

# OpenLab CDS용 Agilent Oligo Analysis Accelerator를 사용한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드의 순도, 함량 분석 및 불순물 프로파일링

## 저자

Brian Rivera  
Agilent Technologies, Inc.

## 소개

치료용 합성 올리고뉴클레오타이드를 다룰 때는 시료의 순도 및 라벨의 표기 사양 또는 분석법의 결정, 불순물의 정량 등 여러 과제에 직면하게 됩니다. 260nm UV 검출에 의존하는 기존의 HPLC 분석법은 품질 관리(QC) 테스트에 필요한 감도나 특이성이 갖춰져 있지 않을 수 있습니다. 질량 분석기와 같이 선택성이 더 높은 검출기를 사용하는 것은 QC 테스트에 적합한 기술입니다. LC/MS 분석법은 올리고의 특성을 파악하는 데 있어 중요한 분석법이지만, 고해상도 정밀 질량 검출기 중 다수는 QC와 같은 일상적인 테스트 환경에 필요한 견고성이 갖춰져 있지 않을 수 있습니다. 또한 MS의 작동, 데이터 분석, 데이터 해석에는 높은 수준의 기술 전문 지식이 필요한 경우가 많습니다.

보다 실용적인 접근 방식은 올리고의 순도, 함량 분석, 불순물 프로파일링에 충분히 선택적이고 민감한 단일 사중극자 검출기를 사용하는 것입니다. Agilent InfinityLab LC/MSD XT는 비교적 높은 질량 범위와 전체 스캔 모드의 감도를 갖추고 있어 LC/MS QC에 대한 요구 사항을 충족시킬 수 있습니다.

Rentel 등이 제시한 바와 같이<sup>1</sup>, LC/MSD XT는 올리고뉴클레오타이드의 QC 배치 릴리스 및 검증을 위해 사용할 수 있습니다. 그러나, 남아 있는 과제 중 하나는 여러 개의 이온 크로마토그램을 추출하고 수동으로 적분을 수행해야 하는 복잡한 다단계 데이터 분석입니다. 이러한 작업을 크로마토그래피 데이터 시스템(CDS) 상에서 수행하면서 규정 준수 요구 사항을 충족시키기 위해서는 긴 시간이 필요할 수 있습니다. 분석을 수행하는 작업자가 직접 수작업으로 작성할 경우 오류 가능성이 높아지고, 의사 결정 또한 더욱 지연될 수 있습니다.

이 기술 개요에서는 Agilent OpenLab CDS용 Oligo Analysis Accelerator(OAA)에 대해 설명합니다. 이 소프트웨어 애드온은 OpenLab CDS의 데이터 분석을 위한 프런트 엔드 역할을 하며, 데이터 무결성 및 규제 준수 요구 사항을 충족하는 데 도움이 되는 내장형 기술 제어 기능을 활용합니다. 적합한 사용자 인터페이스에서 오버레이, 적분, 계산을 수행함으로써 데이터 분석이 크게 간소화됩니다. 이를 통해 업무 시간을 절약할 수 있을 뿐만 아니라 데이터 품질도 향상됩니다.

## 올리고뉴클레오타이드용 이온쌍 역상 액체 크로마토그래피 질량 분석기(IP-RPLC)에 대한 배경

올리고뉴클레오타이드에 대한 IP-RPLC는 잘 확립되어 있지만, 몇 가지 단점이 있습니다. 올리고는 길이가 짧으며 음전하를 띤 올리고머로써, 질량 분석 검출기에 들어가기 전 전기 분무 탈착 과정에서 다중 전하를 띤 엔벨로프로 둘러싸이게 됩니다. 동시에 용출된 불순물은 표적 전체 길이 생성물과 다른 이온 사이에 스펙트럼 중첩을 초래하며, 고분해능 MS 검출기와 고도로 최적화된 LC 분석법을 사용하지 않고도 복잡한 데이터 분석이 가능합니다. 크로마토그래피와 질량 분석의 분리능이 충분하더라도, 모체 올리고와 불순물 간의 화학적 유사성을 찾아내는 것은 극히 어렵습니다. 특히, 견고성과 정확성, 반복성, 특이성을 균형 있게 고려해야 하는 일상적인 테스트 환경에서는 더욱 그렇습니다.

Rentel 등이 개발한 LC/MS 분석법은 이러한 과제 중 대부분을 우회할 수 있습니다. 첫째, 하전 상태 엔벨로프는 상대적으로 소프트한 이온화 조건 외에도 이동상/주입 용매 조건(예를 들어, 물과 아세트니트릴에 용해된 트리부틸암모늄 아세테이트)의

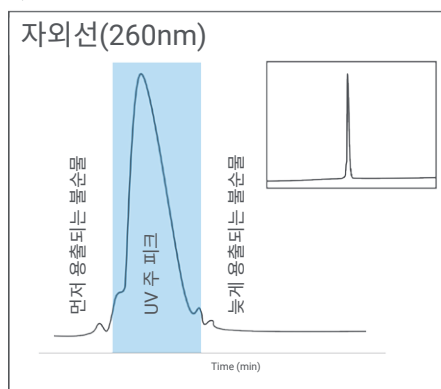
조합을 사용하여 주로 4가의 전하를 띤 상태로 강제됩니다. 하나의 전하 상태가 관찰되므로 화학적으로 유사하며 동시에 용출된 불순물을 측정 및 정량화하는 것이 가능합니다. 이는 0.2% 수준의 불순물을 검출할 수 있을 정도의 우수한 재현성을 통해 입증되었습니다.

이동상에 존재하는 트리부틸암모늄 아세테이트(TBAA)는 전하 상태를 최소화하는 데 최적화되어 있지만, 생성 불순물에 대한 크로마토그래피 분리 성능이 떨어집니다. 그러나 TBAA는 강력한 이온쌍을 이루는 물질로써, 용출을 위해서는 고농도의 아세트니트릴이 필요합니다. 결과적으로 생성되는 높은 유기 전기 분무 이온화 입자가 충분한 감도를 보장합니다. 목표 물질과 동시에 용출되는 모든 불순물은 임계치 이상에서 검출될 수 있습니다. 이 임계치를 초과하는 모든  $m/z$  값(알려진 또는 알려지지 않은 불순물)은 추출된 이온 크로마토그램(EIC)에 사용되며, 이 값은 정량화를 위해 적분됩니다.

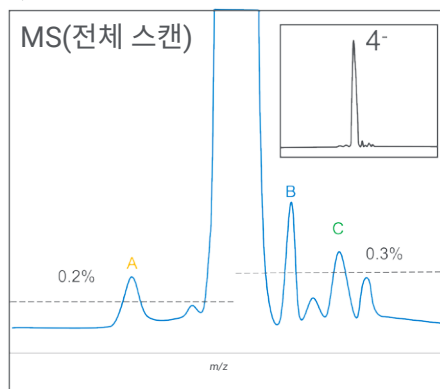
그림 1은 분석 워크플로가 수행되는 방식을 개략적으로 요약한 것입니다. 각 시료 또는 표준물질 주입은 UV 신호를 적분하여 피크 면적에 의한 UV 순도의 백분율을 측정합니다. UV 주 피크의 MS 스펙트럼은 추출되어 사전 정의된 임계치를 초과하는 모든  $m/z$  값에 대해 평가됩니다. 그런 다음 EIC를 적분하여 정량화합니다.

분석 워크플로에는 다른 QC 분석법과 차별화되는 주목할 만한 측면이 몇 가지 있습니다. 예를 들면, UV와 MS 검출을 모두 갖춘 4포인트 검량선이 사용된다는 점입니다. UV 피크 면적은 간단한 선형 상관관계를 사용하는데, 이는 원료 의약품 및 완제 의약품을 위한 분석법을 결정하거나 농도를 측정할 때 필요합니다. 그러나 MS 검량의 경우, 전체 길이 생성물(FLP)과 단일 산화가 일어난 FLP(FLP, P=O)의 피크 면적을 합산하게 됩니다. 이는 두 이온이 거의 동일한 용출 프로파일을 가지고 있기 때문이며, 다른

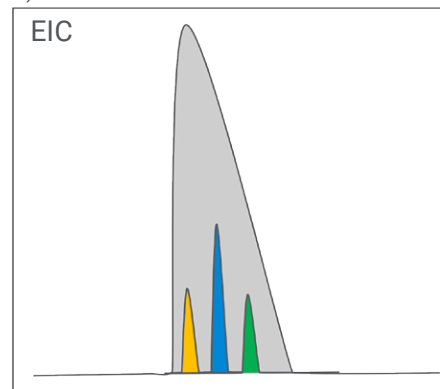
A) UV의 적분



B) 임계치 이상의  $m/z$  값 분류



C) 불순물 EIC의 적분



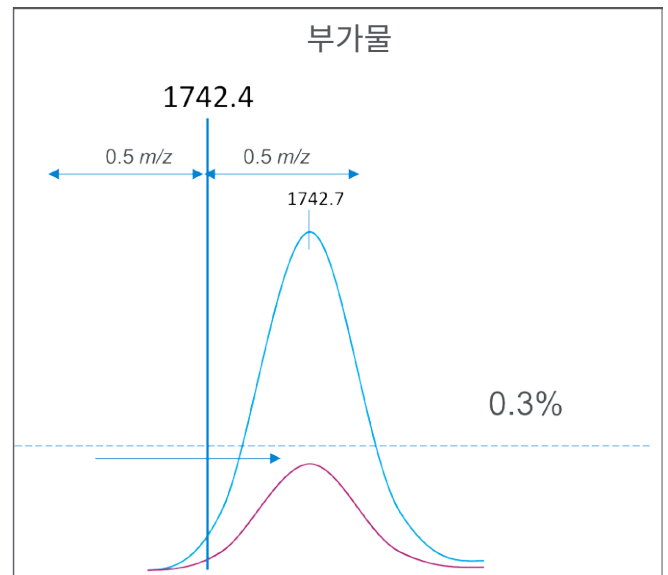
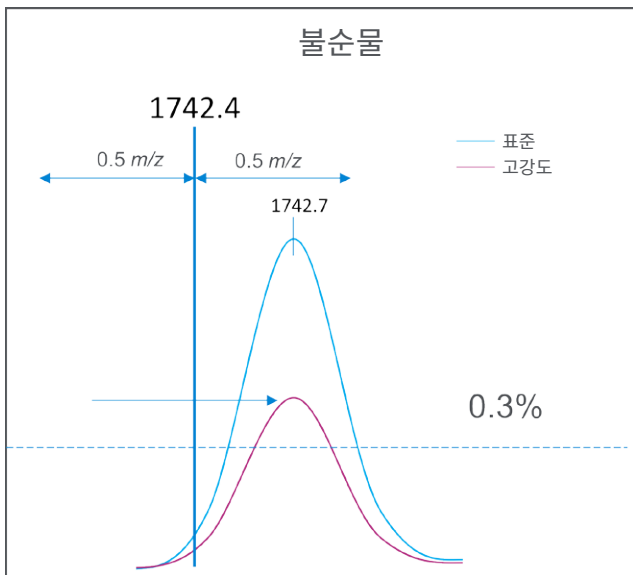
**그림 1.** A) UV 순도는 먼저 용출되는 불순물과 늦게 용출되는 불순물의 주 피크를 적분하여 계산합니다. B) 주 피크의 MS 전체 스캔 스펙트럼은 임계치(0.2% pre-FLP  $m/z$  및 0.3% post-FLP  $m/z$ )를 넘는 불순물을 분류하기 위해 사용됩니다. C) 각 불순물의 EIC를 적분하여 표준물질 또는 시료의 MS 순도를 측정합니다.

부분적으로 분리된 불순물과 비교했을 때 유사한 이온화 효율을 보이기 때문입니다. 포스포로티오에이트는 치료용 올리고머의 보편적인 변형에 해당하므로, 단일 산화는 정확하게 정량화해야 할 일반적인 불순물입니다. FLP와 FLP(P=O)의 결과 합산은 높은 표준 농도 수준에서 가장 두드러지는 비선형 감응을 일으킵니다. 따라서, 2차 또는 2차 다항식 곡선이 사용됩니다.

또한, 분석된 각 시료는 두 가지 다른 MS 소스 조건에서 실행되어야 합니다. 4가 전하 상태에 대한 소프트한 조건에서 소스를 실행해야 하므로 FLP 부가물이 형성될 수 있으며, 이는 특히 시료에 등압에 가까운 불순물이 존재하는 경우 문제가 될 수 있습니다. 따라서 부가물의 존재를 확인하기 위해 이른바 "고강도의" 조건이 실행됩니다. 즉, 등압에 가까운 불순물의 경우, 고강도 조건의 이온 값이 여전히 임계치보다 높으면, 해당 이온은 불순물로 분류되고 정량화를 위한 EIC가 수행됩니다.

표 1은 "작업 표준 용액"(WSS)을 사용한 4포인트 검량과 각 시료에 대한 표준/고강도 요건을 보여주는 주입 시퀀스 목록의 예입니다. 표 2는 수집 방법에 대한 LC 및 MS 파라미터의 권장 사항을 보여줍니다.

이 방법에 대한 마지막 고려 사항은 고유한 이동상으로 인해 이중 올리고의 센스 및 안티센스 가닥이 동시 용출될 수 있으므로 이중 올리고(예: 변성 조건을 위한 siRNA)의 분리가 실용적이지 않다는 점입니다. 또한, -4의 전하 상태는 Agilent InfinityLab LC/MSD XT의 확장된 질량 범위가  $m/z$  3000의 상한을 갖기 때문에, 40mer 이하의 올리고보다 작은 분자로 응용을 제한합니다.



**그림 2.** 소프트한 이온화가 필요하기 때문에, 임계치를 초과하는 이온이 불순물인지 부가물인지 판별하려면 두 가지 다른 MS 수집 방법이 필요합니다. 고강도의 조건에서도 이온이 여전히 임계치를 초과하면 불순물로 간주됩니다. 그렇지 않으면 이온은 부가물로 간주되어, 정량화에 사용되지 않습니다.

**표 1.** Agilent OpenLab CDS의 Agilent Oligo Analysis Accelerator 수집 방법에 대한 주입 목록입니다. 시스템의 컨디셔닝과 평형화를 위해 최소한 하나의 바탕 시료가 필요하나, 일반적으로 세 개의 바탕 시료를 측정해야 합니다. 3개의 QC 표준물질이 사용되며, 그중 하나는 검량선의 세 번째 농도 단계로 사용되기도 합니다. 시료 수집 방법에는 두 가지 방법(표준 및 고강도)이 필요하며, "고강도" 조건의 바탕 시료 주입이 권장됩니다. 라벨은 OpenLab CDS 수집에 사용됩니다.

| 시료명       | 시료 유형   | 라벨 | 주입량(μL) | 수집 방법 |
|-----------|---------|----|---------|-------|
| 바탕 시료     | 바탕 시료   |    | 25      | 표준    |
| 바탕 시료     | 바탕 시료   |    | 25      | 표준    |
| 바탕 시료     | 바탕 시료   |    | 25      | 표준    |
| WSS, 10μL | 검량 표준물질 |    | 10      | 표준    |
| WSS, 20μL | 검량 표준물질 |    | 20      | 표준    |
| WSS, 25μL | 검량 표준물질 | QC | 25      | 표준    |
| WSS, 30μL | 검량 표준물질 |    | 30      | 표준    |
| WSS       | QC      | QC | 25      | 표준    |
| 시료(표준)    | 시료      | S1 | 25      | 표준    |
| 바탕 시료     | 바탕 시료   |    | 25      | 고강도   |
| 시료(고강도)   | 시료      | H1 | 25      | 고강도   |
| 바탕 시료     | 바탕 시료   |    | 25      | 표준    |
| WSS       | QC      | QC | 25      | 표준    |

**표 2.** LC 및 MS 권장하는 파라미터 트리부틸암모늄 아세테이트(TBAA)는 더 낮은 전하 상태를 보장하며, 대부분 단일 가닥 올리고가 -4 상태가 되도록 합니다. 대부분의 올리고의 경우, 스캔 범위는 목표 FLP m/z의  $\pm 150$ 으로 설정됩니다. 표준 및 고강도의 MS 조건은 건조 가스 유량과 가스 온도가 모두 다르며, 고강도의 조건은 부가물 형성을 최소화하기 위해 더 높습니다. 그러나 이로 인해 이온화원 내 조각화(주로 탈퓨린화)가 발생하므로, 특히 정량화의 경우 표준 조건이 여전히 필요해집니다.

|              |                                                                                    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC         | Agilent 1260 Infinity II LC/Agilent 1290 Infinity II LC                            |
| 컬럼           | Agilent AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼, 2.1 x 150mm                                 |
| 이동상          | A: 10% ACN, 5mM 트리부틸암모늄 아세테이트, 1μM EDTA<br>B: 80% ACN, 5mM 트리부틸암모늄 아세테이트, 1μM EDTA |
| 유속           | 0.25mL/분                                                                           |
| 컬럼 온도        | 50°C                                                                               |
| UV           | 다이오드 어레이 검출기, 260nm                                                                |
| 기울기          | 22분간 45-80% B                                                                      |
| MSD          | G6135C                                                                             |
| 소스           | ESI                                                                                |
| 건조 가스 유량     | 12.0L/분(표준)<br>13.0L/분(고강도)                                                        |
| 가스 온도        | 260°C(표준)<br>350°C(고강도)                                                            |
| Nebulizer 압력 | 25psig                                                                             |
| 캐필러리 전압      | 4000V                                                                              |
| 모드           | 음이온                                                                                |
| 스캔           | FLP, m/z -150 - +150<br>예를 들어, m/z 1728.1, 1578.1-1878.1, 프로파일                     |
| 스캔 시간        | 1149ms(표준)<br>975ms(고강도)                                                           |
| Fragmentor   | 100V                                                                               |
| 게인 계수        | 2                                                                                  |

## Oligo Analysis Accelerator 소프트웨어 및 아키텍처

고유한 이동상과 두 개의 별도 MS 소스 조건을 필요로 한다는 점을 제외하면, LC/MS 수집 워크플로는 올리고 분석에 비교적 간단합니다. 그러나 표준 크로마토그래피 데이터 시스템의 범위 내에서 이러한 분석 워크플로를 수행하려면 여러 번의 수동 신호 오버레이와 수작업을 통한 기록이 필요하므로, 시간 소모적인 작업이 될 수 있습니다. 워크플로를 수행할 수 있는 소프트웨어 모듈이 있기는 하지만, 21 CFR Part 11 및 기타 규제 요구 사항을 충족하는 데 필요한 데이터 무결성과 규제 준수에 대해 부족한 면이 있을 수 있습니다.

이에 따라 OAA는 OpenLab CDS와 통신하기 위해 "RESTful API"를 사용하는 웹 클라이언트(Angular)로 개발되었습니다. 이를 통해 OAA는 OpenLab 내의 규제 준수 환경에 대한 프런트 엔드 역할을 수행하여 사용자 액세스 제어, 변경 제어/버전 관리, 감사 추적 및 로그 파일을 통한 추적성을 보장합니다.

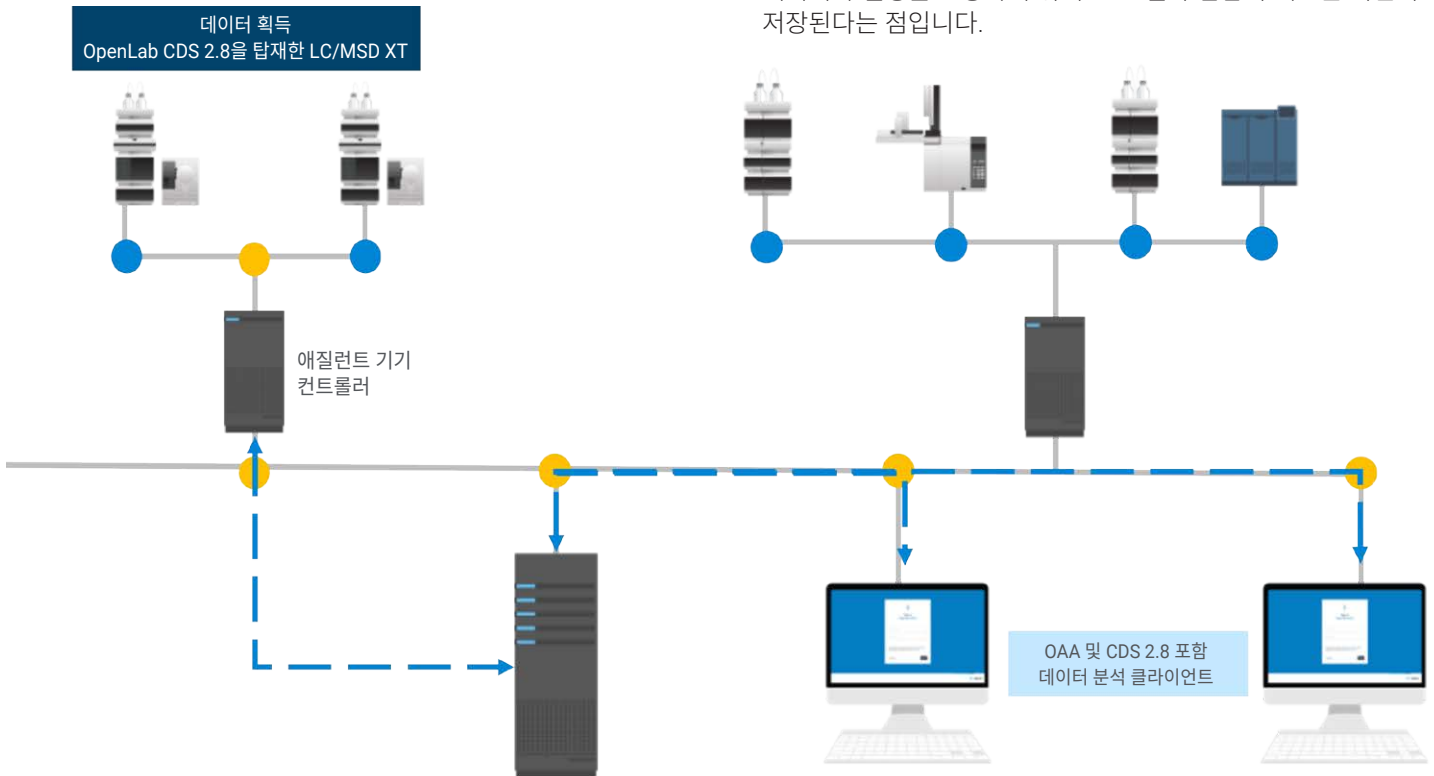
그림 3은 OpenLab CDS 클라이언트-서버 토폴로지에서 웹 클라이언트가 사용되는 방식을 보여줍니다. 요약하면, LC/MSD XT가 데이터를 획득하고, 최적화된 처리 방법을 통해 적분 설정, 스펙트럼 추출 설정, 메타데이터가 올바른 필드에 입력되도록 합니다. 이 원본 수집 결과 집합 버전은 서버의 안전한 저장 위치에 저장됩니다.

### Oligo Analysis Accelerator 분석 워크플로

이 섹션에서는 OAA 애플리케이션의 핵심 소프트웨어 기능 중 일부를 중점적으로 소개하며, 순도, 함량 분석, 불순물 프로파일링에 대한 워크플로를 안내합니다. 워크플로 자체는 다음과 같은 단계로 나뉩니다:

1. 프로젝트 설정, 처리 방법, 데이터 획득
2. 데이터 선택
3. 시스템 적합성
4. 이온 분류
5. 적분
6. 요약

그림 4는 각 워크플로가 어떤 데이터 시스템에서 수행되는지를 강조 표시합니다. 중요한 것은, 데이터 선택이 시작되는 즉시, 데이터 무결성을 보장하기 위해 OAA 결과 집합의 새로운 버전이 저장된다는 점입니다.



**그림 3.** OpenLab CDS용 Agilent Oligo Analysis Accelerator의 클라이언트-서버 토폴로지. 데이터는 애질런트 기기 컨트롤러(AIC)에 연결된 분산형 Agilent InfinityLab LC/MSD XT를 통해 수집됩니다. 데이터는 이어서 Agilent OpenLab Server에 저장됩니다. OAA 클라이언트는 DA API를 통해 데이터에 액세스할 수 있으므로, 처리 방법을 변경할 수 있습니다. 처리 방법에 대한 모든 변경 사항은 OpenLab 내의 해당 로그 파일과 감사 추적에 유지됩니다.

## Agilent OpenLab 제어판 및 수집



## Agilent OpenLab Oligo Analysis Accelerator



## Agilent OpenLab 데이터 분석



**그림 4.** OpenLab CDS용 Agilent Oligo Analysis Accelerator를 사용한 올리고의 순도, 함량 분석, 불순물 프로파일링을 위한 전체 분석 워크플로입니다. 프로젝트 구성 및 데이터 획득은 각각 Agilent OpenLab 제어판 및 수집 창에서 수행됩니다. 데이터 분석은 Agilent Oligo Analysis Accelerator에서 수행됩니다. 보고 및 승인은 Agilent OpenLab Data Analysis에서 수행됩니다.

### 프로젝트 설정, 획득, 처리 방법

사용자는 데이터 처리를 위해 결과 집합을 OAA로 가져오기 전에 프로젝트를 구성해야 합니다. 여기에는 프로젝트 폴더 설정, 처리 방법 최적화, 데이터 획득이 포함됩니다. 이 세 단계는 모두 OpenLab 제어판과 CDS 내에서 수행됩니다.

각 분자는 Agilent OpenLab 제어판에서 구성된 자체 프로젝트 폴더를 가져야 합니다. 시료 사용자 정의 파라미터는 약물 성분 및 약물 시험 보고에 필요한 관련 메타데이터를 입력할 때 사용됩니다. 여기에는 시료 전처리 정보, 수분에 대한 Karl Fisher 측정값, 시료 로트 번호 등이 포함됩니다. 또한, 처리 방법 구성은 웹 애플리케이션에서 수동 적분 및 입력의 양을 최소화하기 위해 사용됩니다. 여기에는 UV 신호와 EIC에 대한 예상 크로마토그래피 성능에 따른 피크 적분 최적화가 포함됩니다.

프로젝트 폴더와 프로세스 방법이 구성되면 분석을 수행하는 작업자는 데이터 획득을 설정할 수 있습니다. 시료 및 참조 표준물질 정보가 시퀀스 테이블에 입력되고, 처리 방법은 각 시료에 할당할 수 있습니다. 가장 중요한 것은 표준 시료와 고강도 조건을 위한 두 가지 별도의 수집 방법입니다. 이러한 소스 설정은 부가물과 불순물을 정확하게 측정하기 위해 필요합니다.

### 데이터 선택

데이터 선택 단계는 웹 애플리케이션에서 수행되는 OAA의 첫 번째 단계입니다. 사용자는 OpenLab 로그인 자격 증명을 통해 웹 포털에 로그인하며, 데이터 선택의 파라미터 입력은 제어판에서 할당된 사용자 역할 및 권한으로 관리됩니다. 그런 다음 프로젝트 수준의 파라미터를 설정할 수 있습니다. 여기에는 알려진 모든 이온이나 m/z 값을 .CSV 형식으로 저장한 이온 목록을 가져오는 작업이 포함됩니다. 또한, 원료 의약품 및 완제 의약품에 대한 파라미터와 함께 시스템 적합성 요구 사항과 시료 파라미터가 입력됩니다.

프로젝트 수준의 파라미터를 입력하면 사용자는 초기 설정으로 이동하게 됩니다. 필요한 경우 사용자는 결과 집합 수준에서 무엇이든 변경할 수 있습니다. 변경이 필요하지 않은 경우, 시스템 적합성에 앞서 결과 집합의 메타데이터와 입력을 검토할 수 있습니다.

### 시스템 적합성

시스템 적합성 테스트(SST)에는 UV 및 MS 신호 모두에 대해 수행해야 하는 여러 가지 계산이 있습니다. Microsoft Excel 워크시트나 OpenLab CDS의 사용자 정의 보고서를 사용하여 SST를 수행해야 할 경우, 긴 시간이 걸릴 수 있습니다. 따라서 OAA 웹 애플리케이션은 결과 집합에서 이미 처리된 데이터를 사용하여 SST를 자동으로 계산합니다.

그러나 웹 애플리케이션에서 수행해야 할 한 가지 단계는 UV 주 피크를 적분하는 것입니다. 이는 작업 표준 용액의 UV 순도를 측정하고 UV 검량선을 생성하는 데 사용됩니다.

OAA 알고리즘은 다음과 같은 방식으로 UV 주 피크의 적분을 결정합니다:

가장 먼저 용출되는 불순물(EEI)은 이온 목록에 있는 모든 알려진 불순물의 머무름 시간을 기준으로 결정됩니다. EIC의 적분 시작은 UV 주 피크 적분 시작점으로 사용됩니다. 가장 늦게 용출되는 불순물(LEI)은 이온 목록에 있는 모든 알려진 불순물 중 가장 늦은 머무름 시간을 기준으로 결정되며, EIC 적분 종료 시간은 UV 주 피크의 적분 종료 지점을 결정하는 데 사용됩니다(그림 5). EEI와 LEI의 적분 지점과 머무름 시간은 모두 UV 및 MS 오프셋을 수용하기 위해 도구를 사용하여 조정됩니다. 이는 자동으로 이루어지므로, 사용자는 별도의 계산을 수행할 필요가 없습니다.

그러나 주 피크의 머무름 시간 시작점을 결정하는 방법에는 약간의 차이가 있습니다. 구체적으로, 일부 분석법에서는 단순히 n-2 변곡점을 나타내는 드롭라인을 구현하게 됩니다. 이 경우, 사용자는 OAA 인터페이스에서 점선을 드래그하여 필요에 따라 조정할 수 있습니다.

UV 주 피크 적분이 완료되면 워크플로의 다음 단계로 넘어가기 전에 시스템 적합성 결과를 검토할 수 있습니다. 결과에는 검량선과 방정식이 포함됩니다. 기준을 충족하지 못하는 모든 파라미터는 적절하게 표시됩니다. 사용자는 테스트를 계속해서 진행할 수 있고, UV 적분으로 돌아가서 적절한 설정을 확인하거나, OpenLab CDS Data Analysis로 돌아가서 데이터를 자세히 검토할 수 있습니다.

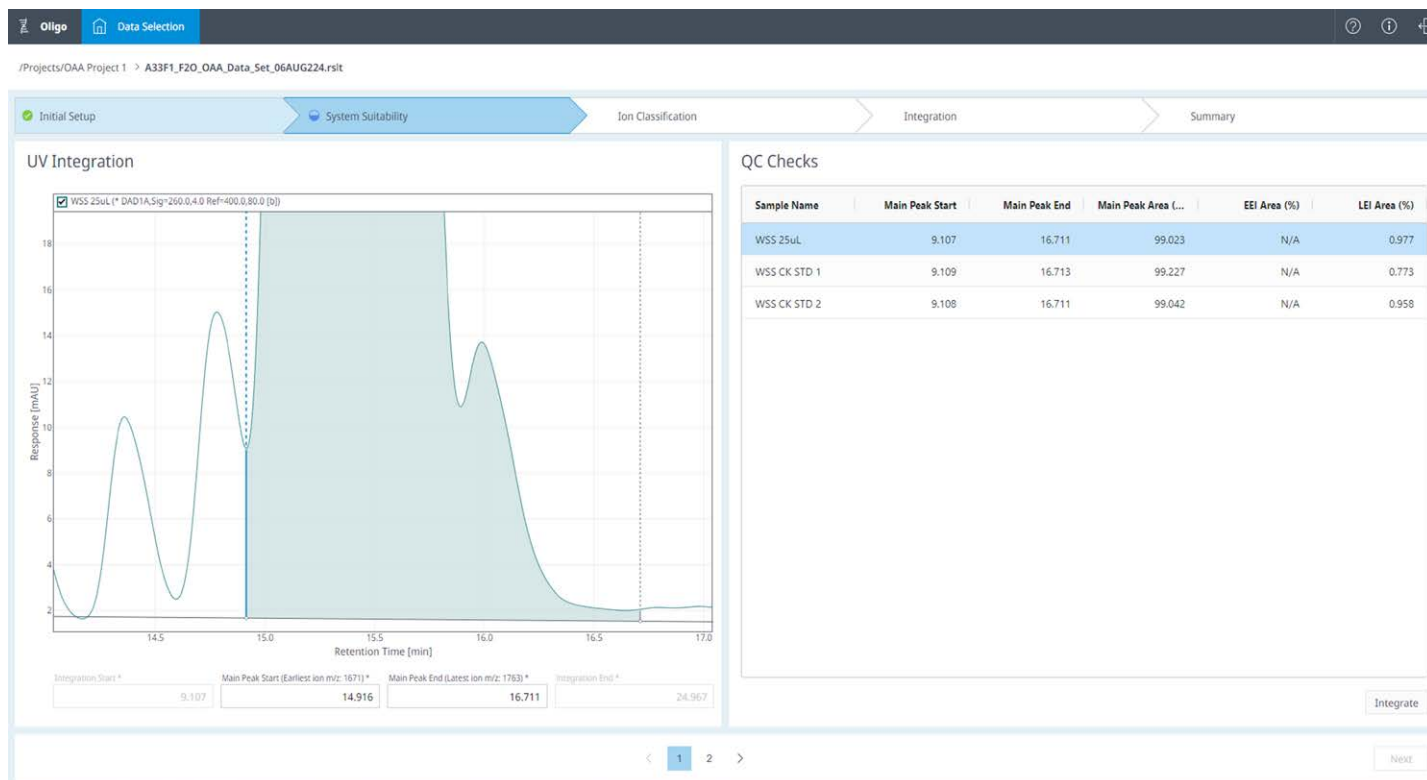


그림 5. 소프트웨어는 가장 먼저 용출되는 불순물과 가장 늦게 용출되는 불순물에 대한 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 사용하여 UV 주 피크의 적분을 자동으로 결정합니다. 단, 사용자는 클릭 앤 드래그의 간단한 조작을 통해 소프트웨어 사용자 인터페이스에서 UV 신호를 직접 수동으로 적분할 수도 있습니다.

## 이온 분류

UV 주 피크에서 FLP와 함께 용출되는 임계치 위의 불순물 피크 면적을 정량화하기 전에 m/z 값을 분류해야 합니다. 즉, 스펙트럼 임계치를 초과하는 모든 이온을 식별하여 이온 목록과 일치 여부를 비교합니다. 그런 다음 모든 일치 항목을 추출하여 순도 계산을 위한 EIC 피크 면적을 측정합니다. 이러한 분류는 분석된 각 시료에 대해 별도로 수행되어야 합니다.

워크플로의 첫 번째 단계는 각각의 평균 MS 스펙트럼을 추출하여 적분된 총 이온 전류(TIC)를 보여줍니다. 사용자는 각 시료 주입의

표준과 고강도 스펙트럼을 오버레이 표시할 수 있습니다. 이는 각 주입이 수집 및 처리 방법에서 적절하게 표시되었는지 확인하기 위해 유용한 기능입니다.

다음 단계는 이온 분류에 해당합니다. 각 이온은 이미 OAA 알고리즘에 의해 분류되어 특정 임계치를 초과하는 m/z 값을 식별합니다. FLP의 -4 전하 상태보다 작은 m/z 값의 경우, 임계치는  $\leq 0.2\%$ 의 상대 존재비를 나타냅니다. FLP의 -4 전하 상태 이온보다 큰 m/z 값의 경우, 임계치는  $\leq 0.3\%$ 의 상대 존재비를 나타냅니다. 각 이온의 정의는 표 3에 나와 있습니다.

이온 분류는 일반적으로 수작업에 해당합니다. 일반적으로 CDS 플랫폼에는 임계치를 초과하는 스펙트럼 값을 평가할 수 있는 기능이 기본으로 제공되지 않으며, 사용자가 두 개의 다른 임계치를 초과하는 m/z 값을 수동으로 식별해야 하기 때문입니다. 임계치보다 높은 모든 값에 대해 이온 목록과 일치 여부를 비교하며, 각각의 이온은 적절하게 추출됩니다. 알려진 불순물/가능한 부가물과 알려지지 않은 불순물을 분류하기 위해서는 표준 MS 조건과 고강도 MS 조건 모두에서 주입한 스펙트럼을 오버레이 표시해야 하므로, 임계치를 초과하는 이온을 육안으로 검사하기가 점점 더 어려워집니다.

이와 달리, OAA는 이러한 항목을 자동으로 분류하여 측정된 값에 대한 이론적인 값을 보고합니다. 또한, 사용자 인터페이스를 통해 필요한 경우 추가 검사를 수행할 수 있으며, 사용자는 소프트웨어 알고리즘이 결정한 것과 다른 분류를 선택할 수도 있습니다(그림 6). 모든 이온이 알려진 이온 또는 알려지지 않은 이온으로 분류되면 각 m/z 값에 대해 EIC가 수행됩니다.

## 적분

적분 단계에서는 추출된 각각의 EIC를 평가하여 정량화가 적절한지 확인합니다. 상대 정량의 0.2% 임계치를 초과하는 영역을 사용하여 UV 주 피크의 순도를 측정하고, 이를 통해 시료의 전반적인 순도를 측정합니다. 수동 적분은 시료가 복잡하고 크로마토그래피 분리가 불충분한 경우 일반적인 테스트 애플리케이션에는 적합하지 않지만, 생성된 EIC는 매우 복잡해질 수 있습니다. 단위 질량 검출을 위한 m/z±0.5의 창은 피크 적분을 어렵게 만들 수 있습니다.

이 워크플로를 용이하게 하기 위해, 사용자 인터페이스에 그림 7에 표시된 바와 같이 FLP, EIC 표준, EIC 고강도의 세 오버레이가 생성됩니다. FLP EIC는 동시 용출 피크 면적의 적절한 적분을 안내하는 유용한 기준으로써 사용됩니다. 이는 표준 EIC를 고강도 EIC와 비교해야 하는 거의 등압 상태에 놓인 알려진 불순물/가능한 부가 이온에 대해 특히 적합합니다. FLP 아래의 피크 면적은 부가물과 관련이 있는 것으로 추정되며, 그에 따라 표준 EIC에 대해서는 관련 피크 면적만 적분됩니다.

표 3. 이온 분류에 대한 정의.

| 이온              | 설명                                                                                                                   |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 충분히 분리되지 않음     | 알려진 불순물과 알려지지 않은 불순물 사이 m/z±1.0 분리능 내에 해당하는 MS 스펙트럼 피크                                                               |
| 부가물             | 검출되지 않은 알려진 부가물(예: 알려지지 않은 불순물 간 m/z ≥ 0.5에 해당하는 분리능)                                                                |
| 알려진 불순물/가능한 부가물 | 알려진 부가물. 부가물과 불순물 사이의 분리가 충분하지 않음(예: 부가물과 알려진 불순물 사이의 m/z ≤ 0.5에 해당하는 분리능); 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                                                                                                |

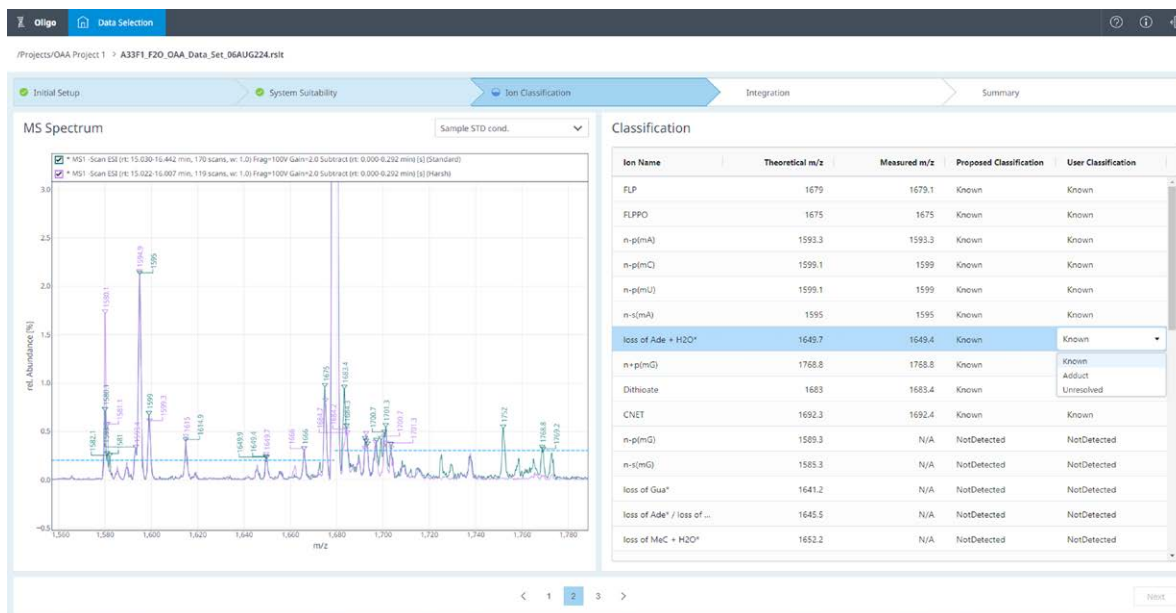


그림 6. 사용자는 이온 분류 워크플로를 진행하면서 소프트웨어에서 제안한 분류를 검토합니다. MS 조건의 스펙트럼이 오버레이 형식으로 제공되어 부가물의 확인을 용이하게 합니다. 사용자는 필요한 경우 분류를 조정할 수도 있습니다. 변경 사항은 추적 가능성 및 데이터 무결성을 위해 로그 파일에 기록됩니다.

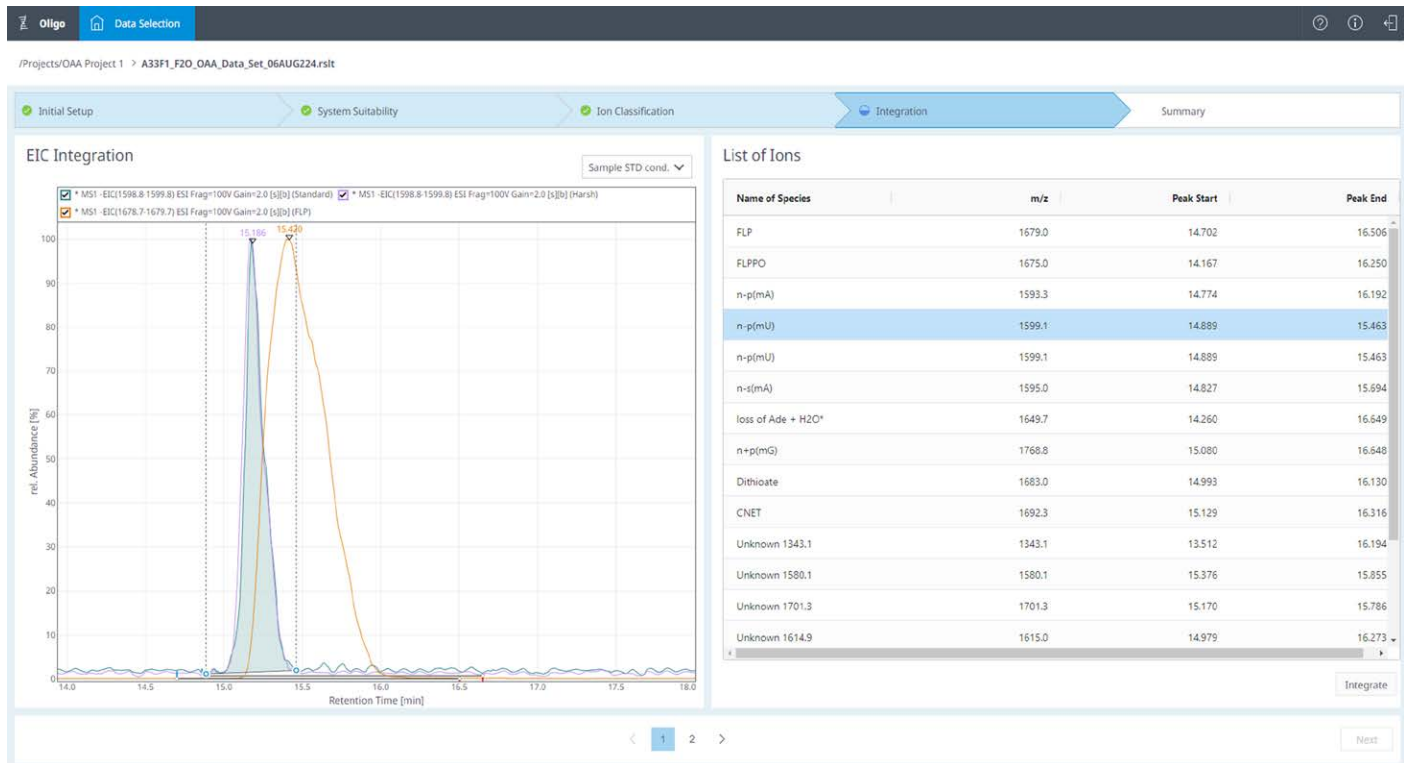


그림 7. 전체 길이 생성물 및 표준/고강도 조건에 대한 EIC 오버레이는 사용자 인터페이스에서 자동으로 생성되어 적분을 용이하게 합니다. 사용자는 표준 EIC 적분만 필요하므로, FLP 및 고강도의 EIC 신호를 선택 및/또는 선택 해제할 수 있습니다.

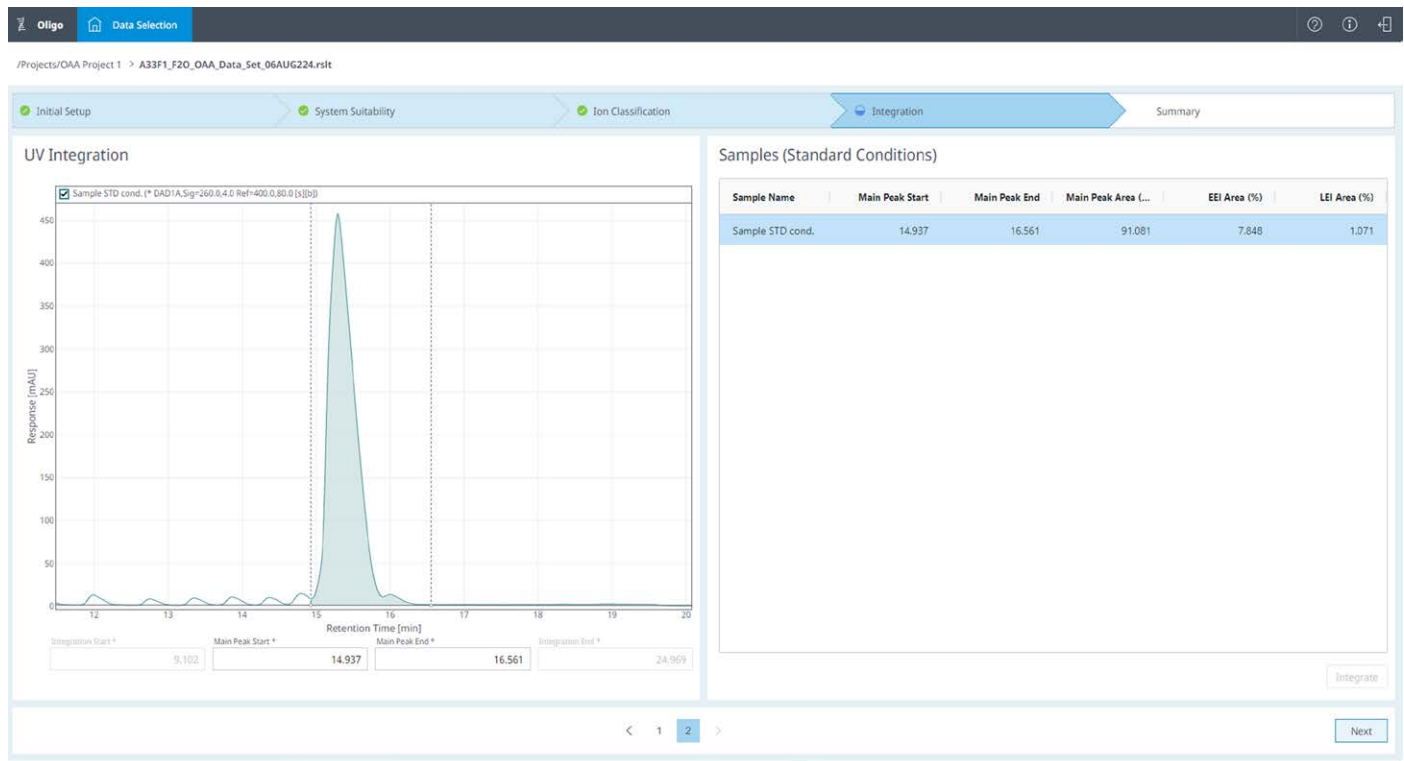


그림 8. 시료 UV의 적분은 시스템 적합성 단계와 유사하게 먼저 혹은 늦게 용출되는 불순물을 기반으로 합니다. 사용자는 필요에 따라 적분의 시작점과 종료점을 조정할 수도 있습니다.

모든 시료의 EIC 피크가 적분되면 OAA는 SST 주 피크 적분과 유사하게 UV 주 피크 적분에 대해 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 8은 EEI와 LEI 적분을 기반으로 주 피크 적분이 자동으로 수행되는 것을 보여줍니다. 해당하지 않는 경우, 사용자는 필요에 따라 UV 주 피크를 수동으로 적분할 수 있습니다.

## 요약

워크플로의 마지막 단계는 결과를 검토하는 것입니다. 여기에는 이전 단계에서 표시된 SST 결과는 물론 순도 및 동일성 결과가 포함됩니다. 분석 결과는 시료에 선택된 제형에 따라 달라질 수 있습니다.

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 CDS에서 이루어집니다. 이는 OAA가 OpenLab CDS 플랫폼 내에 이미 존재하는 데이터 규제 준수 규칙을 활용하기 때문입니다.

## 앞으로의 고려 사항

LC/MS 데이터 분석 워크플로는 스펙트럼이나 크로마토그램을 해석하는 데 사용되는 데이터 시스템에 국한되어 있었습니다. 그러나 올리고뉴클레오타이드와 같은 복잡한 치료제를 개발하기 위해서는 보다 사용자 친화적이고 목적에 맞는 데이터 분석에 대한 필요성이 점점 더 중요해지고 있습니다.

OpenLab CDS용 Agilent Oligo Analysis Accelerator는 소프트웨어 개발 방식에 대한 패러다임을 전환하는 제품입니다.

## 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](http://www.agilent.com/biopharma/oligo-analysis-accelerator)

DE-001083

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
2024년 9월 13일, 한국에서 발행  
5994-7798KO

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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)