

1290 Infinity II Bio LC 시스템을 이용한 mRNA 5' 캡핑 효율성 확인

mRNA 5' Capping Efficiency

– USP Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality

저자

유재영
한국애질런트테크놀로지스 (주)

개요

5' 캡은 mRNA 백신에 있어 mRNA의 안정성과 단백질 발현에 중요한 역할을 합니다. 따라서 5' 캡핑의 효율은 mRNA 백신 품질에 중요한 품질 속성으로 관리되고 있습니다. 이에, USP는 Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines 2nd edition에서 5' 캡핑 효율의 평가 방법을 제시하고 있으며, 이온쌍 역상 HPLC (IP-RP-HPLC) 방법은 그 중 하나입니다.

본 응용 자료에서는 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼을 사용하여 IP-RP-HPLC 방법으로 mRNA의 5' 캡핑 효율을 확인하였습니다. 또한, 키메라 프로브(Chimeric probe)와 5' 캡 조각 간의 상호작용을 극복하여 보다 정확히 5' 캡핑 효율을 확인할 수 있는 방법을 제시하였습니다.

서론

mRNA 백신은 신속한 개발과 높은 효능, 새로운 병원체에 대한 적응성을 제공하며 면역학 분야에서 큰 혁신을 가져왔습니다. 특히 COVID-19 팬데믹 상황에서 mRNA 백신은 감염병 대응에 중요한 역할을 했고, 이 기술의 가능성을 보여주었습니다. 이에 mRNA 백신 개발의 신속화와 높은 신뢰도의 제품 품질 확보를 위해 각국 규제기관에서는 품질 속성에 대한 가이드라인을 제정하고 있고^{1,2)}, 특히 USP는 Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft Guideline을 배포하여 mRNA 백신 제조사의 이해를 돕고 있습니다.

mRNA 백신 품질의 중요한 측면 중 하나는 5' 캡핑 효율입니다. USP Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft Guideline 2nd edition에 따르면, 5' 캡핑 효율은 고품질 mRNA 백신의 생산을 보장하기 위해 엄격하게 평가되어야 합니다. 이 캡 구조는 일반적으로 mRNA의 첫 번째 뉴클레오타이드에 연결된 7-메틸구아노신 삼인산으로, mRNA를 엑소뉴클레아제로부터 보호하고, 번역을 위한 리보솜 결합을 촉진하며, mRNA 분자의 전반적인 안정성을 높이는 데 필수적입니다³⁾.

mRNA 품질에서 5' 캡핑 효율은 매우 중요합니다. 효율적인 캡핑은 mRNA가 세포 내 과정에서 온전하고 기능적으로 유지되도록 하여 백신의 효능에 직접적인 영향을 미칩니다. 캡핑 효율이 낮으면 mRNA가 빠르게 분해되어 단백질 발현 수준이 감소하고, 이에 따라 백신이 유도하는 면역 반응이 줄어듭니다⁴⁾. 따라서 최적의 캡핑 효율을 보장하는 것은 효과적이고 신뢰할 수 있는 mRNA 백신 개발에 필수적입니다. 다양한 mRNA 제조사에서는 높은 캡핑 효율과 엑소뉴클레아제에 대한 보호 효과를 얻기 위해 다양한 종류의 5' 캡을 개발하고 있습니다.

USP Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft Guideline 2nd edition에서는 Nuclease P1을 사용해 mRNA를 캡 뉴클레아제로 분해하여 시험하는 LC-MS/MS 방법과 함께 이온쌍 역상 HPLC 분석을 통해 캡핑 및 캡핑되지 않은 mRNA 조각을 분석하는 방법을 함께 언급하고 있습니다.

이 응용자료는 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼을 사용하여 hexylamine을 이온쌍 시약으로 사용한 IP-RP-HPLC 방법을 통해⁵⁾ mRNA의 5' 캡핑 효율을 평가하는 것을 목표로 하며, 이 중요한 품질 특성을 평가하기 위한 캡 특성에 따른 분석시 고려사항을 소개합니다. 이를 통해 mRNA 백신 생산 최적화와, 백신의 안전성, 효능 및 전반적인 품질을 보장하기 위한 지속적인 노력에 기여하고자 합니다.

실험

표준물질 및 시약

실험에 사용된 Hexylamine과 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol은 Sigma-Aldrich에서 구매했고, acetic acid는 JT Baker에서, acetonitrile은 B&J에서 구매했습니다. 캡핑 및 캡핑되지 않은 SmartCap® mRNA는 ST PHARM에서 제공받았습니다.

분석 기기

- Agilent 1290 Infinity II 바이오 고속 펌프(G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 바이오멀티샘플러(G7137A), 시료 온도 조절장치 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B), 바이오 호환표준 유량 열 교환기 포함
- Max-Light 카트리지 셀 60mm(G4212-60007)을 장착한 Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(G7117B)

컬럼

- Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1 x 150mm, 2.7um (부품 번호: 653750-702)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.7

이동상 제조 방법

이동상은 아래의 분량으로 시약을 첨가하여 조제했습니다. 미리 준비한 물, 물-아세트니트릴 혼합액에 각 시약을 첨가하여 충분히 균질하게 섞어준 뒤 사용하였습니다.

표 1. 이동상의 조성.

종류	조성 (/L)
15mM HA + 25mM HFIP	Hexylamine 1.52g, HFIP 4.20g
100mM HAA, pH 7	Hexylamine 10.12g, Acetic acid 6g

분석 기기 및 조건

표 2. 5' 캡 확인을 위한 HA-HFIP 분석 조건.

파라미터	값		
유속	0.4mL/분		
컬럼 온도	60°C		
주입량	15µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm		
이동상	A: 15mM Hexylamine + 25mM HFIP in water B: Acetonitrile		
그레디언트	시간(분)	%A	%B
	0	85	15
	0.5	85	15
	5	80	20
	11	77.5	22.5
	16	76.5	23.5
	25	76	24
	30	10	90
35	10	90	
사후 시간	5분		

표 3. 5' 캡 확인을 위한 60°C HAA 분석 조건.

파라미터	값		
유속	0.6mL/분		
컬럼 온도	60°C		
주입량	15µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm		
이동상	A: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 25% acetonitrile B: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 90% acetonitrile		
그레디언트	시간(분)	%A	%B
	0	100	0
	1	100	0
	10	90	10
	30	80	20
	30.1	0	100
	35	0	100
사후 시간	5분		

표 4. 컬럼 온도 최적화를 위한 HAA 분석 조건.

파라미터	값		
유속	0.6mL/분		
컬럼 온도	60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C		
주입량	5µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm		
이동상	A: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 25% acetonitrile B: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 90% acetonitrile		
그레디언트	시간(분)	%A	%B
	0	90	10
	1	90	10
	30	82	18
	30.1	0	100
	35	0	100
사후 시간	5분		

표 5. 5'-Cap 확인을 위한 80°C HAA 분석 조건.

파라미터	값		
유속	0.6mL/분		
컬럼 온도	80°C		
주입량	15µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm		
이동상	A: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 25% acetonitrile B: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 90% acetonitrile		
그레디언트	시간(분)	%A	%B
	0	90	10
	1	90	10
	30	82	18
	35	80	20
	35.1	0	100
40	0	100	
사후 시간	5분		

결과

본 시험에 사용된 SmartCap mRNA와 캡핑되지 않은 mRNA는 약 4000nt 크기로 설계되었습니다. 두 시료는 동일한 염기서열을 가지고 있으며, 캡핑되지 않은 mRNA는 별도의 생산과정을 통해 확보하였습니다. 5' 말단의 약 20nt를 얻기 위해, 별도로 설계된 약 20nt의 키메라 프로브를 사용하였고, RNase H를 이용하여 위치 특정 절단(Site specific enzymatic cleavage)을 수행하였습니다. 이후 별도의 정제 과정을 거쳐 5' 말단 조각을 얻었습니다. 별도로 프로브를 포함하여 mRNA 시료와 동일한 전처리 방법을 통해 분석법 바탕 시료를 준비하였습니다.

올리고뉴클레오타이드 분석에는 다양한 이온쌍 시약과 컬럼이 사용될 수 있습니다. 본 시험에서는 먼저, 각 피크의 질량 스펙트럼을 통한 물질 확인을 고려해 표2의 분석 조건에 따라 분석하였습니다. 그림 1과 같이 프로브와 5' 캡핑 및 캡핑되지 않은 조각 피크가 모두 확인되었으며, 별도의 분석을 통해 각 피크가 예상 분자량과 일치하는 것을 검증하였습니다. 프로브와 각 조각의 크기가 유사하여 HA-HFIP (15mM Hexylamine + 25mM HFIP) 조건을 이동상으로 한 분석에서 높은 분리도를 얻지 못하였으며, 특히 캡핑되지 않은 조각의 주 피크는 상대적으로 넓은 피크폭을 나타내어, 캡핑 효율을 판단하기 어려웠습니다.

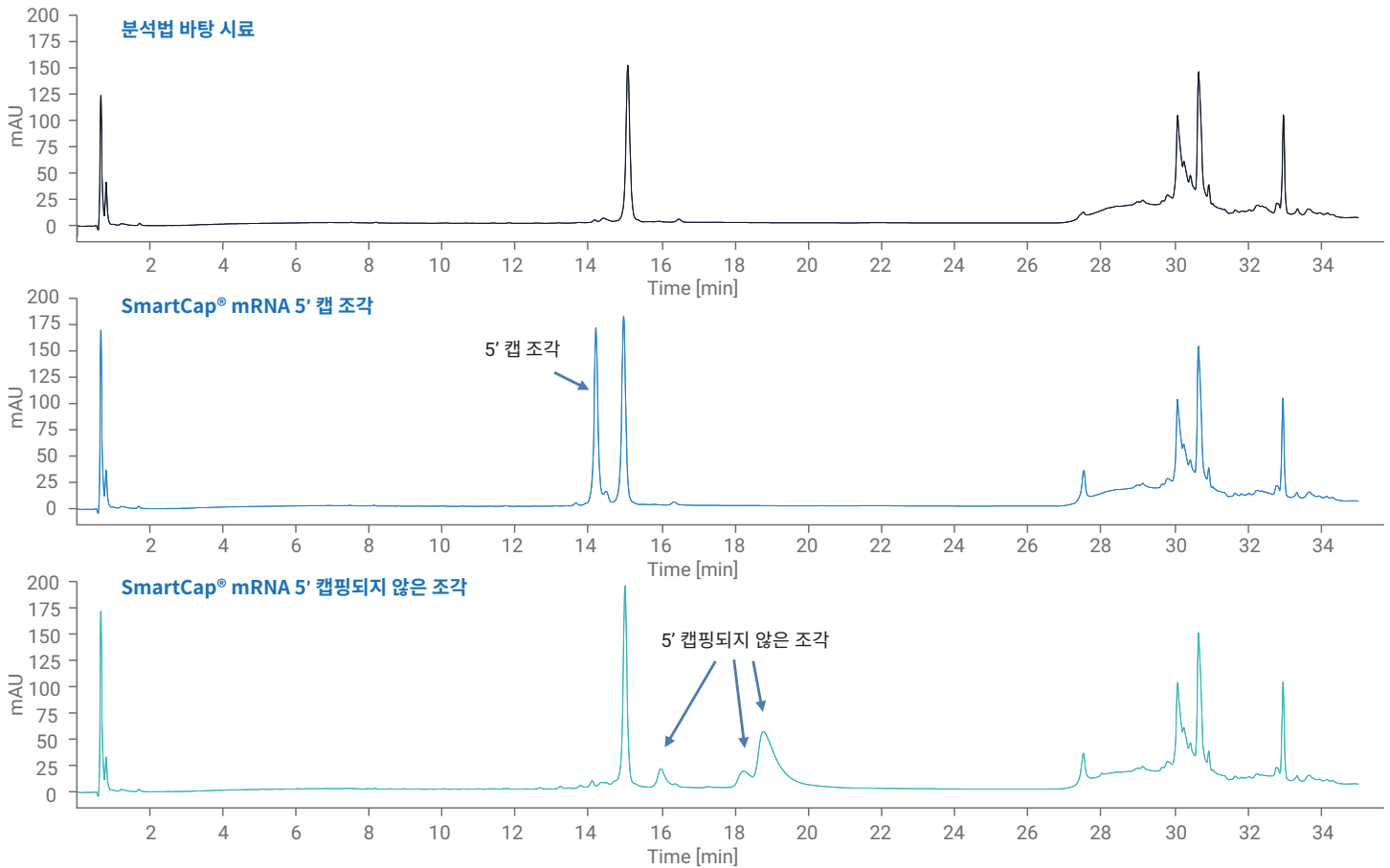


그림 1. 15mM Hexylamine + 25mM HFIP 조건에서 분석한 5' 캡 조각의 UV 크로마토그램.

피크 모양의 개선과 분리도 향상을 위해 분석 조건을 표 3의 100mM HAA를 이동상으로 동일 시료를 분석했습니다. 분석법 바탕 시료의 크로마토그램에서 프로브의 피크는 대칭성을 보이며 확인되었으나, 5' 캡핑 및 캡핑되지 않은 시료를 분석한 크로마토그램에서는 프로브 피크가 테일링을 보이며 넓게 용리되는 것을 확인하였습니다 (그림 2). 그림 1의 HA-HFIP 조건에 대한 결과와 비교했을 때, 5' 캡과 프로브의 주피크는 용리 순서가 바뀌었으며, 5' 캡핑되지 않은 조각의 각 피크는 좁은 피크폭을 보였습니다.

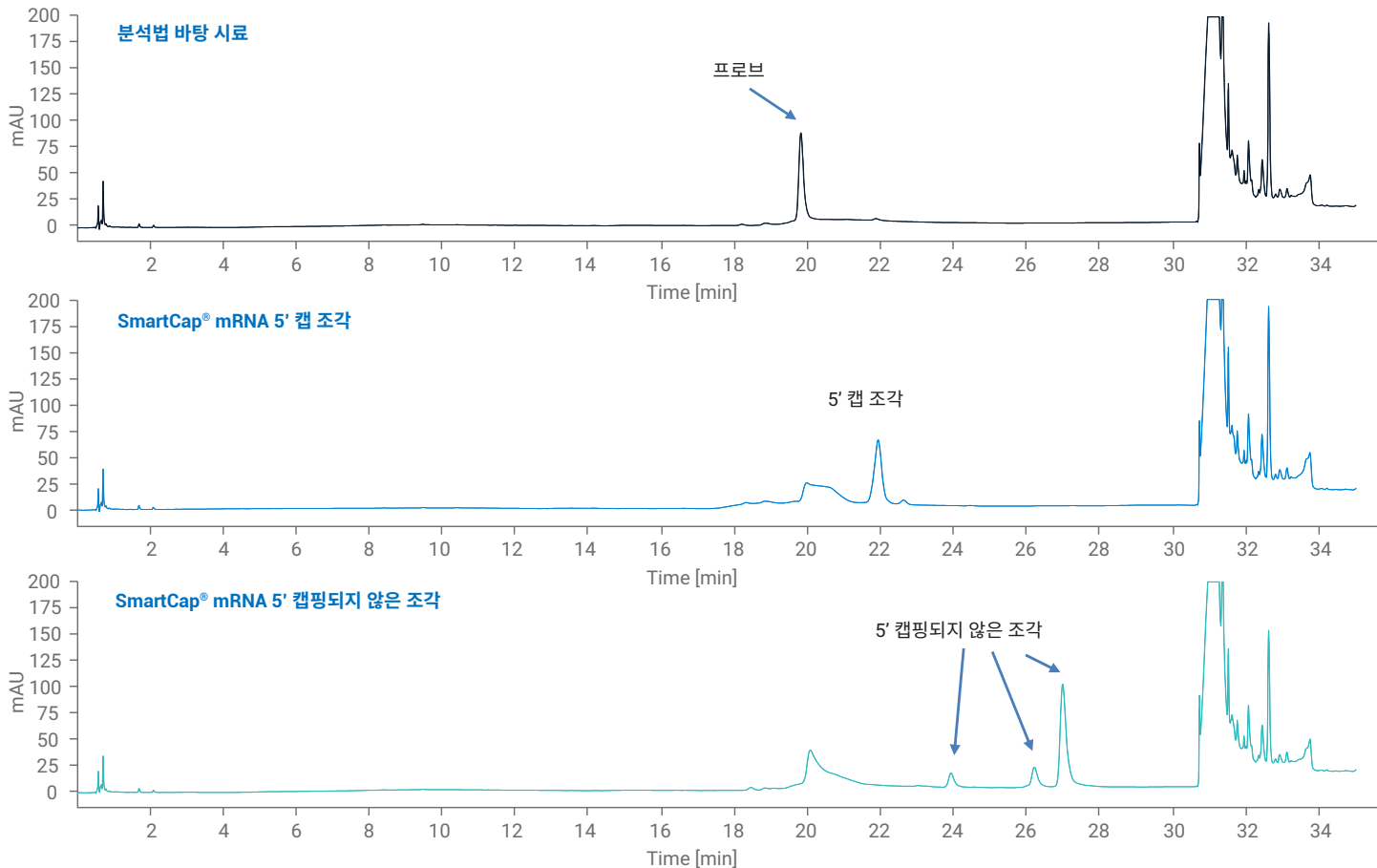


그림 2. 컬럼 온도 60°C 조건에서 분석한 5' 캡 조각의 UV 크로마토그램.

mRNA의 위치 특정 절단에 사용된 키메라 프로브는 mRNA의 캡 절단 조각과 상보적 염기서열을 가지고 있어, 시료 준비 과정과 분석 도중 쉽게 어닐링 될 가능성이 있습니다. 표 3의 조건하에서 컬럼 내에서 변성이 되지 않거나 부분적으로 될 경우 그림 2와 같은 결과를 얻을 수 있습니다. 분석 중 시료의 완전한 변성을 확인하기 위하여 오븐 온도를 60°C - 80°C 로 설정하여 분석한 결과, 그림 3과 같이 65°C 이상에서 충분히 변성되었음을 확인할 수 있었습니다.

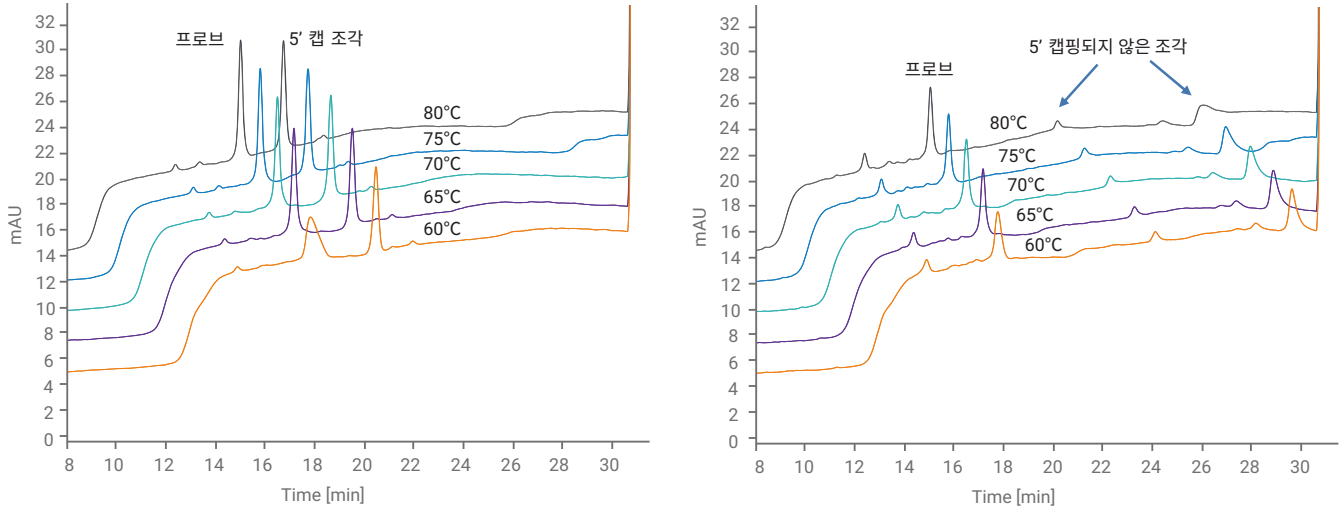


그림 3. 컬럼온도에 따른 5' 캡 조각 (좌측)와 5' 캡핑되지 않은 조각 (우측)의 UV 크로마토그램.

5' 캡과 프로브 간의 변성에 필요한 온도는 염기서열의 G(Guanine), C(Cytosine) 비율에 의존적입니다. G, C 함량이 높을수록 프로브의 결합력은 강해지며, 비특이적 결합을 초래할 우려가 커지고, G, C 함량이 적을수록 RNase H에 의한 위치 특정 절단의 효율이 감소합니다. HPLC 분석에 있어 G, C 함량은 변성에 직접적 영향을 미치므로, 프로브의 G, C 함량에 따라 컬럼 온도는 달라져야 합니다. 그림 4의 결과와 같이 80°C 의 컬럼 온도 조건에서 프로브와 5' 캡 조각이 분리되며, 100mM의 HAA 조건을 통해 높은 피크 분리능을 달성할 수 있습니다.

SmartCap®을 사용한 mRNA 시료의 분석 결과, 캡핑되지 않은 시료에서 유래하는 피크가 관찰되지 않았습니다. 결과적으로, 본 시험에 사용된 SmartCap® mRNA의 캡핑 효율은 100%로 확인되었습니다.

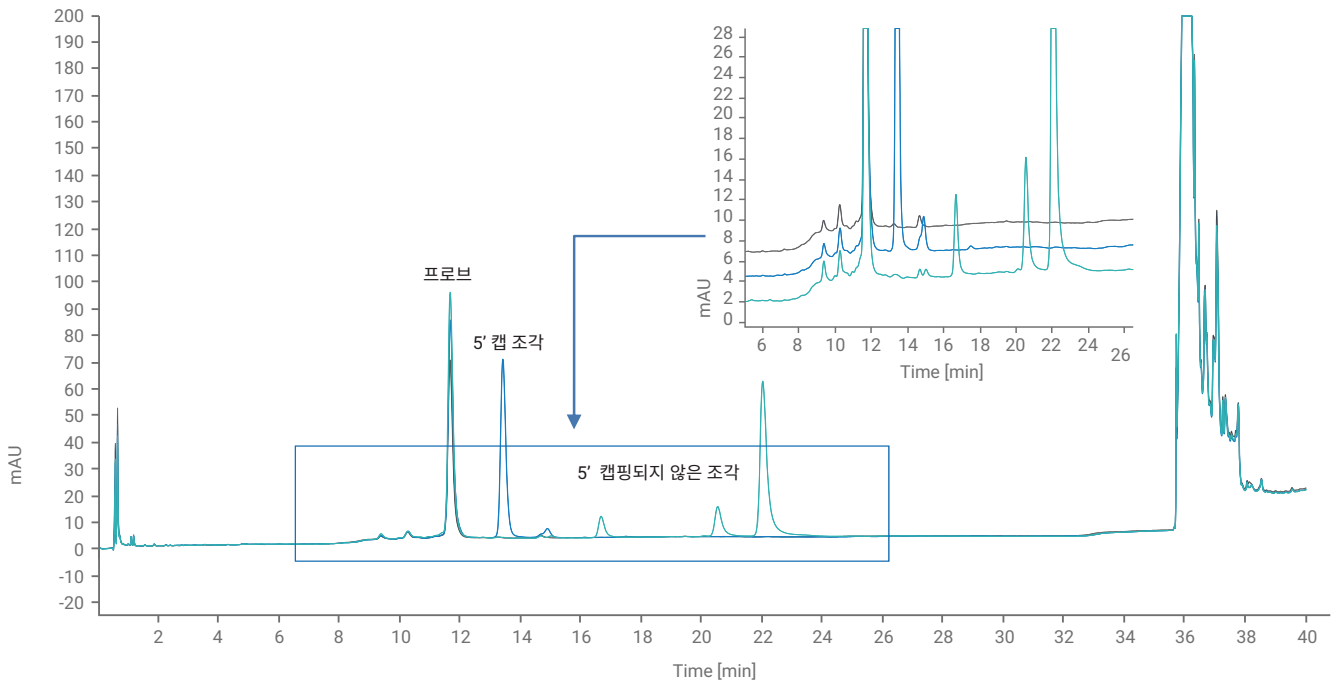


그림 4. 80°C 컬럼 온도 조건에서 100mM HAA를 이용하여 분석한 분석법 바탕 시료 (검정색), 5' 캡 (파란색), 5' 캡핑되지 않은 시료(녹색)의 UV 크로마토그램.

다만, AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼은 최대온도 65°C 의 조건에서 사용 가능한 컬럼으로, 80°C 컬럼 온도는 컬럼의 수명을 급격히 감소시킬 수 있습니다. 시료의 특성을 고려하여 5' 캡핑 효율을 분석하는데 적합한 컬럼 온도를 스크리닝 하는 것이 필요합니다.

결론 및 고찰

USP Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines 2nd edition을 참조하여 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼을 사용하여 5' 캡핑 효율을 평가하였습니다. 5' 캡 조각을 얻기 위해 RNA의 위치 특정 절단을 수행하였고, 정제 과정을 거쳐 얻은 검액으로부터 5' 캡핑 및 캡핑되지 않은 피크를 확인하였습니다. RNA의 위치 특정 절단에 사용된 키메라 브로브는 5' 말단 조각에 대해 상보적 염기서열을 가지고 있으며, 이는 피크 분리에 영향을 미칠 수 있습니다. 컬럼 온도의 변화를 통해 60°C 조건에서 관찰된 피크 끌림 현상이 온도가 높아짐에 따라 현저히 억제되는 것을 확인하였고, 이를 통해 5' 캡핑 처리된 시료 중 캡핑되지 않은 mRNA가 존재하지 않음을 확인할 수 있었습니다.

이는 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템에 DAD HS Max-Light 카트리지가 셀 60mm을 장착함으로써, 낮은 농도의 5' 캡핑되지 않은 피크를 높은 감도로 확인할 수 있었습니다.

참고 문헌

1. USP. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines:2nd Edition. **2023**.
2. EMA. Concept Paper on the development of Guideline on the quality aspects of mRNA vaccines. **2023**.
3. Tu Y, Das A, Redwood-Sawyer C, Polizzi KM. Capped or uncapped? Techniques to assess the quality of mRNA molecules. *Current Opinion in Systems Biology*. **2024**;37:100503.
4. Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Ther*. **2010**;17(8):961-971.
5. Chae-Young R.; Brian L. Oligonucleotide analysis with ion-pair reversed-phase chromatography and Agilent 1260 Infinity II Prime LC. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-5323 EN, **2021**.

www.agilent.com/chem

DE88939768

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023
2024년 05월 31일, 한국에서 발행
5994-7581KOKR

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