

mRNA

Takara enzyme 노하우의 결정판

최적의 mRNA Synthesis

(*in vitro* transcription, IVT) tools

Emerging trends

mRNA 합성은 최근 획기적인 발전으로 전통적인 연구 도구로서의 역할을 넘어, 새로운 백신과 치료제 등을 개발하는 핵심 기술로 진화하였습니다. 몇 년 전부터 mRNA 합성의 심플함과 다양성은 빠른 mRNA 백신의 개발과 광범위한 사용을 이끌어왔고, 지금은 이를 넘어 암 면역 요법과 개인 맞춤형 의학에 기반이 되고 있습니다. 하지만, RNA를 활용한 접근 방식의 다양한 이점에도 불구하고 RNA 안정성, RNA 순도와 integrity, 생산 확장성 등 풀어야 할 숙제는 여전히 mRNA 응용 분야를 확장하는데 방해가 되고 있습니다.

Takara Bio는 기초 연구 개발부터 본격적인 생산에 이르기까지 mRNA 생산 workflow의 모든 단계를 지원하는 혁신적인 기술, 믿고 사용할 수 있는 품질, 유연한 인프라를 제공합니다.

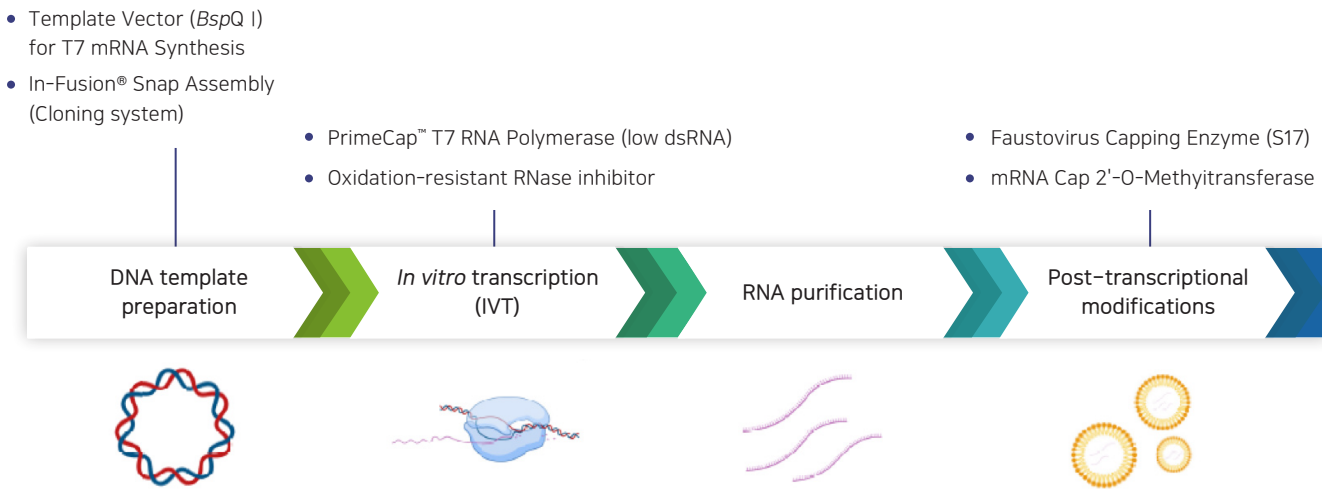
In vitro transcription

RNA는 DNA template을 기반으로 *in vitro* transcription (IVT) 과정을 통해 합성된다. 따라서, 목적에 적합한 template 제작 및 IVT workflow에 사용되는 효소 선택이 매우 중요하다. 예를 들어, 일반적으로 T7 RNA polymerase를 이용한 합성을 하면, 이중 가닥 RNA (dsRNA) 부산물 (byproduct)이 생성되는데, 이는 강력한 면역 반응을 유발할 수 있다고 알려져 있다. 또한, 조각난 RNA나 전사 종료 신호를 지나 합성된 RNA는 생체 내에서 원하지 않는 펩타이드를 생성하여, 실제 target의 효능을 저하시킬 수 있다.

당사는 이를 극복하기 위하여 다양한 응용 분야에 적합한 고수율, 고성능의 *in vitro* transcribed mRNA를 생산하기 위한 효과적인 방법을 제공하고 있다.

최적화된 IVT workflow

Takara에서는 IVT를 위한 DNA template 제작부터 IVT 반응 및 post-transcriptional modification까지 최적화된 total solution을 제공한다.



Step1. DNA template 준비

IVT 반응 시 첫번째로 고려할 사항은 DNA template 설계와 준비다. 이는 전사 효율, mRNA 안정성과 이후 단백질 번역에 중요한 영향을 미치기 때문이다. Takara에서는 가장 효율적인 클로닝 기술인 In-Fusion® 시스템을 바로 적용할 수 있는 선형화된 vector를 제공한다. 이 vector에 원하는 유전자 (Gene of interest, GOI)만 클로닝하면 IVT에 최적화된 DNA template를 간편하게 제작할 수 있다.

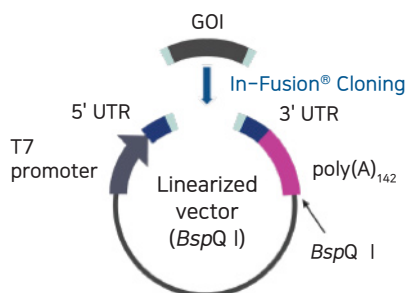


그림 1. Template Vector (*BspQ* I) for T7 mRNA Synthesis. *BspQ* I 인식서열을 포함하고 있어 poly(A) 서열 (142 bp) 바로 뒤를 잘라 선형화하므로, 이후 단백질 번역의 효율을 증가시킬 수 있다 (Code 6146, 6133, 6148에 포함).

mRNA 합성을 위한 template vector (*BspQ* I)는 다음의 요소를 포함하고 있는 선형화된 vector이다. 이 vector를 이용하면, 별도의 A-tail 과정 없이 쉽게 최적의 IVT를 위한 template 제작이 가능하다.

- T7 promoter
- Transcription start 서열 (AGG)
- Untranslated region (UTR)
- In-Fusion® cloning site
- Poly(A) sequence
- 선형화를 위한 *BspQ* I 인식 서열

[주의] GOI를 증폭할 때는 에러를 방지하기 위하여 high fidelity PCR polymerase 사용이 꼭 필요하다. PrimeSTAR® Max DNA polymerase Ver.2 (Code R047A)는 가장 높은 정확도로 GOI를 효율적으로 증폭하는데 이상적이다.

95% 정확도를 가진 고효율 cloning 시스템

In-Fusion® Snap Assembly Master Mix

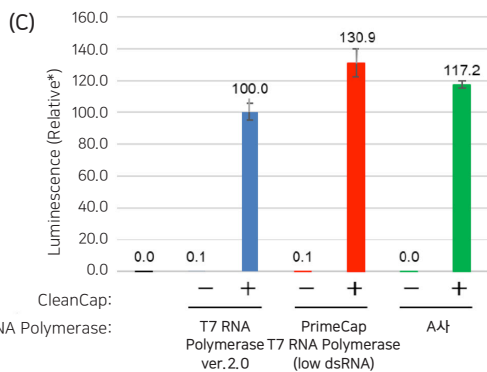
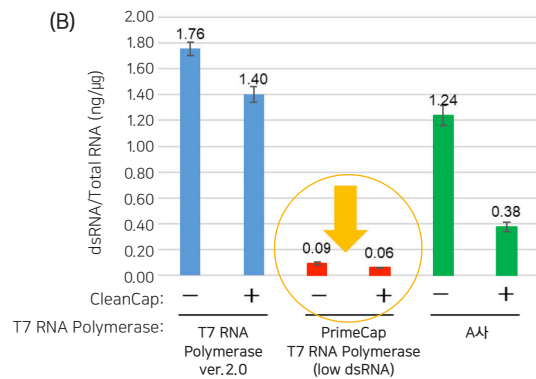
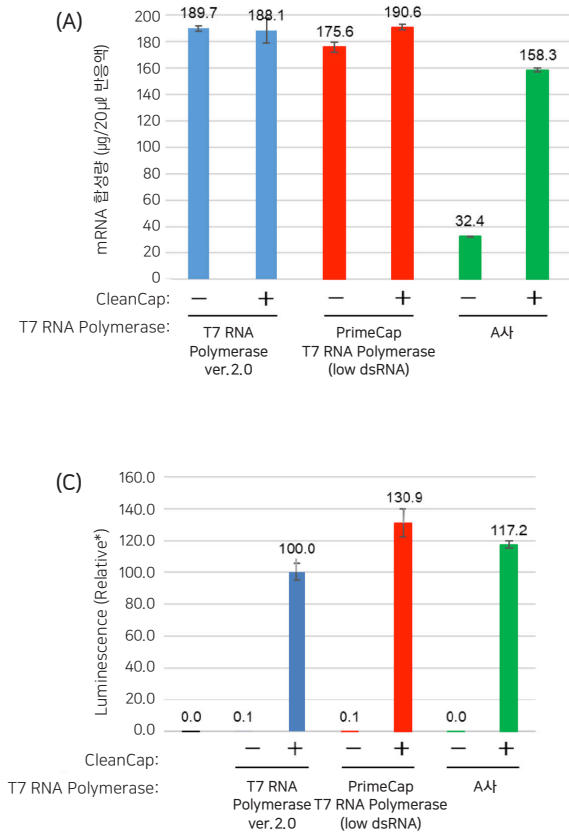
극강의 정확도, high fidelity PCR 효소

PrimeSTAR® Max DNA polymerase Ver.2

Step2. In vitro transcription (IVT) 반응

고성능 T7 RNA polymerase는 mRNA transcript를 효율적이고 정확하게 합성하기 위하여 꼭 필요하며, 전사된 mRNA의 integrity와 기능을 유지하면서 불순물이나 절단 위험을 최소화할 수 있어야 한다. IVT 반응 시 RNA를 기반으로 한 RNA transcription의 부산물로 dsRNA가 생성되어 치료제로서의 적용에서 안전성과 효능을 감소시키는 면역 반응을 유발할 수 있다고 알려져 있다.

PrimeCap™ T7 RNA Polymerase (low dsRNA) (Code 2560A)는 특히 CleanCap® Reagent AG (별도 구매, 그림 2, A)와 같은 cap analog와 함께 사용 시 높은 수율을 유지하면서 dsRNA 생성을 90% 이상 줄이도록 개발되었다.



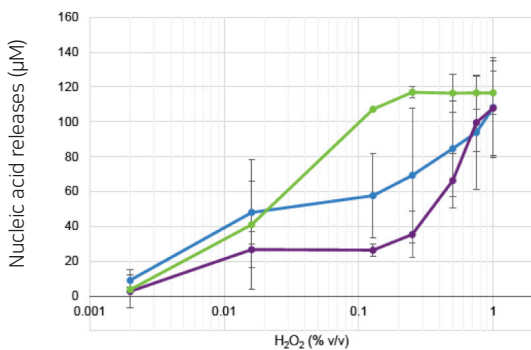
※ T7 RNAP의 CleanCap® analog (+, blue bar)를 100%로 하여 상대값을 그래프로 표기

그림 2. Takara IVTpro™ mRNA Synthesis kit (low dsRNA)(code 6134)^{*1}와 Takara IVTpro™ mRNA Synthesis kit (Code 6144)^{*2}을 이용한 mRNA 합성 수율 및 dsRNA 함량 비교

제품 내 포함되어 있는 Positive Control Template (Fluc)으로 각각의 kit과 타사 제품을 사용하여 CleanCap® analog 유무 조건에서 표준 프로토콜에 따라 IVT 결과를 비교하였다 (그래프에는 각 제품의 기반이 되는 T7 RNA Polymerase로 표기). 그 결과 기존 T7 RNAP를 사용한 제품과 PrimeCap™ T7 RNAP를 기반으로 한 두 제품 모두 mRNA 합성 수율이 높았으며 (A), PrimeCap™ T7 RNAP를 기반으로 한 제품에서 dsRNA의 생성이 기존 제품에 비해 약 95% 억제된 것을 확인할 수 있었다 (B). 또한, mRNA를 세포 내로 도입하여 확인한 단백질 발현 수준 또한 높은 것을 확인하였다 (C).

^{*1} PrimeCap™ T7 RNA Polymerase (low dsRNA)를 기반으로 enzyme 조성을 최적화 (pyrophosphatase, RNase inhibitor 포함)한 kit

^{*2} T7 RNA Polymerase ver.2.0을 기반으로 enzyme 조성을 최적화 (pyrophosphatase, RNase inhibitor 포함)한 kit



● Recombinant RNase Inhibitor ver.2.0 (Code 2315A)
● Recombinant RNase Inhibitor (Code 2313A)
● Recombinant RNase Inhibitor (Company N)

고품질, 고수율 mRNA 합성을 위해서는 RNA polymerase와 함께 pyrophosphatase와 RNase inhibitor와 같은 다른 효소를 추가하는 것이 중요하다.

Pyrophosphatase(inorganic) (Code 2450A)는 IVT 반응에서 생성되는 inorganic pyrophosphate (PPi) 부산물을 분해하여 mRNA 합성을 향상시키는 역할을 하며, 낮은 DTT 농도가 필요한 반응에서도 안정성을 보장하기 위해 필요한 oxidation-resistant Recombinant RNase Inhibitor ver.2.0 (Code 2315A)도 같이 제공하고 있다.

그림 3. 다양한 recombinant RNase inhibitor 간의 산화 저항성 비교
Recombinant RNase Inhibitor ver.2.0 (purple) 사용시 가장 적은 rRNA degradation을 관찰할 수 있었다 (0.1% H₂O₂ 첨가 비교).

Step3 Post-transcriptional modification

IVT 반응 후 mRNA modification (post-transcriptional modification)은 co-transcriptional methods (e.g. cap analog 사용)에 비해 반응의 유연성이 향상되고, 정확한 조절이 가능하여 스케일업 과정을 간소화 시켜, 재현성을 증가시킬 수 있다. 가장 일반적인 post-transcriptional modifications에는 5'capping과 polyadenylation (poly(A) tailing)이 있다.

Capping enzymes

Capping enzyme은 uncapped mRNA의 5' 말단에 95% 이상의 효율로 Cap-0 구조*를 추가한다. 일반적으로 Vaccinia Virus 유래의 Vaccinia Capping Enzyme (VCE) (Code 2460A)과 Faustovirus 유래의 Faustovirus Capping Enzyme (S17) (FCE) (Code 2480A)이 많이 사용된다. 특히, FCE는 다양한 온도에서 capping이 가능하다고 알려져 있어 (그림3), mRNA integrity 보존을 위한 저온 반응은 물론, 까다로운 5'UTR sequence를 수용하기 위한 고온 반응 모두에 적용이 가능하다.

*Capping enzyme 처리시 mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (Code 2470A)를 같이 넣으면, Cap-1 구조를 갖는 Capping이 가능하다

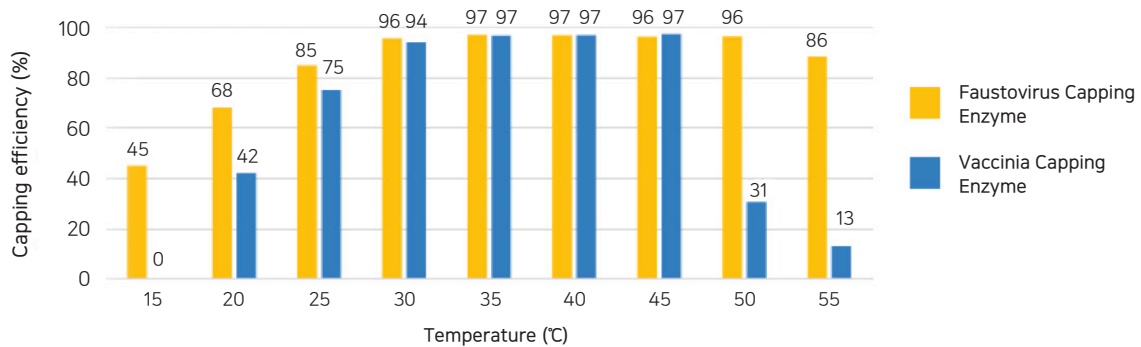


그림 4. Capping enzyme의 효율과 반응 온도의 관계.

Capping 반응은 표시된 온도에서 FCE와 VCE를 이용하여 진행되었으며, capping 효율은 (% Cap-0 RNA) 액체 크로마토그래피-질량 분석법 (LC-MS)으로 측정하였다. 그 결과 FCE가 VCE보다 더 넓은 온도 범위에서 높은 capping 효율을 나타내었다.

[Takara IVT 관련 제품]

용도	Code	제품명	용량	비고
T7 RNA polymerase & 효율 증대 서포트 제품	2560A	PrimeCap™ T7 RNA Polymerase (low dsRNA)	20,000 U	
	2541A	T7 RNA Polymerase ver.2.0	20,000 U	
	2450A	Pyrophosphatase (inorganic)	10 U	
	2315A/B	Recombinant RNase Inhibitor ver.2.0	5,000 U/25,000 U	
효율적인 IVT를 위한 kit	6131	Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (low dsRNA)	1 set	6133 & 6134
	6133	Cloning Kit for mRNA Template (BspQ I)	10 회	
	6146	Template Vector (BspQ I) for T7 mRNA Synthesis	10 µl	
	6134	Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (low dsRNA)	20 회	
	6148	Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (BspQ I)	1 set	6133 & 6144
	6144	Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit	20 회	
	6141	Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System	1 set	6143 & 6144
5' Capping enzyme	6143	Cloning Kit for mRNA Template	10 회	
	2460A/B	Vaccinia Capping Enzyme	500 U/2,000 U	
	2480A/B	Faustovirus Capping Enzyme (S17)	500 U/2,000 U	
GOI (CDS) cloning	2470A/B	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	2,500 U/10,000 U	
	638947 외	In-Fusion® Snap Assembly Master Mix	10 회 외	
	9132	Takara Stable Competent Cells	10 회	
	636763	Stellar™ Competent Cells	10 회	
DNA template 선형화	R047A/B	PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2	100 회/400 회	
	1227A/B	BspQ I	500 U/2,500 U	
	1060A/B	Hind III	10,000 U/50,000 U	
A tailing enzyme	2180A/B	Poly(A) Polymerase	20 U/100 U	
RNA marker	3417A	0.5-10 kb ssRNA Ladder Marker	25 회	
Substrate (NTP)	4041	ATP	25 µmol	
	4042	GTP	25 µmol	
	4043	CTP	25 µmol	
	4044	UTP	25 µmol	