



mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인

(Guideline on the Quality Control of mRNA-based
Gene Therapy Products)

2022. 8.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 세포유전자치료제과

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유: _____)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?		<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서 · 안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞ 지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞ 안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2022 년 8월 26일

담당자
확 인(부서장)

백 정 희
오 일 웅

이 안내서는 mRNA 기반 유전자치료제의 품질관리 사항에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2022년 8월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ '민원인 안내서'란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 식품의약품안전처의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 가이드라인에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료제과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-3539

팩스번호: 043-719-3530

제 · 개정 이력서

mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인

제 · 개정 번호	승인일자	주요 내용
안내서-1217-01	2022.8.26.	「mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인」 제정

목 차

용어설명	6
1. 서론	
1.1. 배경	10
1.2. 목적 및 범위	11
1.3. 일반적 고려사항	11
1.4. 특이적 고려사항	13
2. 품질 평가	
2.1. 일반적 사항	17
2.2. 제조에 관한 사항	18
2.3. 유전자치료제의 구조체 및 조성에 관한 일반 정보 및 설명	23
2.4. 출발물질, 원료물질, 첨가제의 관리	25
2.5. 공정개발 및 공정 중 관리	26
2.6. 제품 특성 분석	27
2.7. 제조의 일관성	29
2.8. 정제 mRNA 원액(원료의약품)의 제조 및 관리	29
2.9. 최종 제형화된 유전자치료제(완제의약품)의 제조 및 관리	33
2.10. 기록	41
2.11. 보관검체	41
참고문헌	42

용어설명

아래에 제시하는 정의는 본 문서에서 사용되는 용어에 적용된다.

- **후보 치료제(candidate products)** : 연구 및 임상 개발 단계에 있으며, 식약처로부터 승인이나 허가를 받지 않은 임상시험용 유전자치료제
- **실험설계(design of experiments)** : 공정에 영향을 미치는 요소와 그 공정 결과 간의 상관 관계를 결정하는 구조화되고 조직화된 접근법. 이 용어는 ICH Q8(R2)에서 언급하고 있다.
- **완제의약품(drug product)** : 최종 제품(final products) 참조
- **원료의약품(drug substance)** : 최종 제형화 이전 정제된 mRNA(일부 품목의 경우, 지질나노입자 혼합물)로서 의약품의 활성 성분. 단일한 균질 생산 배치로 준비하여, 지정된 1가지 이상의 용기에 보관하며, 최종 제형(최종 유전자치료제 또는 완제의약품)의 준비에 사용된다.
- **dsRNA(두 가닥 RNA, double strand RNA)** : 어떤 바이러스는 특정 부위보다는 전장에 걸쳐 완전하게 두 가닥 RNA를 형성한다(예: mRNA의 이차구조). 이 두 가닥 RNA는 세포 내 수용체에 의해 감지되어 선천성 면역반응을 일으킬 수 있다. 제조 방법에 따라 다르겠지만, 어떤 mRNA 기반 유전자치료제에서는 *in vitro* transcription(IVT) 제조공정 중 부산물로서 dsRNA가 생성될 수 있다. 이러한 dsRNA는 제조공정 중 mRNA와 분리하여 제거해야 하는 불순물이며, 최소한 제품 내에서의 양을 확정하고 관리해야 한다. 만일 제조공정 중 dsRNA가 생성되지 않는다면 이러한 공정관리가 필요하지 않다.
- **공정개발용 생산(engineering run(s))** : GMP 생산공정을 확증하거나 증진시키기 위한 공정을 개발하는 데 이용된 생산 단위로 인체에의 사용을 목적으로 하지 않는다.
- **첨가제(excipient)** : 특정한 목적을 위해 제형화에 추가된, 활성 성분 외의 의약품의 구성 요소. 대부분의 첨가제는 비활성 성분으로 간주하는 반면, 일부는 특정 상황에서 알려진 작용이나 효과를 발휘할 수 있다. 첨가제는 의약품의 안전한 사용을 보장하기 위하여 반드시 제품의 라벨 정보 및 첨부문서에 표시해야 한다. 본 문서의 맥락에서는 지질나노입자를 형성하는 지질 등을 의미하며, 지질나노입자 혼합물은 완제의약품(drug product)의 생산에서 중간체로 정의되거나, 일부 품목의 경우 원료의약품으로 정의될 수 있다.
- **최종 원액(final formulated bulk)** : 최종 제품(final products)의 제조공정 중의 중간체로서, 일차 용기에 충전할 농도의 최종 제형화된 균질한 원료의약품이거나 첨가제(excipient)가 포함되어 있다. 다른 방식으로는, 최종 원액을 더 높은 농도로 보관하고

충전 직전에 희석할 수 있다. 본 문서에서는 지질나노입자 및 필요에 따라 다른 첨가제로 제형화한 mRNA를 지칭한다. 만일 다가(multivalent) 혹은 혼합 mRNA 기반 치료제에서처럼 2개 이상의 원료의약품이 혼합될 경우, 이러한 과정은 최종 원액의 준비 과정 중에 이루어질 수도 있다.

- **최종 유전자치료제(final gene therapy products) (또는 완제의약품(drug product))** : 일반적으로 첨가제와 함께 제형화하고 사용을 위해 봉입된 한 개 이상의 원료의약품 (활성 성분)을 함유한 최종 제형(dosage form)(예: 현탁액 또는 동결건조 분말). 본 문서에서는 지질나노입자 및 기타 첨가제 등과 함께 제형화하여 최종 용기에 충전된 mRNA 부유액을 일컫는다. 그 외에도, 최종 용기는 (각 용기가 다회 투여량을 담고 있을 수 있을지라도) 임상 용량에 해당하는 농도로 충전해야 한다. 다른 문서에서는 “최종화된 제품(finished product)”으로도 칭한다.
- **의약품 제조 및 품질관리기준(GMP)** : 제품의 사용 의도에 적합한 품질기준 및 품목허가 요건에 따른 일관적인 제품의 생산 및 관리를 보장하는 시스템
- ***in vitro* transcribed (IVT) mRNA** : DNA-의존적 RNA 중합효소(예: T7, T3 또는 Sp6 파지 RNA 중합효소(phage RNA polymerase)) 및 뉴클레오시드 3인산염(nucleoside triphosphate)을 사용하여 선형 DNA 주형(template)으로부터 mRNA를 *in vitro* 환경에서 생성하는 제조공정
- **지질나노입자(Lipid nanoparticle, LNP)** : mRNA가 세포 밖에서 분해되는 것을 피하고 mRNA의 세포 내 진입 및 세포질(cytosol)로의 방출을 촉진할 목적으로, mRNA의 안정화 및 봉입화를 보장하기 위하여 다양한 구성요소로 이루어진 전달 제형. 지질 성분은 이온화 가능한 및/또는 양이온성의 지질, 도움 지질(예: 인지질 및/또는 콜레스테롤), 폐길화((polyethylene-glycol-ylation(PEGylation))와 같은 변형 지질을 포함한다(다만 여기에 국한되는 것은 아님). LNP 및/또는 지질 성분은 면역반응에 영향을 미칠 수도 있다.
- **품목허가(marketing authorization/approval)** : (유전자치료제를 포함한) 의약품의 시판을 위한 공식 허가. 식약처가 새로운 의약품의 품목허가 신청을 승인하면 이 의약품은 시판할 수 있으며 의사의 처방 및/또는 공중보건 사용을 위해 제공할 수 있게 된다. 품목허가가 되면 새로운 의약품은 허가사항에 따라 제조하고 관리하며 표시·기재하여야 한다.
- **작용기작/작용기전(mode/mechanism of action)** : 유전자치료제가 세포(mode) 또는 분자(mechanism) 수준에서 치료 효능을 나타내는 방식(예: 항암 활성을 갖는 표적 단백질의 발현, 중화항체에 의한 중화작용(neutralization), T-세포에 의한 세포독성(cytotoxicity) 등)
- **변형된 뉴클레오시드(modified nucleoside)** : mRNA 제작 시 일반적인 뉴클레오시드 (이 경우, 우리딘(uridine))를 대체할 수 있는 자연 발생적으로 변형된 뉴클레오시드

(예: 슈도우리딘(pseudouridine))로서 안정성을 증가시킬 수 있다. 다른 변형의 종류로는 메틸화(methylation)가 있다. 뉴클레오시드는 또한 비자연적 변형을 포함하고 있을 수도 있다.

- **mRNA 완전성(mRNA integrity)** : mRNA의 정확한 길이(length), 합성된 mRNA의 5' cap 효율(efficiency), 3' poly(A) 개수 및 mRNA의 염기서열의 정확성을 확인하여야 한다.
- **mRNA(messenger RNA)** : 세포의 세포질에서 단백질로 번역되는 단일 가닥의 RNA 분자. mRNA는 하나 또는 그 이상의 표적 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임(ORF), 주변을 둘러싼 비번역 부위(UTR), 5' cap(또는 대체물) 및 3' poly(A) tail을 포함한다.
- **새로운 첨가제(novel excipient)** : 인체 투여를 위해 허가 또는 승인된 의약품에서 이전에 사용한 적이 없는 첨가제(예: 지질나노입자 등), 또는 인체 투여를 위해 허가나 승인된 제품에서 이전에 사용하였다면, 허가 또는 승인된 투여경로와 동일하게 (그리고/또는 더 높은 농도로 제작하여) 사용하지 않는 첨가제.
- **플랫폼 기술(platform technology)** : 기존과 다른 적용 및 공정, 기술의 개발을 위한 토대로 사용되는 기술들의 모음. mRNA 기반 유전자치료제의 맥락에서, 다양한 질환(개별 각각의 유전자치료제) 또는 혼합 mRNA나, 동일 질환에 대한 mRNA 유전자치료제 개발을 위한 기반으로써 제조사는 한 가지 이상의 플랫폼을 보유하고 있을 수도 있다. (1) 제조 방법을 본질적으로 변경하지 않고(그러나 각 특이적 치료제 후보에 대해 최적화할 수 있음), (2) 기준 및 시험법(확인 시험, 역가 시험, 안정성 시험은 제외)과 허용기준은 변경하지 않았으며, (3) 면역조절 복합체나 요소를 변경하지 않았고, (4) GMP 준수의 변경이 없는 경우, 플랫폼 기술이라는 용어의 사용이 적절한 것으로 간주한다. 새로운 후보 치료제 개발을 위한 플랫폼 기술 사용에 따른 특이사항은 획득한 경험과 지식 및 생성된 자료(제조 및 관리, 안정성, 비임상), 변경되지 않은 방법에 대한 벨리데이션을 모두 더욱 신속한 새로운 후보 치료제의 평가 및 개발을 위한 보조자료로 사용할 수 있다는 것이다. 안전한 시작용량(starting dose) 또는 내약용량(tolerable dose)과 관련하여 플랫폼에서 얻은 임상 및 비임상 자료는 또한 이 플랫폼으로 이미 내약성이 있다고 파악된 용량에서 새로운 후보 치료제의 임상시험을 개시하도록 뒷받침해 줄 수도 있다. mRNA 서열과 더불어, 이 플랫폼 기술에 변경된 측면이 있다면, 초기 플랫폼으로 생성된 자료가 새로운 후보 유전자치료제를 뒷받침할 수 있다고 간주해야 하는 이유에 대해 근거를 제시해야 한다. mRNA 기반 유전자치료제를 위해 사용하는 생산 및 관리 방법은 제조사 간에 아직 표준화되지 않았기 때문에, 다른 제조사에서 생성한 정보가 플랫폼 기술을 뒷받침해주지 못할 것이다. 만일 근거를 제시하고 그 근거가 강력하다면, 이러한 정보는 제품군에 대한 정보와 유사한 것으로 간주할 수 있으며 보조 자료로 평가될 수 있다. 더 나아가, 플랫폼 기술 사용에도 불구하고 현재 표준화가 부족하기 때문에, mRNA 기반 유전자

치료제 규제에 대한 과학적 접근방식의 유연성이 정당화될 수 있다. 늘 그러듯이, 사례별 접근법이 타당하며 식약처와 논의하고 동의를 구해야 한다.

- **sa-mRNA(self-amplifying mRNA)** : 목표로 하는 발현 단백질 외에도, 특정 알파바이러스의 비구조 단백질(nonstructural protein)도 (항원과 동일한 분자에 또는 별도의 분자에) 코딩하는 mRNA 기반 유전자치료제. 이러한 ORF가 세포 내 발현 시 알파바이러스의 복제 기전을 지닌 단백질을 생산하며, 이를 통해 세포는 표적 단백질을 코딩하는 다수의 mRNA 카피를 생산할 수 있게 된다. sa-mRNA의 목적은 생성되는 표적 단백질의 양을 증가시킴으로써 mRNA 기반 유전자치료제의 체내 역가를 높이는 것이다. 이러한 형태의 mRNA 기반 유전자치료제는 이 문서에서 sa-mRNA라는 용어를 사용할 것이다.
- **표적 단백질(target protein)** : mRNA기반 유전자치료제로 투여된 mRNA에서 발현된 단백질 혹은 그 일부.
- **tRNA(transfer RNA)** : 리보솜에 의해 사용되는 RNA 분자이며, mRNA상의 코돈을 단백질로 번역하는 데에 관여하는 어댑터(adaptor)역할을 한다.

mRNA 기반 유전자치료제 품질평가 가이드라인

1. 서론

1.1. 배경

RNA의 번역자극 효과는 1960년대 초부터 알려져 왔으나(1), 단백질 발현 유전자를 일시적으로 도입하기 위한 *in vitro* transcribed(IVT) mRNA의 직접적인 체내 투여 가능성은 “naked” 핵산의 직접 주입 이후인 1990년에 증명되었다(2). 그 후 과학기술의 발전으로 mRNA 안정화 및 RNA 기반 제품의 제조 가능성이 높아져, mRNA 기반 백신 및 유전자치료제의 개발에 상당한 진보가 이루어졌다(3-5).

이에, mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가에 관한 가이드라인의 필요성이 대두되어, (a) mRNA의 본질적인 번역학 및 이화학, 구조적 특성, (b) 안정성과 효율적인 mRNA 전달을 보장하기 위한 지질나노입자와 같은 특별한 제형의 필요성, (c) 새로운 무세포 (cell-free) 효소 공정 등에 대한 고려사항을 다룬 지침을 제공하고자 한다. 생산에 사용되는 방법에 대한 상세한 정보가 알려지지 않았고, 안전하고 효과적인 mRNA 기반 유전자치료제를 위한 관리가 표준화되지 않았으며, 특정 세부 사항은 특허정보로 남아 공개되지 않았으므로 현시점에서는 구체적인 국제적 가이드라인이나 권고사항의 수립이 가능하지 않다. 따라서 현재 규제적인 유연성이 필요하며, mRNA 기반 유전자치료제의 품질, 안전성, 유효성에 영향을 줄 수 있는 중요한 변경은 물론, 세부적 생산 및 관리 절차는 사례별로 식약처와 논의하고 승인을 받아야 한다. 그럼에도 본 문서에서 기술하는 핵심 원칙은 일반적으로 mRNA 기반 유전자치료제에 적용 가능하며 더 많은 세부 정보의 사용이 가능해질 때까지 지침을 제공하고자 한다.

어떠한 제조사의 mRNA 기반 치료제이든 결과적으로 새로운 제품의 제조나 관리를 반드시 변경해야 할 필요 없이(확인 및 역가에 대한 특이적 시험, 안정성은 제외) 번역되는 영역을 쉽게 변경할 수 있는 플랫폼 기술로써 여겨질 수 있다. 그러나 이러한 결정은 최종 유전자치료제의 결과적인 특성에 따라 달라질 것이다. 최종 치료제의 유의한 변경으로 인해 세포의 상호반응 뿐 아니라 주요 품질 특성(Critical Quality Attributes, CQAs)이 변경된다면 이 제품의 제조공정 및 관리, 시험에 대한 추가적인 고려가 필요할 것이다.

1.2. 목적 및 범위

본 문서는 인체 투여를 위한 mRNA 기반 유전자치료제의 제조 및 품질관리의 핵심적인 측면과 그와 관련된 정보와 규제 고려사항을 포함한다.

mRNA 기반 유전자치료제는 새로운 형태의 유전자치료제이며 다른 종류의 유전자치료제들(심지어 플라스미드 DNA 기반 치료제와 같은 다른 형태의 핵산 치료제)과도 다르기 때문에 유용하다고 판단되는 경우 mRNA 기반 유전자치료제 특이적인 주제에 대하여 본 문서에서는 간략한 개론을 제공하고 있다. mRNA 기반 유전자치료제와 제조공정의 신규성으로 인하여 제조사가 이러한 종류의 제품을 개발하고 심사자들이 이러한 제품을 평가할 때 모든 관련된 측면들을 고려할 수 있도록 포괄적인 접근법을 채택하였다.

본 문서는 치료목적의 표적 단백질(단클론항체 포함)을 코딩하는 서열을 체내로 전달하기 위해 지질나노입자로 봉입된 mRNA 및 sa-mRNA를 설명하고 있다. 지질나노입자 외에 다른 제형도 개발 중이며 본 문서의 일부는 이러한 제품에도 적용할 수 있다. 복제 인자로 구성된 벡터 및/또는 바이러스 벡터 즉, 바이러스 단백질로 봉입되었거나 플라스미드 DNA로 코딩된 RNA replicon은 본 문서의 범위에 속하지 않는다.

다가(multivalent) mRNA 기반 유전자치료제를 개발하거나 특정 질환에 대한 기존 유전자치료제의 단백질 코딩 서열을 변경해야 할 수 있으므로, 본 문서에서는 필요할 경우 특정 고려사항을 제공하고 있다.

본 문서는 현재까지의 지식에 근거하여 작성하였다. 유전자치료제 제조 기술 및 임상 시험 설계 분야 모두 빠르게 변화하고 있는 점을 고려할 때, 본 문서는 현재까지의 이용가능한 식약처의 질환 특이적 가이드라인 및 권고사항을 포함하여 관련된 최근 가이드라인과 연계하여 참고해야 한다.

1.3. 일반적 고려사항

기존의 유전자치료제와 마찬가지로 표적 단백질 발현 구조체와 치료하고자 하는 질환 및 표적 인구를 포함하여, mRNA의 계획한 임상적 사용에 관해 심사자들에게 익숙한 기존의 승인된 유전자치료제 유형과 비교하여 기술해야 한다. mRNA 후보 유전자치료제의 새로운 구조 및 제조를 감안할 때, 품질 및 안전성, 유효성에 대한 mRNA 기반 유전자치료제 평가 시에는 다음과 같은 사항들을 고려해야 한다.

- 특히, 특정 mRNA 기술의 사용에 따른 연관성 있는 생물학적 특성을 설명해야 한다.

예를 들면, 유전자치료제 설계의 근거에 대한 타당성을 제시하기 위하여 특정 효능 효과와 관련있는 작용기전에 대해 알려졌거나 사용 가능한 모든 정보를 기술해야 한다. 또한 해당 mRNA의 표적 단백질-특이적 반응뿐 아니라 선천성 면역반응 유발 능력과 반감기(half-life) 등 생체 내(*in vivo*) 안정성이 포함된다.

- 표적 단백질이나 그 일부 그리고 코딩된 모든 단백질(예; 사이토카인 등)의 선택 및 제안한 작용기전(제안한 방어기제)에 이들이 기여하는 바에 대하여 근거를 명확하게 기술해야 한다. 마찬가지로, 표적 단백질이 특정한 구조(conformation)로 접히도록 하는 데 사용되는 코딩 서열과 같이, 표적 단백질에 추가된 코딩 서열이나 예상치 않은 ORF(Open Reading Frame)를 포함한 표적 단백질의 변경을 선택한 근거를 제시해야 한다. 모든 ORF를 확인해주는 주석을 단 전체 서열, 그리고 모든 기타 서열 요소를 (그 사용에 대한 근거와 함께) 제공해야 한다. poly(A) tail과 같이 특정 혹은 특이적으로 설계된 비코딩 서열 및 선택한 5' cap 구조 혹은 그 대체재와 같은 구조적 요소의 사용에 대한 근거를 제시해야 한다. sa-mRNA의 경우에는 전달 후 인체 세포 내에서 mRNA의 증폭이 가능하도록 하는 유전자치료제 구조체 안에 코딩된 바이러스 복제효소 유전자(viral replicase gene)에 대해 상세히 기술해야 한다. 특정 비코딩 및 구조적 요소들과 이들이 전반적인 작용기전에 기여하는 바에 대한 설명과 함께, mRNA에 코딩된 각 유전자 서열에 대해 예상하는 기능과 목적을 제시해야 한다.
- 최종 유전자치료제 제품 및 모든 첨가제(지질나노입자의 생성에 사용한 모든 구성 성분을 포함)의 제형화에 대해 기술해야 한다. 제안한 최종 유전자치료제 제품의 조성 및 첨가제 포함에 대하여 적절한 근거를 제시해야 한다. 중간체와 최종 제품의 주요 품질 특성 및 공정 중 관리, 멸균 절차에 대한 정보를 포함하여 지질나노입자 및 최종 유전자치료제 제품(완제의약품)의 생산 방법에 대한 정보 또한 제공해야 한다.
- 각 새로운 첨가제의 경우(정의에 대해서는 용어 참조), 이러한 첨가제 포함의 근거에 대한 상세한 자료, 생산 방법(출발물질, 중간체, 원료에 대한 세부 사항 및 관리를 포함), 안전성에 관한 비임상 및/또는 임상 연구에서 얻은 자료(그리고 식약처의 요구가 있다면 안전성 약리시험 자료)를 제공해야 한다.
- 회석에 필요한 회석제뿐 아니라 투여량, 투여경로, 새로운 투여기기에 대한 설명 및 근거를 제공해야 한다. 필요하다면 관련된 적합성(compatibility) 연구를 수행해야 한다.
- 어떤 제조사의 mRNA 기반 유전자치료제 제품은 표적 단백질의 서열만을 변경한 경우는 플랫폼 기술로 간주될 수 있으나 각 유전자치료제의 관리 및 비임상시험, 임상 개발은 개별적으로 고려해야 하며, 이 후보 유전자치료제의 독특한 특성을 감안해야 한다. 해당 후보 유전자치료제의 효율적인 개발을 위해 식약처와의 조기 상담이 필요할 수 있다.

1.4. 특이적 고려사항

현재 임상 개발에서 mRNA 기반 유전자치료제는 생물학적 방식의 세포 배양보다는 효소를 기반으로 생산되므로 개발자나 심사자에게 익숙한 대부분의 다른 생물약품의 생산과는 다르다(1, 3). 제조는 (플라스미드 DNA 기반 치료제와 같은 생물약품을 생산하는 방식과 유사함) 박테리아에서 생산된 선형화된 DNA 플라스미드로 시작하거나, 또는 중합효소 연쇄반응(PCR) 혹은 다른 새로운 합성방식의 효소학적으로 생산된 선형 DNA 분자로 시작하게 된다. mRNA의 제조를 플라스미드 DNA로부터 형성된 선형 분자에서 또는 다른 방식으로 이미 생성된 선형 DNA 서열에서 시작하는가와는 관계 없이, mRNA는 선형 DNA 주형(template)을 mRNA 분자로 전사하는 DNA-의존성 RNA 중합효소(DNA-dependent RNA polymerase)를 사용하여 시험관내 전사(*in vitro* transcription)로 생산한다. 일반적으로 mRNA 서열은 코딩 영역, mRNA 전사를 조절하는 5' 및 3' 비번역영역(UTR), 5' cap 및 3' poly(A) tail과 같은 세포 mRNA의 일반적인 요소로 구성되어 있다.

제조에 사용되는 뉴클레오티드에는 자연 발생적인 뉴클레오시드 또는 변형되었거나 합성된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다(3). 자연 발생적 뉴클레오시드에 대한 변경의 예시로는 우리딘(uridine)을 대체하는 슈도우리딘(pseudouridine) 또는 N1-메틸슈도우리딘(N1-methylpseudouridine), 5-메톡시우리딘(5-methoxyuridine)의 사용이 포함된다(3, 4, 6). 또한(코딩된 아미노산의 변경 없이) 코돈 사용의 변경이나 최적화는 안정성에 영향을 주고 인체 내의 mRNA 번역을 향상시킬 수 있다(예: 인체 세포에서 더 빈번하게 발견되는 운반 RNA(tRNA)에 의한 번역 목적). 그렇지 않으면, 단백질의 번역 속도를 낮추고 그 결과 원하는 단백질 접힘(protein folding)이 가능해지도록, 빈도가 더 낮은 tRNA를 위하여 코돈을 선택할 수 있다. mRNA에 대한 일부 변경은 mRNA의 안정성 등을 높이기 위해 설계할 수 있다(4). 표적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 개시 및 종결코돈을 포함하고, 3'과 5' 비번역 부위(UTR)로 둘러싸여 있으며, 일반적으로 5' cap 및 3' poly(A) tail이 있어야 한다(4). 효소 처리를 통해, 또는 적절한 캡 유사체(appropriate cap analogue)를 사용하여 *in vitro* transcription(IVT) 중에 mRNA에 5' cap을 추가할 수 있다(3). 마찬가지로, 3' poly(A) tail을 DNA 주형에 코딩하거나 IVT 이후 효소를 사용하여 추가할 수 있다. 이러한 설계상의 특징은 mRNA 원료약품 및/또는 최종 완제의약품의 주요 품질 특성, 제조 방법 및 관리 항목에 영향을 줄 수 있다.

제품에서 RNA가 취하는 구조는 mRNA 기반 유전자치료제의 안전성 및 유효성에 대한 고려사항과 연관이 있다. 일반적으로 이중 나선 형태인 DNA와는 달리, 대부분의 RNA는 단일 가닥이므로 그 서열에 따라 다양한 단일 가닥의 고리(loop)를 사이에 두고 짧은 두 가닥의 분절로 구성된 복잡한 구조를 형성할 수 있다. 이러한 이중 가닥인 RNA(dsRNA) 구조는 일부 RNA 바이러스의 유전체가 취하는 형태이므로 세포가 바이

러스 감염에 대한 선천적 반응으로써 면역 반응원성(immune reactivity)을 촉발하도록 유도할 수 있다. 그러나 내인성 세포 RNA는 부분적으로 두 가닥인 분절에도 불구하고 이런 효과를 유발하지 않는다. 이 점을 고려하여, mRNA 후보 유전자치료제의 체내 효과 특성을 분석하고, 유전자치료제 설계 및 비임상 연구와 임상 시험을 계획해야 한다.

일반적으로 RNA와 mRNA 들은 뉴클레아제에 의해 분해될 수 있으므로, 가장 발전된 형태의 mRNA 기반 후보 유전자치료제들은 지질나노입자로 제형화하여 안정성을 높여 체내에 전달한다(7~11). 지질나노입자는 조성 및 채택한 지질의 종류, 사용한 제조 공정에 따라서 여러 종류가 있다(12). 일부는 아직 mRNA의 전달을 위해 사용하지 않았을 수 있다(13~16). 폴리머 및 폴리펩타이드를 사용하는 다른 안정화 및 전달 시스템, 그리고 다른 지질-기반 시스템, 또는 폴리머와 지질-기반 시스템들의 결합 역시 향후에는 mRNA 전달을 위해 개발될 수 있다. 이러한 약물 전달 시스템 또한 필요시 맞춤형 세포성 반응을 위해 표면 변형이 가능할 수 있다.

지질나노입자 혼합물은 완제의약품(drug product)의 생산에서 중간체로 정의되나, 일부 품목의 경우 원료의약품으로 정의될 수 있다. 지질나노입자를 형성하는 지질은 최종 유전자치료제나 완제의약품의 첨가제이다. 서로 다른 지질을 기반으로 하는 지질 나노입자 제조는 완제의약품 제조공정의 일부이다. 일부 지질나노입자는 그 조성에 따라서 생체 내에서 면역반응을 조절하는 효과를 부가적으로 나타낼 수 있다(15~18). 이와 유사하게, 앞서 논한 바와 같이 RNA 자체가 치료 작용을 할 수 있다. 따라서, 두 가지 구성 요소(mRNA 및 지질나노입자에서 지질)는 모두 유전자치료제의 작용 기전에 기여할 수 있으며, 이에 따른 영향을 주요 품질 특성과 비임상 및 임상 평가에서 고려해야 한다.

일부 후보 유전자치료제는 서로 다른 표적 단백질을 코딩하는 다양한 mRNA를 함유하고 있을 수 있다. 그 예시로는 동일한 질병과 관련된 단백질에서 추출한 다수의 폴리펩타이드, 또는 치료 효과를 기대하는 여러 단백질을 암호화하는 mRNA이다.

다른 혼합 유전자치료제나 다가 유전자치료제와 마찬가지로, 각각의 mRNA는 최종 완제의약품에서 혼합되는 각각의 원료의약품으로 간주할 것이다. 다른 혼합 유전자 치료제나 다가 유전자치료제처럼 각 표적 단백질에 대한 mRNA의 양, 그리고 각각의 발현 효율 및 결과적인 효력 반응은, 모든 표적 단백질의 발현과 효력 반응에 대한 간섭을 방지하고 전체 유전자치료제의 효능을 보장하기 위해, 내제 mRNA(endogenous mRNA)를 포함한 나머지 다른 mRNA들에 대하여 반드시 대조해 보아야 한다. 추가로 최대 내약(maximally tolerable) mRNA(및 지질나노입자) 총량을 초과함 없이, 각 코딩된 표적 단백질에 대한 적절한 용량의 달성을 고려해야 한다. 만일 다가 유전자 치료제 혹은 혼합 유전자치료제가 플랫폼 기술에 기반한다면 주어진 집단에서의 최대 내약용량은 그 플랫폼에 기반한 이전의 유전자치료제 혹은 후보 유전자치료제의

자료를 참고할 수 있다. 완제의약품의 적절한 품질관리를 보장하고, 최종 유전자치료제 내의 각 mRNA 성분(각 원료의약품)의 관리를 위해 사용한 분석법의 적합성 확인을 위해, 다가 유전자치료제의 제조, 관리 및 안전성 역시 추가적인 고려가 필요하다.

mRNA와 지질나노입자 사이의 상호작용은 지질나노입자의 지질 조성뿐 아니라 mRNA의 길이 및 이차구조에 따라 달라질 수 있다. 그러므로, 다른 mRNA를 사용하는 경우, 지질나노입자의 크기 및 형태학적 특성, 표면 특성, 그리고 mRNA 봉입효율(또는 흡착률)이 변경될 수도 있다. 따라서 최종 유전자치료제의 바람직한 특성에 대한 이해를 위해 mRNA와 지질나노입자 두 가지 모두의 주요 품질 특성 및 이화학적 성질에 대한 고려가 필요하다.

일부 후보 제품은 mRNA의 자가 증폭(self-amplifying)(소위 self-amplifying mRNA 또는 sa-mRNA)을 허용하는 데 필요한 구성성분을 포함하고 있다(7, 19). 이러한 제품은, 표적 단백질 외에도, 동일한 또는 다른 mRNA 분자 중 한 곳에 (현재까지는 알파바이러스(alphavirus) 유래) 복제효소 단백질(replicase protein)을 위한 유전자 서열을 지니고 있다. 그 결과, 표적 단백질을 코딩하는 mRNA의 체내 복제가 가능해져 상대적으로 높은 수준의 표적 단백질 발현이 가능한 장점이 있다. 반면, sa-mRNA는 바이러스 유래 복제효소 유전자를 포함하므로 바이러스 유전물질 또는 복제효소 등에 의해 체내 면역반응이 유발될 수 있다. 따라서 이에 대한 안전성을 평가하고 필요에 따라 품질관리를 고려하여야 한다. 표적 단백질 유전자를 복제효소 유전자 염기서열과 동일한 분자에 암호화하느냐 별도의 분자에 암호화하느냐의 설계에 따라 유전자치료제의 안전성과 유효성에 영향이 있을 수 있다. 예를 들면 지질나노입자의 입자크기 및 형태학적 특성은 봉입된 mRNA의 크기에 따라 달라질 수 있다. 덧붙여, 유전자치료제 설계 및 평가에 있어서 고려될 수 있는 dsRNA의 양, mRNA 반감기 등뿐만 아니라 발현 효율 정도의 차이로 인해 안전성 프로파일에 차이를 가져올 수도 있으므로, 동일한 수준의 유효성 달성을 위해 필요한 mRNA의 총량은 위의 두 가지 설계 사이에 달라질 수 있다.

바이러스 구조 단백질로 봉입된 viral replicon과는 대조적으로, sa-mRNA는 지질나노입자 또는 다른 전달 시스템으로 전달된다. 다시 말해, virus replicon은 바이러스 수용체를 통해 세포에 진입하는 반면, sa-mRNA의 세포 진입은 지질나노입자와 같은 제형에 의존한다(7). 표적 단백질이 별도의 mRNA 분자, 또는 복제효소 유전자 서열과 동일한 분자에 코딩되어 있다면, sa-mRNA의 설계로 인해 유전자치료제 안전성 및 유효성에 영향이 있을 수 있다. 세포와 viral replicon에 감염되는 세포는 다를 것이다(7). 또한 RNA 기반 제품은 바이러스 기반 유전자치료제로 사용되는 바이러스의 구조 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고 있지 않기 때문에, 바이러스 벡터 유전자치료제와는 다르다. 따라서, 다양한 유사 제품이 개발 중이며, 이들 사이의 차이점은 대체로 생물학적 특성이나 설계에 따라 결정된다. 다른 유사한 기술로는 개발 중인 원형 RNA 제품, cap 대신 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 사용하는 mRNA, 그리고 폴리머와

폴리펩티드 시스템(또는 폴리머와 지질-기반 시스템의 결합)을 사용한 다른 약물 전달 시스템으로 봉입된 RNA가 포함된다.

현재의 mRNA 기반 유전자치료제는 발현을 위해 근육 혹은 면역세포로 흡수되는 것으로 개발되고 있다는 점을 유의해야 한다. 그러나 mRNA 기반 유전자치료제의 설계는 오로지 이러한 세포들만을 표적으로 삼도록 제한한 것은 아니다. 앞으로의 전달 시스템은 mRNA가 특정 세포나 조직을 겨냥할 수 있도록 설계할 것으로 예상된다(예: 리간드/모티프(ligand/motif)를 지질나노입자 표면에 부착할 수도 있는 표면을 변경한 (surface-modified) 지질나노입자를 사용). 또 다른 효능·효과를 불러오는 이화학적 특성에 대한 변경은 mRNA 또는 sa-mRNA 기반 유전자치료제의 안전성이나 유효성에 추가적인 영향을 줄 수 있다.

2. 품질 평가

2.1. 일반적 사항

모든 mRNA 기반 유전자치료제는 첨단바이오의약품으로 규제하며, 첨단바이오의약품을 포함한 다른 생물학적약품과 마찬가지로 출발물질 및 원료물질, 첨가제 그리고 제조공정에 대한 적절한 관리는 최종 제품에 대한 관리만큼이나 중요하다. 따라서 규제 고려사항은 원료의약품과 최종 유전자치료제 자체에 대한 포괄적인 특성분석 및 출하 시험뿐 아니라 유전자치료제의 관리 전략 및 제조공정에 주안점을 두고 있다.

제조 개시부터 종료까지 각 로트에 대해 품질 모니터링이 가능하도록, (가능한 경우, 주요 및 그 외 품질 특성을 측정하는 공정 중 시험 포함) 다수의 공정 중 모니터링 및/또는 관리 항목을 허용 가능한 기준이 설정된 위해 기반 접근법으로 수립해야 한다. 출하 규격 및 특성 분석 방법은 임상시험 승인이나 품목허가를 위하여 식약처의 승인이 필요하다. 품목허가를 위한 원료의약품 및 완제의약품의 출하 규격은 임상시험에서 사용한 로트에 대해 획득한 결과뿐 아니라 상업적 생산을 위해 확정된 제조공정으로 제조한 제품에 대한 시험을 기반으로 설정해야 한다. 이러한 규격 및 특성분석 방법에서는 안전하고 효과적인 유전자치료제를 제공하는 데 필요한 일관된 품질을 보장할 수 있는 주요 파라미터를 다루어야 한다. 여기에는 함량, 확인, 순도, mRNA 완전성, 역가, 기타 품질 및 안전성 파라미터, 안정성을 평가하는 방법이 포함될 것이다.

임상시험에서 사용할 mRNA 기반 유전자치료제 역시 임상 개발 단계에 적합한 GMP 조건하에서 준비해야 한다. 즉, 제조 및 관리 절차가 개발 중이며 아직 밸리데이션 되지 않았을 수 있는 초기 개발 단계에서는 완전한 GMP 준수가 가능하지 않을 수 있다. 유익성/위해성 평가를 토대로, 일부 GMP 준수에 미치지 못한 원료물질의 사용을 고려할 수 있다. 생산 및 관리에 사용한 모든 시약의 품질 및 정확한 확인(identity)을 확보하는 데에 적절한 주의를 기울여야 한다. 인간을 포함한 동물 유래 성분의 기원/유래 물질을 사용하는 경우에는 특별한 주의가 필요하다. 잠재적인 외래성 인자의 부정이나 관리 역시 적절한 증거 및 위해 평가로 뒷받침하며 관심을 기울여야 한다. 엔도톡신 및 안정성, 무균에 대한 시험과 같이 첨단바이오의약품의 품질관리를 위한 일반 요건 중 많은 부분이 mRNA 기반 치료제에도 적용할 수 있다. 임상시험에서 수용 가능한 성능을 증명한 로트에 대한 시험 결과를 기반으로 품목허가시 적용할 시험항목별 규격을 설정해야 한다. 원료물질 및 첨가제에 대한 관리와 제조 중간체에 대한 공정 중 관리를 포함하여 지질나노입자로 제형화한 mRNA 또는 sa-mRNA에 특이적인 추가 관리 사항에 대해 기술해야 한다.

규제당국이 요구하는 세부사항의 수준은 제품 개발이 진전됨에 따라 증가하며, 임상

개발의 시작 단계에서 임상시험 신청서에 수록한 정보는 완제의약품 및 제조공정에서 유래하는 위해 평가가 가능하도록 적합해야 한다. 예를 들면, 공정 중 사용한 모든 물질에 대한 동정(identification) 및 규격, 인간을 포함한 동물 유래의 물질에서 유래하는 위해성의 평가, 제조시설의 인증 또는 단계에 적합한 GMP 준수, 공정 및 시험에 대한 간략한 설명, 제안한 임상시험에 사용할 유전자치료제 로트(가능하다면 임상시험 시 투여를 위한 위약 혹은 다른 대조약)의 시험 결과, 예비 안정성 시험 결과가 포함될 것이다. 모든 유전자치료제와 마찬가지로, 핵심 임상시험의 경우, mRNA 기반 유전자치료제의 품질(제조 및 관리)에 관해 제공하는 세부 정보가 상당히 확보될 것으로 기대한다.

모든 mRNA 기반 유전자치료제를 플랫폼 기술을 기반으로 제작한다고 볼 수는 없으나, (각 후보 유전자치료제에 대해 최적화된) 제조공정이나 시험(확인시험 혹은 역가시험, 안정성은 제외), 규격이 본질적으로 변경되지 않는다면, 이전의 mRNA 후보 유전자치료제나 허가된 유전자치료제로 획득한 자료로써 뒷받침할 수도 있다. 이는 서열만 변경되었으나(이 변경이 새로운 mRNA 결과물의 크기나 이차구조를 변경할 수 있음) 지질나노입자와의 상호작용은 변경하지 않는 경우에 해당된다. 보조자료에는 제조공정, 시험, 규격, 비임상 및 임상 안전성에 대하여 획득한 자료가 포함될 수도 있다. 임상 로트 제조 중 제품 조성(product composition)에 대한 변경(예: mRNA 서열 변경 또는 결합가(valency) 증가, 첨가제 변경, 보존제 추가) 또는 제조 변경(예: 공정이나 제조소, 제조 규모의 변경)에 대하여 적절히 서술해야 한다. 최종 제품 조성이 어떻게 변경되었는가에 따라(예: 새로운 첨가제 추가), 새로운 비임상 연구가 필요할 수도 있다. 제조 공정 변경(예: 생산 규모 증가 또는 정제 공정 변경)의 경우, 변경을 적용한 원료의약품 및 완제의약품을 이전 공정을 사용해 생산한 결과물과 비교동등성(comparability) 평가를 해야 한다. 이러한 비교동등성 연구에는 동물모델에서 도출한 효력 자료 및 이화학적 분석 결과, 공정 및 제품 관련 불순물 시험, 안정성 자료가 포함될 수도 있다. 이와 관련하여는 ‘생물의약품의 제조방법 변경에 따른 비교동등성 평가 가이드라인(식약처, 2019)’을 참고해야 한다. 허가 후 제품에 실시한 변경은 동 가이드라인에서 열거한 요건을 따라야 한다.

유전자치료제에 활성 원료의약품으로 사용된 정의된 재조합 핵산은, 그 유래가 생물학적이든 또는 합성된 것이든, 요청 시에는 국제일반명(INN, International Nonproprietary Name for Pharmaceutical Substances)을 부여받을 수도 있다(20, 21).

2.2. 제조에 관한 사항

mRNA 기반 제품은 새로운 첨단바이오횰약품 제품군을 대표하며 전통적인 첨단바이오횰약품과 다르게 제조한다. 대부분의 생물의약품은 세포-기반(또는 유기체-기반)

시스템으로 증식 또는 생산하는 반면 mRNA 구성성분은 *in vitro* transcription(IVT)를 통해 효소 공정으로 제조한다. 생산공정에서는 재조합 효소 및 뉴클레오시드 3인산염으로 DNA-의존성 RNA 전사를 이끌기 위하여 선형 DNA를 주형으로 사용하게 된다. ORF 뿐 아니라 UTR의 구조와 서열, 그리고 cap과 poly(A) tail의 길이를 선택한 근거를 제시해야 한다.

일반적으로, mRNA가 전사되면, mRNA를 정제하기 전에 디옥시리보핵산 가수분해효소(DNase)를 사용하여 주형 DNA를 제거한다. IVT 공정 중 cap과 poly(A) tail 요소를 추가하지 않거나, 또는 더 긴 poly(A) tail이 필요하다면, 이들을 합성 이후 그러나 정제 이전에 효소 반응을 통해 추가할 수 있다(6, 22, 23). DNA 주형 제거 외에도, 부착되지 않은 cap, mRNA합성에 사용되지 않고 남은 잔여 뉴클레오티드 및 생산에 사용한 효소(예: RNA 중합효소), 그리고 모든 공정-관련 및 제품-관련 불순물(예: dsRNA 및 크기가 부정확한 mRNA 분자)도 가능한 범위까지 제거해야 한다. 만약 DNA 주형 수준에서 전사되지 않는 경우에는 DNA 중합효소 및 제한효소와 같이 DNA 주형의 생성에 관여할 수 있는 효소도 주의 깊게 제거해야 한다. 정제 방법과 그 목적에 관해 설명하고 근거를 제시해야 한다. 불순물 감소 단계로서 단백질 효소를 이용한 단백질 분해와 같은 정제 공정은 밸리데이션을 통해 증명해야 한다('2.5. 공정개발 및 공정 중 관리' 참고).

대부분은, 비록 mRNA가 실제 표적 단백질이 아니며, 그보다는 표적 단백질을 코딩하는 전사물(transcript)에 해당하는 것이라 할지라도, 정제된 mRNA는 다른 의약품의 경우 명명하는 “정제된 원액(purified bulk)”에 상응하는 것으로 간주할 수 있다. 이것은 또한 원액 생물학적 물질(bulk biological substance) 또는 원액 활성 성분(bulk active substance)이라고도 볼 수 있으며, 본 문서에서는 유전자치료제 내의 생물학적 활성 요소를 기술하는 데에 대부분의 제조사와 심사자들에게 친숙한 용어를 사용하기 위해 원료의약품(drug substance)이라 칭한다. 그리고 다른 첨단바이오의약품에 대해서도 예상하는 바와 같이, 각 공정 단계 및 이 단계에서 채취한 검체, 그리고 어떤 공정 중 관리시험(in-process control test)을 위해 검체를 채취하는가를 표시한 공정 흐름도를 제공해야 한다. 공정 흐름도에는 원료의약품 및 최종 제형화 원액, 최종 충전된 유전자치료제(완제의약품)의 단계에 도달하는 공정상의 단계, 그리고 공정 중 관리 및 출하 시험을 위해 검체 채취가 진행되는 흐름도 상의 단계를 명확히 밝혀야 한다. 농축 정제된 mRNA(원료의약품) 또는 유지하거나 저장되는 중간체(예: 최종 제형화 원액)의 저장 기간은 정치 시간(hold time)/안정성 연구로 뒷받침할 수 있다. 이를 위해 안정성 평가 계획(프로그램)에 원료의약품의 적절한 로트 수를 포함시켜야 한다.

mRNA(원료의약품)는 특정 제형(완제의약품 생산의 일부로서의 준비)으로 보호되고 전달되지 않는다면 임상적 사용에는 부적합하다. 지금까지 가장 개발이 많이 진행된 제형화는 지질나노입자 기반이다. 비록 mRNA 기반 제품의 봉입을 위한 다른 접근법들이 있으나, 본 문서에서는 지질나노입자를 사용하는 시스템만을 상세하게 다룰 것이다. 이 제형화는 mRNA를 안정화시킬 뿐만 아니라, 능동적 또는 수동적으로 세포 안으로의

진입과 세포액(cytosol)으로의 방출을 촉진한다. 지질나노입자는 또한 면역반응을 유도하여 효력에 영향을 미칠 수 있다(15, 17, 18). 지질나노입자는 mRNA를 핵산 분해 효소(nuclease)로부터 보호해야 하지만, 일단 표적 세포 안에 진입한 후에는 지질나노입자로부터 반드시 mRNA가 방출되어야 한다. 또한 지질나노입자는 표적 세포로 효율적으로 진입할 수 있도록 적절한 표면 특성을 갖고, 그의 크기는 적절한 범위에 해당되어야 한다. 따라서 제형화 및 제조공정 두 가지 모두의 최적화에 관하여 제품 개발 자료를 제공해야 한다. 예를 들면, 서로 다른 구성성분들의 해동 온도뿐 아니라, 서로 다른 지질의 농도, 지질-mRNA의 비율, 완충액/용매의 pH, mRNA 봉입 효율, 봉입 공정시 지질과 mRNA의 유속(flow rate) 및 혼합비율(mixing rate)은 모두 최종 유전자 치료제(완제의약품)의 품질에 영향을 주기 때문에, 이들에 대해 고려해야 한다. 이러한 방식으로, 지질나노입자로 봉입하는 공정을 주의 깊게 관리할 수 있으며, 생산 방법과 관리 방안을 적절하게 기술하고 적합하게 밸리데이션 해야 할 것이다.

sa-mRNA에는 체내 증폭(그러나 바이러스 비구조 유전자가 필요한 봉입(packaging)은 제외)을 허용하는 추가적 단백질에 대한 코딩 서열을 포함하고 있으나, IVT 이후 정제 및 지질나노입자 제형화를 실시하는 제조 방법은 앞서 기술한 내용과 근본적으로 동일하다. 표적 단백질 코딩 서열과 동일한 분자에 추가적인 코딩 서열을 지닌 sa-mRNA의 제조공정에 필요한 관리 방안은 mRNA 기반 유전자치료제의 경우와 유사하거나 동일할 수도 있다. 그러나 복제효소 유전자(replicase gene)가 별도의 mRNA 분자에 코딩되어 있다면, 추가적인 제조공정 및 품질관리가 필요할 수 있으며, 필요한 mRNA가 지질나노입자에 적절하게 봉입되도록 보장하기 위해 이러한 사항들에 관하여 기술해야 한다. 두 개의 봉입된 mRNA의 분자량 비율 정보 및 그 타당성 그리고 밸리데이션 방법을 제공하여야 한다. 발현 효율의 정도 역시 이 두 접근법 사이에 차이가 있을 수 있으며(예: 한 가지 mRNA 사용과 대조적으로 두 가지 mRNA를 사용), 이는 dsRNA의 함량 및 유도된 선천성 면역반응, mRNA 반감기의 차이로 인하여 유전자치료제 설계에 대해 예상하는 안전성 및 유효성에 영향을 줄 수도 있다. 각각의 mRNA 분자들을 별도로 봉입하고 봉입 이전에 혼합하지 않는다면, 이러한 사항 역시 기술해야 할 것이며, 두 가지(또는 그 이상의) mRNA의 적절한 혼합 및 적합한 비율을 보장하기 위해 추가적인 제조공정 및 품질관리를 수반해야 할 수 있다. 마찬가지로, 다가 mRNA의 경우 봉입 이전 또는 이후의 혼합 단계에 관해 기술해야 하며 적절히 관리가 필요하다. mRNA가 봉입되고 혼합된 경우 주목해야 할 중요한 점은 각각이 생체 내에서 동일한 세포에 의해 흡수되어야 하는 방법 또는 필요 여부에 대해 확실한 타당성을 제시하여야 한다는 것이다. 이는 다가 혹은 혼합 유전자치료제에서는 덜 중요할 수 있고 sa-mRNA 기반 유전자치료제에서는 더 중요할 수 있다.

핵심 품질관리 사항에는 다음이 포함된다.

가) 출발물질, 원료물질 및 첨가제 - 다음을 포함하나 이에 국한되지 않는다: ① 효소적으로 혹은 합성적으로 생성된 산물(예: PCR 혹은 새로운 방법)이거나 일반적으로 제한 효소로 선형화한 플라스미드 DNA일 수도 있는 선형 DNA 주형(linear DNA template) ② 뉴클레오티드 ③ 효소(예: DNA-의존성 RNA 중합효소(일반적으로 T7 polymerase), 캡 형성(capping) 효소, 2' O-methyltransferase, poly(A) 중합효소, DNase) ④ 완충액 ⑤ 용제 ⑥ 지질. 선형 DNA 주형은 원료의약품 제조의 출발물질로 여겨진다. 목록에 제시되지 않은 제조에 사용되는 것도 원료물질에 포함된다. 첨가제는 완제의약품/유전자치료제에서 활성이 없는 원료물질이다.

* 특히, 동물(인간 포함) 유래 출발물질이나 원료물질 또는 첨가제, 또는 동물(인간 포함) 유래 원료를 사용하여 생산된 출발물질이나 원료물질 또는 첨가제는 적절한 외부 조달 및 관리시험, 위해성 평가를 통해 관리해야 한다.

* 타당한 증거 및 위해성 평가로 뒷받침하면서 잠재적인 외인성 인자의 부재 확인 또는 관리를 보장하는 데에 주의를 기울여야 한다.

나) 제조공정 및 중간체의 공정 중 관리 - 최종 제형화 원액의 제형화(지질나노입자 제조 및 봉입 단계) 및 충전뿐 아니라 원액 mRNA 성분(원료의약품)의 제조를 위해 실시한 공정을 포함한다. 또한, 지질나노입자 제형화의 일관성(크기 및 다분산도(polydispersity)), mRNA 봉입의 일관성, 그리고 부분적 mRNA, dsRNA 불순물의 제거에 대한 관리 또는 밸리데이션 중의 한 가지를 포함한다.

다) 제조 후 mRNA 기반 유전자치료제 원료의약품 및 최종 충전된 유전자치료제(완제의약품)의 출하도 포함한다.

라) 공정 밸리데이션 - 원하는 품질 프로파일을 가진 상업용 최종 완제의약품의 공정 일관성을 확인하기 위하여 공정 밸리데이션을 수행해야 한다.

이러한 핵심 품질관리 사항 중 일부를 평가하기 위해 고려할 수도 있는 분석 방법은 정확한 방법 및 기준이 공개된 바가 많진 않으나, 다음의 방법들을 다양한 주요 품질 관리 관점에서 특성 분석이나 관리를 위한 고려해야 하는 시험방법의 예시로 간주할 수 있다(24~26).

표 1. 특성 분석 및 품질 관리 시험방법의 예시

평가 항목	시험방법 예시
확인	DNA 주형 서열분석, mRNA 서열분석
확인 및 함량	역전사효소 정량 PCR
함량 및 순도, 봉입 비율(%)	자외선 분광법(ultraviolet spectroscopy), 형광-기반 분석(fluorescence-based assays)
함량, 순도, 크기, RNA 완전성, 표면전하, 봉입 비율(%)	아가로스 또는 아크릴아마이드 겔 전기영동 (모세관 전기영동 포함)
mRNA 함량, 순도, 지질 함량 mRNA 품질, 나노입자 완전성, 봉입 비율(%)	크로마토그래피 분석(예: 크기 배제(size-exclusion) 또는 음이온 교환(anion-exchange), 친화성(affinity), 역상(reverse-phase))
mRNA 함량, 지질나노입자 완전성, capping efficiency, poly(A) tail	질량 분석법(mass spectrometry)
기타 품질 파라미터, 순도	dsRNA 블롯, 캡 형성(capping) 비율(%) 시험, poly(A) tail 말단 전사물(transcript)의 비율(%) 및 poly(A) tail의 크기
역가 및 단백질 정확도	무세포 번역 또는 세포-기반 발현 시스템
지질나노입자 크기 및 분포 (순도, 일관성, 안전성) 표면 전하	광산란법(light scattering)(예: 정적 또는 동적 광산란법), 나노입자 추적분석, 전자현미경, 크기-배제(size-exclusion) 크로마토그래피
입자 표면 특성분석 (크기 및 다분산도, 표면 전하(제타 전위, zeta potential) 포함)	레이저 도플러 전기영동(laser doppler electrophoresis), 동적 광산란 분석
이화학적 특성 분석 (표면 및 형태학적 특성 포함)	전자현미경, 원자력 현미경, X-선 회절(XRD), 시차 주사 열량측정(differential scanning calorimetry) 분석
안전성 파라미터	무균 시험, 엔도톡신 함량
품질특성	pH; 함습도(중량, 공비, 적정)

* 이는 현재 과학기술 수준에서 검증된 시험방법으로, 향후 특이성, 정확성 및 정밀성이 개선된 시험방법이 개발되면 이를 적용할 수 있다.

임상시험에서 사용되는 mRNA를 임상시험 단계에 따라 적절한 GMP 조건에서 제조해야 한다. 3상 임상시험에서 사용하는 임상시험용 의약품 그리고 상업적 제조에 대해서는 GMP를 완전히 준수하여야 한다. 임상 개발 중의 제조 변경을 특히 핵심 안전성 및 유효성 시험이 완료된 후 품목허가 신청 이전에 실시하였다면, 이에 대하여 서술하고 근거를 제시해야 한다. 또한, 임상적으로 검증된 배치와 비교 분석을 수행해야 한다. 상세한 내용은 ‘생물의약품의 제조방법 변경에 따른 비교동등성 가이드라인(식약처, 2019)’을 참고할 수 있다.

2.3. 유전자치료제의 구조체 및 구성에 관한 일반 정보 및 설명

mRNA 원료의약품 및 제형화한 mRNA 기반 유전자치료제에 대하여, 그 설계와 구축, 조성(예: 지질 및 기타 첨가제), 사용한 각 첨가제의 함량, mRNA 서열과 관련하여 정보를 제공해야 한다. 선택한 첨가제에 대한 근거 및 기능도 서술해야 한다. 해당되는 경우, 사용한 지질의 구조 및 분자량 그리고 제형화 시 사용한 지질에 대한 정보를 포함해야 한다.

2.3.1. mRNA 서열 및 요소의 배열

- 가) 주석을 첨부한 DNA 주형의 서열을 제공해야 한다. 표적 단백질을 위한 ORF 뿐만 아니라, 개시 및 종결 코돈, ORF를 둘러싼 UTR, 조절 요소(예: RNA 중합효소를 위한 프로모터(promoter)), 5' cap 및 3' poly(A) tail을 포함하여, mRNA 안에 포함된 모든 요소의 서열 및 위치 또는 길이를 제시해야 한다. 이 중 3' poly(A) tail은 일정 길이 이상으로 제시 가능하다. 추가적인 단백질을 코딩한다면(예: 자가 증폭 구조체 또는 사이토카인 등을 위한 단백질), 이들의 서열을 제공해야 한다(아래의 (라) 및 (마) 항목 참조). 또한, 구조체에 포함된 추가 서열의 존재 및 기능에 대해 기술해야 한다.
- 나) mRNA는 자연발생적이거나 또는 변형이나 합성된 뉴클레오시드를 포함하여 제조가 가능하기 때문에, 서열 정보에는 사용된 특정 뉴클레오시드를 포함해야 한다.
- 다) 또한, 표적 단백질의 자연 상태에서의 원래(native) 코돈보다는 최적화된 코돈(예: 인체 세포 내의 tRNA의 빈도에 더 잘 부합 하거나, mRNA의 특정한 이차 또는 삼차 구조를 획득하거나, mRNA의 생체 내 안정성을 향상하기 위한 코돈)을 사용할 수 있다. 이러한 최적화된 코돈에 대해 기술하고 타당성을 제시해야 한다.
- 라) 위에 서술한 바와 같이, sa-mRNA는 표적 단백질 외에도, 바이러스 RNA-의존성 RNA 중합효소 복합체를 코딩할 수 있다. 이러한 구조체는 replicon을 구성하며, 결과적으로, 환자의 세포 내 전달 및 세포에 의한 흡입 시 표적 단백질을 코딩하는 mRNA 복제를 다수 생성할 수 있으며. 따라서 잠재적으로 유전자치료제의 역가를 증가시킨다. 이러한 replicon의 서열 정보를 제공하고 그 기능을 설명해야 한다. 복제효소가 표적 단백질과는 별도의 mRNA 분자에 제공된다면, 각 구성성분의 제조 및 관리에 대하여 도해와 서술식 설명을 제공해야 한다. 일반적으로, 이러한 코딩 서열은 동일한 분자에 위치하지만, 만일 분리되어 있다면 추가적인 관리가 필요하며 이에 대해 서술해야 한다.
- 마) mRNA 기반 유전자치료제가 또 다른 표적 단백질(예 : 사이토카인 등)를 코딩하는 서열 또는 다른 목적으로 작용하도록 의도한 비코딩(non-coding) 서열을 포함하고

있다면, 이러한 서열과 이들의 목적에 대한 정보를 제공해야 한다.

- 바) 설계한 염기서열대로 mRNA가 제조되었다는 것은 품질관리 측면에서 중요하므로 해당 자료를 제공할 필요가 있다.

2.3.2. 제형화 및 구성성분

- 가) 배치 조성(batch formula) : 상업적 생산을 위한 배치 조성은 제형의 모든 조성 구성 성분을 제시해야 한다. 일회 접종량 중 각 성분 함량의 목록을 제시해야 한다. 한 배치의 전체 용량을 정의해야 한다. 만일 2종 이상의 mRNA 물질(원료의약품)이 완제의약품(최종 유전자치료제)에 포함되어 있다면 각각의 mRNA가 동시에 혹은 개별적으로 지질나노입자에 봉입되어 sa-mRNA 유전자치료제, 다가 유전자치료제 혹은 혼합 유전자치료제가 만들어지는 지를 기술해야 한다.
- 나) 화학적 특성 및 제형화 : mRNA는 원칙적으로 안정성을 향상하고 세포 내 흡입을 돕기 위해 제형화한다. 몇몇 잠재적인 전달인자(delivery agent) (예: 프로타민 복합체(protamine complex), 양이온성 리포솜, 지질-, 폴리머- 또는 지질/폴리머-기반 나노입자)가 있으나, 현재 사용 중이거나 임상시험이 가장 진전된 mRNA 후보 유전자치료제들은 지질나노입자로 봉입한 것이다. 이러한 제형화의 화학적 특성분석 및 구조적 제형화(예: 나노입자)에 대한 물리적 파라미터와 관련된 특성분석에 대해 서술해야 하며, 제형화와 최종 제품의 일관성 및 안정성과 같은 특성을 다루어야 한다. 지질과 완제의약품의 주요 품질 특성 역시 포함해야 한다. mRNA-지질나노입자 복합체 및 표적 세포 내로의 흡입에 대하여 충분한 특성 분석이 필요하다. 여기에는, mRNA를 적절히 보호하고, 유전자치료제에 요구되는 안정성을 확보하기 위하여, 합성된 mRNA-지질나노입자 복합체의 표면 화학(surface chemistry) 및 전하, 나노입자 크기, 형태, 다분산도(polydispersity)에 대한 이해가 포함되어야 한다. 따라서, 유전자치료제의 독성 및 이상 사례, 면역 반응, 유효성에 영향을 줄 수 있는 제형화의 특성에 대해 서술하고, 그 영향(긍정적 또는 부정적)에 대해 고려해야 한다.
- 다) 추가적 서열 : mRNA가 특이적인 세포나 장기에 작용하거나 엔도솜(endosome)으로부터의 mRNA 방출이 증가하도록 추가 서열을 포함했다면, 이러한 추가 부분의 서열 및 기능에 대해 서술하고, 제안한 작용기전을 뒷받침하기 위해 이들의 기능에 대한 증거를 제시해야 한다.
- 마) 기타 첨가제(예: 보존제) : 지질나노입자 외 추가된 기타 첨가제의 조성, 필요성, 그리고 (보존제의 경우) 보존적 유효성에 대해 기술하고, 지질나노입자의 특성에 유해한 영향을 주지 않음을 증명해야 한다.

2.4. 출발물질, 원료물질, 첨가제의 관리

다른 유전자치료제와 마찬가지로, 생산에 사용하는 모든 시약의 구매 및 품질에 특별한 주의를 기울여야 한다. 시약/원료물질은 내부에서 정의한 품질 시스템을 통해 제조사가 승인한 판매업체/공급업체로부터 공급받아야 한다. 이러한 물질의 공급업체는 제조사가 적절한 품질검증 프로그램으로 관리해야 한다.

2.4.1. 출발물질, 원료물질, 첨가제의 품질

mRNA를 생산하기 위해 사용한 출발물질, 원료물질과 첨가제(예: DNA 주형, 뉴클레오티드(변형된 뉴클레오티드 함유 가능), 효소, 완충액, 용제, 정제 시 사용한 컬럼 등) 및 지질나노입자의 지질을 포함하여 기술해야 한다. 각 출발물질과 원료물질을 제조공정의 어느 시점에서 사용하는가를 포함하여, 이들의 출처 및 품질, 관리, 안정성, 역할에 대해 서술해야 한다. 이러한 물질들은 GMP 생산에 적합해야 하며, 참조한 식약처가 인정하는 공정서 및 의약품집이나, 이들의 규격에 대한 세부사항을 표기해야 한다. 시약 또는 출발물질(예: 선형 DNA 주형)의 추출을 위해 사용한 공정 정보 역시 제공해야 한다. mRNA 기반 유전자치료제의 생산을 위한 출발물질은 선형 DNA 주형이나 그 주형은 재조합 세포은행에서 증식된 DNA 플라스미드와 같은 생산 출발단계의 물질로부터 유래할 수 있다. 지질나노입자와 관련하여 지질나노입자 제조에 사용한 지질의 출처 및 품질은 (특히, 이전에 비임상 및 임상적으로 연구된 적이 없는 지질나노입자 내에 존재하는 새로운 지질인 경우) 안전성과 품질에 대한 유의한 평가가 가능하도록 충분히 상세하게 기술해야 한다. 새로운 것으로 간주하지 않는 첨가제의 경우에도 적합한 규격을 제공해야 한다. 새로운 첨가제의 경우(예: 양이온 지질), 가능하다면, 이 새로운 지질(출발물질 및 중간체 포함)의 제조공정 및 관리에 대한 상세 내용을 제공해야 한다. 여기에는 새로운 첨가제의 합성에 사용되는 제안한 출발물질 및 모든 중간체에 대한 정보 그리고 타당한 근거가 포함될 것이다. 만일 관련이 있다면 (양이온성) 지질에서 수행되는 nitrosamine류 불순물 발생에 대하여 위해 평가를 고려해야 한다. 출발물질 및 원료물질(예: 시약 및 용제), 중간체, 최종 첨가제(지질)에 대한 필수적인 공정관리 및 규격과 함께, 제조소 및 제조공정의 세부 사항을 제공해야 한다. 용제의 사용 및 관리 그리고 금속 불순물(elemental impurities)에 의한 잠재적 오염 역시 고려해야 한다(27~29). 물질/시약/용제의 재활용을 제안한 경우, 이에 대한 근거를 제시하고 적절하게 관리해야 한다. 첨가제와 관련된 불순물의 수준 또한 적절하게 관리하고 타당성을 입증해야 한다. 정제 및 분리 단계를 상세히 설명해야 한다. 의약품 제조에 사용 이력이 없는 첨가제의 품질을 보장하기 위해, 해당 제조사는 또한 이 물질의 특성 분석, 안정성 모니터링, 배치 분석을 위해 사용한 분석법에 대하여 가용한 관련

정보를 구비해야 한다. 폐길화된 지질의 포함은 지질나노입자의 안전성 제공 및 세포와의 상호작용 증강에 핵심적 역할을 수행하기 때문에(11), 폐길화된 지질에 대해 적절한 관리(예: PEG 분자량 및 다분산에 대한 관리)를 실시해야 한다.

위에서 설명한 바와 같이 선형 DNA 주형은 mRNA의 GMP 생산을 위한 출발물질로 간주한다. 플라스미드 DNA로부터 선형 DNA가 준비되는 경우, 세포은행 확립 및 플라스미드 DNA 제조는 후속 GMP 제조 시 사용할 물질로서의 생산 요구 사항에 따라 수행하여야 한다. 제품 특성과 개발 전략에 따라 그 근거가 충분하고 타당할 경우, 세포은행 구축 없이 플라스미드 DNA와 선형 DNA 주형을 만들어 mRNA의 제조에 사용하는 것을 고려할 수 있다. 다만, 이 경우 선형 DNA 주형에 대하여 염기서열 분석을 포함한 확인·순도 시험 등의 품질관리가 충분히 이뤄져야 한다.

주형 DNA 제조를 위하여, 세포은행 시스템을 확립하고, 이에 관하여 기술하며 타미생물, 박테리오파지 등의 외래성인자 부정시험을 수행해야 한다. 종자은행(seed bank)의 유전적 안정성을 반드시 증명해야 한다. 만일 poly(A) tail이 플라스미드 DNA로부터 코딩이 된다면 특별히 DNA 플라스미드에서 그 부분에 대한 재조합 비율에 대해 시험해야 한다. DNA 플라스미드로부터의 불순물(예 : RNA 및 숙주-세포 DNA, 단백질, 지질, 다당류)을 줄이기 위해 정제 공정을 또한 실시해야 한다. 미생물 오염의 위험을 최소화하기 위한 방식으로 제조공정을 수립해야 한다.

DNA 플라스미드(선형 DNA를 생성하는데 사용되는 경우) 및 선형 주형에 대한 시험에는, 적절한 표준물질(상용표준품 또는 자사표준품 등)을 사용하여 잔류 계놈 DNA, RNA 및 단백질, 무균 또는 허용 가능한 바이오버든, 엔도톡신 수준에 대한 시험들뿐만 아니라, 서열 분석을 통한 유전적 동일성, 무결성(원하는 암호화된 표적 단백질 서열 및 조절/제어 서열의 확인 포함) 및 선형 DNA 백분율에 대한 시험이 포함되어야 한다. 초기 개발에서는 DNA 플라스미드(사용되는 경우) 또는 선형 DNA에 대해서만 시험할 수 있다.

2.4.2. 출발물질, 원료물질, 첨가제의 사용승인

다른 유전자치료제와 마찬가지로, 제조사가 모든 출발물질, 원료물질 및 첨가제가 정해진 기준규격에 적합함을 확인하고 제조에 사용하여야 한다.

2.5. 공정개발 및 공정 중 관리

상업용 제조공정의 개발 이력을 제공해야 한다. 공정관리 실시를 보장하고 공정 관리에 대한 피드백을 제공하기 위하여, 제조공정 중 중요 단계의 경고 및 조치 한계에 관한 시험 및 허용기준을 개발하고 타당성을 입증해야 한다. 충분히 확립된 플랫폼

기술을 사용하고 있는 경우에는, 허가된 제품의 제조에서 얻은 지식을 타당한 범위 내에서 고려할 수 있다.

제조 공정 밸리데이션을 통해, 제조공정의 주요, 핵심 파라미터를 준수하고 있으며 사전에 정의한 품질 특성을 일관되게 충족하는 제품의 생산을 증명해야 한다. 이때에는 공정 및 제품 관련 불순물에 대해 인체에 의도된 용도에 허용 가능한 수준으로, 재현 가능하며 일관되게 제거함을 증명해야 한다.

무균 공정과 같은 중요 제조 공정 및 완제의약품의 무균상태가 임상시험용 의약품의 제조 시에 관리되고 있음을 무균 공정 밸리데이션을 실시하고 임상단계별 공정 밸리데이션을 실시하거나 적절히 증명해야 한다. 다만, 초기 임상시험에서 사용되는 후보 유전자치료제에 대해서는 공정 밸리데이션이 반드시 요구되지는 않는다.

2.6. 제품 특성 분석

공정 중 시험 및 로트 출하 시험에 추가적으로 mRNA(원료의약품)와 최종 유전자 치료제(완제의약품)의 특성 분석에 대한 요약을 제공해야 한다. 상호보완적인(orthogonal) 화학적, 분자적, 물리학적 그리고 생물학적 방법을 사용한 철저한 특성 분석이 핵심이다. 특성 분석은 모든 로트에 대해 일상적으로 수행하지는 않은 연구와 분석이지만, 제조사는 특성 분석을 통해 공정과 시험법의 개발 및 개선에 지침을 제공해주는 제품의 구조 및 성능, 안전성에 대하여 중요한 지식을 획득할 수 있다. 이는 모든 로트에 대해 실시하는 공정 중 시험 및 로트 출하 시험과 대비된다. 특히 대체 기술 사용 시 다른 결과를 얻게 될 가능성이 있을 때(예: 다른 방법을 사용한 입자크기 측정)에는 다양한 파라미터 결정을 위한 분석법 선택의 타당성 입증을 고려해야 한다. 상호보완적 방법을 권고하는 것은 이러한 이유 때문이다.

제조한 mRNA군(population)의 서열을 확인하고 적절한 서열의 일관성 정도를 정의해야 한다. 제조의 일관성은 이후 '2.7. 제조의 일관성'에서 더 자세히 논하고 있다. 캡 형성(capping) 및 폴리아데닐화의 일관성 정도 역시 특성 분석되어야 하고 밸리데이션이 필요할 수 있다('2.5. 공정개발 및 공정 중 관리'). 절단되었거나 대체 형태를 포함하지 않은 코딩된 완전한 단백질의 발현을 증명해야 한다. 특히 특성 분석 연구 중 표적 단백질이 절단되었거나 대체 형태의 발현이 증명되고 이러한 대체 형태가 원하지 않는 이상반응 발생으로 귀결될 수 있다면, mRNA 서열의 재설계가 필요할 수 있다. 지질 나노입자를 사용한 mRNA 봉입의 일관성 정도 역시 특성 분석에서 다루어야 하며, 한편으로는 입자 흡입(particle uptake) 연구가 입자를 흡수하는 세포 종류의 확인, 흡수 기작, 흡수 효율, 이러한 작용의 평가를 위한 최적의 무세포(cell-free) 혹은 시험관내(in vitro) 시험법의 선택을 통해 잠재적인 역가 척도(potency measure)의 특성 분석에 도움을 줄 수도 있다. 특성 분석 중에는, 이러한 특성 중 어느 것을 주요 품질 특성 및

/또는 안정성 지시(stability indicating) 파라미터로 관리할 것인지를 결정해야 한다.

지질나노입자의 특정 측면들은 매우 면밀하게 특성을 분석해야 한다. 이러한 측면에는, mRNA를 함유한 지질나노입자의 형태학적 그리고 치수적(dimensional) 특성을 탐색하기 위해 다른 분석기술을 활용하여 확인한 입자크기가 포함된다. 지질나노입자 내 PEG(polyethylene glycol)의 밀도는 제품의 안정성 및 세포와의 상호작용, 면역학적 반응 특성에 영향을 주기 때문에, 이들에 대한 정보 역시 mRNA-지질나노입자 복합체의 표면 특성의 이해를 돕는데 유용할 것이다. 이러한 정보는 또한 제조한 유전자치료제의 일관성을 확증하는 데 도움을 줄 것이다. 표면전하 측정(예: 제타 전위) 또한 지질나노입자의 특성 분석을 위한 방법으로 간주해야 한다.

제품에서 이러한 특성의 중요성 때문에 제품의 특성 분석과 그에 대한 이해를 위해 비임상 연구에서는 mRNA로 코딩된 표적 단백질이 유도하는 생물학적 특성을 분석해야 한다. 추가적으로 지질나노입자가 내재적으로 면역조절 효과를 지니고 있다면, 이 역시 특성 분석이 필요하다. mRNA에 다른 면역조절 요소나 유전자가 포함된 모든 경우에는, 특성 분석을 실시한 제품 설계에 이들을 포함한 바에 대하여 타당성을 제시하기 위해, 이러한 면역조절 요소 또는 유전자가 mRNA로 코딩된 표적 단백질의 작용 기전(예; 면역원성)에 기여하는 부분 또한 측정해야 한다. 이러한 사항은 제품 디자인을 최적화하고 적절한 관리 방법을 발전시키려는 제품 이해와 지식을 위해 중요하다. 출발물질 및 정제된 mRNA 내의 잠재적 제품 혹은 공정 유래 불순물에 대해 기술하고 조사해야 한다. 이러한 불순물에는 잔여 세균 숙주-세포 단백질(DNA 주형의 제조에 사용한 경우), 엔도톡신, 잔여 세균 숙주-세포 RNA 및 염색체 DNA(DNA 주형의 제조에 세균을 사용한 경우), 효소(예 : DNA 및 RNA 중합효소, 제한효소), 통합되지 않은 뉴클레오티드, 잘못 접힌 RNA, dsRNA, 불완전하거나 크기가 다른 RNA, 그리고 제조공정에 사용된 기타 물질이 포함될 수 있다. 정제된 RNA에 존재하는 불순물에 대한 정보를 이들의 최대 허용 가능 또는 최저 달성 가능 수준에 대해 설정된 규격과 더불어 제공해야 한다. 알려진 또는 잠재적인 독성이 있는 불순물 및 잔여물의 경우, 독성학적인 위해 평가를 수행할 것을 권고한다. 분해된 RNA는 폴리아크릴아마이드나 아가로스 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 모세 겔 전기영동과 같은 분석 절차의 일부로서 평가할 수 있다. mRNA의 서열 및 구조의 일관성 정도와 mRNA가 세포로 *in vitro* 형질 주입 시 일관된 단백질의 발현은 완제의약품에 대해 중요한 특성으로서 평가해야 한다.

완제의약품의 제조에 사용되는 지질로부터 유래할 수 있는 잠재적 불순물(공정 및 제품 유래)에 대한 특성 분석과 조사를 수행하여야 한다. 이것은 또한 불순물이 적절하게 통제되고 임상적으로 결정된 허용 범위 내에서 제안된 규격 한도의 타당성을 허용할 것이다.

2.7. 제조의 일관성

다른 생물의약품과 마찬가지로, 품목허가 신청에 앞서 다수의 연속 배치에 대하여 제조의 일관성을 확정하기 위해 밸리데이션된 방법을 사용해 시험 및 분석을 수행해야 한다. 한 배치와 시험한 파라미터의 허용 가능 범위를 벗어난 다른 배치 사이의 차이에 주목하고 연구해야 한다. 이러한 연구에서 얻은 자료를, 제품과 공정에 대한 지식 및 일정한 특성상의 변동의 위험도(criticality) 평가와 더불어, 선택한 규격의 타당성을 입증하기 위한 기반으로 사용해야 한다.

초기 임상 개발 중에는, 로트 생산이 적어 생산의 일관성 증명이 제한적이거나 불가능할 수 있다. 일관성을 증명하는 능력은 제품 개발 중 제조 경험을 획득함에 따라 증강될 것이다. 로트의 일관성 확증은 일반적으로 개발이 진전된 단계이지만(예: 상업적 제조를 위해 제조공정의 규모가 확대된 시점) 품목허가 신청은 제출하기 이전에 실시하게 된다. 그러나 일부 경우에는, 상업적 제조를 위한 생산 규모 확대를 임상시험 규모 물질에 대해 품목허가를 하는 동안 실시하게 될 수 있다. 제조공정에 변경을 실시할 때마다, 특히 핵심 연구에 사용한 로트 및 계획한 상업적 공정으로 제조한 로트에 대하여 로트 간의 비교동등성을 입증해야 한다. 비교동등성 시험계획서 및 비교동등성 증명을 위한 전략은 ‘생물의약품의 제조방법 변경에 따른 비교동등성 평가 가이드라인(식약처, 2019)’을 참고할 수 있다.

2.8. 정제 mRNA 원액(원료의약품)의 제조 및 관리

앞서 ‘2.2. 제조에 관한 사항’에서 기술한 바와 같이, mRNA의 개발 및 제조에 관한 개요에는 표적 단백질 유전자 및 mRNA 서열에 포함된 다른 유전자(들), UTR, 5' cap, 3' poly(A) tail, 사용된 조절 성분(regulatory element)을 선택한 근거를 포함하여 유전자 발현 또는 다른 최적화 변형(optimization modification)에 대하여 서술해야 한다. 완전한 DNA 주형 및 mRNA의 서열에 대하여 주석을 첨부하여 제공해야 한다. 도해식이며 주석이 포함된 흐름도 그리고 제조 및 공정 중 관리, 출하 시험에 대한 서술을 제공해야 한다. mRNA 기반 유전자치료제의 품질 및 안전성, 유효성에 영향을 미칠 수 있는 중대한 변경 사항과 함께 세부적인 생산 및 관리 절차에 대하여 식약처와 논의하고 승인을 받아야 한다.

sa-mRNA의 경우, 복제효소와 표적 단백질이 별도의 mRNA에 발현된다면, 이에 대해 기술하고 제공되는 흐름도에서 명확히 설명해야 하며, 여기에는 추가적인 제조공정 및/또는 품질관리 시험 역시 포함해야 한다. 예를 들어, 만일 복제효소-코딩 mRNA 분자와 표적-항원-코딩 mRNA 분자 두 가지 모두를 동일한 지질나노입자에 봉입했다면,

이 분자들의 비율에 대한 관리를 고려해야 한다. 만일 각각의 mRNA가 봉입되고 혼합된다면 각각이 생체 내에서 동일한 세포에서 흡수되어야 하는 방법 및 필요 여부와 효능의 의미에 대한 타당성을 제시해야 한다.

2.8.1. 정제 mRNA 원액의 관리

정제 mRNA 원액의 확인 및 순도, 함량, 물리적 상태, 안전성, 품질에 대한 주요 품질 특성 관련 규격을 확립하고 타당성을 입증해야 한다. 사용한 분석법에 대해 설명하고, 허용 한계의 정의 및 분석법 밸리데이션에 대해 기술해야 한다. 상업적 규모로 생산한 모든 배치의 시험 결과를 요약하여 제공해야 한다. 저장 조건에서의 안정성에 대한 규격도 설정해야 한다.

개발 초기 임상시험 승인을 뒷받침하기 위하여, GMP에 따라 제조한 배치의 시험 결과와 확보가 가능하다면 제조 절차 확립을 위해 실시한 공정개발용 생산(engineering run)으로 생산한 배치의 시험에서 도출한 결과들을 요약하여 제공해야 한다. 개발 초기에는 규격이 제한적이며 허용기준은 다소 광범위할 수 있으나, 제조공정 및 분석법에 대한 경험을 축적함에 따라, 적절한 경우, 규격 및 기준을 검토하고 강화해야 한다. 제품 특성 분석 중 진행하는 모든 시험을 출하 시험으로서 각 유전자치료제 배치에 대해 실시할 필요는 없다. 일부 시험은 생산 방법 및 생산의 일관성 확립을 위하여 제한적인 일련의 배치에 대해 제품 및 공정 지식을 획득하려는 목적으로서만 필요하다. 그러므로, 원료 의약품의 확인 및 순도, 품질, 안전성, 안정성과 관련하여 일관성 확립을 위해 최초의 상업적 생산 배치에 대해 포괄적인 분석을 실시해야 한다. 그 후에는 일관적인 품질 관리를 위해 자체적으로 선정한 시험항목 및 품목허가 받은 바에 따른 시험항목과 그 기준에 따라 품질관리를 하여야 한다.

정제 mRNA 원액에 관한 규격에는 최소한 mRNA의 확인, 순도 및 물리적 상태와 양, 엔도톡신 및 무균, 미생물 한도에 대한 평가를 포함해야 할 것을 권고한다. 규격에 대한 근거를 제시해야 한다. 또한 보관조건 하에서의 안정성에 대하여 규격을 수립해야 한다.

2.8.1.1. 확인

정제 mRNA 원액에 대하여 각 배치의 확인 시험을 수행해야 한다. 확인 시험에는 직접적인 RNA 서열분석, 또는 RT-PCR 산물의 서열분석(또는 이 산물의 존재나 부재를 측정), 초고속 차세대(high-throughput) 서열분석을 통한 mRNA 염기서열 판정을 포함해야 한다. 전체 mRNA 서열 중 일부만을 대표하는 RT-PCR amplicon을 기반으로만 확인한다면, 선택한 서열은 해당 mRNA 제품(부속 및 조절 영역 포함)에 고유한 것이어야 하며, 동일 시설이나 동일 장비를 이용하여 제조했을 수 있는 다른

제품에 공통된 것이어서는 안 된다. mRNA의 확인 및 순도에 대한 검증을 위해서는 전체 mRNA 염기서열을 분석하는 것이 더 적절할 수 있다.

2.8.1.2. 순도 및 불순물

정제 mRNA 원액의 각 배치에 대하여 순도 시험을 수행해야 하며, 결과는 설정한 한도 내에 포함되어야 한다. 불순물 관리에서는, DNA 주형, 잔여 뉴클레오티드, 부착되지 않은 cap, 효소, mRNA 분절, dsRNA와 같은, 제조 중 도입된 물질도 다루어야 한다. 이는 공정 관련 불순물의 제거공정을 확립 및 관리하기 위해서는 밸리데이션 또는 잔류 불순물에 대한 시험(공정 중 시험 또는 출하 시험 등)을 통해 달성할 수 있다. 모든 공정에서 dsRNA가 생성되지 않는기 때문에, dsRNA에 대한 시험의 필요성을 고려할 때에는 제조공정 디자인을 고려해야 한다. 분석에는 공정 및 제품 관련 불순물에 대한 민감하고 신뢰할 수 있는 시험을 포함해야 하며, 정제 mRNA 원액 내의 함량에 대하여 엄격한 상한(최대 허용 가능 한도)을 명시해야 한다. 크로마토그래피 검출법을 고려할 수 있다. 잔여 DNA 주형은 정량 PCR로 정량화할 수도 있다. 순도를 증명하고 불순물을 측정하기 위해 사용하는 기술은 가능한 한 광범위한 이화학적 및/또는 생물학적 분자적 특성을 기반으로 하는 것이 중요하다. 강제 분해(forced degradation) 연구와 같은 방법의 결과를 고려하면 제품 관련 어떤 불순물이 생산 중, 출하 시 및/또는 안정성 프로토콜에서 테스트 및/또는 측정되어야 하는지 결정하는데 지침이 될 수 있다.

품질관리의 일환으로서 공정 또는 주성분 관련 잔여 불순물 수준에 대한 시험은, 불순물의 적절한 제거에 대하여 생산공정을 적절하게 밸리데이션하고 생산의 일관성을 증명한다면, 식약처의 동의하에 축소하거나 중단할 수 있다. 공정의 주기적 재밸리데이션에 관한 계획 및 규격에 대해 기술해야 한다. 공정이 밸리데이션될 때까지, 식약처가 동의한 바와 같이 다수의 로트에 대하여 불순물 시험 및/또는 측정을 지속해야 한다. 공정에 중요한 변경을 도입한 경우, 식약처가 동의한 다수의 로트에 대하여 재검정이나 지속적인 측정을 시행해야 할 것이다. 용기-마개 시스템 적합성과 용출물 및 추출물(leachable and extractable) 역시 평가하고 품목허가 신청 시 논의해야 한다.

2.8.1.3. 정량화 및 물리적 상태

mRNA 구조의 완전성은 mRNA 출하를 위한 주요 품질 특성으로 간주한다. 따라서 mRNA의 완전성, 5' cap 형성 효율, 3' poly(A) tail의 존재 및 길이, 순도 시험, mRNA 분절 비율(%), dsRNA 비율(%) 등에 대한 관리가 필요하다. 3' poly(A) tail의 존재 및 길이 측정에 대한 필요성은 mRNA에 이 서열을 추가하는 방식에 따라 달라진다. DNA 주형에 코딩되어 있다면, 전장 mRNA에 3' poly(A) tail이 포함되어 있어야 하지만,

IVT 이후 효소 처리를 통해 추가한 경우라면, 이 파라미터는 시험이나 공정 밸리데이션을 통해 다루는 것이 적절할 것이다. 마찬가지로, dsRNA는 사용한 공정이 dsRNA를 불순물로서 생성할 수 있는가에 따라 그 존재 여부가 결정된다. 이러한 목적으로 겔 전기영동 또는 PCR, 크로마토그래피 검출법과 같은 시험을 고려할 수도 있다. mRNA 정량화는 유전자치료제 용량 설정의 기반이며 온전한 mRNA는 유전자치료제의 작용기전에 핵심이라는 점을 명심해야 한다. 따라서 mRNA 정량화를 위해 사용하는 방법(예 : 자외선 분광광도법(UV spectrophotometry)) 그리고 온전한(intact) mRNA의 정량화를 위해 사용하는 방법(예 : 겔 전기영동)에 대해 기술해야 한다.

2.8.1.4. 안전성 특성

관련된 안전성 시험에 대하여 기술해야 한다. 여기에는 세균과 진균에 대한 무균시험(시험 물질의 발육저지활성 검증 포함) 또는 미생물 한도 시험(함량, 미생물 동정, 그리고 명시된 불필요한 유기체의 부정)과 더불어, 엔도톡신 시험을 포함할 수 있다. 그러나 실시 및 허용 가능한 납득할 만한 대체 시험이 있는 경우라면 언제나 동물시험을 피해야 한다. 과학 및 윤리적 이유로, 시험 시 동물 사용을 최소화하기 위해 “대체, 감소, 개선”의 3R 원칙을 적용하는 것이 바람직하며, 안전성 평가 그리고 기타 제품 시험을 위해서도 적절한 *in vitro* 대체 시험법의 사용을 고려해야 한다.

2.8.1.5. 추가적 품질 파라미터

추가적인 중요한 품질특성(예: 색상, pH, 그리고, 해당 시, 점도)을 수립하고 관리해야 한다. 추가로, mRNA와 관련된 다수의 주요 품질 특성(예: poly(A) tail의 길이 및 캡 형성 효율)이 있으며, 순도 및 불순물과 관련하여 앞서 언급한 바와 같이, 이들에 대한 관리가 필요하다(‘2.8.1.2. 순도 및 불순물’ 참조).

2.8.1.6. 표준 물질

분석시험의 표준화 및 비교동등성 평가에 사용할 내부(in-house) 표준물질(즉, 작업용 표준물질(working standard))을 확립해야 한다. 정제 원액 mRNA의 시험에 사용하는 표준품 또는 표준물질에 대한 정보를 품목허가 신청 시까지 제공해야 한다.

적합한 배치(즉, 임상적으로 평가한 배치)를 그 화학적 조성 및 순도, 생물학적 활성, 전체 서열과 관련하여 완전한 특성 분석을 실시하고, 적합한 검체를 화학 및 생물학적 표준물질로 사용하기 위해 보관해야 한다. 표준물질은 적절한 형태로 제형화해야 한다. 표준물질이 안정적이라고 증명된 조건에서 저장해야 하며 이러한 안정성 모니터링을 실시해야 한다. 최초 표준물질 소진 시 이를 대체하기 위한 계획도 필요하다.

개발 초기(예: 초기 임상시험)에는 적절한 임상시험용 배치에 대한 확인과 특성 분석이 완료될 때까지, 핵심 비임상 연구에서 평가된 mRNA 배치나 공정개발용 생산 배치를 상업용 제조공정과 후기 개발단계(예: 핵심 임상시험)의 표준물질로서 사용할 수 있다.

2.8.1.7. 안정성

안정성 평가는 ‘생물의약품 안정성 시험 가이드라인(식약처, 2015)’에 따라 수행해야 한다. 수행한 연구의 종류 및 준수한 연구계획서, 연구 결과를 문서와 함께 도표나 그래프와 같은 적절한 서식으로 요약해야 한다. 요약 자료에는 적절한 보관조건 또는 유효기간에 관한 결론뿐만 아니라 결과를 포함해야 한다. 원액(혹은 보관된 중간체)의 유효기간 및 차후 유효기간의 연장을 뒷받침하기 위한 안정성 자료는 실제 조건 하에서 실시간 장기 안정성 연구를 기반으로 해야 한다. 만일 중간체나 원료의약품의 운송이 있다면 적절한 온도와 조건 하에서 수행된 운송 밸리데이션이 요구된다.

2.9. 최종 제형화된 유전자치료제(완제의약품)의 제조 및 관리

앞서 ‘2.2. 제조에 관한 사항’에서 기술한 바와 같이, 유전자치료제의 개발 및 제조에 관한 개요에는 제조 및 공정 중 관리, 출하 시험에 대해 도해식의 주석을 첨부한 흐름도와 서술을 포함해야 한다. 지질나노입자의 적절한 제형화를 확인하기 위해 사용한 방법을 자세히 설명해야 한다. 원액 제형화 또는 원액 지질나노입자에 대해 제안한 정치 시간(hold-time)을 적절히 명시하고 밸리데이션해야 한다. 이 정치 시간 중의 이화학적 안정성 및 미생물 관리를 보장하는 데 적절한 고려가 필요하다. 최종 제형화 및 충전, 마감에 사용한 방법을 설명하고 적절히 밸리데이션 해야 한다.

2.9.1. 조성

원료의약품(mRNA) 및 모든 첨가제(예: 지질)를 포함하여 유전자치료제의 최종 조성에 대해 - 특히 두 가지 이상의 용량이나 제형에 대해 품목허가를 계획하고 있다면 각 포장단위 내의 구성성분들의 함량과 함께 기술해야 한다. 각 구성성분의 기능에 대해서도 기술해야 한다.

2.9.2. 지질나노입자의 제조와 관리 그리고 mRNA 봉입

지질나노입자의 적절한 제형화를 보장하기 위해 사용한 방법을 설명해야 한다. 제안한 지질나노입자의 제형화 및 제조공정에 대한 근거를 뒷받침하기 위해 적절한 제품 개발

자료를 제공해야 한다. 지질나노입자 및 최종 mRNA-지질나노입자의 모든 주요 품질 특성에 대해 조사해야 한다. 적합한 경우, 실험설계(Design of Experiment) 접근법을 채택할 수도 있다. 이들의 크기 및 다분산도, 그리고 이에 따른 안정성은 모두 지질과 수용성 상(aqueous phase)의 유동 역학(flow mechanics) 그리고 제조공정 중 유도되는 전단응력(shear stress), 이 두 가지 모두의 영향을 받는다. 그러므로 mRNA-지질나노입자 제형화 및 최종 제형화 유전자치료제의 안정성에 관한 주요 가공 파라미터(critical processing parameter)와 이들의 최적 운영범위(operational range)를 탐색하는 관련된 연구를 수행해야 한다. 이를 통해 요구되는 품질 조건에 부합하는 제품의 일관성 있는 제조가 보장될 수 있을 것이다. 원액 지질나노입자 또는 원액의 제형화에 대하여 제안한 정치 시간을 적절하게 명시하고 밸리데이션해야 한다. 보관할 경우, 최종 유전자치료제 생산의 중요한 중간체이므로 적절하게 관리해야 한다. 이러한 정치 시간 중의 이화학적 안정성 및 미생물 관리에 대해 적절한 고려가 필요하다.

지질 준비 단계, 지질과 함께 mRNA의 봉입 단계, 희석 및 정제 단계, 그리고 이후 적합한 용기로의 충전 단계에 대해 기술하고, 각 공정이 필수적인 공정 중 규격을 충족함을 밸리데이션 해야 한다. 지질나노입자 준비에 사용한 원료물질의 제거를 위해 다양한 여과 기법(예: 접선유동여과(tangential flow filtration))을 고려해야 한다. 지질나노입자를 사용한 봉입 중, 그리고 지질나노입자 및 최종 mRNA-지질나노입자 제품의 안정성에 영향을 준다고 알려진 제조 조건하에서(예: mRNA의 해동 그리고 지질나노입자나 mRNA-지질나노입자의 동결 속도에 따른 영향) mRNA의 분해를 최소화하는 데 특별히 관심을 기울여야 한다. 마찬가지로, 동결건조를 한다면, 동결건조 및 용해(reconstitution)를 위한 조건을 고려하고 타당성을 입증해야 한다. 해당되는 경우 희석제 또는 재구성 용액을 설명해야 한다.

지질나노입자를 위한 적절한 관리에 대해서도 기술해야 하며, 일반적으로 다음 사항을 포함하게 될 것이다. (1) 지질의 확인 및 함량, 순도(불순물 포함), (2) 입자크기 및 분포, 다분산도, (3) RNA 봉입 효율/봉입된 비율. 일부 경우에는 제품의 일관성 및 안정성을 보장하기 위해 표면 특성(예: 전하), 지질 분자 비율 혹은 mRNA 대 양이온성 지질 비율(예: 질소 대 인산염의 비율)도 명시해야 할 수 있다. mRNA 원료의약품에 대한 변경(예: 서열 또는 길이, 이차구조의 변경)이 차후 지질나노입자의 주요 품질 특성에 미칠 수 있는 영향(예: 입자크기와 분포, 형태학 및 표면 특성) 그리고 궁극적으로 최종 제품에 미칠 수 있는 영향(예: 봉입 비율 및 세포와의 상호작용/세포 내 흡입)에 대한 고려 역시 중요할 것이다. 마찬가지로 플랫폼 데이터가 새로운 후보 유전자치료제 개발을 지지하기 위한 것이라면 이러한 요소의 영향을 결정해야 한다.

2.9.3. 최종 유전자치료제의 제조, 충전 및 용기

정제된 원액 mRNA(원료의약품)로부터 최종 유전자치료제(완제의약품)까지의 제조

단계를 도해로 제시하는 주석을 첨부한 흐름도를 제공해야 한다. 흐름도에는 최종 제형화 원액의 회석, 재료 및 중간체의 확인, 공정 중 시험 및 품질관리 시험과 같은 모든 단계(즉, 단위 작업(unit operation))를 포함해야 한다. 흐름도에서 묘사한 각 공정 단계에 대한 서술을 제공해야 한다. 예를 들어, 각 공정 단계의 규모, 완충액 및 기타 첨가제, 주요 장비, 공정관리(관련된 개발 자료로 타당성을 입증한 허용기준이 설정된 공정 중 시험 및 주요 공정 운영 변수(process operational parameter)를 포함)를 포함해야 한다. 멸균공정 및 미생물 관리도 포함해야 한다.

모든 주요 품질 특성이 유지되며 필요한 규격을 충족함을 보장하기 위해 mRNA-지질나노입자의 무균 충전 공정을 적절히 밸리데이션 해야 한다. 용기 및 마개(그리고, 해당되는 경우, 전달 기기)를 구성하는 물질이 유전자치료제의 품질에 유해한 영향을 주지 않음을 보장하기 위해 주의를 기울여야 한다. 이를 위해, 최종 용기 및 마개 시스템에 대한 용기/마개 무결성 시험과 추출물 및/또는 용출물 평가는 일반적으로 용기의 적격성 입증에 위해 요구되며, 안정성 평가의 일부로서 필요할 수 있다.

다회 투여용량 유전자치료제 바이알을 사용하며 유전자치료제가 보존제를 함유하고 있지 않는 경우, 정해진 시간 내에 사용해야 한다. 또한, 다회 투여용량 용기(multi-dose container)는 개봉 후 내용물의 미생물 오염을 방지해야 한다. 제안한 용기-마개 시스템의 적합성을 증명하기 위하여 용기-마개 시스템에 대한 적절한 시뮬레이션 연구(예: 다회-천자(multi-puncture) 시험)가 필요할 수 있다. 다회 투여용량 바이알은 정확한 투약이 가능하도록 허용 가능한 과충전량과 함께, 라벨 표시량을 충족하도록 설계해야 한다. 다회 투여용량 유전자치료제 바이알은 바이알 무결성 손상의 위험 및 바이알 오염 가능성을 평가하기 위해 예상되는 최대 격막 천자(maximum septum puncture)에 대해 평가해야 한다. 다회 투여용량 바이알의 추출 가능 함량을 밸리데이션 해야 한다. 다회 투여용량 유전자치료제 바이알이 농축액으로 제공된다면, 제안한 재구성 용액을 사용하여 적합성(compatibility) 연구를 추가로 진행하며 적절한 회석 후 정치 시간을 확립해야 한다. 회석 전과 회석 후 규격을 설정하고 타당성을 입증해야 한다. 제조사는 적절한 보관 및 유통 조건 하에서 그리고 사용 중 제품의 안정성을 증명하는 적합한 자료를 식약처에 제공해야 한다.

최종 유전자치료제가 두 종류 이상의 mRNA를 함유하고 있다면(예 : 다가 유전자치료제 또는 별도의 mRNA들로 구성된 sa-mRNA), 이러한 최종 유전자치료제의 제조 시 추가적인 고려사항이 있을 수 있다. 이러한 고려 사항 중 하나는 각각의 발현을 최적화하기 위해 제형에서 각기 다른 mRNA의 적절한 비율을 보장하는 것이다(조합 또는 다가 유전자치료제의 경우). 다른 고려사항은 mRNA들을 지질나노입자 제형화 이전에 혼합할 것인지 아니면 각각의 mRNA를 지질나노입자로 봉입한 후에 mRNA-지질나노입자의 혼합물을 준비할 것인지가 될 것이다. 둘 중 어느 경우라도 선택한 접근법에 대해 기술해야 한다.

2.9.4. 최종 유전자치료제의 관리

최종 유전자치료제 각 로트에서 채취한 검체를 평가해야 한다. 모든 기준 및 시험법은 식약처의 승인이 필요하다. 제조사는 최종 유전자치료제에 관한 규격을 수립하고 근거를 제시해야 한다. 원칙적으로, 최종 규격은 임상 연구를 통해 성능이 허용 가능하다고 입증된 로트에 대한 시험 결과를 기반으로 정의해야 한다. 분석법 밸리데이션에 대한 정보를 포함하여 유전자치료제에 대한 분석법 및 허용 한도에 대해 기술해야 한다. 시험에는 확인, 순도, 함량, 안전성, 추가적 품질 파라미터, 역가에 대한 평가를 포함할 것을 권고한다. 개발 초기에는 규격이 제한적이며 허용기준이 다소 넓을 수 있으나, 제조공정 및 분석법에 대한 경험을 획득함에 따라, 적절한 경우, 이를 검토하고 강화해야 한다. 또한 요구된 유효기간을 증명하기 위해 안정성을 확립해야 한다.

상업적 규모로 생산한 모든 로트에 대한 시험 결과를 요약하여 제공해야 한다. 개발 초기에는 임상시험 승인을 뒷받침하기 위해, GMP를 준수하여 제조한 로트 시험의 결과와 가능한 경우, 제조 절차 확립을 위해 실시한 공정개발용 생산 로트의 제조에 대한 요약 정보를 제공해야 한다.

제품 개발 중 수행하는 모든 시험을 상업적 규모로 생산한 모든 유전자치료제 로트에 대해 실시할 필요는 없다. 앞서 '2.6. 제품 특성 분석', '2.7. 제조의 일관성'에서 논한 바와 같이, 일부 시험은 생산 방법 및 생산의 일관성을 확립하기 위하여 제한적인 일련의 배치에 대해 제품과 공정에 관한 지식을 획득하기 위한 목적으로서만 필요하다. 제조 일관성 확증을 위하여 최종 제형인 유전자치료제의 몇몇 연속 로트를 밸리데이션된 방법을 사용하여 시험하고 분석해야 한다. 한 로트와 다른 로트 간의 통계적으로 유의하거나 과학적으로 의미가 있는 차이에 주목하고 조사해야 한다. 다양한 로트를 사용한 임상시험 결과뿐 아니라, 이러한 연구에서 획득한 자료를, 제품과 공정에 대한 지식 그리고 특정한 속성의 변동에 대한 중요도(criticality) 평가와 더불어, 일상적인 로트 출하를 위해 사용되는 유전자치료제 규격 및 허용기준을 정의하기 위한 기반으로 사용해야 한다. 그러므로 mRNA 유전자치료제의 확인 및 순도, 농도/분량/함량, 안전성, 추가적 품질 파라미터, 역가, 안정성과 관련하여 일관성 확립을 위해 초기 상업적 생산 로트에 대한 광범위한 분석을 실시해야 하지만, 식약처가 동의한다면, 이후에는 보다 제한적인 일련의 시험이 적절할 수 있다.

최종 유전자치료제가 두 종 이상의 mRNA를 함유하고 있다면(예: 다가 유전자치료제 또는 별도의 mRNA들로 구성된 sa-mRNA), 이 최종 유전자치료제의 제조 시 추가적인 고려사항이 있을 수 있다. 이러한 고려사항 중 일부는, 예를 들어, mRNA들을 혼합물로서 함께 봉입했는가 또는 개별적으로 봉입한 후 각각의 mRNA-지질나노입자를 혼합하였는가와 같이, 제조 시 취한 접근법을 기반으로 할 것이다. 이것은 이후 지질 나노입자 크기 및 전하, 다분산도에 영향을 줄 수 있다. 추가로, 혼합(mixing)의 일관성 밸리데이션은 각 용량에 각각의 mRNA가 적절한 비율로 함유되어 있는가를 확인하는 데

대단히 중요하다. 총 mRNA 함량은 용량 설정의 기반이 되므로, 최종 유전자치료제의 전체 mRNA 함량 중 적절한 비율을 확인하는 것은 대단히 중요하다. 확인 시험에서는 제조소에서 제조한 다른 제품으로부터 이 유전자치료제를 구별하는 한편, 각각의 mRNA가 포함되었는가를 다루어야 한다. 한 가지 원료의약품이나 구성성분(예 : replicon을 코딩하는 mRNA)이 이 제조소에서 생산하는 두 가지 이상의 유전자치료제나 제품에 사용된다면, 확인 시험은 혼동을 방지하기 위해 대단히 중요하다.

제조 일관성에 대한 경험을 획득함에 따라, 허가 후 변경 시에는 공정 밸리데이션, 제품 특성 분석 및/또는 비교동등성 시험계획서를 사용하여 필요한 시험 및 보조자료 축소를 허용하게 될 수도 있다.

2.9.4.1. 확인

각 유전자치료제 로트는 최종 제품의 확인 그리고 동일 시설에서 제조했거나 동일 장비를 이용해 제조한 다른 제품으로부터의 구분을 위해 적절한 시험을 거쳐야 한다. 유전자치료제에 2개 이상의 mRNA가 포함되어 있는 경우(예: sa-mRNA, 혼합 또는 다가 유전자치료제), 각 mRNA의 식별을 확인해야 한다. 염기서열 분석을 통한 확인을 고려해야 한다.

2.9.4.2. 순도 및 불순물

최종 유전자치료제의 각 로트의 순도를 평가하고 명시한 한도 내에 있음을 증명해야 한다. 전달 시스템의 구성성분에서 기인하는 잠재적 불순물 그리고 최종 유전자치료제의 산화 및 분해에서 유래하는 불순물의 관리 측면에 대해 고려해야 한다. 모든 불순물을 검출하려면 단회 시험으로는 충분하지 않을 것이다. mRNA 완전성 및 입자크기, 지질/폴리머 불순물, 지질나노입자로 봉입한 mRNA의 비율/효율에 관한 시험을 고려해야 한다. 품목허가 신청 시에는 용기-마개 시스템의 적합성 그리고 용출물 및 추출물에 대한 평가와 논의가 필요하다('2.8.1.2. 순도 및 불순물' 참조). 유전자치료제에 하나 이상의 mRNA(예: sa-mRNA, 혼합 또는 다가 유전자치료제)가 포함된 경우, 각 mRNA의 함량 및 각 mRNA에 대한 비율이 의도한 대로이고 총 mRNA 용량을 초과하지 않았는지 확인해야 한다.

2.9.4.3. 함량 또는 농도

mRNA 유전자치료제는 무게 단위의 mRNA 함량을 기반으로 투여 용량을 산출한다. 따라서 역가 평가에 추가로 mRNA의 정량화 방법에 대해 기술해야 한다.

2.9.4.4. 안전성 특성

각 유전자치료제 로트에 대하여 세균 및 진균 무균시험(시험물질의 발육저지 활성이 없음을 포함)을 수행해야 한다. 유전자치료제를 비경구 외(non-parenteral)로 투여하는 경우, 무균시험 생략 및 적절한 대체 미생물 한도 시험 포함에 대해 적절한 근거 제시가 필요하다. 더 나아가, 엔도톡신 시험을 각 로트에 대하여 실시하고, 적절한 규격을 설정해야 한다. 식약처가 요구한다면 발열성 시험을 수행할 수 있다(단핵구활성시험(monocyte activation test)일 수 있음). 그러나 실시 및 허용 가능한 납득할 만한 대체 시험이 있는 경우라면 언제나 동물시험을 피해야 한다. 과학 및 윤리적 이유로, 시험 시 동물 사용을 최소화하기 위해 “대체, 감소, 개선”의 3R 원칙을 적용하는 것이 바람직하며, 안전성 평가 그리고 기타 제품 시험을 위해서도 적절한 *in vitro* 대체 시험법의 사용을 고려해야 한다.

2.9.4.5. 추가적인 품질 파라미터

다른 중요한 품질 파라미터 또한 확립하고 관리해야 한다. 여기에는 성장(불용성 이물 및 불용성 미립자 두 가지 존재를 모두 포함) 및 추출 가능 용량, pH를 포함할 수 있다. 제품 특성에 따라, 삼투압 농도(osmolality) 또는 점성도(viscosity) 역시 중요할 수 있다. 최종 유전자치료제(완제의약품)의 경우, 추가적인 파라미터에는 지질/폴리머 확인(identification) 및 함량, mRNA-지질나노입자 비율, 다분산도 지수(polydispersity index)가 포함된다.

나노입자 크기와 관련하여, 나노입자-기반 유전자치료제의 관리와 유사하게 다지점 관리사항(multiple point control)을 채택하고, 입자크기 측정을 위해 사용하는 시험은 채택한 분석법에 따라 그 결과가 달라지므로 명시가 필요하다. 비봉입 mRNA는 불안정하다고 간주하기 때문에, 지질나노입자를 사용한 mRNA의 봉입 정도 역시 주요 품질 특성으로 간주해야 한다. 최종 제품의 구조가 동결-해동 및 희석으로 인해 변경되지 않음을 입증해야 한다. 순도나 확인을 위해 이미 수행 중인 겔 또는 모세관 전기영동 및/또는 HPLC와 같은 기법이 일부 품질 기준 평가 시 유용할 수 있다.

제형화 뿐만 아니라 제품의 물리적 특성을 확인하기 위해 다른 시험이 필요할 수 있다 (예: 유전자치료제를 동결건조한다면, 잔여 수분에 관한 시험). 제품의 확인된 주요 품질 특성에 대한 관리를 보장하기 위하여, 사용되는 분석법의 밸리데이션에 대해 기술해야 한다.

2.9.4.6. 역가

적절히 정량적이며 밸리데이션된 기능적 방법(functional method)을 사용하여 최종

유전자치료제의 각 로트의 역가를 결정해야 한다. 질환 특이적일 수 있는 (기능성을 포함한) 역가의 다양한 측면을 관리하기 위해 서로 다른 시험들이 필요할 수 있다. 환자에 대한 효능은 (self-amplifying replicon 구성성분 포함이 가능한) mRNA로 코딩된 단백질의 발현뿐만 아니라 유전자치료제 제형화를 통한 표적 세포로의 전달을 포함하여, 최종 유전자치료제 특성들의 복합적인 기능이다. 따라서, 잠재적인 *in vitro* 역가 분석시험에는 세포-기반 형질주입(transfection) 시스템 또는 무세포 분석(cell-free assay)을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 정확히 확인된(correct identity) 올바른 크기의 단백질이 mRNA로부터 발현되었음을 증명해 줄 것이다. 그러나 역가는 제품 종류(이 경우에는 mRNA 유전자치료제)뿐 아니라 치료하고자 하는 질환의 임상 적응증을 기반으로 분석해야 하므로, 역가를 측정하기 위해 사용해야 하는 특정 분석시험을 지정하는 것은 가능하지 않다. 제품 관리를 위해 선택한 역가 시험에 대하여 과학적 근거와 임상 결과 및 모든 품질 검사항목과의 상관관계를 제시해야 한다. 새로운 질환에 대한 신규 후보 유전자치료제를 개발하는 경우, 역가시험이 질환 변경에 대해 유효한지에 대해 확실히 확인하여야 한다.

mRNA에 대한 역가 규격은, 임상시험에서 유효성 증명을 위해 사용하는 최소 용량에 인체 효력시험 자료를 추가하여, 이를 기반으로 설정해야 한다. 사용 가능한 인체 안전성 자료를 기반으로 상한(upper limit) 또한 정의해야 한다.

동물-기반 분석시험은 변동성이 높으며 밸리데이션이 어려운 경향이 있다. 시험 시 동물 사용을 최소화하기 위해 “대체, 감소, 개선”의 3R 원칙을 적용하는 것이 또한 바람직하다. 따라서 역가시험을 위해서 적절한 *in vitro* 대체 시험법의 사용을 고려해야 한다. 플라스미드 DNA 기반 유전자치료제과 마찬가지로, mRNA 기반 유전자치료제의 역가 확립 및 모니터링을 위하여 생화학 또는 생물물리학적 척도들(measure)(예: 핵산 함량, mRNA 완전성 및 유전자 서열)을 조합하여 사용할 수도 있을 것이라 예측된다. 제조사는 적절하게 정량적이며 기능을 측정하는 *in vitro* 분석시험의 실시를 목표로 노력할 것을 권장한다. 그러나 이러한 척도는 mRNA에만 해당되며, 제형 및 다른 첨가제 등의 영향에 대해서는 설명하지 못한다는 점을 인정해야 하며, 따라서 mRNA 유전자치료제의 역가 평가는 사례별로 고려해야 할 것이다. 그러므로, 적절한 역가 척도에 대해 논의하고 식약처의 동의를 구할 것을 권한다.

2.9.4.7. 표준물질

임상적으로 평가한 적합한 최종 유전자치료제 로트를 화학적 조성 및 순도, 생물학적 활성, 전체 서열과 관련하여 완전히 특성을 분석하고, 내부 표준물질로 사용하기 위해 보관해야 한다. 이 물질을 상업적 생산 로트에 대한 품질관리 평가의 기반으로 사용해야 한다.

2.9.4.8. 안정성 시험, 보관 및 유효기간

각각의 mRNA에 대하여 ‘의약품 등의 안전에 관한 규칙’의 ‘[별표 1] 의약품 제조 및 품질관리기준’, ‘[별표 3] 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준’, ‘생물의약품 안정성 시험 가이드라인(식약처, 2015)’에서 제시하는 적합한 관련 지침을 적용해야 한다.

2.9.4.8.1. 안정성

적절한 안정성 연구는 유전자치료제 개발의 핵심적 부분을 구성한다. 상업적 사용을 보장하기 위해, 사용을 제안한 용기에 담긴 최종 제품의 안정성을 측정하고, 그 결과를 적절한 보관 조건 하에서의 유효기간 설정에 사용해야 한다. 안정성을 지시해 줄 수 있는(stability-indicating) 파라미터를 측정해야 하며, 여기에는 성장(불용성 이물 및 불용성 미립자 포함) 및 mRNA 함량, 유전자치료제 역가, mRNA 완전성, 봉입 정도, 입자크기, 다분산도, mRNA 및 지질과 관련된 불순물이 포함될 수 있다. 측정할 파라미터에 대해 설명하고 규격을 설정하며 근거를 제시해야 한다. 높은 온도에서의 가속 안정성 연구(accelerated stability study)는 제품의 안정성에 대하여 보완하는 추가적인 보조자료를 제공하고, 안정성 측정을 위해 채택한 분석시험이 안정성을 지시해주는 특성을 확인할 수 있으나, 앞서 설명한 목적으로 실시간 안정성 연구를 수행해야 한다. 동결 이상의 온도에서 장기간(예 : 6개월 이상) 보관하는 것이 고려되는 경우, 잠재적인 지질 산화 또는 기타 그러한 변화와 이러한 변화가 효능에 미치는 결과적인 영향을 처리하기 위한 추가 분석 방법을 포함해야 할 수 있다. 추가로, 유효기간을 뒷받침하기 위해 플랫폼 자료뿐 아니라 가속 및 가혹시험(stress testing) 자료를 고려할 수 있다. 고온에서의 단기 보관 및 조제 시 안정성에 관한 자료와 같이 임상적 사용을 뒷받침해주는 안정성 자료를 생성해야 한다. 다회 투여용량 바이알의 경우, 요구되는, 사용 중 조건 하에서의 유전자치료제의 미생물 품질 및 안정성을 보장하기 위하여, 사용 중 안정성 (in-use stability) 자료가 필요할 것이다.

초기 임상 개발 중에는, 안정성 정보가 제한적일 것으로 예상된다. 예를 들면, 임상 시험 승인 신청 시점에서 일부 심사자는 임상시험에서 사용될 용기에서 제안한 임상 시험에서 사용할 최종 유전자치료제의 로트 또는 동일한 용기 타입 및 크기에 있어서 이와 동일한 방식으로 제조하였으며 동일 규격을 충족하는 로트의 3개월 실시간 안정성을 수용하지만, 이에 대해 식약처의 동의가 필요하다. 가속 안정성 평가 프로그램을 활용한 예측 안정성 모델링의 결과로써 초기 임상 개발을 뒷받침할 수도 있다. 마찬가지로 플랫폼 기술에 대한 안정성 데이터는 해당 플랫폼을 기반으로 하는 새로운 후보 유전자 치료제를 뒷받침할 수 있다.

장기 보관을 위해 초저온(deep-freeze) 조건을 권고한다면, 유전자치료제의 유통 및 조제를 뒷받침하기 위해 대체 단기 보관 조건(예: 냉동 및/또는 냉장)을 탐색해야 한다.

이와 유사하게, 온도 일탈(temperature excursion) 연구 또는 운송 시뮬레이션 연구도 권고한다. 보관 안정성과 용기-마개 시스템의 적합성(예: 용출물 및 추출물 관련 적합성 포함)을 평가하고 논해야 한다. 안정성 평가는 ‘생물의약품 안정성 시험 가이드라인(2015)’를 준수해야 하며 ‘생물의약품의 안정성 시험 기준 질의응답집(2020)’을 참고할 수 있다. 열 안정성이 더 높은 유전자치료제 제형화 개발을 고려해야 한다.

2.9.4.8.2. 보관조건

보관조건을 밸리데이션 해야 한다. 유전자치료제는 제조시설에서 유통을 개시하기 전 또는 보관시설에서 출하하기 전에, 유전자치료제 제조사가 역가의 최소 손실에 적합하다고 증명한 기간 및 온도를 상회하는 조건에서 보관해서는 안 된다. 최대 보관 기간은 안정성 연구 결과를 기반으로 식약처의 승인을 받아 확정해야 하며, 용기 및 포장에 명시한 최소 역가를 포함하여, 최종 제품에 대한 모든 품질 규격이 유효기간 만료 시까지 유지됨을 보장할 수 있도록 해야 한다.

2.9.4.8.3. 유효기간

유효기간은 실시간 안정성 연구가 뒷받침하는 최종 용기의 유효기간(shelf-life)을 기반으로 정의해야 하고 식약처의 승인을 받아야 한다. 유효일자는, 해당되는 경우, 최종 제형화 원액의 혼합 일자 또는 충전 일자, 최종 로트에 대한 최초의 유효한 역가시험 일자를 기반으로 해야 하며, 식약처의 동의가 필요하다.

2.10. 기록

후보 유전자치료제의 개발 단계에 맞추어 ‘의약품 제조 및 품질관리기준’, ‘생물학적 제제등 제조 및 품질관리기준’, ‘임상시험용의약품 제조 및 품질관리 기준’에서 제시하는 관련 권고사항을 적용해야 한다.

2.11. 보관검체

향후 연구 및 필요에 대비하여 충분한 수의 검체를 보관해야 한다. 보관 검체가 필요한 경우로는 제조와 관련된 연구 및 개발, 비임상 연구, 향후 가교 임상시험이 포함되나 이에 국한되지 않는다. 핵심 임상시험에서 사용한 유전자치료제 로트는 표준물질로서 사용이 가능하며, 이러한 목적으로 충분한 수의 바이알을 적절히 비축 및 보관해야 한다. 적당한 수의 핵심 임상시험 로트의 용기를 보유할 수 있도록 사전 계획이 필요하다.

[참고문헌]

1. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics – developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(10):759–80 (abstract: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25233993/>, accessed 15 June 2021).
2. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465–8.
3. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018 Apr;17(4):261–79.
4. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2008;10 Nov;16(11):1833–40.
5. Thess A, Grund S, Mui BL, Hope MJ, Baumhof P, Fotin-Mleczek M, et al. Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2015 Sep;23(9):1456–1464.
6. Zhong Z, McCafferty S, Combes F, Huysmans H, De Temmerman J, Gitsels A, et al. mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano Today [Internet].* 2018 Dec 1 [cited 2021 May 1];23:16–39. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013218301099>
7. Lundstrom K. Nanoparticle-based delivery of self-amplifying RNA. *Gene Ther.* 2020 May;27(5):183–5.
8. Bertrand N, Leroux J-C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2012 Jul 20;161(2):152–63.
9. Sedic M, Senn JJ, Lynn A, Laska M, Smith M, Platz SJ, et al. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Vet Pathol.* 2018 Mar;55(2):341–54.
10. Li S-D, Huang L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol Pharm [Internet].* 2008 Aug 1 [cited 2021 May 1];5(4):496–504. Available from: <https://doi.org/10.1021/mp800049w>
11. Mui BL, Tam YK, Jayaraman M, Ansell SM, Du X, Tam YYC, et al. Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013 Dec 17;2:e139.
12. Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Res Pharm Sci.* 2018 Aug;13(4):288–303.
13. Guevara ML, Persano F, Persano S. Advances in Lipid Nanoparticles for mRNA-Based Cancer Immunotherapy. *Front Chem.* 2020;8:589959.
14. Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, Lee A, Woods A, Yuzhakov O, et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Apr 15;15:1–11.
15. Buschmann MD, Carrasco MJ, Alishetty S, Paige M, Alameh MG, Weissman D. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines.* 2021 Jan 19;9(1).

16. Alfagih IM, Aldosari B, AlQuadeib B, Almurshedi A, Alfagih MM. Nanoparticles as Adjuvants and Nanodelivery Systems for mRNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Jan [cited 2021 May 1];13(1):45. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/1/45>
17. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(26):6867-75.
18. Pizzuto M, Bigey P, Lachagès A-M, Hoffmann C, Ruyschaert J-M, Escriou V, et al. Cationic lipids as one-component vaccine adjuvants: A promising alternative to alum. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2018 Oct 10;287:67-77.
19. Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther*. 2020 Oct 22;49.
20. Guidance on the Use of International Nonproprietary Names(INNs) for Pharmaceutical Substances https://www.who.int/medicines/services/inn/FINAL_WHO_PHARM_S_NOM_1570_web.pdf?ua=1 accessed June 1, 2021
21. Robertson JS, Chui W-K, Genazzani AA, Malan SF, López de la Rica Manjavacas A, Mignot G, et al. The INN global nomenclature of biological medicines: A continuous challenge. *Biologicals* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 May 1];60:15-23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104510561930048X>
22. Arbuthnot P, Ely A, Bloom K. A convenient method to generate and maintain poly(A)-encoding DNA sequences required for in vitro transcription of mRNA. *BioTechniques*. 2019 Jan;66(1):37-9.
23. Trepotec Z, Geiger J, Plank C, Aneja M, and Rudolph C. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life. *RNA* 2020, 25:507-518. <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.069286.118>.
24. Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W, Mastrobattista E. Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *J Pharm Sci* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited WHO/BS/2021.2402 2021 Feb 19];110(3):997-1001. Available from:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354920307851>
25. Muralidhara BK, Baid R, Bishop SM, Huang M, Wang W, Nema S. Critical considerations for developing nucleic acid macromolecule based drug products. *Drug Discov Today*. 2016 Mar;21(3):430-44.
26. Poveda C, Biter AB, Bottazzi ME, Strych U. Establishing Preferred Product Characterization for the Evaluation of RNA Vaccine Antigens. *Vaccines*. 2019 Sep 27;7(4).
27. ICH Q3C(R6). Impurities: guideline for residual solvents. 2016. https://database.ich.org/sites/default/files/Q3C-R6_Guideline_ErrorCorrection_2019_0410_0.pdf
28. ICH Q3D(R1). Guideline for elemental impurities. 2019. https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R1EWG_Document_Step4_Guideline_2019_0322.pdf
29. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. 2012. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use-step_en.pdf, accessed 27 June 2021



mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인 (민원인 안내서)

발 행 일 2022월 8월

발 행 인 서경원

편집위원장 박인숙

편 집 위 원 오일웅 양성준 강진욱 최경숙 박정연

박송희 백정희 전설희 박지원 유혜선 이재린 한덕희 안난영

홍영기 류정임 유지수

도움주신 분 강태진(레나임), 김학균(국립암센터), 김현진(인하대),

남재환(가톨릭대), 박기량(씨드모젠), 백순명(테라젠바이오),

양주성(에스티팜), 이혁진(이화여대)

발 행 처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료제과



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원