

Technical Report

mRNA 수율 증대를 위한 IVT 반응 최적화 방안



Objective _____

단일 가닥인 mRNA 분자를 *in vitro* 로 합성하는 것은 실험적으로 널리 활용되어 왔으며, RNA 연구 및 치료제 개발에 있어 매우 중요한 부분입니다. mRNA는 지난 수십년 간 소규모로 개발되고 사용되어 왔으나, SARS-CoV-2 의 대유행으로 치료제 개발에 대한 요구가 전례없이 증폭하여 더욱 주목 받게 되었습니다. mRNA 치료제는 용도에 맞게 구조에 따른 맞춤 공정이 필요하므로, 어떤 요인들이 IVT (*in vitro* transcription) 반응에 영향을 줄 수 있는지 확인하는 것은 중요한 일입니다.

우리는 mRNA 수율 향상을 위해 IVT 반응의 설정과 최적화에 영향을 줄 수 있는 여러 요인들에 대해서 테스트 하였으며, Magnesium ion 또는 nucleotide 농도와 같은 요인들이 IVT 반응과 mRNA 전체 수율에 상당한 영향을 미친다는 것을 확인 하였습니다. 신뢰할 수 있고 효율적인 mRNA 합성을 위해서는 반응에 영향을 주는 이런 주요 사항들을 철저하게 적정하고 테스트하는 것은 매우 중요한 일일 것 입니다.

December 2022

Alexander Latta, Neera Sammeta

Roche CustomBiotech, Indianapolis, USA

Stefan Kutter, Monika Seller,

Bhawana Poudel-Bochmann, Peter Rasor

Roche CustomBiotech, Penzberg, Germany

Birgit Rogell

Roche CustomBiotech, Mannheim, Germany

Introduction

규격화된 mRNA IVT kit는 보통 연구 및 초기 개발 단계에서 사용됩니다. 그렇지만 이런 kit는 치료제 개발을 위한 mRNA 제조 공정 (그림 1에서 설명된 일반적인 작업흐름) 에서 고품질의 RNA를 일관되게 생산하기 위해 필요한 두 가지 요구 사항들을 만족시키지 못 할 수 있습니다. 첫째, buffer 조성, 길이 및 template 유형에 따라 달라지는 mRNA 분자에 대한

반응 시약의 최적화가 제한적일 수 있습니다. 둘째, 생산에 필요한 품질로 재현되지 않을 가능성이 있습니다. 첫번째 요소는 효율적인 조건으로 시약을 사용하여 규모에 맞는 수율을 달성함으로써 비용 감소를 이루기 위한 것이고, 후자의 경우는 연구에서 생산 규모로 전환 시 그 과정을 쉽게 하기 위해 필수적인 요소입니다.



그림 1: 일반적인 mRNA 생산 워크플로

IVT 반응의 주요 구성 요소는 DNA template, RNA polymerase 및 기질들로 구성됩니다.

반응 기질로 rNTP(ribonucleoside triphosphates) 또는 필요한 경우 변형된 ribonucleotide(예: N1-methyl-pseudo-UTP)가

사용됩니다. Magnesium salt (예: magnesium chloride) 및 기타 Mg^{2+} 이온을 포함하는 transcription buffer도 필요합니다. 이러한 각 구성 요소는 특정 기능을 수행하며 최적화 할 수 있습니다.

Results

Template의 길이와 반응 조건에 따라 다양한 Buffer를 선택 할 수 있어 우수한 수율을 제공합니다.

개별 Ribonucleotide가 중합됨에 따라 pH는 감소될 수 있으므로, IVT 반응시 지속적으로 pH를 일정하게 유지 하는 것이 필요 합니다.¹⁾ 버퍼 시스템의 선택이 IVT 반응 성능에 미치는 영향을 확인하기 위해 HEPES 및 Tris 버퍼로 실험 해 보았습니다. Tris 및 HEPES 버퍼 모두 template의 크기나 유형에 관계없이 비교적 높은 mRNA 수율을 나타냈습니다.

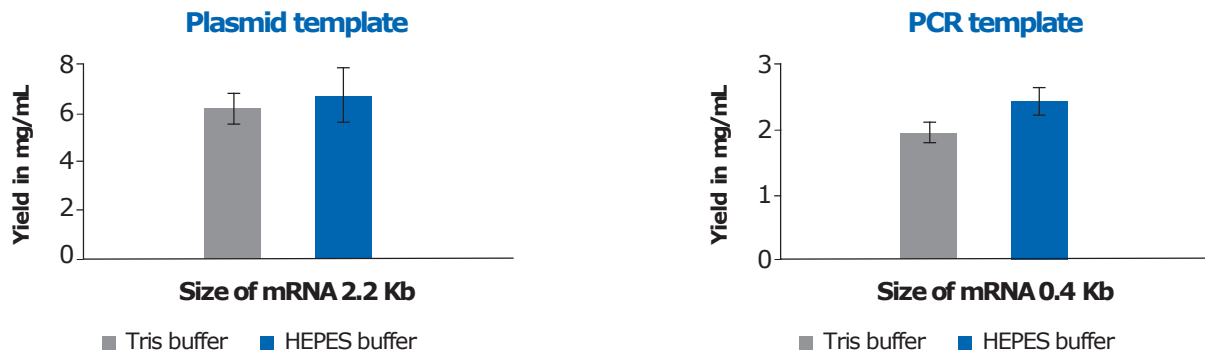


그림 2: HEPES 및 Tris 버퍼 시스템에서의 IVT 반응 확인. mRNA 2.2kB와 0.4kB 사이즈에 대한 template (각각 플라스미드와 PCR DNA template 사용)를 제작하여 mRNA 합성에 사용. 각각 10x buffer master mix가 사용됨 : TIRS (10x Tris: 400 mM Tris-HCl, 20 mM spermidine, 100 mM DTT, pH 7.9), HEPES (10x HEPES: 1 M HEPES-KOH, 20 mM spermidine, 400 mM DTT, pH 7.5)

Mg²⁺ 및 ribonucleotide 농도를 특정 수준으로 증가시키면 반응수율이 향상될 수 있습니다.

Mg²⁺ 이온은 IVT 반응의 효소 촉매 작용에 중요한 요인이므로,^{2), 3)} MgCl₂의 농도는 IVT 반응에서 중요한 요소입니다. 우리는 최상의 반응 수율을 얻을 수 있는 농도를 찾기 위해 다양한 Mg²⁺ 및 ribonucleotide 농도로 테스트 했습니다.

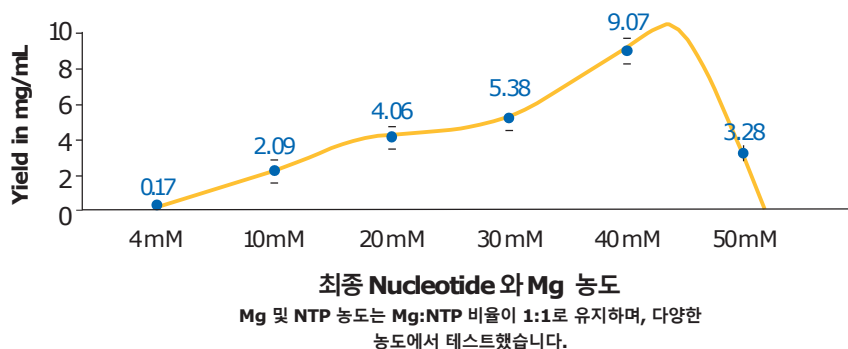


그림 3: IVT 반응의 Mg²⁺와 ribonucleotide 농도의 적정. Mg²⁺ 및 총 rNTP 농도는 실험마다 다르지만 주어진 실험에서 1:1의 일정한 비율로 유지하였음.

Template 농도를 최적화하면 수율과 생산 비용 간의 균형을 맞추는데 도움이 됩니다.

IVT 반응의 전체 수율에 대한 DNA template 농도의 영향을 조사하기 위해 일련의 실험에서 다양한 양의 DNA template을 적정했습니다.

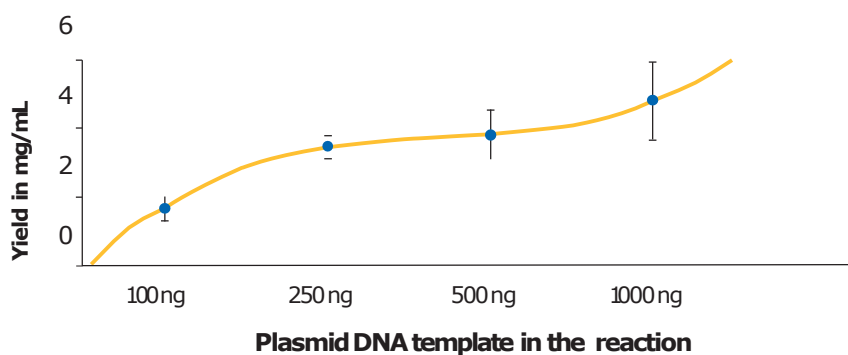


그림 4: IVT 반응 중 template 양의 적정.

1.1 kb 크기 mRNA에 대한 플라스미드 template를 100 ng – 1000 ng 양으로 테스트했습니다.

Pyrophosphatase(PPase)를 첨가하면 전체 mRNA 수율이 향상됩니다

Pyrophosphate는 IVT 반응의 부산물로서 Mg^{2+} 이온의 침전을 유발하므로 반응에 대한 억제제 역할을 합니다.⁴⁾ Pyrophosphatase 효소를 첨가하여 Pyrophosphate를 비활성 단일 orthophosphate 이온으로 가수분해하여 Mg^{2+} 이온과 결합하지 못하게 할 수 있습니다. Pyrophosphatase 유무에 따른 비교 실험은 이 효소의 첨가가 전체 mRNA 수율을 증가시킬수 있음을 보여줍니다.

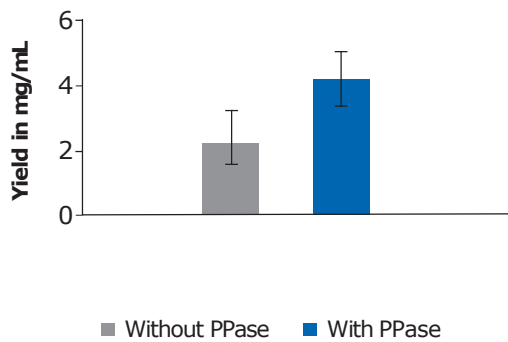


그림 5: Pyrophosphatase가 IVT 반응에 미치는 영향. 총 20μL IVT 반응에 PPase를 첨가하지 않거나, 1μL를 첨가하여 테스트했습니다.

N1-methyl-pseudo-UTP는 T7 RNA polymerase와 효율적으로 작용하며, 일반 ribonucleotide를 사용한 경우와 유사한 수율을 제공합니다

변형된 ribonucleotide의 추가가 IVT 반응의 전체 성능 및 수율에 미치는 영향을 테스트하기 위해 일반 ribonucleotide만 사용한 경우와 모든 UTP를 N1-methyl-pseudo-UTP로 대체한 경우를 비교했습니다. 변형된 ribonucleotide를 사용한 경우, 일반 ribonucleotide를 사용한 실험과 비교하여 수율이 크게 달라지지 않았습니다. 따라서 변형된 ribonucleotide를 IVT 반응에 사용하는 것은 반응 수율에 영향을 주지 않는 것으로 보여집니다.

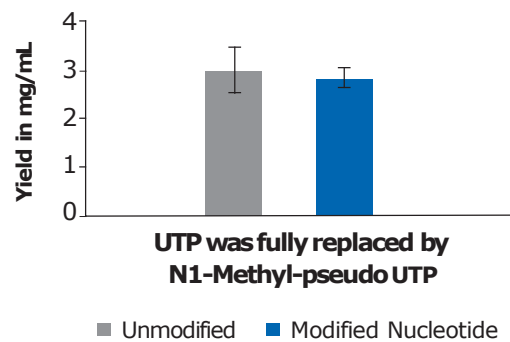


그림 6: 변형된 ribonucleotide를 추가한 IVT 반응. UTP를 N1-methyl-pseudo-UTP로 대체하여 테스트했습니다.

'Fit-for-purpose' mRNA 합성원료 시약

로슈 fit-for-purpose 원료 시약에 대한 품질의 오차 범위는 제품이 최종적으로 사용되는 용도에 맞게 이들이 필요로 하는 민감도를 기반으로 설정하고 관리되어 집니다. 일관된 성능 및 재료의 순도 기준을 충족하는 것 뿐만 아니라, 로슈의 mRNA 합성 시약은 엄격한 조건과 추가적인 정밀 검사를 통해 생산됩니다.

Product	Catalog number	Pack size	GMP Grade	Animal-origin-free ¹ (AOF)	Antibiotic-free	Tested for RNase / DNase activity	Extended impurity testing ⁴
Proteins							
T7 RNA Polymerase, rec., GMP Grade	08 140 669 103	10 ml (ca. 10 mg)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Pyrophosphatase, rec., GMP Grade	08 140 677 103	20 ml (ca. 40 mg)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
RNase Inhibitor, rec., GMP Grade	09 537 643 103 09 537 589 103	100 kU 2 MU	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DNase I, rec., RNase-free	09 483 195 103 03 539 121 103	20 kU 200 kU	Yes	No ²	Yes	Yes	Yes
Proteinase K, rec.	03 654 672 103	850 mL	Yes (except for Hb assay)	No ²	Yes	Yes	Partially
SP6 RNA Polymerase, rec.	09 788 131 101 09 788 131 103	2.5 mL 25 mL	Planned	Yes	Yes	Yes	Yes
Xba I rec.	09 520 848 101 09 520 848 103	5 ml (50 kU) 25 ml (250 kU)	No	Yes	Yes	No	Partially

Product	Catalog number	Pack size	GMP Grade	Animal-origin-free ¹ (AOF)	β-Lactam-antibiotic-free	Tested for RNase / DNase activity	Extended impurity testing ⁴
Ribo-Nucleotides							
ATP	04 980 824 103	100 mL	Yes	No ^{2,3}	Yes	Yes	No
CTP	04 980 875 103	100 mL	Yes	No ^{2,3}	Yes	Yes	No
GTP	04 980 859 103	100 mL	Yes	No ^{2,3}	Yes	Yes	No
UTP	04 979 818 103	100 mL	Yes	No ^{2,3}	Yes	Yes	No
N1-Methyl-Pseudo-UTP, GMP Grade	09 744 878 103 09 744 762 103	100 mL 1.0 mL	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Pseudo-UTP	09 754 334 103 09 538 798 103	100 mL 1.0 mL	No	Yes	Yes	Yes	Yes

Product	Catalog Number	Pack size
Residual kit		
Residual DNA E.coli Kit	7728735001	96 PCR reactions

¹ 보다 자세한 사항은 Certificates of Origin(COO) 참고.

² TSE/BSE certificate 제공 가능.

³ 생산 단계에서 직교 바이러스 제거 단계가 포함 됨 (예. Virus retentive filter) 해당 연구에 대한 추가 정보 제공 가능.

⁴ 내독소, 중금속, 숙주세포 DNA와 단백질 테스트 포함.

주요 내용 요약

우리의 실험결과는 규격화된 KIT를 쉽게 적용하는 것보다 비록 일정 시간이 투자되어야 하더라도 목적에 맞는 원료로 IVT 반응의 최적화를 하는 것은 이점이 있다는 것을 보여 줍니다. 생산에 있어서 현실적인 문제인 비용과 반응 수율간의 균형을 맞출 수 있다는 점은 매우 중요한 장점입니다. Mg^{2+} 이온과 ribonucleotide의 적절한 비율 및 농도와 같이 반응 최적화를 위해 몇 가지 주요 사항들에 대한 결과를 보여주었습니다.

Buffer

버퍼 시스템은 Tris 또는 HEPES 버퍼 조건 모두 사용할 수 있습니다. rNTP 추가되는 과정 중 H^+ 가 방출될 때 IVT 반응의 pH가 감소할 수 있으므로, 사용되는 버퍼는 반응 중 pH 유지를 위한 충분한 이온 강도를 가져야 합니다.¹⁾

Mg^{2+} 와 nucleotide 농도

이 요소는 RNA 수율에 가장 큰 영향을 미칩니다. 효과적인 IVT 반응을 위해서는 최적의 균형을 이룰 수 있는 Mg^{2+} 와 rNTP의 조건이 필요합니다.^{2),3)}

Pyrophosphatase

이 효소는 IVT 반응 중에 생성된 pyrophosphate를 제거합니다. Pyrophosphate는 유리된 Mg^{2+} 이온을 침전시켜 Mg^{2+} 를 감소시키므로 IVT 반응을 저해 할 수 있습니다.⁴⁾

RNase inhibitor, template 그리고 T7 RNA polymerase의 농도

더불어 고려되어야 할 요인들은 RNase inhibitor의 추가와, template 및 T7 RNA polymerase 농도입니다. RNase는 환경 어디에나 존재하며 RNA 생산의 주요 위험 요소입니다. RNase의 활성은 RNase inhibitor를 사용하여 차단할 수 있습니다.⁵⁾ 그 외 T7 RNA polymerase 및 template 농도가 적정해야 하며, mRNA 구조를 고려하여 전반적인 반응 시간도 최적화해야 합니다.

CustomBiotech mRNA 시약은 mRNA 합성에서의 여러 과제를 극복하고 생산 목표 달성을 하기 위해 어떻게 도움이 될까요?

Roche CustomBiotech은 30년 이상 진단 및 바이오 의약품 생산을 위한 효소, 단백질 및 기타 원료를 개발하고 생산하는 150여개의 프로젝트를 완수하며 치료제 생산 기업들의 주요 파트너가 되어 왔습니다.

항상 시장 발전에 발맞춰 왔고, 이제 우리는 차세대 mRNA 치료제 개발을 가능하게 하는 핵심 역량을 제공하고자 합니다. Roche CustomBiotech은 T7 RNA polymerase, ribonucleotide(rNTP), modified rNTP (예: N1-methyl-pseudo-UTP 또는 pseudo-UTP), RNase inhibitor, pyrophosphatase 및 Dnase I과 같은 IVT 반응과 upstream/downstream 제조 공정에 필요한 주요 구성 요소를 공급합니다. 이 모든 제품들은 mRNA 치료제 및 백신 생산에 적합한 품질(fit-for-purpose)로 제공됩니다.

반응 조건

반응 혼합물은 1.1kb mRNA 크기의 선형화된 플라스미드의 500ng DNA template, 1µl T7 RNA polymerase (CustomBiotech Mat #08140669103), 1 µl pyrophosphatase (CustomBiotech Mat #08140677103), 20 U RNase inhibitor (CustomBiotech Mat #09537643103), 2 µl reaction buffer, 그리고 최종 부피가 20 µl가 되도록 RNase-free water로 맞춤. Reaction buffer는 400mM Tris-HCl(pH 8.0), 20mM spermidine, 100mM DTT로 구성된 10X Tris transcription buffer master mix 로 준비. 이들은 37°C에서 1시간 동안 반응 하였으며, 이어서 RNA는 High Pure FFPE RNA Isolation kit (Mat # 06650775001, Roche Molecular Systems; www.lifescience.roche.com)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 proteinase K 분해 및 DNase I 처리를 포함하여 정제하였음. 각 실험은 세 번 반복 수행. RNA는 Agilent® Bioanalyzer를 이용하여 분석하였고, UV/Vis 분광광도계(NanoDrop™)를 사용하여 260nm에서 정량. 실험별 조건은 각 그림 설명에 언급되어 있습니다.

References

- 1) Borkotoky S, Kumar Meena C, Bhalerao GM, Murali A. An in-silico glimpse into the pH dependent structural changes of T7 RNA polymerase: a protein with simplicity. *Sci Rep.* 2017, Jul 24;7(1): 6290. doi: 10.1038/s41598-017-06586-1. PMID: 28740191; PMCID: PMC5524818.
- 2) Kartje ZJ, Janis HI, Mukhopadhyay S, Gagnon KT. Revisiting T7 RNA polymerase transcription in vitro with the Broccoli RNA aptamer as a simplified real-time fluorescent reporter. *J Biol Chem.* 2021 Jan-Jun; 296:100175. doi: 10.1074/jbc.RA120.014553. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33303627; PMCID: PMC7948468.
- 3) Young, J.S., Ramirez, W.F. and Davis, R.H. (1997), Modeling and optimization of a batch process for in vitro RNA production. *Biotechnol. Bioeng.*, 56: 210-220. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10970290\(19971020\)56:2<210::AID-BIT10>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)10970290(19971020)56:2<210::AID-BIT10>3.0.CO;2-K)
- 4) Kern, J.A. and Davis, R.H. (1997), Application of Solution Equilibrium Analysis to in vitro RNA Transcription. *Biotechnol Progress*, 13: 747-756. <https://doi.org/10.1021/bp970094p>.
- 5) Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2005;80:349-74. doi: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1. PMID: 16164979; PMCID: PMC2811166.

Regulatory disclaimer

For further processing only.

custombiotech.roche.com/mrna

한국로슈진단(주)



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