

## Roche CustomBiotech Recombinant Trypsin

### 자주하는 질문 정리

본 자료에서 Recombinant Trypsin에 대해 자주 묻는 질문과 답변을 확인하실 수 있습니다.

제품은 아래의 번호와 용량으로 제공됩니다.

| 제품번호           | 용량           |
|----------------|--------------|
| 03 358 658 103 | 3.5 MU       |
| 06 369 880 103 | 1g = 0.23 MU |

**Q:** Roche CustomBiotech은 바이오제약 시장을 위한 recombinant Trypsin을 생산한지 얼마나 오래 되었나요?

**A:** Roche는 2004년부터 *Pichia pastoris*에서 발현한 recombinant Trypsin을 생산해 왔습니다.

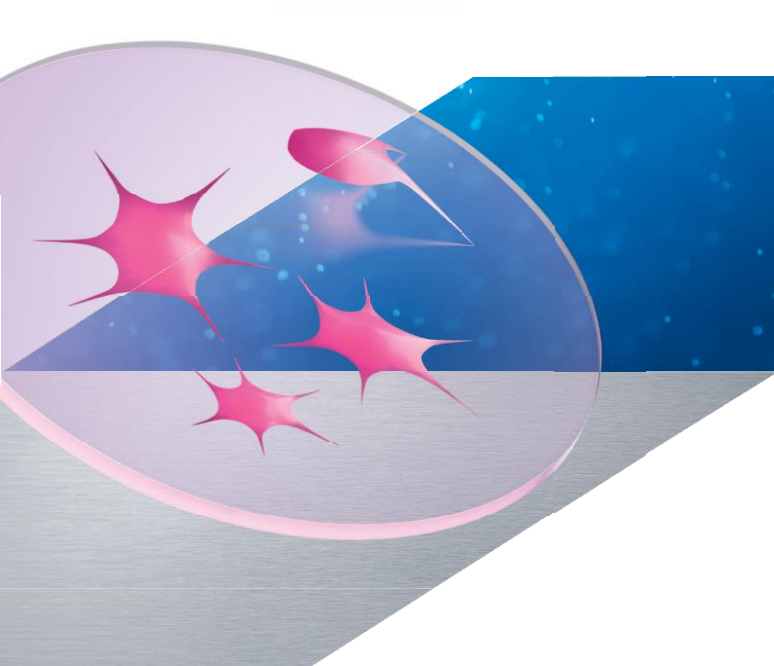
### 제품 형식

**Q:** Roche의 Recombinant Trypsin은 액상 형태로 제공되나요?

**A:** 고농도 용액으로 제공되며, 실제 사용하는 농도로 희석하여 사용할 수 있습니다.

**Q:** Roche Recombinant Trypsin을 R&D 용도로 좀 더 작은 사이즈로 판매할 수 있나요?

**A:** 현재는 3.5MU (= 240mL)와 0.23MU (=15mL)의 두 가지 용량으로 제공됩니다. 본 제품은 GMP의 준수를 위해, 검증이 된 용량으로만 제공될 수 있습니다.



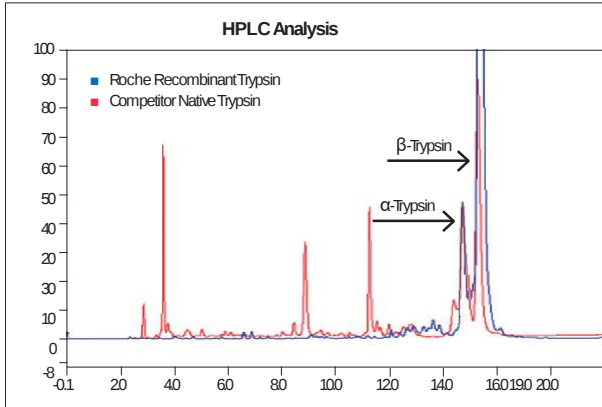
## 제품 활성

**Q: Native trypsin과 비교했을 때 Roche Recombinant Trypsin의 활성은 어느 정도 인가요?**

**A:** 아래에 native trypsin과 Roche recombinant Trypsin의 HPLC와 활성 비교 데이터가 있습니다. Roche recombinant Trypsin의 경우, 단백질의 분해나 이물질 없이 깨끗한  $\alpha$ -와  $\beta$ -trypsin의 피크가 나타남을 볼 수 있습니다.

피크 면적 분석을 통해 경쟁사 제품이 34%의  $\beta$ -trypsin과 23%의  $\alpha$ -trypsin으로 구성되어 있는 반면, Roche 제품은 73%의  $\beta$ -trypsin과 13%의  $\alpha$ -trypsin으로 이루어져 있음을 알 수 있었습니다.

Roche Recombinant Trypsin의 높은 순도는 활성도와 상관관계가 있으며 이는 Chromozyme TRY(Roche의 방식)와 BAEE (USP 방식)로 확인 되었습니다.



Activity measurement

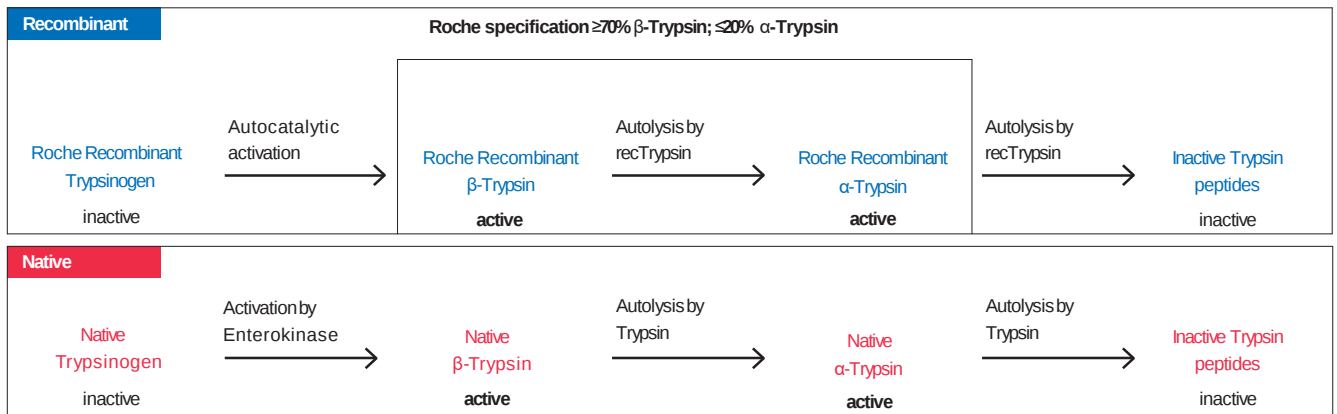
| Product                                     | Specific activity (Roche method) | Specific activity (USP method) |
|---------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Roche Recombinant Trypsin, GMP Grade</b> |                                  |                                |
| Sample 1                                    | 220 U/mg                         | 4,900 U/mg                     |
| Sample 2                                    | 240 U/mg                         | 5,130 U/mg                     |
| Sample 3                                    | 230 U/mg                         | 4,990 U/mg                     |
| <b>Competitor Native Trypsin</b>            |                                  |                                |
| Sample                                      | 160 U/mg                         | 3,450 U/mg                     |

**Q: 활성면에서  $\alpha$ -trypsin과  $\beta$ -trypsin의 차이는 무엇인가요?**

**A:** 비활성 전구체인 trypsinogen의 첫 번째 단백질 분해 산물이  $\beta$ -trypsin입니다.  $\alpha$ -trypsin은 그 두 번째 분해 산물로 두 개의 peptide chain이 이황화결합으로 연결되어 있습니다. 이 두 가지 모두 활성형입니다.

아래 그림은 trypsin의 life cycle을 나타낸 것입니다.

Recombinant Trypsin의 합성에서는 down stream 단계에서, 제어된 자동 촉매 과정을 통해 전구체 분자인 Trypsinogen에서  $\beta$ -Trypsin을 다량 만들어 낼 수 있게 됩니다.  $\beta$ -Trypsin은 활성 trypsin의 1차 형태이며 이런 제어된 자동 촉매 과정은 분해 되지 않은  $\beta$ -Trypsin의 함량을 70% 이상으로 보장 할 수 있게 합니다. 반면, Native Trypsinogen으로 시작하는 공정인 경우에는 연쇄적으로 활성 및 비활성 분해 생성물로 바뀌어 버리게 됩니다.



**Q: Roche Recombinant Trypsin 생산 로트 당  $\alpha$ -trypsin 과  $\beta$ -trypsin 의 기준 함량은 얼마입니까?**

**A:**  $\beta$ -trypsin  $\geq 70\%$ ,  $\alpha$ -trypsin  $\leq 20\%$ .

**Q:  $\alpha$ -trypsin 과  $\beta$ -trypsin 의 기준 함량이 왜 중요한가요?**

**A:** Roche Trypsin 은  $\beta$ -trypsin 의 함량이 70% 이상이며 추가적인  $\alpha$ -trypsin 의 분해 (autolysis) 에 의한 비 활성형의 생성을 최소화 하는 조건에서 생산합니다.

**Q: Roche Recombinant Trypsin 의 unit 당 활성도 테스트에 대해 보다 자세한 정보를 알 수 있을까요?**

**A:** Trypsin 의 활성은 Chromozym TRY substrate 를 이용하여 분광 광도법으로 측정하였습니다. 1 Chromzyme TRY Unit 은 21.3 USP Unit 과 동일합니다. Roche CustomBiotech 은 Chromozym TRY substrate (Cat. No. 10 378 496 103) 를 공급하고 있습니다.

**Q: Roche Recombinant Trypsin 은 농축된 형태인데, 실제 생산에서는 얼마나 사용을 해야 하나요?**

**A:** "Use of Roche Recombinant Trypsin for cell culture applications" 이라는 application note 에 관련 가이드라인이 있습니다. CustomBiotech 공식 홈페이지인 [custombiotech.roche.com](http://custombiotech.roche.com) 에서 다운로드 받으시거나 영업사원에게 요청하여 받으실 수 있습니다. 보통 일반적인 사용을 위해서 1/10000 의 희석을 제안하고 있지만, application 별 적합한 사용 농도 및 배양 시간은 실험을 통해 결정 되어야 합니다.

**Q: 만약 Roche Recombinant Trypsin 을 대규모 공정에서 사용하게 된다면, 일정시간의 효소 반응 후, 결과물의 수율 등에 영향을 주지 않으면서 효과적으로 효소의 활성을 멈출 수 있는 방법은 무엇입니까?**

**A:** 부착성 세포의 대량 배양에서는 serum 이 들어 있는 배지를 첨가 하는 일반적인 방식을 사용할 수 있으며, Serum free condition 의 경우 SBTI 와 같은 Trypsin inhibitor 를 처리하여 Trypsin 의 활성을 중단 시킬 수 있습니다.

## 안정성

**Q: Roche Recombinant Trypsin 는 얼마나 안정한가요?**

**A:** Roche Recombinant Trypsin 의 제품 사양은  $-15^{\circ}\text{C}$  ~  $-25^{\circ}\text{C}$  에서 36개월간 안정합니다. (1g 과 3.5MU 제품 모두 해당). 1/10000 으로 희석한 경우,  $-15^{\circ}\text{C}$  ~  $-25^{\circ}\text{C}$  그리고  $2^{\circ}\text{C}$  ~  $8^{\circ}\text{C}$  에서 모두 최대 24개월간 안정함을 보였습니다.

**Q: 한 번 희석이 된 Roche Recombinant Trypsin 의 상온 안정성은 어떤가요?**

**A:** 상온에서는 24시간 이상 방치하지 않습니다.

**Q: Roche Recombinant Trypsin 은 반복적인 freeze-thaws 에 안정한가요?**

**A:** Roche 는 일단 녹인 효소는 작업 원료 준비에 적합한 일회용 볼륨으로 분주하기를 권장합니다. 5번의 freeze-thaw cycles 로 구성된 가속 조건 실험 (Stress test) 에서는 활성이 90% 이상 회복됨을 보여주었고,  $\alpha/\beta$  의 비율에도 큰 변화가 없었습니다. Working stock 으로 희석된 용액은  $-15^{\circ}\text{C}$  ~  $-25^{\circ}\text{C}$  나  $2^{\circ}\text{C}$  ~  $8^{\circ}\text{C}$  에서 24개월간 안정성이 확인되었습니다.

**Q: Roche 제품 중 상온에서 안정적인 Recombinant Trypsin 이 있나요?**

**A:** 현재 Roche 에서는 상온 안정성을 가진 Recombinant Trypsin 은 없습니다.

## 잔류물 검사

**Q: 최종산물에서 Recombinant Trypsin 의 잔류물을 확인할 수 있는 테스트법이 있나요?**

**A:** Roche CustomBiotech 이 제공하는 Residual Protein Trypsin Kit (07 568 975 001) 를 이용하여 특이적이고 민감한 검출이 가능합니다. 이 테스트는 process development, in-process control 그리고 최종 QC 에 적합합니다.

## 품질 관리 및 규제

**Q: Roche Recombinant Trypsin의 로트별 차이/일관성은 어떤가요?**

**A:** 최소 30개 연속적인 배치의 rec Trypsin이 특정 활성 범위 내에 들어오는 것을 확인하였습니다.

**Q: Roche Recombinant Trypsin의 생산 과정은 animal free인가요??**

**A:** 네. Certificate of origin (COO) 상에 생산 공정이 animal free라고 명기 되어 있으며 COO는 요청 시 제공 됩니다.

**Q: Roche Recombinant Trypsin에 대해서 규제 지원을 위한 어떤 문서를 제공합니까?**

**A:** Roche는 고객의 요구에 따라 CDA (confidentiality agreement) 협약 후 기술문서 (technical dossiers)를 제공하고 있습니다.

**Q: Roche에서는 Good Manufacturing Practices를 어떻게 정의하고 있나요?**

**A:** GMP 지침은 아래 사항을 포함하고 있습니다:

- Validation
- Equipment
- Processes, including filling
- QC procedures (extended testing)
- Stability programs
- Cleaning procedures, dedication concept
- Hygienic environment
- Continuous monitoring
- Clearly defined hygienic zones
- Established change control notification (CCN) procedures

**Q: 규제와 관련된 경험을 공유해 주실 수 있나요??**

**A:** 요청하실 경우, 제품의 등록을 지원 하기 위해 규제 관련 전문가가 도와드릴 수 있습니다.

### Reference

Roche CustomBiotech Application Note "Use of Roche Recombinant Trypsin for cell culture applications" January 2018.

### Regulatory for Trypsin and Chromozyn TRY substrate

Recombinant Trypsin and Chromozyn TRY substrate are for further processing only.

### Regulatory disclaimer for Residual Protein Trypsin Kit

Residual Protein Trypsin Kit is for quality control/manufacturing of IVD/medical devices/pharmaceutical products only.

[custombiotech.roche.com](http://custombiotech.roche.com)

**한국로슈진단(주)**



서울특별시 강남구 테헤란로 108길 22 (06174)  
TEL : 02-550-3300 Fax : 02-550-1218  
E-mail : [korea.diagnostics@roche.com](mailto:korea.diagnostics@roche.com)  
Homepage : <http://custombiotech.roche.com>