

리간드 결합형 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 순도, 함량 분석, 불순물 프로파일의 측정

OpenLab CDS용 Agilent Oligo Analysis Accelerator의 활용 방법

저자

James Webster
AstraZeneca
Macclesfield(영국)

Brian Rivera
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara(미국 캘리포니아)

개요

이 응용 자료에서는 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어용 애드온인 OpenLab CDS용 Agilent Oligo Analysis Accelerator(OAA)를 통해 기존의 데이터 무결성 및 규정 준수 아키텍처를 활용하면서 데이터 분석을 간소화하는 방법에 대해 소개합니다. 포스포로티오산 리간드 결합형 안티센스 올리고뉴클레오타이드(LICA)를 분석하여 순도, 함량 분석, 불순물 프로파일을 측정했습니다. 최적화된 처리 방법을 사용하면 시료의 복잡성과 순도에 따라 전체 데이터 분석 시간이 시료당 1시간 미만으로 단축되는 것으로 나타났습니다.

소개

치료용 합성 올리고뉴클레오타이드 개발에는 시료 순도, 라벨 표시 또는 함량 분석을 측정하고 불순물을 정량화하는 것과 관련된 여러 가지 과제가 있습니다. 이는 후기 단계 개발에 매우 중요하며 올리고뉴클레오타이드의 품질 관리(QC) 및 배치 릴리스를 지원하는 데 필수적입니다. 기존의 HPLC 분석법에는 QC 테스트에 필요한 감도나 특이성이 갖춰져 있지 않을 수 있습니다. 질량 분석기(MS)와 같이 선택성이 더 높은 검출기를 사용하는 것은 QC 테스트에 적합한 기술입니다. 실제로 선호되는 접근 방식은 UV 신호를 사용하여 고농도의 불순물을 정량화하는 동시에, 선택성 및 감도가 보다 높은 MS 검출을 통해 저농도의 불순물을 식별 및 정량화하는 것입니다.

Rentel 등이 제시한 바와 같이, Agilent InfinityLab LC/MSD XT는 올리고뉴클레오타이드의 QC 배치 릴리스 및 검증을 위해 사용할 수 있습니다. 이는 단일 사중극자의 사용 편의성, 전체 스캔 모드의 감도, 더 긴 결합형 올리고뉴클레오타이드를 분석하기에 충분한 질량 범위 덕분입니다. LC/MS 분석법은 UV와 MS 신호를 모두 사용하여 불순물을 정량화합니다. UV 검출은 크로마토그래피로 분리된 불순물을 정량화하는 데 사용되고, MS 검출은 전체 길이 생성물(FLP)과 함께 용출되는 불순물에 사용됩니다. 또한, 이러한 방식에서 사용되는 분석법은 여러 면에서 독특합니다. 올리고뉴클레오타이드에 대한 대부분의 이온쌍 역상 방법과 달리, 이 방법에서 사용되는 소프트 이온화 조건은 모체 올리고뉴클레오타이드와 그 불순물의 전하 상태 분포를 주로 -4 전하 상태로 집중시킵니다. 이를 통해 스펙트럼이 단순화되고 저농도의 불순물을 검출하는 감도가 높아집니다. 또한, FLP 부가물과 불순물 피크의 구별을 용이하게 하기 위해 시료를 고강도의 이온화원 조건에서 주입하는데, 이를 통해 완충액 부가물로 인한 평균 질량 스펙트럼의 피크가 제거됩니다. 분석법 자체는 견고한 것으로 입증되었지만, 독특한 방법으로 인해 데이터 분석이 어렵고 시간이 오래 걸릴 수 있습니다. 여러 개의 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 추출하고, 수동으로 적분하며, Microsoft Excel에서 많은 계산을 수행해야 합니다.

이 응용 자료에서는 OpenLab CDS용 Agilent OAA를 사용하여 LICA를 분석하여 순도, 함량 분석, 불순물 프로파일을 측정하는 방법에 대해 설명합니다.

실험

기기의 파라미터는 2022년 IONOIS(미국 캘리포니아주 칼즈배드) 소속의 Rentel 등이 제시한 분석법¹으로부터 채택했으며, 표 1은 관련 LC/MSD 파라미터를 강조하여 표시하고 있습니다. 시퀀스/주입 작업 목록은 표 2에 나와 있습니다. 이 방법에는 UV와 MS 신호에 대한 4단계 검량이 포함되어 있습니다. 또한 워크플로의 각 시료에 대해서는 표준 및 고강도에 해당하는 두 가지 MS 수집 방법이 필요합니다. 특정 MS 수집은 올리고뉴클레오타이드 서열에 따라 달라질 수 있으며, 소스 설정은 경험적 결과에 따라 최적화되어야 합니다.

분석에 사용된 시료는 AstraZeneca에서 공급한 16-mer 리간드 결합형 안티센스 올리고뉴클레오타이드로, 0.1mg/mL의 수용액 형태로 준비되었습니다.

데이터는 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어 버전 2.8을 사용하여 수집되었습니다. 데이터 처리는 Agilent OAA 버전 1.0을 사용하여 수행했습니다.

표 1. Agilent OAA에 대한 LC/MSD 분석법 파라미터.

HPLC 파라미터	
HPLC	Agilent 1290 Infinity II LC
컬럼	Hybrid C18, 3.5µm 2.1 x 150mm
이동상	A: 10% ACN, 5mM 트리부틸암모늄 아세테이트, 1µm EDTA B: 80% ACN, 5mM 트리부틸암모늄 아세테이트, 1µm EDTA
유속	0.25mL/분
컬럼 온도	50°C
기울기	22분 동안 45-80% B
UV 검출	가변 파장 검출기, 260nm
MS 파라미터	
MSD	Agilent InfinityLab LC/MSD XT (제품 번호 G6135C)
소스	전자분무 이온화
건조 가스 유량	13.0L/분
가스 온도	255°C(표준) 350°C(고강도)
Nebulizer 압력	25psig
캐필러리 전압	4000V
모드	음이온
스캔	m/z 1347.3–1847.3
스캔 시간	1149ms(표준) 1200ms(고강도)
Fragmentor	100
게인 계수	2

표 2. 시퀀스/주입 작업 목록.

시료명	시료 유형	라벨	주입량(μL)	수집 방법
물 바탕 시료	바탕 시료		25	표준
컨디셔닝(표준)	N/A		25	표준
컨디셔닝(고강도)	N/A		25	고강도
물 바탕 시료	바탕 시료		25	표준
물 바탕 시료	바탕 시료		25	표준
물 바탕 시료	바탕 시료		25	표준
작업 표준 용액(WSS), 10μL	검량 표준물질		10	표준
작업 표준 용액(WSS), 20μL	검량 표준물질		20	표준
작업 표준 용액(WSS), 25μL	검량 표준물질	QC	25	표준
작업 표준 용액(WSS), 30μL	검량 표준물질		30	표준
작업 표준 용액(WSS)	QC	QC	25	표준
시료(표준)	시료	S1	25	표준
바탕 시료	바탕 시료			
시료(고강도)	시료	H1	25	고강도
바탕 시료	바탕 시료		25	표준
작업 표준 용액(WSS)	QC	QC	25	표준
세척	시료		25	표준

결과 및 토의

OAA는 OpenLab CDS 데이터를 처리하는 소프트웨어 애드온으로, 데이터 분석 워크플로를 실행하는 데 필요한 작업을 자동화하는 프론트엔드 역할을 합니다. 여기에는 적분, 신호 오버레이, 스펙트럼 조사와 같은 수동 단계는 물론, Excel과 같은 스프레드시트 프로그램에서 일반적으로 수행되는 계산도 포함됩니다. 그림 1은 데이터 획득부터 보고 및 승인까지 프로세스의 각 단계에 대한 대략적인 개요를 보여줍니다.



그림 1. 데이터 시스템에 따른 순도, 함량 분석 및 불순물 프로파일링 워크플로 및 각 워크플로 내의 단계. 데이터의 수집은 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어에서 Agilent InfinityLab LC/MSD XT를 사용하여 수행됩니다. 데이터의 처리는 웹 애플리케이션에서 이루어집니다. 보고서의 작성은 다시 OpenLab CDS로 돌아와 수행됩니다.

시스템 적합성

프로젝트 설정과 데이터 선택이 완료된 후, 데이터 분석 워크플로의 첫 번째 단계는 시스템 적합성을 결정하는 것입니다. 이 분석법에서 중요한 단계는 QC 표준물질을 위한 UV 주 피크를 적절히 적분하는 것입니다. 먼저 용출되는 불순물(EEI)과 늦게 용출되는 불순물(LEI)의 적분 및 머무름 시간은 UV 크로마토그램이 적분되는 방식을 결정합니다. 이 작업은 참조 표준물질에 미리 정의된 알려진 EEI 및 LEI의 EIC를 사용하여 수행됩니다. 그 후, 유로에서 UV 및 MS 신호 지연으로 인한 머무름 시간 오프셋이 고려됩니다. 이 워크플로는 일반적으로 수동으로 수행되며, 크로마토그래피 데이터 시스템(CDS) 사용자가 이온 목록에서 알려진 불순물을 추출하고, 각 EIC를 수동으로 적분한 다음, 가장 먼저 용출된 불순물과 가장 늦게 용출된 불순물을 판별합니다. 계산은 스프레드시트에서 수행됩니다. 이 과정은 시간이 오래 걸릴 뿐만 아니라, 수작업으로 작성되어 오류가 발생하기 쉽습니다.

반대로, OAA 알고리즘은 UV 신호에 대한 EEI와 LEI 적분을 자동화하는 동시에 UV 신호에 대한 머무름 시간 오프셋을 자동으로 적용합니다. 또한, 시스템 적합성을 판별하기 위한 계산도

애플리케이션 내에서 수행되므로, 사용자는 결과 집합이 유효한지 확인하기 위해 계산을 직접 입력하거나 보고서를 생성할 필요가 없습니다.

그림 1은 UV 적분을 위한 사용자 인터페이스(UI)를 보여줍니다. OAA 알고리즘을 기반으로, 가장 먼저 용출된 불순물은 m/z 1617.3의 이온이며, 이는 n-p(dMeC) 불순물, 즉 메틸화된 시토신이 없어 길이가 더 짧은 불순물에 해당한다는 것을 확인했습니다. 식별된 가장 늦게 용출된 불순물은 m/z 1646.6의 이온이며, 이는 GalNAc + H₂O의 손실에 해당합니다. FLP가 LICA라는 점을 고려하면 당 부분이 손실되면 분자의 소수성이 더 커지게 되며, 따라서 이온쌍 역상 크로마토그래피를 통해 늦게 용출될 것입니다.

사용자가 적분 설정을 수동으로 변경해야 하는 경우, 웹 애플리케이션 UI에서 직접 변경할 수 있습니다. 예를 들어, 일반적으로 가장 먼저 용출된 불순물 대신 주 피크의 n-2 번곡점이 사용됩니다. 이 경우, 사용자는 인터페이스에서 점선을 클릭하고 드래그하여 필요에 따라 조정할 수 있습니다. 수동 적분은 완전한 추적성을 위해 감사 추적에 기록되며, 감사 추적에는 수동 적분을 수행한 사용자, 적분이 수행된 시점, 적분이 수행된 방법(즉, "DA API" 또는 웹 애플리케이션을 통해)이 표시됩니다.

UV Integration

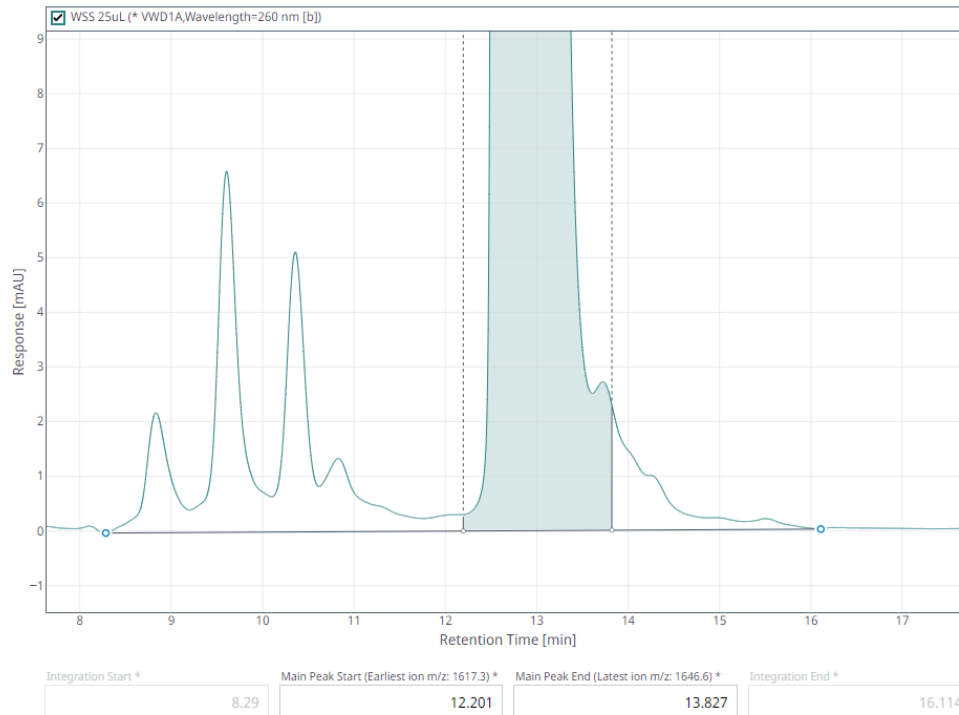


그림 2. Agilent OAA의 시스템 적합성을 위한 UV 적분. 적분에 사용된 불순물은 크로마토그램 아래 필드에 표시됩니다. 주 피크의 시작 적분은 m/z 1617.3의 적분 시작에서 UV/MS 오프셋을 빼서 결정됩니다. 주 피크의 종료 적분은 m/z 1646.6의 적분 종료에서 UV/MS 오프셋을 빼서 결정됩니다.

이온 분류

시스템 적합성 검토의 다음 단계는 임계치를 초과하는 질량 피크를 분류하는 것입니다. FLP보다 m/z 값이 작고 높이가 0.2% 이상인 피크, 또는 FLP보다 m/z 값이 크고 높이가 0.3% 이상인 피크는 표 3에 설명된 기준에 따라 분류해야 합니다.

표 3. Agilent OAA의 이온 분류 단계에서 m/z 값(이온)에 대한 정의입니다.

이온 분류 이름	정의
알려진 불순물	이온 목록에 알려진 생성물/공정 관련 불순물이 있음; 부가물 사이 충분한 분리능(알려진 이온의 $m/z \pm 0.5$ 이내)
충분히 분리되지 않음	알려진 불순물과 알려지지 않은 불순물 사이 $m/z \pm 1.0$ 분리능 내에 해당하는 MS 스펙트럼 피크
부가물	겹쳐지지 않은 알려진 부가물(즉, 알려지지 않은 불순물 사이 $m/z \geq 0.5$ 분리능)
알려진 불순물 / 가능한 부가물	분리능이 부족하지만 부가물과 불순물 사이의 알려진 부가물(즉, 부가물과 알려진 불순물 사이의 분리능이 $m/z \leq 0.5$); 확인을 위해 표준 및 고강도 조건에 해당하는 스펙트럼의 오버레이가 필요함
알려지지 않은 불순물	임계치를 초과하지만 이온 목록의 값과 일치하지 않는 이온. 확인을 위해 표준 및 고강도 조건에 해당하는 스펙트럼의 오버레이가 필요함
미검출	알려진 이온이 임계치 미만 영역에 있음

이온 분류는 수동 프로세스입니다. CDS 플랫폼에는 일반적으로 임계치 이상의 스펙트럼 값을 평가하는 기능이 내장되어 있지 않기 때문입니다. 따라서 사용자는 두 개의 서로 다른 임계치를 초과하는 m/z 값을 수동으로 식별해야 합니다. 임계치보다 높은 모든 값은 이온 목록과 일치 여부를 비교하며, 각 이온은 적절히 추출됩니다. 각각의 알려진 불순물/가능한 부가물 및 알려지지 않은 불순물을 정확하게 식별하고 분류하려면, 표준 및 고강도의 MS 조건 모두에서 주입한 스펙트럼을 오버레이시켜야 하므로, 임계치를 초과하는 이온을 육안으로 검사하는 것이 점점 더 어려워집니다.

이와 달리, OAA는 이러한 항목을 자동으로 분류하고 측정된 값에 대한 이론적인 m/z 값을 보고합니다. 또한, UI는 각 시료의 표준 조건에서의 스펙트럼과 고강도 조건에서의 스펙트럼을 자동으로 오버레이시켜 필요한 경우 추가로 검사할 수 있도록 합니다. 그러면 사용자는 소프트웨어 알고리즘이 결정한 것과 다른 분류를 선택할 수 있습니다(그림 3). 이 기능은 전체 스캔 스펙트럼에서 다른 이온과 스펙트럼이 겹치는 것으로 의심되는 불순물이 있는 영역에 유용할 수 있습니다. 예를 들어, 시료에 포스트 피크 $n+1$, Na/K+ 부가물(중복될 수 있음)이 포함되어 있을 것으로 의심되는 경우, 표준 조건의 스펙트럼 값과 고강도 조건의 스펙트럼 값을 비교할 때에도 잘못 식별하는 경우가 발생할 수 있습니다.

모든 이온이 알려진 이온 또는 알려지지 않은 이온으로 분류되면 각 m/z 값에 대해 EIC가 수행됩니다.

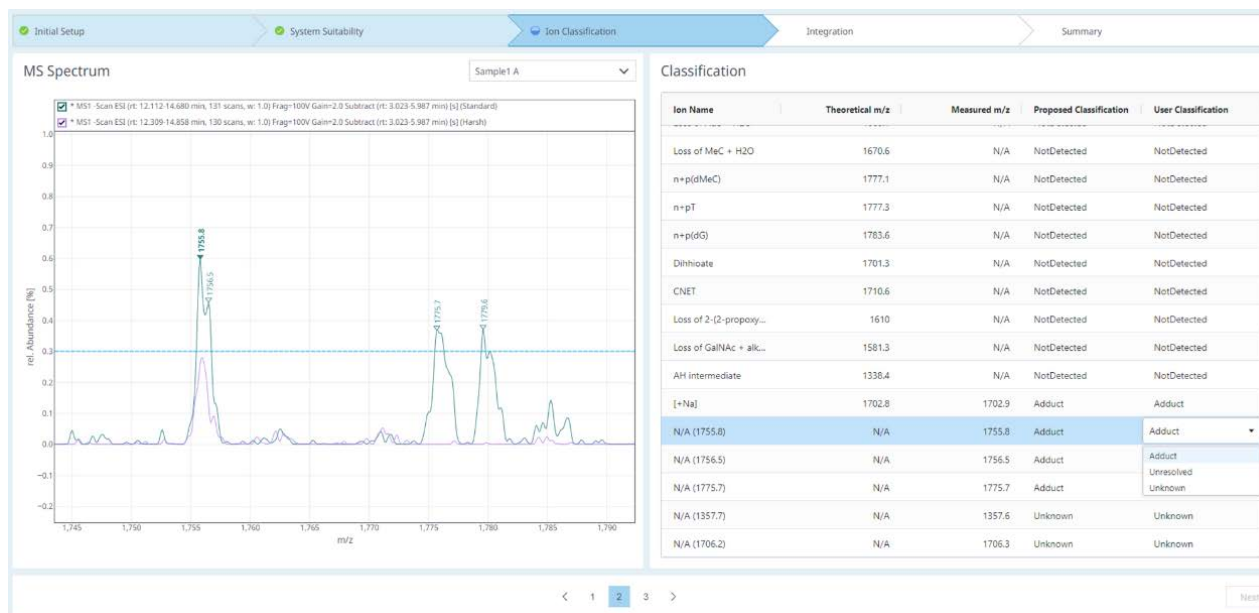


그림 3. 사용자는 이온 분류 워크플로를 진행하면서 소프트웨어에서 제안한 분류를 검토합니다. 두 가지 MS 조건에서 생성된 스펙트럼이 오버레이 형식으로 제공되어 부가물의 확인을 용이하게 합니다. 필요할 경우, 사용자가 수동으로 분류를 조정할 수도 있습니다.

적분

적분 단계에서는 각 EIC를 평가하여 정량화가 적절한지 확인합니다. 상대 정량의 0.2% 임계치를 넘는 결과 영역을 사용하여 UV 주 피크의 MS 순도를 측정하고, 이를 통해 시료의 전체 순도를 측정합니다. EIC의 수동 적분은 시료가 복잡성과 밀접하게 관련된 불순물에 대해 크로마토그래피 분리능이 불충분한 경우에 필요합니다.

이러한 워크플로를 간소화하기 위해, 그림 4에 표시된 것처럼 OAA는 그래픽 UI에서 FLP, EIC 표준, EIC 고강도의 세 가지 오버레이를 생성합니다. 가장 나중에 용출된 불순물은 GalNAc와 물 분자가 손실되어 더 소수성이 된 FLP로, 이로 인해 뚜렷하지

않은 피크가 발생합니다. 이는 상대적으로 양이 적기 때문(상대 피크 면적 기준 $\leq 1.0\%$)이거나 단위 질량 분리능의 제한으로 인해 함께 추출된 불순물이 발생하기 때문일 수 있습니다. 어느 경우든, 크로마토그래피 분리능이 낮으면 피크를 수동으로 적분해야 합니다.

모든 시료의 EIC 피크가 적분되면 OAA는 시스템 적합성 주 피크 적분과 유사하게 UV 주 피크 적분에 EEI 및 LEI 설정을 적용합니다. 즉, EEI 피크의 적분 시작은 주 피크 적분의 시작에 사용되며, LEI 피크의 적분 종료는 주 피크 적분의 종료에 사용됩니다. UV 및 MS 신호 오프셋은 자동으로 발생합니다. 그림 5는 EEI와 LEI 적분을 기반으로 메인 피크 적분이 자동으로 수행되는 것을 보여줍니다.

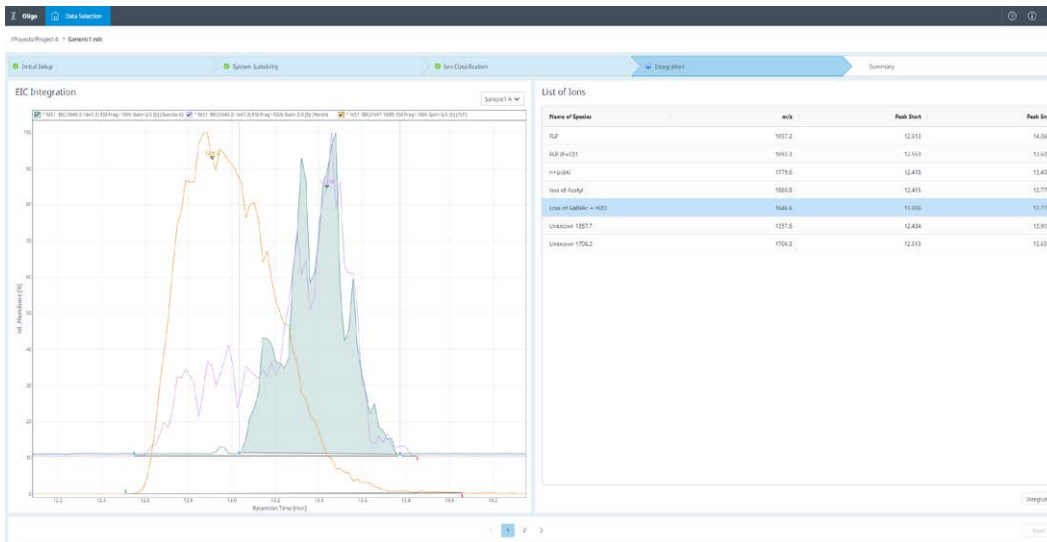


그림 4. 전체 길이 생성물에 대한 EIC와, LEI에 해당하는 "GalNAc + H₂O의 손실"에 대한 표준/고강도 조건의 오버레이. 오버레이는 UI에서 자동으로 생성되며, 이를 통해 사용자는 애플리케이션 상에서 직접 수동으로 피크를 적분할 수 있습니다.

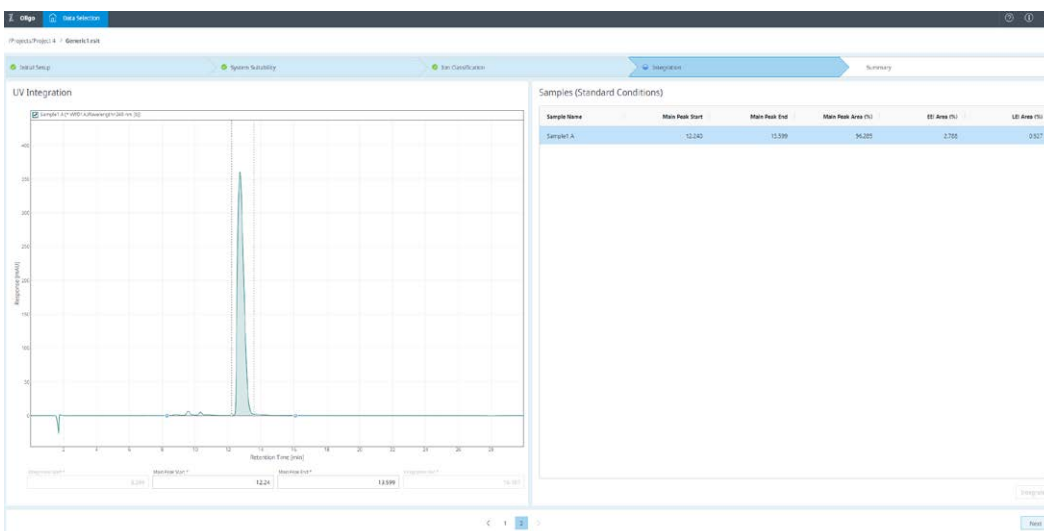


그림 5. EIC 적분이 수행된 후, EEI와 LEI를 기반으로 시료의 UV 적분이 자동으로 생성됩니다. 사용자는 필요에 따라 적분의 시작점과 종료점을 조정할 수도 있습니다.

데이터 요약 및 보고

워크플로의 마지막 단계는 초기 순도 및 분석/라벨링 결과를 검토하는 것입니다(그림 6). 여기에는 이전 단계에서 표시된 시스템 적합성 결과가 포함됩니다. 요약 자체는 보고서가 아니라는 점에 유의해야 합니다. 결과를 검토용으로 보고하려면 OpenLab CDS 보고서 템플릿을 사용해야 합니다. 또한, 모든 전자 서명 및 승인은 OAA가 아닌 OpenLab Reporting에서 이루어집니다. 이는 OAA가 OpenLab CDS 플랫폼 내에 이미 존재하는 데이터 규제 준수 규칙을 활용하기 때문입니다.

또한, OpenLab Reporting은 시료에서 확인된 각 불순물의 상대적 정량화를 포함하여 시료에 대해 더 광범위한 정보를 제공합니다. 테스트된 올리고뉴클레오타이드의 결과는 표 4에 명시되어 있습니다.

OpenLab Reporting을 사용하면 보고서 템플릿을 쉽게 수정하여 보고되는 데이터를 맞춤 설정할 수 있습니다. 이를 통해 검토자는 웹 애플리케이션의 워크플로에 표시되지 않은 데이터를 확인할 수 있습니다. 예를 들어, UV 신호를 적분하기 위해 EEI/LEI로 선택된 m/z 값과 해당 EIC가 있습니다.

순도, 함량 분석, 라벨 표시 계산 외에도, 이 보고서는 n-1 및 무염기 불순물과 같은 이온 범주에 대한 계산도 제공합니다. 또한, 검출 한계나 정량 한계를 넘는 이온을 포함한 광범위한 불순물 프로파일도 보고합니다(표 4).

표 4. 시료의 불순물 프로파일.

이름	측정값	면적	결과(%)
FLP	1697.3	87402126.09	89.835
FLP(P=O)1	1693.1	501650.387	0.516
n+ p(dA)	1779.6	295681.246	0.248
Acetyl기의 손실	1686.8	1343267.863	1.13
GalNAc + H2O의 손실	1646.4	560489.353	0.471
1706.2(미확인)	1706.2	378111.8885	0.317

Sample1 A



Identity

Pass/Fail	Parameter	Criteria	Result
 Pass	Molecular weight (Da)	6793.2 ± 1	6793.200

Purity

Pass/Fail	Parameter	Criteria	Result
 Pass	UV purity (%)	> 95	96.285
 Pass	MS purity (%)	> 90	93.306
 Pass	Relative target conce...	75 < c < 130	99.400

그림 6. 보고서 생성 전 요약 페이지입니다. 식별 및 순도 결과가 보고되며, 시스템 적합성 결과를 검토할 수 있습니다.

결론

LC/MS 분석은 리간드 결합형 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (LICA)와 같은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 치료제의 ID, 순도, 함량 분석 및 불순물 프로파일을 측정하는 데 있어 절대적인 기준입니다. Agilent InfinityLab LC/MSD XT는 이 분석법에 대해 최적의 선택성과 감도를 갖추고 있습니다. 단, 전통적으로 여러 단계의 수동 작업이 필요한 복잡한 워크플로로 인해, 데이터 분석은 까다로울 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 OpenLab CDS용 Agilent Oligo Analysis Accelerator를 사용하여 데이터 분석을 간소화하고 LICA의 순도, 함량 분석, 라벨 표시를 측정하는 방법에 대해 다룹니다.

참고 자료

1. Rentel, C.; Gaus, H.; Bradley, K.; Luu, N.; Kolkey, K.; Mai, B.; Madsen, M.; Pearce, M.; Bock, B.; and Capaldi, D. Assay, purity, and impurity profile of phosphorothioate oligonucleotide therapeutics by ion pair-HPLC-MS. *Nucleic Acid Ther.* **2022**, 32(3), 206-220. <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0056>

OpenLab CDS용 Oligo Analysis Accelerator에 대해 자세히 알아보려면 다음을 방문하세요.

www.agilent.com/biopharma/oligo-analysis-accelerator

DE-003153

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 12월 11일, 한국에서 발행
5994-7993KO

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