

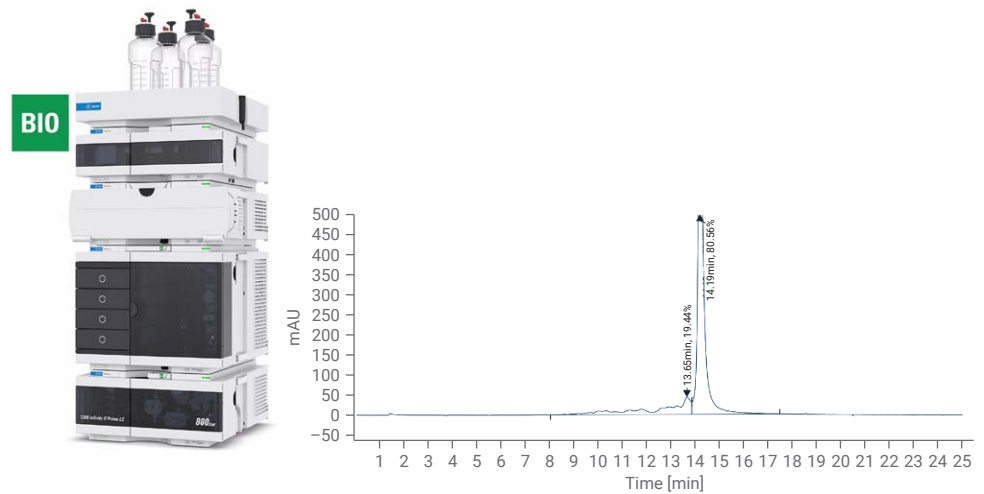
Agilent Infinity II Bio LC 시스템과 PLRP-S 컬럼을 이용한 mRNA의 유연물질 확인

mRNA Percent of Fragments by RP-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. 특히, 원료 의약품과 완제 의약품에서 수행해야 할 순도 시험은 HPLC 등을 이용하도록 하고 있습니다.

본 응용자료에서는 HPLC를 사용한 메신저 리보핵산(mRNA)의 분석사례를 소개하고 더 좋은 품질의 시험 결과를 얻기 위해 고려할 사항을 살펴보았습니다.

서론

과거에는 바이러스나 스파이크 단백질을 직접 주사해 후천 면역을 얻는 방법이 주류였으나, 현재에는 mRNA 백신의 필요성과 이에 따른 장점으로 인해 다양한 제약회사에서 mRNA 백신을 개발하고 있습니다. 이러한 접근 방식은 빠른 백신 개발과 효율적인 면역 응답을 도모하여 전염병 대응에서 획기적인 발전을 가져오고 있습니다.

이와 더불어 제조 중 mRNA 백신의 완결성을 확보하기 위해 품질평가에 적합한 시험방법을 개발하는 데에도 노력을 기울이고 있습니다. USP에서는 mRNA 개발자와 생산자들이 분석법을 개발하는 과정을 최소화하고, 보다 신속하게 제품을 개발할 수 있도록 공통적으로 적용 가능한 분석법을 제안하여, 효율적인 제조 프로세스를 유도하고, 품질을 향상시켜 보다 안정하고 효과적인 mRNA 백신을 양산하는데 도움을 주기 위해 노력하고 있습니다.

Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality에서는 5' capping efficiency, 3' poly(A) tail length, Product related impurities – aggregate quantitation, Product related impurity – percentage of fragment mRNA 시험방법을 HPLC를 이용하여 수행하도록 제안하였습니다. 가이드라인에는 상당히 구체적인 시험방법이 제시되어 있어, 실제 mRNA 시료를 분석할 때 초기 시험방법을 설정하는 데에 기준점이 될 수 있습니다. 하지만, 실제 분석 사례가 수재되어 있지 않고, 일반 mRNA 시료의 분석에 적용시키기 위해서 고려해야 할 부분이 언급되어 있지 않아 분석법 설정에 어려움을 겪을 수 있습니다.

본 응용자료에서는 USP mRNA Guideline에서 제안한 시험 방법을 바탕으로 mRNA의 순도를 평가하였고, 시험방법을 설정할 때 고려해야 할 파라미터에 대해 고찰하였습니다.

실험

표준물질 및 시약

실험에 사용된 Triethylamine과 hexylamine은 Sigma-Aldrich에서 구매했고, acetic acid는 JT Baker에서, acetonitrile은 B&J에서 구매했습니다. CleanCap FLuc mRNA(ORF 1929 nucleotides, UTR 261 nucleotides)는 TriLink에서, mRNA sample 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 Max-Light 카트리지 셀 60mm(G4212-60007)

컬럼

- Agilent PLRP-S 1000 Å 8 µm, 2.1 x 150 mm (P/N PL1912-3802)
- Agilent PLRP-S 4000 Å 8 µm, 2.1 x 150 mm (P/N PL1912-3803)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.7

이동상 조제방법

이동상은 아래의 분량으로 시약을 첨가하여 조제했습니다. 미리 준비한 물, 아세트오니트릴, 물-아세트오니트릴 혼합액에 Acetic acid와 각 알킬아민(alkyl amine)을 첨가하여 충분히 균질하게 섞어준 뒤 사용하였습니다.

표 1. 이동상의 조성.

종류	조성 (L)
100mM TEAA, pH 7	Acetic acid 6g, Triethylamine 10.12g
100mM HAA, pH 7	Acetic acid 6g, Hexylamine 10.12g

분석 기기 및 조건

표 3. Triethylamine acetate를 사용한 HPLC 분석 조건.

파라미터	값		
유속	0.3mL/min		
컬럼 온도	50°C		
주입량	10µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm		
이동상	A: 100mM Triethylamine acetate, pH 7 B: 100mM Triethylamine acetate, pH 7 in acetonitrile		
그라디언트	시간(분)	%A	%B
	0	90	10
	1.5	90	10
	7.5	87	13
	25	84	16
	25.1 30	10 10	90 90
사후 시간	5 min		

표 4. Hexylamine acetate를 사용한 HPLC 분석 조건.

파라미터	값		
유속	0.3mL/min		
컬럼 온도	60°C		
주입량	10µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm		
이동상	A: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 10% acetonitrile B: 100mM Hexylamine acetate, pH 7 in 90% acetonitrile		
그라디언트	시간(분)	%A	%B
	0	70	30
	1.5	70	30
	7.5	57.5	42.5
	25	50	50
	25.1	0	100
30	0	100	
사후 시간	5 min		

결과

USP mRNA guideline에서 언급한 컬럼은 Polystyrene divinylbenzene polymer 레진이 충전된 컬럼으로, 애질런트 PLRP-S 컬럼과 상응하는 컬럼입니다. 넓은 pH, 온도 범위에서 안정적으로 사용할 수 있고, mRNA 분석에 충분한 크기의 공극을 가질 수 있는 것이 특징입니다. mRNA 조각을 분석하기 위해서는 mRNA가 충분히 상호작용할 수 있도록 1000Å 이상의 공극을 가지는 컬럼을 이용해야 하고, 이온 쌍(Ion-pair) 시약의 pH를 고려하여 높은 pH에 안정한 컬럼을 사용해야 합니다. 더불어, 부분적으로 이차구조를 가질 수 있는 mRNA의 분석에 있어서 분석온도를 이용한 변성(denaturation)을 발생시켜야 하는데, PLRP-S가 이 조건들을 모두 충족하는 컬럼입니다. mRNA의 이온 쌍 분석에 사용되는 alkylamine은 대표적으로 triethylamine이 있지만, RNA를 분석함에 있어 낮은 분리효율을 보이므로, 이를 개선하기 위해 hexylamine과 같은 다른 종류의 이온 쌍 시약이 사용되고 있습니다. 100mM TEAA와 100mM HAA 조건으로 각각 PLRP-S 1000Å 컬럼을 통해 약 2200nt의 CleanCap FLuc mRNA (50ug/mL)를 분석한 결과, 100mM HAA 조건에서 주피크에 대해 좁은 피크 폭을 확인할 수 있었습니다. 하지만, 두 조건에서 모두 조각이 명확히 분리되지 않았습니다. (그림1)

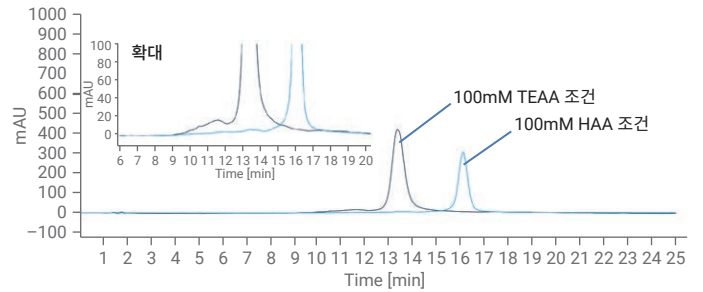


그림 1. PLRP-S 1000Å 조건에서 100mM TEAA와 100mM HAA의 이동상별 FLuc mRNA의 크로마토그램

크기가 약 2200nt인 mRNA는 1000Å 컬럼에서 낮은 피크 분리능을 나타낼 수 있는데 반해, 더 큰 공극 크기를 가진 컬럼에서는 더 탁월한 선택성을 보일 수 있습니다. PLRPS 4000Å 컬럼을 사용해 100mM TEAA와 100mM HAA 조건에서 각각 FLuc mRNA를 분석하였을 때, 보다 명확히 조각이 구분되었습니다. (그림2)

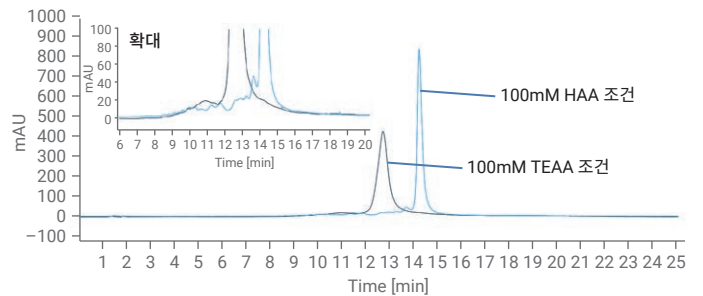


그림 2. PLRP-S 4000Å 조건에서 100mM TEAA와 100mM HAA의 이동상별 FLuc mRNA의 크로마토그램.

최종, PLRP-S 4000Å 컬럼과 100mM HAA 조건에서 약 2200nt의 mRNA 조각의 양은 19.44%로 확인되었습니다.

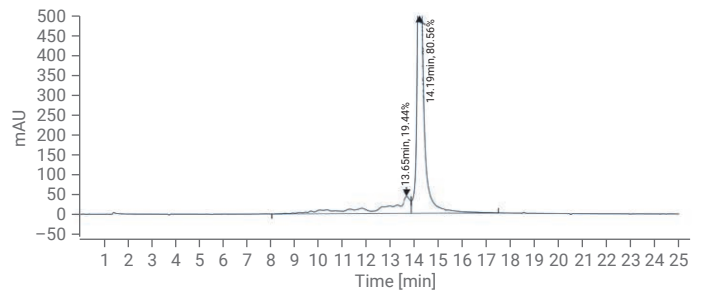


그림 3. PLRP-S 4000Å, 100mM HAA의 조건으로 분석한 CleanCap FLuc mRNA의 크로마토그램과 면적 백분율.

긴 mRNA는 각기 다른 염기 서열을 포함하며, 종종 부분적으로 2차 구조를 나타냅니다. 이는 상보적인 염기 서열의 존재로 인한 것입니다. 따라서 mRNA의 길이와 피크 머무름 시간 간의 연관성은 mRNA 종류에 따라 달라질 수 있습니다. 예를 들어, 시료 1은 15분에 주피크가 검출되었지만, 비슷한 크기의 시료 2는 12.5분의 주피크 외에도 다른 피크가 함께 관찰되었습니다. (그림 4) 이러한 차이를 해석하기 위해 2차 구조의 영향을 확인하기 위해 컬럼 온도를 변화시켜 분석을 수행했습니다.

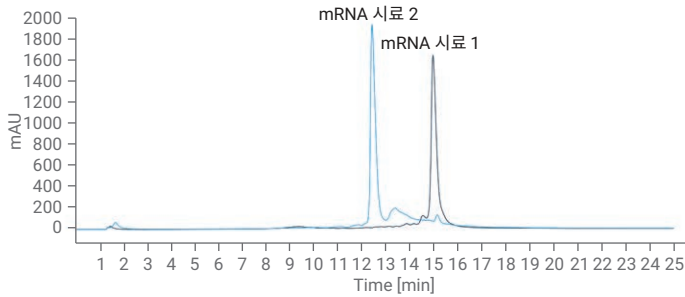


그림 4. 60°C 컬럼 온도 조건에서 100mM HAA와 PLRP-S 4000Å 컬럼을 이용한 mRNA 시료 1, 시료 2의 크로마토그램.

컬럼 온도를 60 - 90 로 설정하여 mRNA 시료 2를 분석한 결과, 머무름 시간이 단축되었을 뿐만 아니라, 개선된 질량 이동(mass transfer)으로 인해 유연물질 피크의 크기가 현저히 감소하는 것을 확인했습니다. 여러 피크들의 변화와 온도에 대한 다른 반응성은 2차 구조의 다양성과 결합력의 강도가 서로 다르기 때문으로 판단됩니다. 이러한 이해를 바탕으로, mRNA의 2차 구조의 다양성을 고려하여 최적의 컬럼 온도를 설정하는 것이 바람직합니다.

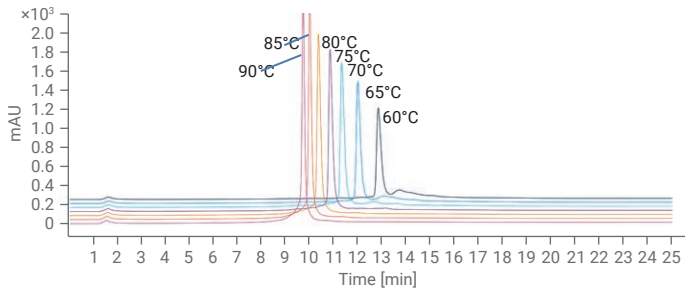


그림 5. 컬럼 온도별 mRNA 시료 2의 크로마토그램 변화.

결론 및 고찰

USP Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines 2nd edition을 참조하여 Agilent 1290 Infinity II Bio UHPLC를 활용해서 mRNA 시료 분석을 수행했습니다. mRNA의 길이와 이온 쌍 시약의 종류에 따라 다양한 시험 결과가 나타나며, 또한, 컬럼의 공극 크기는 mRNA의 길이에 따라 조절되어야 한다는 것을 확인하였습니다. 뿐만 아니라, mRNA의 이차구조에 따라 나타나는 피크 양상은 컬럼 온도에 따라 변하는 것을 관찰할 수 있었습니다.

약 2200nt 길이의 CleanCap FLuc mRNA는 100mM HAA와 PLRP-S 4000Å 조건에서 19.44%의 조각 함유량을 보였습니다. 이 결과는 Agilent 1290 Infinity II 바이오 고속 펌프가 낮은 용매 조성 변경 조건을 지원함과 함께, DAD HS Max-Light 카트리지가 셀 60mm의 높은 감도를 통해 얻을 수 있었습니다.

참고 문헌

1. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines:2nd Edition. *USP*, **2023**.
2. 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**.
3. Gerd V.; Sonja S. Evaluation of different ion-pairing reagents for LC/UV and LC/MS analysis of oligonucleotides. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-2957EN, **2021**.

www.agilent.com/chem

DE22452161

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023
2023년 12월 29일, 한국에서 발행
5994-7191KOKR

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

