

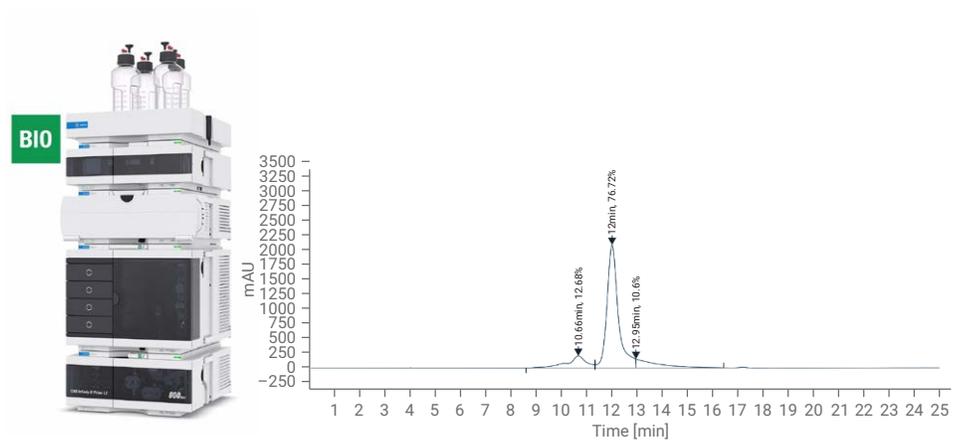
Agilent Infinity II Bio LC 시스템과 Bio-SEC 컬럼을 이용한 mRNA의 응집체 분석

mRNA Aggregation by SEC-HPLC

– USP Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality

저자

유재영
한국애질런트테크놀로지스 (주)



개요

USP는 Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines 2nd edition을 통해 mRNA 생산 공정별 주요 품질 속성을 관리하기 위한 품질 평가방법을 제안하였습니다. 이 가이드라인에서는 mRNA의 응집체 분석법을 함께 소개하고 있으며, mRNA 원료 의약품과 mRNA 완제 의약품에 대한 각각의 시험방법을 확인할 수 있습니다.

본 응용에서는 mRNA의 응집체를 평가함에 있어 컬럼과 이동상의 선정이 실제 mRNA 시료 분석에 미치는 영향에 대해 확인하였습니다.

서론

mRNA는 뉴클레오타이드 간의 상보적 결합을 기반으로 2차구조를 형성하거나 응집체의 형태로 존재할 수 있습니다. 이러한 2차구조와 응집체는 RNA가 단백질로의 번역을 방해할 수 있는 방해요소로 작용할 뿐만 아니라, 지질 나노입자로의 제형화 효율성에도 영향을 미칠 수 있습니다. 따라서, 제제학적 및 효능적 관점에서 mRNA 응집체의 관리는 중요한 품질평가 항목 중 하나로 간주됩니다.

pH 7 이하의 낮은 환경에서는 핵산의 가수분해가 촉발될 수 있습니다. 따라서, mRNA 백신 제조에는 안정성을 유지하기 위한 적정 완충 시스템이 선택되어야 합니다. 바이오의약품의 제조에는 일반적으로는 인산염 완충액을 사용하고 있지만, 인산염 완충액은 온도가 낮아졌을 때 pH가 달라질 우려가 있어, 일반적인 mRNA 백신의 보관 조건인 냉동 환경을 고려했을 때 pH 관리의 어려움이 있습니다. 더욱이, Mg²⁺ 또는 Ca²⁺ 이온은 효소에 의한 mRNA의 절단에 참여하므로, 이동상 중 EDTA의 mRNA의 안정성에 도움을 줍니다.

USP 가이드라인에 제시된 mRNA 원료 의약품의 응집체 분석 방법은 150mM 인산염 완충액을 이동상으로 사용하고 있습니다. 반면, mRNA 완제 의약품의 응집체 분석 방법은 100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA 완충액을 이동상으로 제시하였습니다. 이 조건에 따른 시험분석에서, 이동상에 포함된 염의 농도와 뉴클레오타이드의 스테인리스 스틸에 대한 영향을 고려했을 때 응집체 평가에는 바이오 호환 재질의 HPLC가 요구됩니다. 이에, 본 응용에서는 Bio LC를 사용하여 이동상과 컬럼의 선정이 mRNA의 응집체 분석에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 평가하였습니다.

실험

표준물질 및 시약

실험에 사용된 Sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, 10x TAE buffer는 Sigma-Aldrich에서 구매했습니다.

100bp DNA ladder와 1kbp DNA ladder는 Thermo Fisher에서, Poly A(평균 길이 4,831 뉴클레오타이드)는 Sigma-Aldrich에서 구매했고, CleanCap FLuc mRNA(ORF 1,929 뉴클레오타이드, UTR 261 뉴클레오타이드)와 CleanCap β-galactosidase mRNA(ORF 3420)는 Trilink에서, mRNA 시료 1 및 2는 고객사에서 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
- Agilent 1290 Infinity II Diode Array Detector (G7117B) with Bio-inert Max-Light 카트리지 셀 60 mm(G5615-60017)

컬럼

- Agilent Bio SEC-5 500 Å, 7.8 x 300 mm, 5 μm (P/N 5190-2531)
- Agilent Bio SEC-5 1000 Å, 7.8 x 300 mm, 5 μm (P/N 5190-2536)
- Agilent Bio SEC-5 2000 Å, 7.8 x 300 mm, 5 μm (P/N 5190-2541)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.7

이동상 조제방법

150mM 인산염 완충액 pH 7.0는 인산이수소나트륨 6.32g과 인산일수소나트륨 13.8g을 물에 녹여 1L로 하여 사용했고, 100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA 완충액은 10x TAE buffer 250mL에 물 750mL을 넣어 최종 1L로 하여 사용했습니다.

분석 기기 및 조건

표 1. 인산염 완충액 HPLC 분석 조건.

파라미터	값
유속	0.6mL/min
컬럼 온도	25°C
주입량	5μL
샘플러 온도	4°C
검출기	UV 260nm
이동상	150mM 인산염 완충액
분석시간	25min

표 2. 100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA HPLC 분석 조건.

파라미터	값
유속	0.6mL/min
컬럼 온도	40°C
주입량	5µL
샘플러 온도	4°C
검출기	UV 260nm
이동상	100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA
분석시간	25min

결과

USP mRNA 가이드라인의 mRNA 원료 의약품에 대한 응집체 분석 방법으로 제안된 150mM 인산염 완충액을 사용하여 100bp DNA ladder, 1kbp DNA ladder, Poly A (1mg/mL)를 SEC-5 500 Å, 1000 Å, 2000 Å 컬럼 조건으로 각각 분석하였습니다.

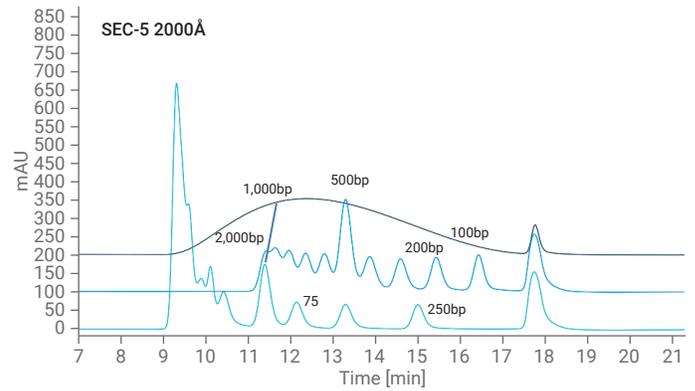
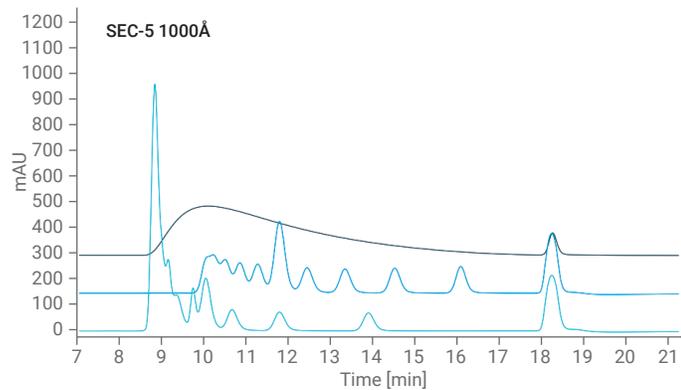
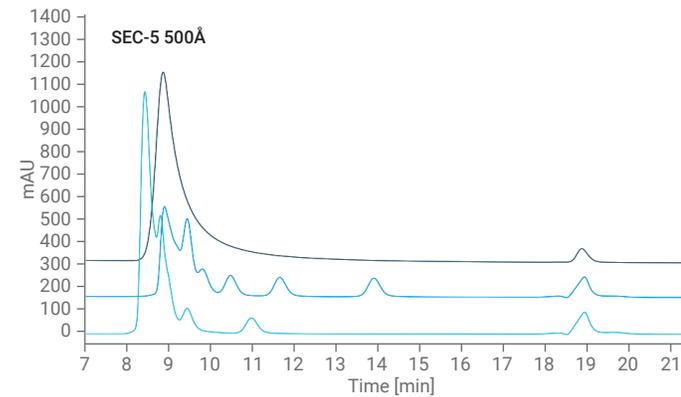
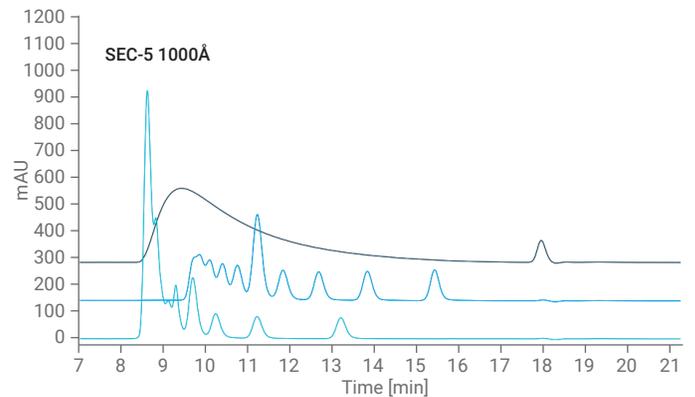
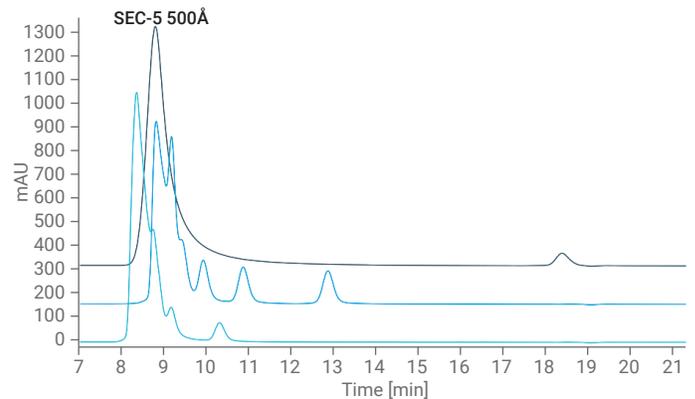


그림 1. 150mM 인산염 완충액 조건에서 컬럼 규격별 Poly A, 100 bp DNA ladder, 1 kbp DNA ladder의 크로마토그램 (각 크로마토그램의 위에서부터 Poly A, 100 bp DNA ladder, 1 kbp DNA ladder 순서).

반면, 동일한 표준액과 컬럼을 사용하여 100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA를 이동상으로 사용했을 때 얻은 크로마토그램은 다음과 같습니다. 150mM 인산염 완충액과 비교했을 때 크로마토그램 양상에서의 큰 차이를 보이지 않았지만, 용리 시간이 약간 단축되어 각 피크의 평균 분자량이 더 커진 것으로 관찰되었습니다.



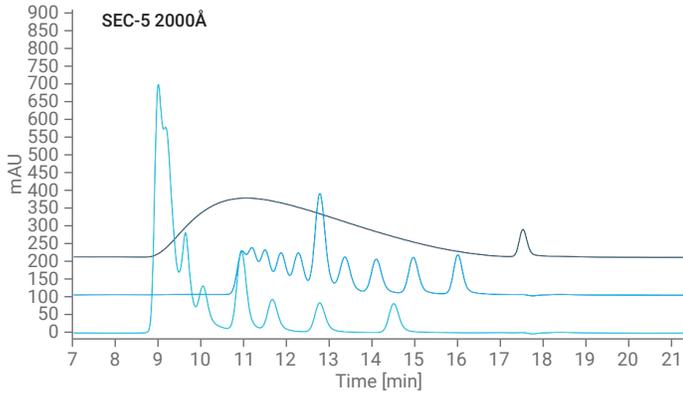


그림 2. 100 mM Tris acetate / 2.5 mM EDTA 조건에서 컬럼 규격별 Poly A, 100 bp DNA ladder, 1 kbp DNA ladder의 크로마토그램

약 2000nt 길이의 CleanCap FLuc mRNA를 각 조건에서 분석하여 결과를 비교했습니다. 100bp DNA ladder, 1kbp DNA ladder를 참조하여 크기를 비교했을 때, 피크값으로 422bp에 상응하는 크기로 확인되었습니다(그림 3, 4). 이중 가닥 DNA는 상보적인 결합이 이루어진 형태로 긴 선형구조를 띠고 있어 비교적 단순한 입체구조를 나타내는 반면, 단일 가닥 RNA는 국소적인 상보적 결합을 통해 이차 구조를 나타냄으로써 복잡한 입체구조를 나타낼 수 있습니다. 크기배제크로마토그래피의 분자 크기에 따른 머무름 시간은 Hydrodynamic radius(Rh)에 직접적으로 영향을 받으며, RNA의 상보적 결합에 의한 분자 구조는 Rh에 영향을 미치게 됩니다. 따라서, 단일 가닥 RNA의 용리 시간은 dsDNA에 비해 RNA의 구조에 의해 달라질 수 있습니다. 또한, 이차 구조의 다양성과 Poly-A의 길이 분포에 의해 넓은 피크 폭을 갖는 것이 특징입니다.

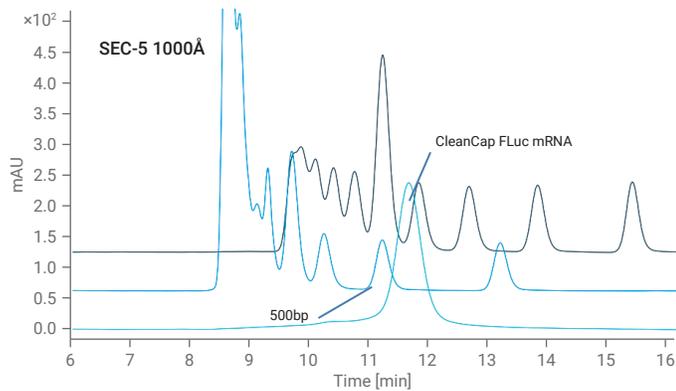


그림 3. 100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA + SEC-5 1000Å 조건에서의 100bp DNA ladder, 1kbp DNA ladder, CleanCap FLuc mRNA 크로마토그램.

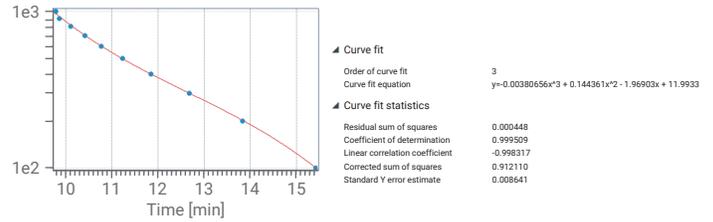


그림 4. 100bp DNA ladder 결과를 바탕으로 OpenLab CDS GPC add-on을 통한 머무름 시간의 길이 환산 예시 (검량선 가로축: 머무름 시간, 세로축: 길이(bp))

RNA의 응집체를 분석할 때, 컬럼이 측정 가능한 크기 범위와 응집체의 분포 범위를 충분히 고려하여 컬럼을 선정해야 합니다. 넓은 분포를 가진 Poly-A 또는 1 kbp DNA ladder와 같이 컬럼의 Full exclusion 구간과 full permeation 구간을 확인할 수 있는 시료를 분석하는 것으로 컬럼의 측정 가능 범위를 확인할 수 있습니다.

이와 함께, 응집체를 용이하게 확인 가능한 분석 조건을 확인해야 합니다. CleanCap FLuc mRNA의 경우, SEC-5 1000Å 컬럼을 사용해서 100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA 조건 하에 분석했을 때 약 8.5%의 응집체를 확인할 수 있었습니다.

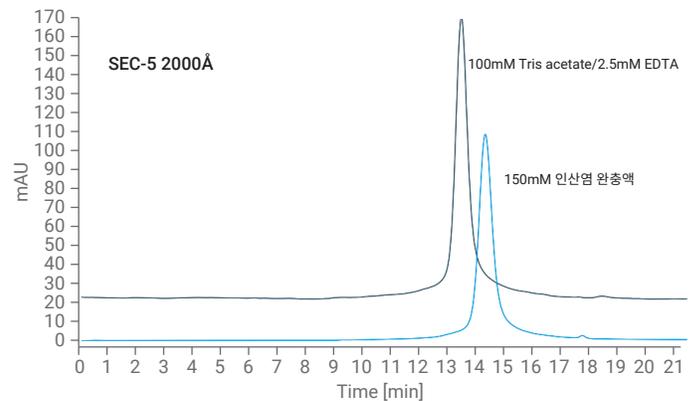
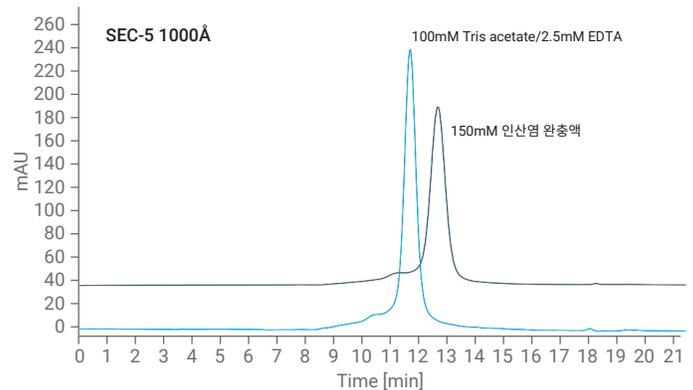


그림 5. CleanCap FLuc mRNA의 조건별 크로마토그램.

약 3500nt의 CleanCap β-galactosidase mRNA를 100mM Tris acetate / 2.5mM EDTA 조건을 이용하여 분석했을 때 SEC-5 1000Å 컬럼이 좋은 결과를 보여주었으며, 이 때 응집체의 비율은 약 24.9%로 확인되었습니다.

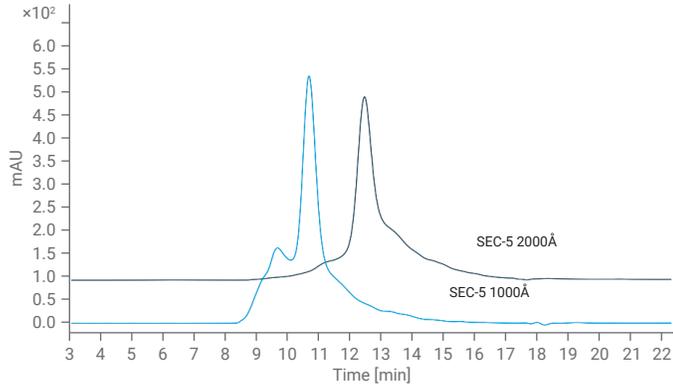


그림 6. CleanCap β-galactosidase mRNA의 컬럼 공극 크기별 크로마토그램.

유사한 크기의 mRNA 시료 1과 시료 2는 사전에 수행한 조건 스크리닝을 통해 2000Å 컬럼과 100mM Tris acetate/2.5mM EDTA의 이동상 조건에서 최적의 시험 결과를 보였고 시료 1은 약 12.7%, 시료 2는 약 9.6%의 응집체가 확인되었습니다.

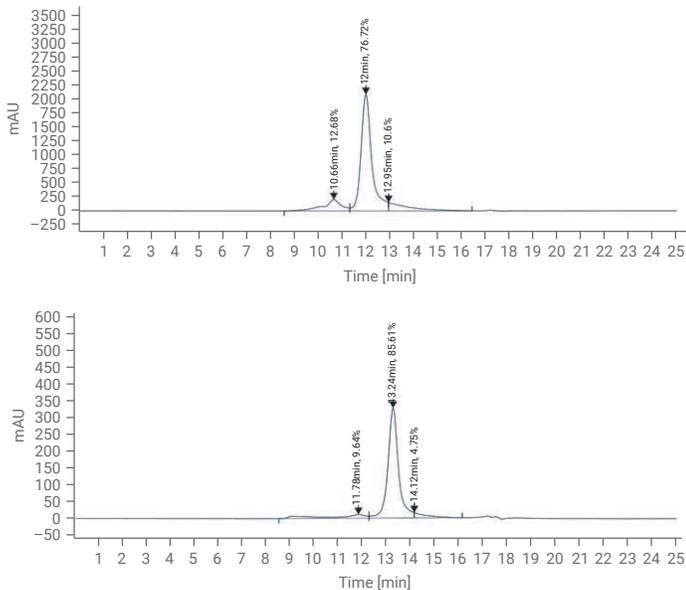


그림 7. mRNA 시료 1 (위)과 시료 2 (아래)의 응집체 분석 결과.

결론 및 고찰

USP Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines 2nd edition을 참조하여 Agilent 1290 Infinity II Bio UHPLC를 활용해서 mRNA 시료의 응집체 분석을 수행했습니다. mRNA의 크기와 특성에 따라 적절한 이동상과 컬럼을 선택해야 했고, ladder 표준품을 이용하여 컬럼의 측정 가능 범위를 확인할 수 있었습니다.

이러한 조건 확인을 바탕으로 약 2200nt 길이의 CleanCap FLuc mRNA의 응집체는 약 8.5%로, 3500nt 내외 길이의 CleanCap β-galactosidase mRNA는 약 24.9%, mRNA 시료 1은 12.7%, 시료 2는 약 9.6%로 각각 확인되었습니다. 이 결과는 고농도 염에 대한 높은 저항성과 낮은 상호작용의 특성을 지닌 Bio LC를 통해 얻을 수 있었습니다.

참고 문헌

1. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines:2nd Edition. *USP*, **2023**.
2. Chungoo Park. Et al. Differential requirements for mRNA folding partially explain why highly expressed proteins evolve slowly. *Biological Sciences*. **2013**, 110 (8), 678-686.
3. Feiran C. Et al. Research Advances on the Stability of mRNA Vaccines. *Viruses*. **2023**, 15, 668.
4. Alexander B. Et al. Sizes of Long RNA Molecules Are Determined by the Branching Patterns of Their Secondary Structures. *Biophysical Journal*. **2016**, 111, 2077-2085.
5. Chae-Young R.; Brian L. Oligonucleotide analysis with ion-pair reversed-phase chromatography and Agilent 1260 Infinity II Prime LC. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-5323EN, **2021**.

www.agilent.com/chem

DE42363509

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023
2024년 2월 7일, 한국에서 발행
5994-7192KOKR

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

