형 올리고뉴클레오타이드에 대한 정성 분석 및 서열 확인이 가능함을 확인하였습니다. 그 밖에도 BioConfirm12.0 소프트웨어상에서 시각화된 자료를 함께 제시함으로써 복잡한 데이터에 대한 손쉬운 결과 해석이 가능합니다.

참고 문헌

1. Wang S. et al. Cellular uptake mediated by epidermal growth factor receptor facilitates the intracellular activity of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 2018, 46(7), 3579-3594.
2. Ramasamy T. et al. Nano drug delivery systems for antisense oligonucleotides (ASO) therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 2022, 352, 861-878.
3. Jung J. 고분해능 질량분석기 LC-QTOF를 이용한 올리고뉴클레오타이드 정성/정량 분석, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4883KOKR, 2022.
4. Lenore M. Polo and Patrick A. Limbach. Analysis of Oligonucleotides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. 2000, 10.2.1-10.2.20
5. McLuckey SA, Van Berkel GJ, Glish GL. Tandem massspectrometry of small, multiply charged oligonucleotides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1992, 3(1), 60-70.
6. Karin M. Keller, Jennifer S. Brodbelt. Charge state-dependent fragmentation of oligonucleotide/metal complexes. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2005, 16(1), 28-37.

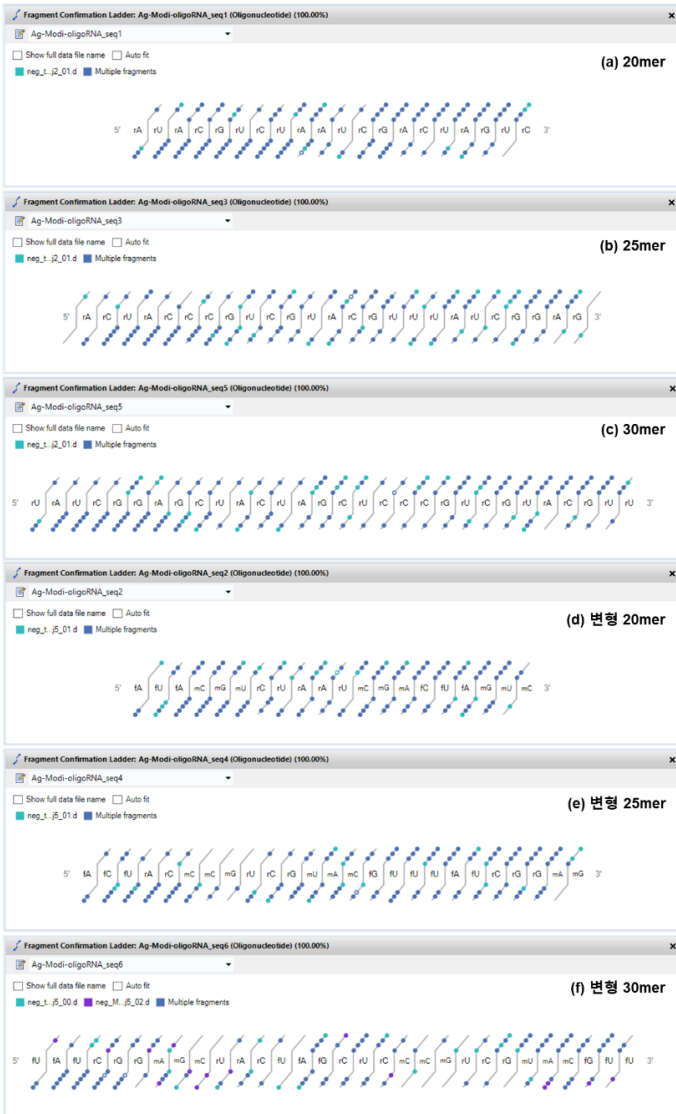


그림 7. 올리고뉴클레오타이드의 서열 확인 결과.

www.agilent.com/chem

DE55311322

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023
2023년 7월 11일, 한국에서 발행
5994-6346KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

