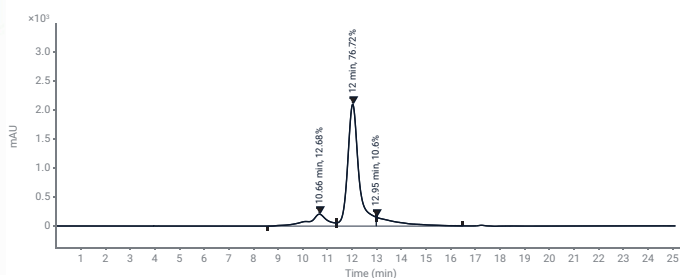


## Agilent Infinity II Bio LC システムと Bio-SEC カラムによる mRNA の凝集体分析

SEC-HPLC による mRNA 凝集体の分析 – mRNA ワクチンの  
品質に関する USP 分析手順



### 著者

Chae-Young Ryu  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

米国薬局方 (USP) は、mRNA 生産プロセスにおける主な品質特性の管理を目的とした品質評価メソッドを Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality ガイドライン草案第 2 版で提案しました<sup>1</sup>。このガイドラインでは、mRNA 凝集体を分析するためのメソッドを提示し、mRNA 原薬と mRNA 医薬品に対する試験メソッドをそれぞれ規定しています。このアプリケーションノートでは、カラムと移動相の選択が mRNA 凝集体の分析による凝集性の評価にどのような影響をおよぼすのかを調査します。

## はじめに

mRNA は、ヌクレオチド間の相補的結合にもとづいて二次構造を形成するか、凝集体の形で存在する可能性があります。このような二次構造や凝集体は、タンパク質への RNA の翻訳を妨害する阻害要因となるだけでなく<sup>2, 3</sup>、脂質ナノ粒子の製剤効率に影響を与える可能性もあります<sup>4</sup>。したがって、mRNA 凝集体を管理することが、製剤および効能の両方の観点からきわめて重要な品質評価基準であると考えられています。

低 pH、特に pH 7 未満の環境下では、核酸が加水分解される可能性があります。そのため mRNA ワクチンを生産するには、適切な緩衝系を選択して安定性を保つ必要があります。バイオ医薬品の製造ではリン酸緩衝液が使用されるのが一般的ですが、低温では pH が変化する可能性が懸念されます。凍結も含む mRNA ワクチンの一般的な保管条件では、これが特に大きな問題となります。また、マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) やカルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) は酵素による mRNA の切断に関与しますが、移動相に EDTA を添加すれば、mRNA の安定化を助けることができます<sup>4</sup>。

USP ガイドラインで提案されている mRNA 原薬の分析メソッドでは、150 mM リン酸緩衝液を含む移動相が採用されています。その一方で、mRNA 医薬品の分析メソッドで提案されているのは、トリス酢酸/2.5 mM EDTA 緩衝液を含む移動相です。これらの条件下では、移動相中の塩濃度とヌクレオチド-ステンレス間の相互作用を考慮して、凝集体の評価に、生体適合材料を用いた HPLC を使用する必要があります。そこで、今回の研究では、Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを使用して、移動相とカラムの選択が mRNA 凝集体の分析におよぼす影響を評価しました。

## 方法

### 標準と試薬

実験に用いたリン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、および 10x TAE 緩衝液は、Sigma-Aldrich 社から購入しました。

100 bp DNA ラダーおよび 1 kbp DNA ラダーは、Thermo Fisher 社から購入しました。ポリ (A) (平均鎖長 4,831 ヌクレオチド) は Sigma-Aldrich 社から、CleanCap FLuc mRNA (ORF 鎖長 1,929 ヌクレオチド、UTR 鎖長 261 ヌクレオチド)、および CleanCap  $\beta$ -ガラクトシダーゼ mRNA (ORF 鎖長 3420 ヌクレオチド) は TriLink 社から購入しました。また、mRNA サンプル 1 および 2 は顧客から提供されたものを使用しました。

### 装置

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)、サンプルサーモスタット付き
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Agilent InfinityLab バイオイナートクイックコネクタ熱交換器 (G7116-60071) 付き
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B) とバイオイナート Max-Light カートリッジセル 60 mm (G5615-60017)

### カラム

- Agilent Bio SEC-5 500Å、7.8 × 300 mm、5  $\mu$ m (部品番号 5190-2531)
- Agilent Bio SEC-5 1000Å、7.8 × 300 mm、5  $\mu$ m (部品番号 5190-2536)
- Agilent Bio SEC-5 2000Å、7.8 × 300 mm、5  $\mu$ m (部品番号 5190-2541)

### ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS、バージョン 2.7

### 移動相

リン酸一ナトリウム 6.32 g とリン酸水素二ナトリウム 13.8 g を水に溶解して容量を 1 L に調整することで、150 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を調製しました。また、10x TAE 緩衝液 250 mL と水 750 mL を混合して容量を 1 L に調整することで、100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA 緩衝液を調製しました。

## メソッド

表 1. リン酸緩衝液を用いた HPLC 分析条件

パラメータ	値
流量	0.6 mL/min
カラム温度	25 °C
注入量	5 $\mu$ L
サンブラ温度	4 °C
検出器	UV 260 nm
移動相	150 mM リン酸緩衝液
分析時間	25 分

表 2. 100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA を用いた HPLC 分析条件

パラメータ	値
流量	0.6 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	5 $\mu$ L
サンブラ温度	4 °C
検出器	UV 260 nm
移動相	100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA
分析時間	25 分

## 結果と考察

mRNA 原薬の凝集体分析メソッドとして USP の mRNA ガイドラインで提案されているとおり 150 mM リン酸緩衝液を使用して (表 1)、100 bp DNA ラダーとポリ (A) (1 mg/mL) をそれぞれ SEC-5 500Å、1000Å、および 2000Å のカラム条件下で分析しました。DNA ラダーで現れるピークの見分けがカラムのポアサイズに応じてばらつくことが観察されました。また、ポリ (A) のピーク分布範囲での試験により、SEC に有効なリテンションタイムの範囲を推測しました。300 bp 未満の DNA サイズに相当する mRNA に対しては、500Å 条件が適切であることがわかりました。また、1,000 bp 未満のサイズの mRNA には 1000Å 条件が必要であり、2,000 bp に相当する比較的大きな mRNA には 2000Å カラムが適していました (図 1)。

一方、同じ標準液とカラムで、移動相に 100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA を使用して (表 2) 得られたクロマトグラムは、150 mM リン酸緩衝液を使用した場合と比べて、クロマトグラムのパターンに大きな違いはありませんでしたが、溶出時間がわずかに短くなり、各ピークの平均分子量は大きくなりました (図 2)。

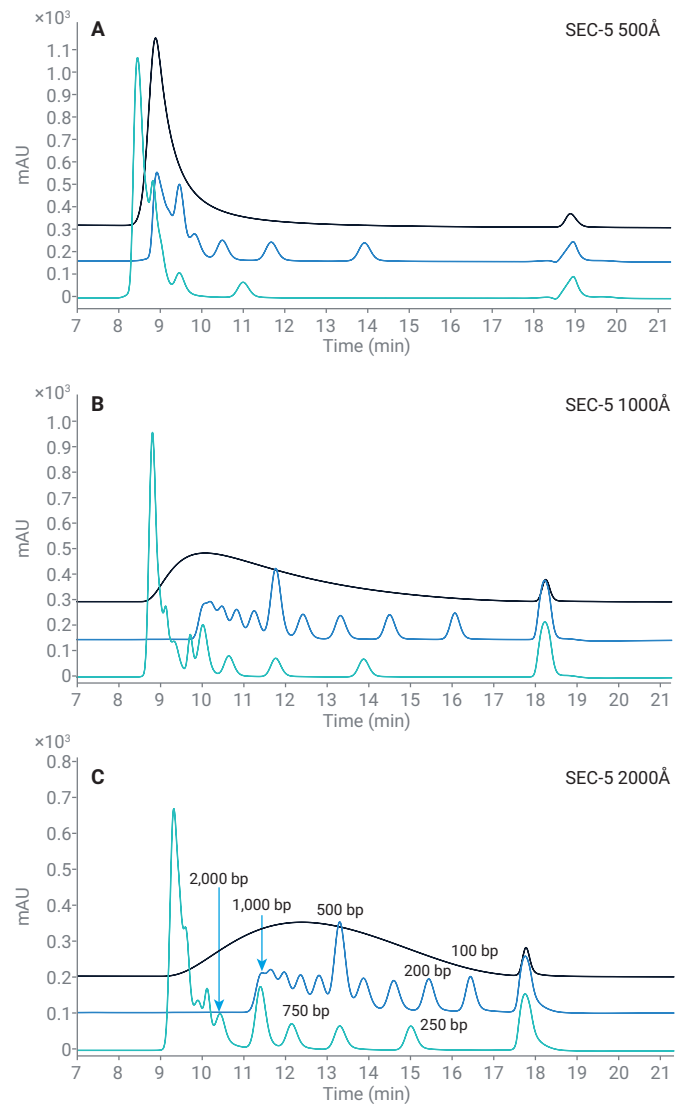


図 1. 各カラム寸法を用いて 150 mM リン酸緩衝液条件下で分析した (A) ポリ (A)、(B) 100 bp DNA ラダー、(C) 1 kbp DNA ラダーのクロマトグラム (各クロマトグラムで上から下へ: ポリ (A) (黒)、100 bp DNA ラダー (青)、1 kbp DNA ラダー (緑))

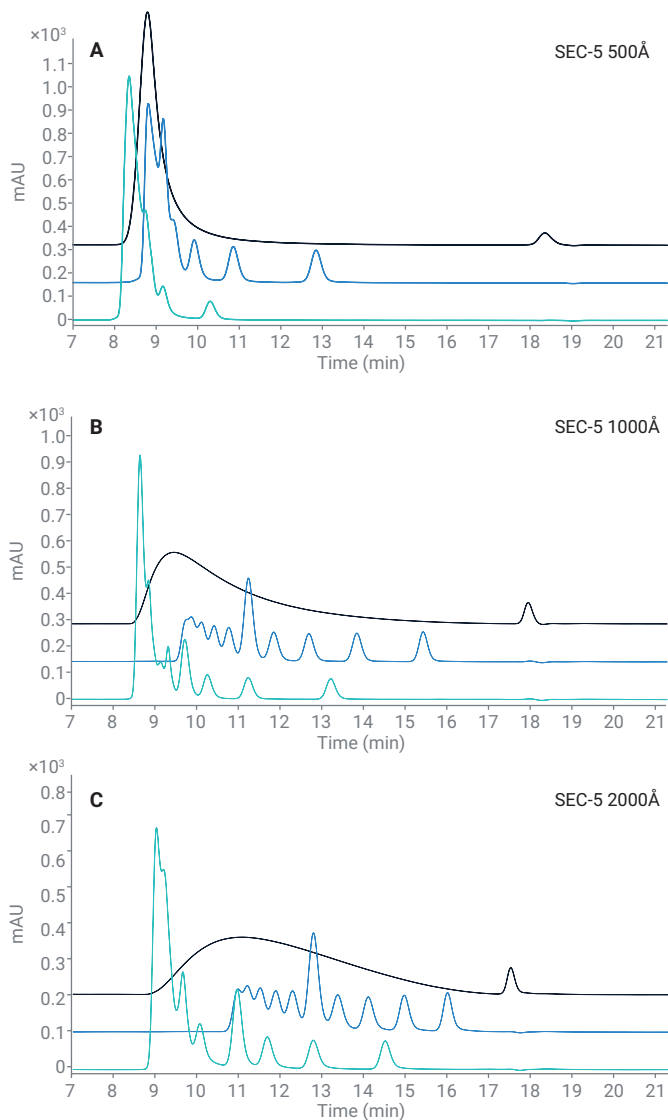


図 2. さまざまなポアサイズのカラムを用いて 100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA 条件下で分析した (A) ポリ (A)、(B) 100 bp DNA ラダー、(C) 1 kbp DNA ラダーのクロマトグラム (各クロマトグラムで上から下へ：ポリ (A) (黒)、100 bp DNA ラダー (青)、1 kbp DNA ラダー (緑))

ただし mRNA 凝集体の評価では、カラムを選択する際に凝集体のサイズも考慮しなければなりません。約 2,000 nt の CleanCap FLuc mRNA を各条件下で分析し、結果を比較しました。OpenLab CDS 2.7 の GPC アドオンで得られたカラムキャリブレーション情報をもとに、DNA ラダー中の塩基対の数にもとづいて変換し、mRNA のサイズを推定しました。リファレンスとして 100 bp DNA ラダーと 1 kbp DNA ラダーを使用してサイズを比較したところ、ピーク値はサイズ 422 bp に相当していました (図 3 および 4)。カラムの測定範囲内には、ターゲット mRNA だけでなく、凝集体に対応するピークの前フロンティングもすべて含まれていることが観察されました。

二本鎖 DNA は相補的結合によって長い直線構造を形成する、比較的単純な三次元構造を持っています。それに対し、一本鎖 RNA は局所的な相補的結合によって二次構造を形成する、複雑な三次元構造を呈しています。サイズ排除クロマトグラフィーにおける分子サイズにもとづくリテンションタイムは流体力学半径 (Rh) の影響を直接受け、Rh には相補的結合による RNA の分岐構造が影響を与えます。つまり、一本鎖 RNA の溶出時間は、二本鎖 DNA よりも構造に左右されやすく、ポリ (A) の二次構造の多様性と鎖長分布が広いピーク幅という特性に寄与していると考えられます。

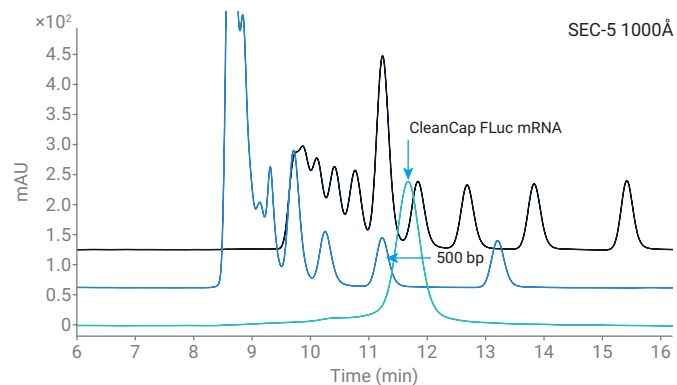
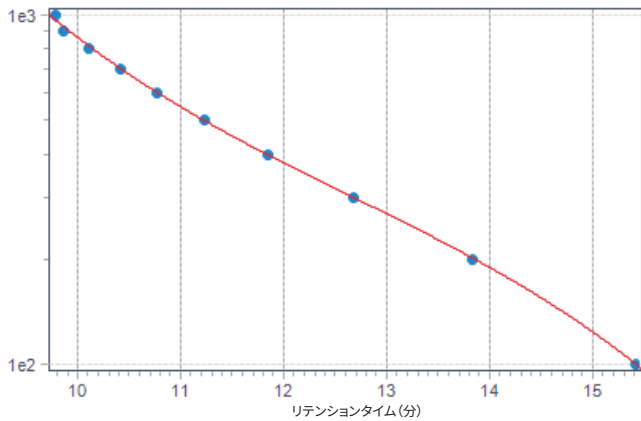


図 3. 100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA + SEC-5 1000Å 条件下で得られたクロマトグラム (上から：100 bp DNA ラダー (黒)、1 kbp DNA ラダー (青)、CleanCap FLuc mRNA (緑))



**曲線適合**

曲線適合の次数

3

曲線適合式

$$y = -0.00380656x^3 + 0.144361x^2 - 1.96903x + 11.9933$$

**曲線適合の統計値**

残差平方和

0.000448

決定係数

0.999509

直線性相関係数

-0.998317

修正平方和

0.912110

標準 Y 誤差推定値

0.008641

図 4. Agilent OpenLab CDS の GPC アドオンにより 100 bp DNA ラダーの結果をもとに変換した鎖長とリテンションタイムの関係例 (検量線の横軸: リテンションタイム、縦軸: 鎖長 (bp))

RNA 凝集体を分析する際は、カラムの測定可能なサイズ範囲と凝集体の分布範囲の両方を考慮してカラムを選択することが不可欠です。広い分布を持つポリ (A) や 1 kbp の DNA ラダーなど、カラムの排除範囲と浸透範囲をすべてカバーしたサンプルを分析することで、カラムの測定可能な範囲を評価することができます。

また、凝集体を容易に確認できる分析条件を特定することも非常に重要です。CleanCap FLuc mRNA では、SEC-5 1000Å 条件下で 100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA を使用して分析した場合 (表 2)、約 8.5% の凝集体が観察されました (図 5)。一方、SEC-5 2000Å 条件下では、ターゲット mRNA と凝集体を十分な分離能で分離するのが容易でないことがわかりました (図 5)。

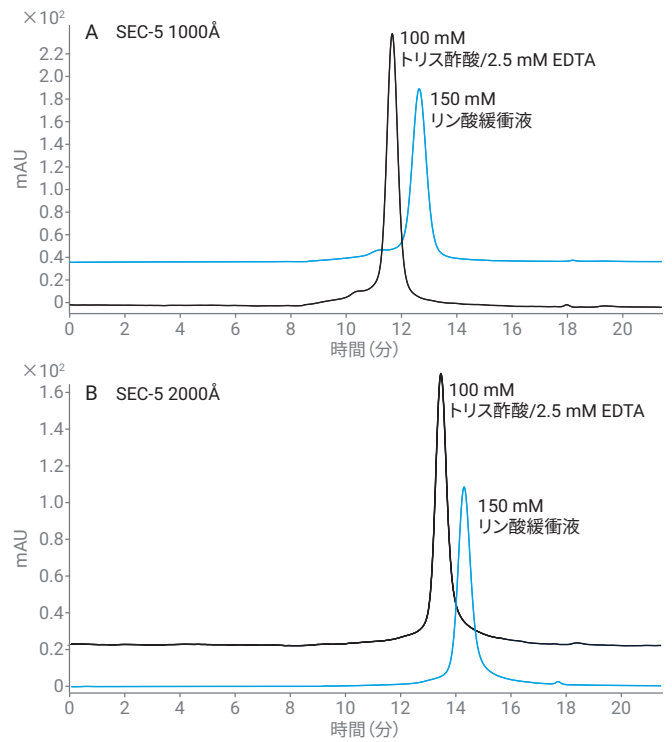


図 5.さまざまな条件下で分析した CleanCap FLuc mRNA のクロマトグラム

約 3,500 nt の CleanCap  $\beta$ -ガラクトシダーゼ mRNA を 100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA 条件で分析したところ (表 2)、SEC-5 1000Å カラムにより、凝集体比約 24.9% という良好な結果が得られました (図 6)。

サンプル 1 および 2 の同様のサイズの mRNA については、条件として SEC-5 2000Å カラムと移動相 100 mM トリス酢酸/2.5 mM EDTA を用いたスクリーニングから、前述の条件で最適な試験結果が得られることがわかりました (図 7)。ターゲット mRNA の評価には SEC-5 1000Å カラムも適していましたが、凝集体の溶出範囲とカラムの測定可能範囲を踏まえると、SEC-5 2000 Å カラムの方が適切でした。この設定では、サンプル 1 では約 12.7%、サンプル 2 では約 9.6% の凝集体が観察されました。

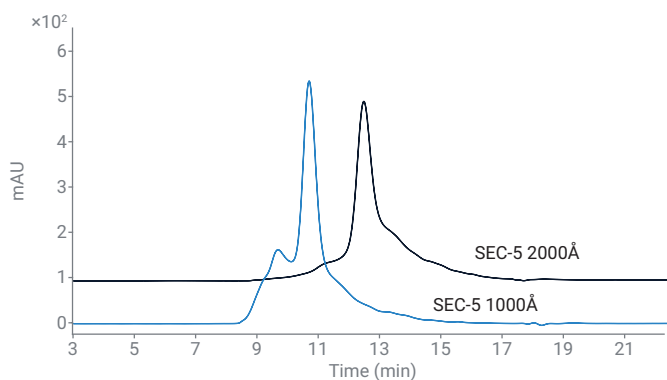


図 6. さまざまなポアサイズのカラム条件下で分析した CleanCap  $\beta$ -ガラクトシダーゼ mRNA のクロマトグラム

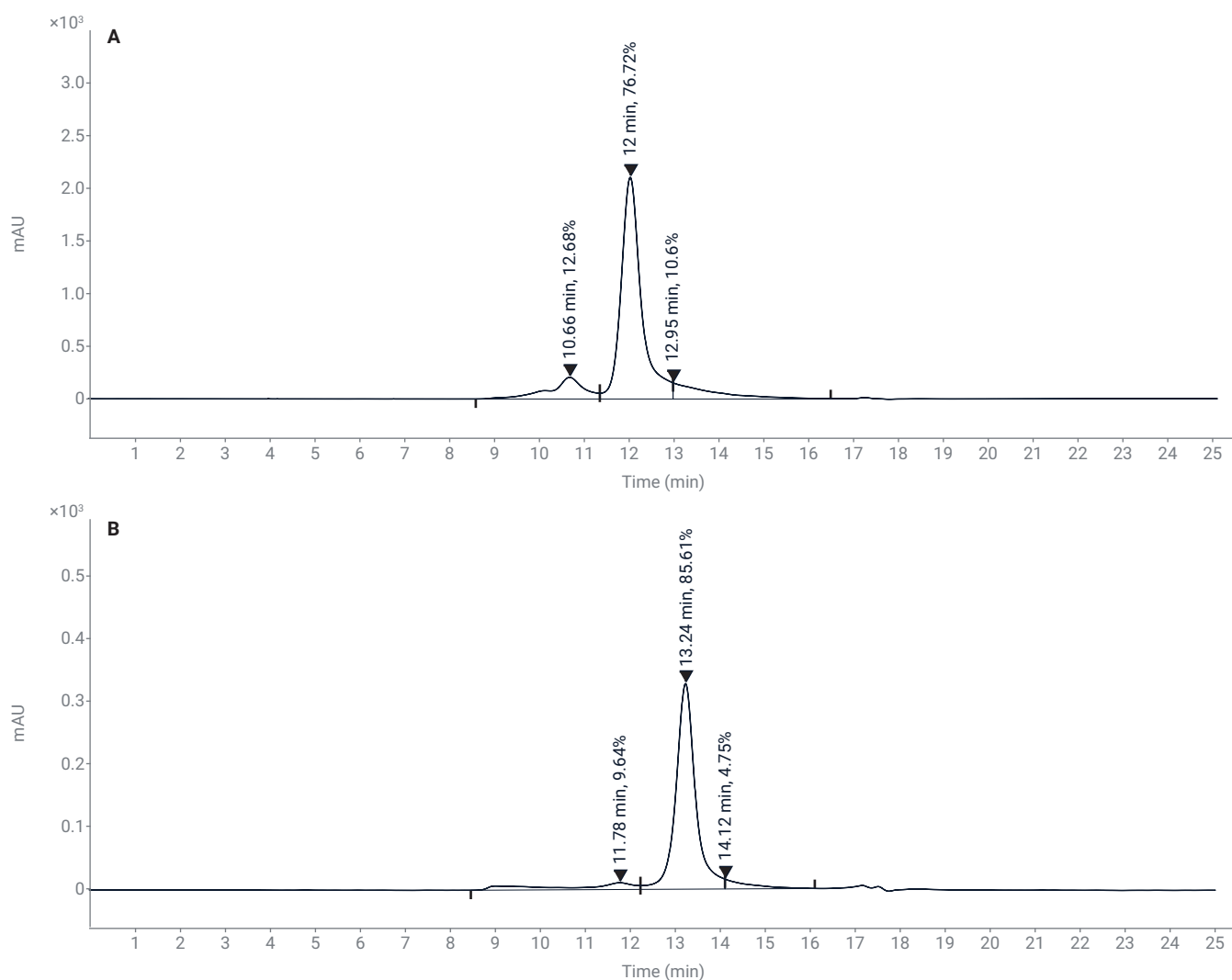


図 7. (A) サンプル 1 および (B) サンプル 2 の mRNA の凝集体分析結果

## 結論

Agilent 1290 Infinity II Bio LC を使用し、USP の Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality ガイドライン草案の第 2 版に従って mRNA 凝集体の分析を行いました。mRNA 凝集体の分析では、mRNA のサイズと特性にもとづいて適切な移動相とカラムを選択することがきわめて重要でした。そこで、ラダー標準を用いてカラムの測定可能範囲を確認したところ、多様な構造のアイソフォームとポリ (A) 分布を持つ mRNA は、DNA ラダーよりも広いピーク幅を示しました。つまり、凝集体と明確に区別するためには、移動相とカラムによって最適な分離条件を求めることが不可欠です。また、カラムを選択する際は、その測定可能範囲が凝集体の分布をカバーしているかどうかを考慮しなければなりません。

今回実施した試験では、mRNA 凝集体の評価において、約 2,000 nt の mRNA には 1000Å カラムが、また 4,000 nt 未満の mRNA には 2000Å カラムが適していることが示されました。ただし、CleanCap β-ガラクトシダーゼ mRNA のような例外的なケースもあるため、カラムのスクリーニングによって最適な条件を確立することが必要です。

鉄をまったく含まない流路を備えた Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムは、腐食によるシステムの損傷を防ぎ、サイズ排除クロマトグラフィーの分析条件に最適です。

## 参考文献

1. USP: Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft Guidelines: 2nd Edition. **2023**.
2. Park, C.; Chen, X.; Yang, J. R.; Zhang, J. Differential Requirements for mRNA Folding Partially Explain Why Highly Expressed Proteins Evolve Slowly. *PNAS*, **2013**, *110*(8), E678–E686.
3. Borodavka, A.; Singaram, S. W.; Stockley, P. G.; Gelbart, W. M.; Ben-Shaul, A.; Tuma, R. Sizes of Long RNA Molecules are Determined by the Branching Patterns of Their Secondary Structures. *Biophys.J.* **2016**, *111*(10), 2077–2085.
4. Cheng, F.; Wang, Y.; Bai, Y.; Liang, Z.; Mao, Q.; Liu, D.; Wu, X.; Xu, M. Research Advances on the Stability of mRNA Vaccines. *Viruses* **2023**, *15*(3), 668.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE00179261

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, April 2, 2024

5994-7311JAJP