

LabSolutions Insight™ Biologics 소프트웨어를
이용한 올리고뉴클레오타이드 불순물 분석 워크플로우

An Oligonucleotide Impurity Analysis Workflow Using LabSolutions Insight™ Biologics Software

사용자 활용 포인트

- ◆ LabSolutions Insight Biologics 소프트웨어는 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 불순물의 특성 분석을 위한 간단한 워크플로우를 제공한다.
- ◆ 올리고뉴클레오타이드 불순물의 포괄적인 특성 분석이 가능하다.
- ◆ 조각 커버리지(Fragment coverage)는 간단한 그래픽 형식으로 표시되며, 누락되거나 변형된 뉴클레오타이드를 강조한다.

■ 서론

올리고뉴클레오타이드 치료제는 최근 몇 년간 급속한 발전을 거듭해 왔으며 신약 발견의 새로운 방식으로 관심을 끌고 있다. 이러한 개발로 인해 올리고뉴클레오타이드 치료제의 불순물을 검출하고 확인하여 안전성과 효능을 보장해야 한다는 요구가 생기고 있다. 이 뉴스레터에서는 LCMS-9050 사중극자 비행시간(Q-TOF) 질량 분석기 시스템과 LabSolutions Insight Biologics 소프트웨어를 기반으로 올리고뉴클레오타이드에 대한 불순물 분석 워크플로우를 설명한다.

■ 시료

뉴클레오타이드 시퀀스 CTG CTA GCC TCT GGA TTT GA (unrefined PS 20-mer)을 갖는 비정제 phosphorothioate-modified 20-mer 올리고뉴클레오타이드를 분석하였다.

■ 분석 조건

Data dependent acquisition (DDA) 모드에서 Nexera™ XS inert 시스템과 LCMS-9050 시스템을 사용하여 분석하였다. LC 조건은 표 1에, MS 조건은 표 2에 나타내었다.

표 1. LC 분석조건

[HPLC Conditions] (Nexera XS inert)

Column : Shim-pack Scepter™ Claris C18-120 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm*)
 Mobile Phase (A): Aqueous solution of 100 mM HFIP and 10 mM TEA
 Mobile Phase (B): 50 % Methanol solution of 50 mM HFIP and 5 mM TEA

	Time (min)	Flow rate (mL/min)	A. Conc	B. Conc
Gradient program:	0.00	0.3	95	5
	1.00	0.3	95	5
	26.00	0.3	60	40
	26.10	0.3	10	90
	30.00	0.3	10	90
	30.10	0.3	95	5
	34.00	0.3	95	5

Oven Temp.: 60 °C
 Injection Volume: 2 μL

*1: P/N: 227-31210-02

표 2. MS 분석조건

[MS Conditions] (LCMS-9050)

Ionization: ESI (Negative mode)
 Mode: MS scan (m/z 550 to 2500), DDA
 Interface Voltage: -3.0 kV
 Nebulizing Gas Flow: 3.0 L / min
 Drying Gas Flow: 10.0 L/min
 Heating Gas Flow: 10.0 L/min
 DL Temp.: 250 °C
 Block Heater Temp.: 400 °C
 Interface Temp.: 350 °C

■ 분석 파라미터 구성

LabSolutions Insight Biologics는 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 불순물을 특성화하는 데이터 분석 소프트웨어이다. 먼저, 사용자는 소프트웨어에서 제공하는 핵염기, 링커, 리보스 및 변형체를 사용하여 파라미터 구성 창에서 올리고뉴클레오타이드 시퀀스를 생성한다. 필요에 따라 각 탭에서 핵염기, 링커, 리보스 및 염기 변형을 추가하고 제거할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 시퀀스가 입력되면 소프트웨어는 해당 올리고뉴클레오타이드의 분자 구조, 단일동위원소 질량 및 구조식(오른쪽)을 표시한다 (그림 1). 입력된 시퀀스에 따라 구조식도 실시간으로 업데이트되므로 입력 오류를 시각적으로 쉽게 확인할 수 있다. 그림 2에서 보는 바와 같이, 핵염기는 쉽게 확인할 수 있도록 다양한 색상으로 표시할 수 있으며, 분절화 부위도 표시할 수 있다.

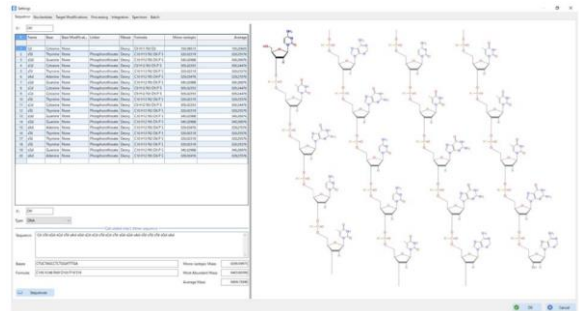


그림 1. 파라미터 구성 창

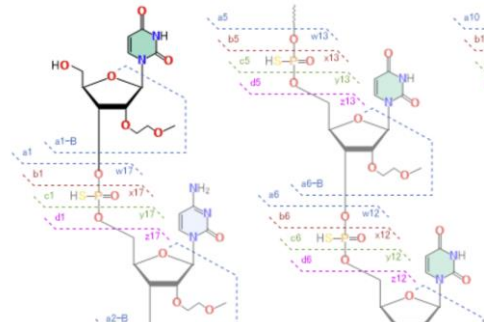


그림 2. 분절화 부위의 색상 디스플레이

"Target Modifications" 탭은 예상되는 불순물을 선택하는 데에도 사용된다. 이 소프트웨어는 다른 가닥 길이, 누락된 핵염기, 탈퓨린화/탈피리미딘화, 탈아민화 및 보호 그룹과 같은 불순물 뿐만 아니라 추가 이온, 알려지지 않은 변형 그룹의 분자 변화도 검색할 수 있다.

■ 결과

정제되지 않은 PS 20-mer는 포토다이오드 어레이(PDA)와 질량 분석기로 검출되었다. 각 방법으로 얻은 크로마토그램은 그림 3에 나타났다. LC 크로마토그램 (상단)과 MS 크로마토그램 (하단)은 피크를 직접 비교할 수 있도록 정렬하였다.

질량 스펙트럼은 MS1 스펙트럼을 기반으로 하며 다른 원자가 및 동위원소의 신호를 결합하는 성분 크로마토그램으로 표시된다. 성분 크로마토그램의 생성은 이 소프트웨어의 고유한 기능으로, 성분에 기여하는 모든 개별 신호가 단일 XIC 크로마토그램으로 합산된다.

그림 4는 PS 20-mer의 다가 이온 질량 스펙트럼과 디콘볼루션 된 질량 스펙트럼을 보여준다. 올리고뉴클레오타이드 불순물의 스펙트럼도 디콘볼루션 되어 불순물을 검색하는데 사용되었다.

MS1 데이터를 기반으로 불순물에 대한 철저한 검색을 통해 다른 가닥 길이, 누락된 염기, 추가 이온이 있는 30개 이상의 불순물을 검출하였다.

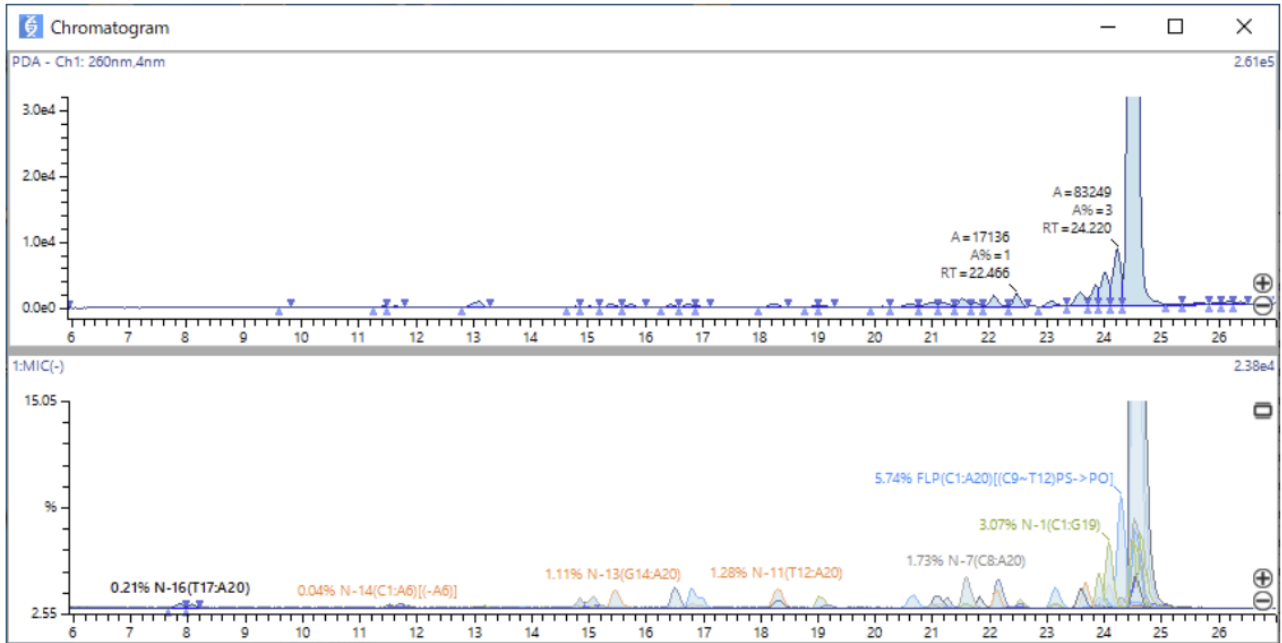


그림 3. 정제되지 않은 PS 20-mer의 UV 크로마토그램 (상단) 및 성분 크로마토그램 (하단)

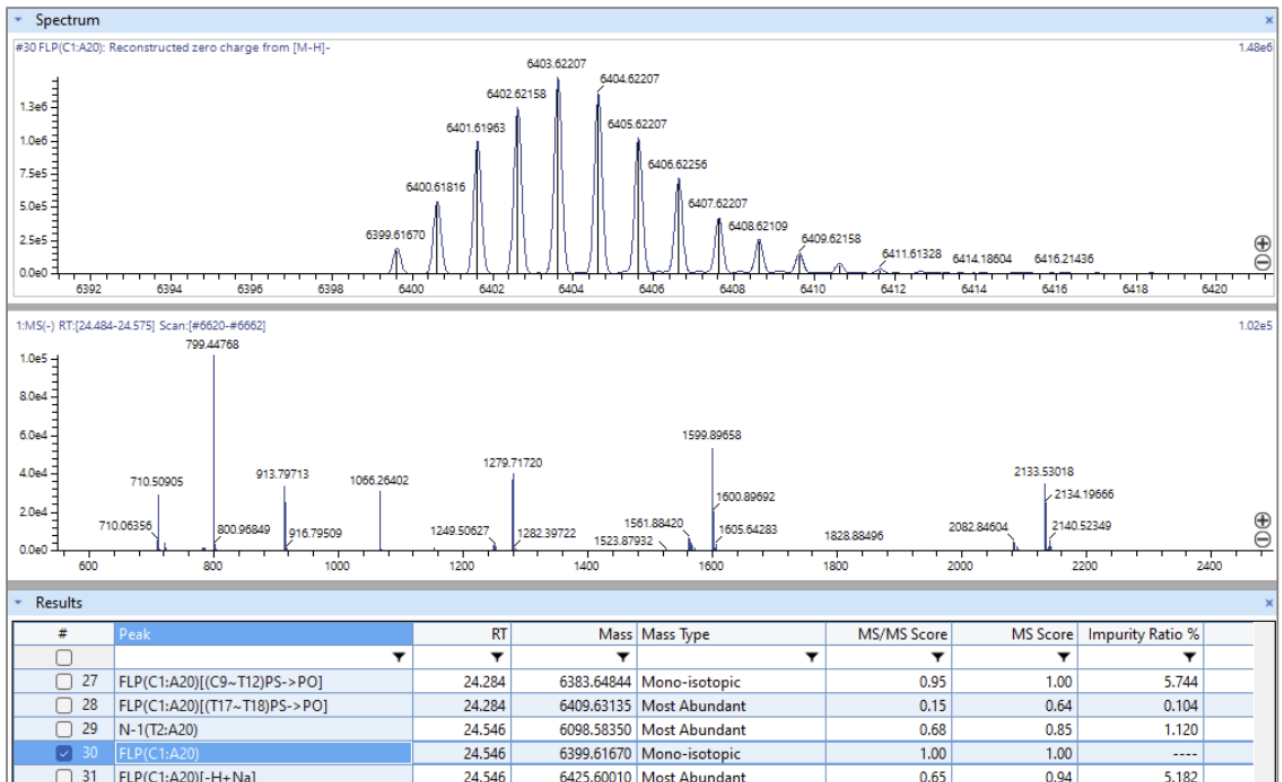


그림 4. PS 20-mer 질량 스펙트럼 (상단) 및 디콘볼루션 된 질량 스펙트럼 (하단)

또한, 소프트웨어는 MS2의 분절화된 스펙트럼을 기반으로 시퀀스 커버리지를 나타낸다. PS 20-mer 시퀀스에 대한 조각을 정렬하여 얻은 결과는 그림 5와 그림 6과 같다. 분석을 통해 생성된 조각 이온은 PS 20-mer의 모든 핵염기에서 절단되며, PS 20-mer의 시퀀스와 일치한다.

소프트웨어는 두 가지 모드로 시퀀스 커버리지를 표시하며 사용자는 관심 있는 정보에 따라 모드 사이를 전환할 수 있다. Fill mode는 신호 정보와 정렬된 조각 이온의 완전성을 보여주며, Branch mode는 조각의 시퀀스를 보여준다.

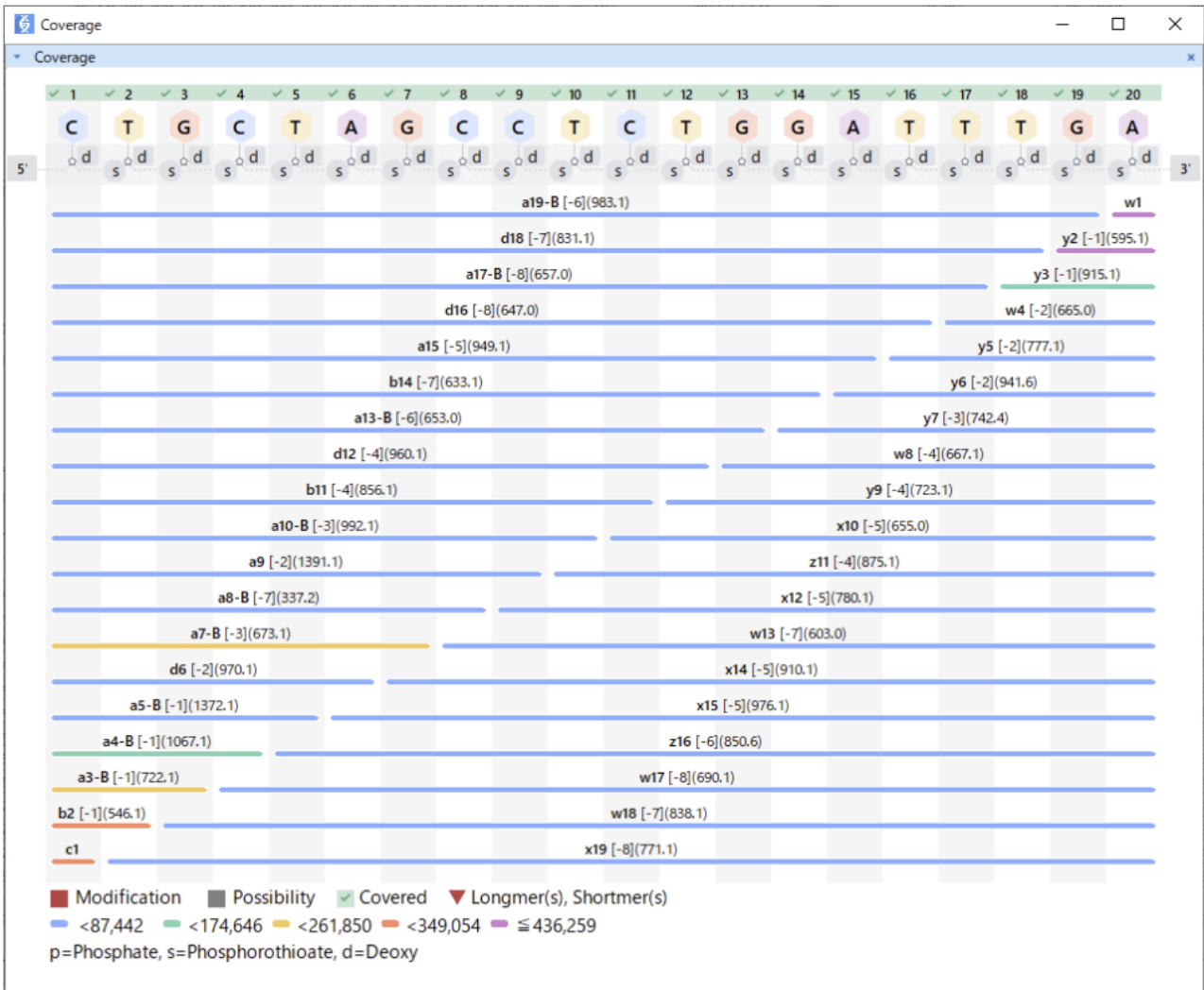


그림 5. PS 20-mer 시퀀스 커버리지 (Fill mode)

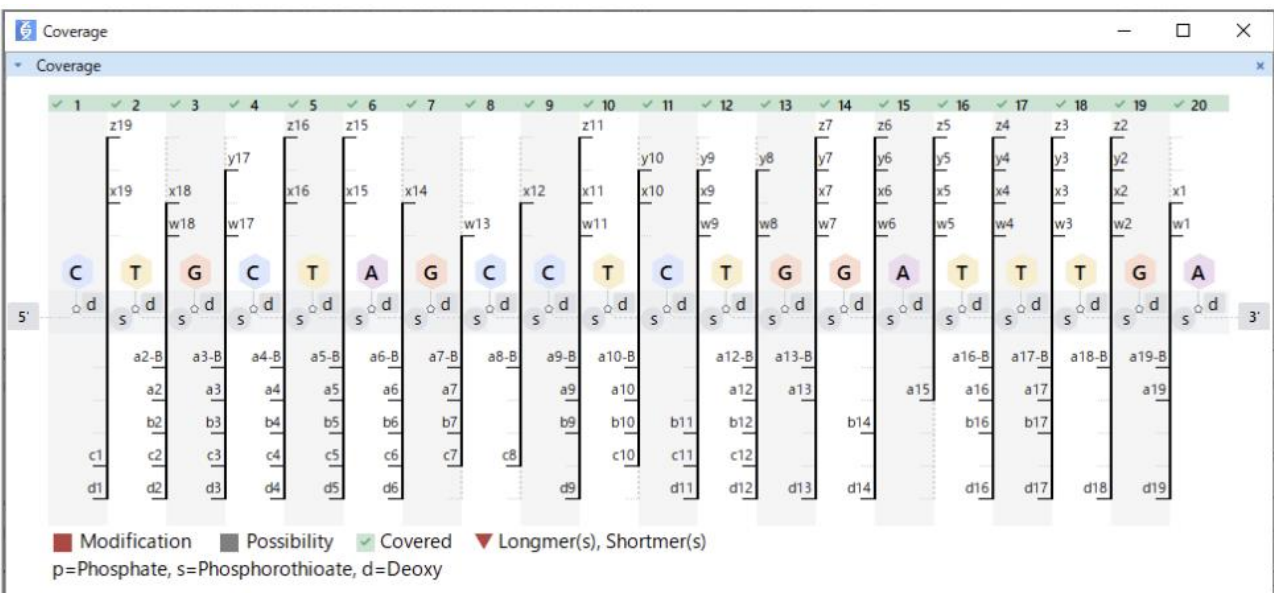


그림 6. PS 20-mer 시퀀스 커버리지 (Branch mode)

■ 불순물의 시퀀스 조사

5'말단 (이하 N-14)에서 14개의 뉴클레오타이드가 누락되고, 주 시료 성분의 0.5%로 존재하는 불순물의 시퀀스를 조사했다. 데이터의 유효성은 검증된 핵염기 위에 녹색 체크 마크로 표시된 대로 높은 비율의 시퀀스 커버리지로 표시된다 (그림 7).

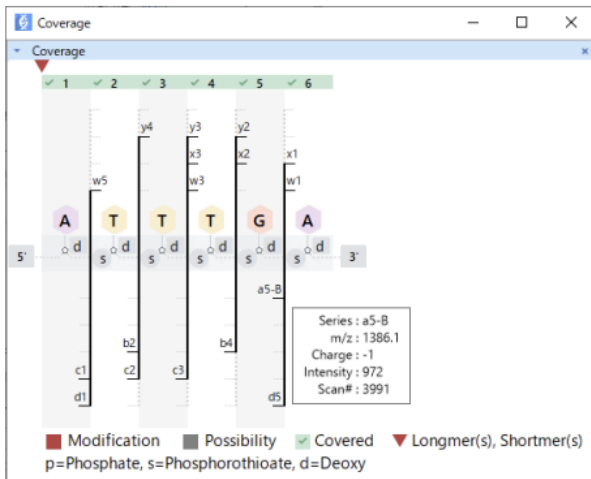
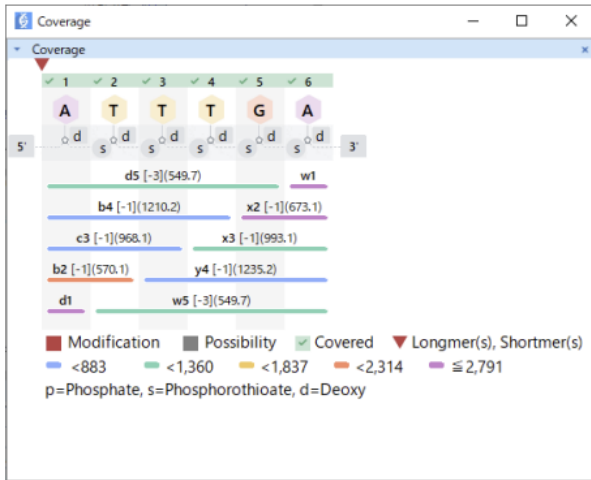


그림 7. N-14 시퀀스 커버리지

■ 결론

LabSolutions Insight Biologics 소프트웨어는 올리고뉴클레오타이드 불순물의 시퀀스를 종합적으로 특성화하고 확인할 수 있다. 이 뉴스레터에서 설명된 분석 워크플로우는 주 시료 성분 뿐만 아니라 주 시료 성분과 비교하여 상대적 존재비가 0.5%인 불순물에 대해서도 완전한 시퀀스 커버리지를 얻었다.