

생명과학의 세계 · 8주차

mRNA 치료제와 전달 시스템

mRNA Therapeutics and its Delivery Systems (1)~(4) 통합 정리

이규리 교수 (고려대 바이오시스템의과학부)

(1) RNA 치료제 개요

(2) mRNA 백신과 면역

(3) mRNA 생산과 최적화

(4) 지질나노입자(LNP)

강의 (1) RNA 치료제의 기본 개념과 종류

학습목표: RNA 치료제의 기본 개념 이해 · RNA 기반 치료제의 종류 구분 · 실제 사례 살펴보기

1-1 바이오의약품과 제약 산업의 흐름 BioPharmaceuticals

바이오의약품	무엇을 약으로 쓰나	예
단백질 치료제 (Protein)	단백질 자체	항체, 인슐린, 호르몬
유전자 치료제 (Gene)	DNA-RNA 등 유전물질	mRNA, siRNA, ASO
세포 치료제 (Cell)	살아 있는 세포	줄기세포, CAR-T 세포

- 시장 점유율 추이: **화학합성의약품(chemical drugs)**은 서서히 줄고, **바이오의약품**은 1990년대부터 늘어 2020년 무렵 역전
- 1990년대 성장의 주역은 **단백질 치료제(항체)**, 2000~2010년 이후에는 **유전자·세포 치료제**가 가파르게 성장 (점선)

1-2 RNA 치료제의 두 목표 – 켜기와 끄기 Gene "ON" / Gene "OFF"

Aim 1. 유전자 발현 도구 → Gene "ON"

- **pDNA** (플라스미드 DNA): 원형 DNA
- **mRNA**: 5' cap ... poly(A) 꼬리(AAA)를 가진 선형 RNA

없는 단백질을 새로 만들게 함

Aim 2. 유전자 억제 도구 → Gene "OFF"

- **ASO** (안티센스 올리고뉴클레오타이드)
- **siRNA** (작은 간섭 RNA)
- **CRISPR-Cas9** (가이드 RNA + 절단 효소)

해로운 유전자의 발현을 막음

+ 보충

pDNA보다 mRNA가 유리한 점

- pDNA는 핵 안까지 들어가야 전사될 수 있음 → 분열하지 않는 세포에서 효율이 낮고, 드물게 숙주 유전체에 끼어들 위험이 있음
- mRNA는 세포질에 도착하면 바로 리보솜이 번역함 → 핵에 들어가지 않으므로 유전체를 바꾸지 않고, 며칠 뒤 분해되어 효과가 일시적임
- CRISPR-Cas9은 RNA(가이드 RNA)가 길잡이 역할을 하지만 실제로는 DNA를 자르는 유전자 편집 도구라는 점에서 나머지와 다름

1-3 RNA 치료제 4종의 작동 방식 RNA Therapeutics

종류	구조	작동 방식	결과
A. ASO (안티센스 RNA)	단일가닥	mRNA에 상보적으로 결합 → 스플라이싱 조절 또는 분해 유도	분해 촉진 / 번역 억제 (Gene OFF)
B. siRNA (RNAi)	이중가닥	RISC에 실린 뒤 가닥 분리 → 표적 mRNA를 절단	
miRNA (RNAi)	이중가닥 유래	부분 결합으로 여러 mRNA 억제 (7주차 1-6)	분해 / 번역 억제
C. RNA 앵타머	입체 구조	단백질(수용체)에 항체처럼 결합해 기능·신호 전달을 막음	단백질 기능 차단
D. mRNA	단일가닥, cap·poly(A)	세포 안에서 단백질로 번역	단백질·항원 발현 (Gene ON)

- mRNA 플랫폼의 세 갈래: mRNA 치료제, mRNA 기반 세포치료, mRNA 백신

1-4 RNA를 세포 안으로 - 전달 경로 RNA Delivery

형태	들어가는 길
Naked RNA (아무것도 씌우지 않은 RNA)	막을 직접 통과?(direct translocation?) - 교안도 물음표로 됨. 실제로는 거의 못 들어감
나노입자 (Nanoparticle)	RNA를 입자에 싸서 세포내 섭취(endocytosis)로 들어감
접합체 (Conjugate)	RNA에 특정 수용체가 알아보는 분자를 붙여 수용체 매개 세포내 섭취로 들어감

+ 보충

2주차 "방과 문" 비유로 보는 RNA 전달의 어려움

- RNA는 크고 음전하를 띤 극성 분자 → 인지질 이중층을 스스로 통과하지 못함 (2주차 규칙 1 "문이 없으면 못 들어감")
- 게다가 혈액·조직에 RNA 분해효소(RNase)가 많아 맨몸으로는 금방 분해됨
- 그래서 2주차 2-8에서 배운 세포내 섭취를 이용해 "막째로" 들여보내는 전략을 씀 → (4)강의 LNP가 그 대표
- 접합체 예: 간세포 수용체가 알아보는 당(GalNAc)을 붙인 siRNA는 피하주사만으로 간에 잘 전달됨

1-5 실제 RNA 치료제 사례 Real-world examples

승인된 대표 약 (교안 표 발체)

약 (제품명)	종류	투여 경로	질환	상태 (교안)
Nusinersen (Spinraza)	ASO	척수강 내	척수성 근위축증(SMA)	FDA 2016
Eteplirsen (Exondys 51)	ASO	정맥	뒤센 근이영양증	FDA 2016
Inotersen (Tegsedi)	ASO	피하	가족성 아밀로이드 다발신경병증	FDA 2016 → 실제 2018
Volanesorsen (Waylivra)	ASO	피하	가족성 킬로미크론혈증 증후군	EU 2019
Patisiran (Onpattro)	siRNA	정맥	다발신경병증	FDA 2018
Givosiran (Givlaari)	siRNA	피하	급성 간성 포르피린증	FDA 2019
Pegaptanib (Macugen)	RNA 앵타머	유리체 내	황반변성	FDA 2014 → 실제 2004
BNT162b2 (화이자·바이오엔텍)	mRNA	근육	코로나19	FDA 긴급사용 2020
mRNA-1273 (모더나)	mRNA	근육	코로나19	FDA 긴급사용 2020

임상 단계 후보 - 눈여겨볼 패턴

- **miRNA 치료제**(miRagen): Cobomarsen(혈액암), Remlarsen(켈로이드), MRG-110(조직 재생) – 2상 이하
- **mRNA**는 대상이 가장 넓음: 감염병 백신(코로나19, 거대세포바이러스, 지카, 광견병, 치쿤구니아), **암**(흑색종, 폐암, 고형암 – 종양 내 주사도 많음), 희귀 대사질환(메틸말론산혈증, 요소회로 이상), 낭포성 섬유증(흡입), 허혈성 심장병(심외막 주사)
- 투여 경로가 질환 부위에 맞춰 다양함: 척수강·유리체·종양 내·흡입 등 → 전달이 RNA 약의 핵심 과제임을 보여 줌

+ 보충

교안 표 이후 바뀐 것 (2026년 기준)

- BNT162b2(코미나티)는 2021년 8월, mRNA-1273(스파이크박스)은 2022년 1월 FDA 정식 승인을 받음
- CureVac의 CVnCoV는 3상에서 예방 효과가 기대에 못 미쳐(약 48%) 2021년 개발이 중단됨
- 모더나 mRNA-4157(개인 맞춤 암 백신)은 이후 3상으로 진입함 → 2-6 참고
- 교안 표의 임상 단계는 자료 작성 시점 기준이므로 최신 상태와 다를 수 있음

강의 (1) 학습정리

- 제약 산업은 전통적 화학의약품에서 첨단 바이오의약품으로 옮겨가고 있으며, RNA가 중심 역할을 함
- RNA 약은 유전자 발현을 "켜거나"(mRNA) 해로운 유전자를 "꺼서"(ASO, siRNA, miRNA) 병을 치료함

강의 (2) mRNA 백신과 면역

학습목표: mRNA 백신이 면역계를 "가르치는" 원리 설명 · 면역의 기본 개념 이해 · mRNA를 이용한 암 치료의 미래 탐색

2-1 siRNA와 mRNA의 구조 siRNA for inhibition / mRNA for expression

siRNA – 유전자 억제

siRNA (21 nt 이중가닥) → RISC에 실림 → 가닥 풀림(unwinding) → 표적 mRNA-siRNA 복합체 →

mRNA 절단

- RNA 간섭(RNAi)을 발견한 앤드루 파이어·크레이그 멜로 → 2006년 노벨 생리의학상

mRNA – 유전자 발현 (mRNA construct → 암호화된 단백질)

부위 (5'→3')	역할
5' Cap	리보솜이 붙는 표지. 분해효소로부터 앞쪽 끝을 보호
5' UTR	번역 시작 효율 조절
ORF (open reading frame)	실제 단백질 정보가 담긴 부분
3' UTR	mRNA 안정성·수명 조절
Poly(A) tail	A가 길게 이어진 꼬리. 분해를 늦추고 번역을 도움

2-2 mRNA의 응용 – 단백질 대체와 백신 Applications of mRNA

① 단백질 대체 요법

몸에 없거나 모자란 단백질의 mRNA를 넣어 세포가 직접 만들게 함. 만들어진 단백질은 세 가지로 쓰임

- 분비 단백질 (세포 밖으로)
- 막관통 단백질 (세포막에 박힘)
- 세포내 단백질 (세포 안에서 작용)

② 백신 개발

mRNA를 면역세포(대식세포, 수지상세포)에 전달해 항원을 만들게 함

- 예방 백신 (prophylactic): 감염 전에 면역 기억을 만듦 – 코로나19
- 치료 백신 (therapeutic): 이미 생긴 병(암)을 공격하게 함

암 면역치료에서 mRNA의 4가지 쓰임 (교안 원형 그림)

사분면	내용
항원 제시 (APC)	mRNA로 만든 항원 조각을 MHC I-II에 실어 T세포에 보여 줌

사분면	내용
보조제 기능 (APC)	mRNA 자체가 TLR3/7/8, RIG-I/MDA5를 자극해 면역을 깨움
단백질 생산	항체, 사이토카인·케모카인, 공동자극 리간드 등을 몸 안에서 만들게 함
항원 수용체 (림프구)	T세포에 CAR, TCR을 발현시켜 암을 알아보게 함

2-3 코로나19 mRNA 백신의 작동 과정 mRNA Vaccine for COVID-19

단계	근육세포 또는 항원제시세포 안에서 일어나는 일
1	지질나노입자(LNP)+mRNA 복합체가 세포에 다가감 (transfection)
2	세포내 섭취 (endocytosis)로 엔도솜 안에 들어감
3	mRNA가 엔도솜에서 빠져나와 세포질로 이동 (일부는 세포 안에서 분해)
4	리보솜이 번역 → 바이러스 스파이크 단백질 생성
4a → 5a	일부는 프로테아솜이 잘게 분해 → MHC I 에 실려 세포 표면에 제시 (근육세포)
4b → 5b	일부는 소포체·골지체를 거쳐 세포 밖으로 분비
6b	분비된 스파이크를 항원제시세포가 다시 받아 MHC II 로 제시
7	면역세포(T세포·B세포)가 제시된 항원을 보고 학습 → 항체·기억 형성

정리 ▪ mRNA는 바이러스 전체가 아니라 "스파이크 단백질 설계도"만 줌. 세포가 직접 만든 스파이크를 보고 면역계가 미리 연습하는 원리임

- 교안의 특허 네트워크 그림: 모더나·바이오엔텍·큐어백 주위에 UPenn(변형 뉴클레오사이드), Acuitas·Arbutus·Genevant(LNP), NIH(스파이크 단백질) 등이 라이선스·소송으로 얽혀 있음 → mRNA 백신은 **mRNA 기술 + 전달(LNP) 기술**의 결합임

2-4 면역의 기초와 암 면역치료 Basic immunity · Cancer immunotherapy

암 면역치료의 두 열쇠

항원제시세포(APC) → (1) 항원 제시 → T세포 → (2) 면역 활성화 → 공격 → 암세포 (같은 항원)

- 보조제(adjuvant)**: 선천면역 수용체(예: TLR)를 자극해 면역반응을 키움 → APC가 사이토카인을 내고, T_H1(세포성 면역: 대식세포·NK·CTL) 또는 T_H2(체액성 면역: B세포·중화항체)로 이어짐

면역치료란 (What is Immunotherapy?)

- 몸 자신의 면역계를 이용해 암을 공격하는 치료
- 치료가 끝나도 **면역 기억(memory)** 덕분에 효과가 오래가고 **전이를 억제**함

- 종류: ① 단일클론항체(mAbs) ② 비특이적 면역 자극 ③ 암 백신 ④ 면역관문 억제제 ⑤ 입양 T세포 전달(T세포 치료)

종양 면역감사의 발견

- 맥팔레인 버넷(Burnet)이 제안: 면역계는 늘 몸을 "스캔"하며 새로 생긴 악성 세포를 찾아 없앴 = **면역감시 (immune surveillance)**
- 근거 실험: 방사선으로 죽인 종양 X 세포로 생쥐를 면역 → 살아 있는 종양 X는 거부, 다른 종양 Y는 거부 못함 → 면역이 **종양마다 고유한 항원**을 알아봄

암 면역편집의 3E (cancer immunoediting)

단계	상태
제거 (Elimination)	면역계가 암세포를 없앴 - 면역감시
평형 (Equilibrium)	면역계가 암세포를 억눌러 둠 - 암이 숨어 지속
회피 (Escape)	암세포가 MHC를 줄이거나 억제 신호를 내 면역을 피함 - 암 진행

+ 보충

버넷-메다워의 노벨상은 무엇이었나

- 두 사람은 **1960년 노벨 생리의학상**을 받았는데, 수상 이유는 "후천성 면역 관용"의 발견임 (면역계가 자기를 공격하지 않도록 배우는 원리)
- 면역감시 가설은 버넷이 그 뒤 따로 제안한 것이며, 3E 면역편집 개념은 2000년대 Dunn-Schreiber 등이 정리함

2-5 면역관문 억제제 - CTLA-4, PD-1 Immune checkpoint inhibitors

암은 T세포의 "브레이크(면역관문)"를 밟아 공격을 피함 → 브레이크를 항체로 막아 T세포를 다시 움직이게 하는 것이 면역관문 억제제임.

CTLA-4 (림프절)

- T세포 활성화에는 신호 두 개가 필요
 - **신호 1**: TCR이 MHC 위 항원을 인식
 - **신호 2**: CD28이 수지상세포의 B7에 결합
- CTLA-4가 B7을 가로채면 신호 2가 막혀 T세포 활성화 억제
- **항-CTLA-4 항체**(이필리무맙) → T세포 활성화 허용

PD-1 (종양 환경)

- T세포가 **PD-1** 수용체를 가짐
- 암세포의 **PD-L1**(리간드)이 PD-1에 붙으면 TCR 신호가 막혀 T세포 활성화 억제
- **항-PD-1 항체**(펌브롤리주맙, 니볼루맙) 또는 항-PD-L1 항체 → T세포 활성화 허용

- PD-1을 발견한 **혼조 다스쿠**, CTLA-4 차단 효과를 밝힌 **제임스 앨리슨** → **2018년 노벨 생리의학상**

+ 보충

교안 라벨 "PD-1 checkpoint: Priming T cells"

- CTLA-4는 림프절에서 T세포가 처음 활성화되는 **점화(priming) 단계**를 조절함
- PD-1은 주로 이미 활성화된 T세포가 **종양 조직에서 공격하는 단계**를 억제함 (교안 본문 설명 "T-cell activation in Tumor environment"가 이 뜻)
- 그래서 두 약을 함께 쓰면 서로 다른 단계의 브레이크를 동시에 푸는 효과가 있음

2-6 mRNA 암 백신 mRNAs for Cancer Vaccine

공유 암 항원 (Shared)

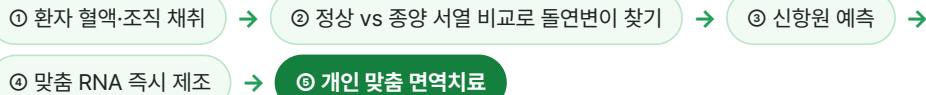
같은 암이면 여러 환자가 공통으로 가진 항원 →
기성품처럼 만들 수 있음

- BioNTech BNT111(흑색종),
BNT112(전립선암), BNT113(HPV16+
두경부암), BNT114(삼중음성 유방암),
BNT115(난소암)
- CureVac CV9202(비소세포폐암)

개인 맞춤 신항원 (Individualized neoantigen)

환자 암세포에만 생긴 돌연변이 항원 → 환자마다
따로 제작

- BioNTech + Genentech iNeST:
BNT122(흑색종)
- Moderna mRNA-4157(고형암)



정리 ▪ ②번의 "정상 vs 종양 서열 비교"는 7주차 NGS, ③번 예측은 7주차 빅데이터·AI임. 개인 맞춤 암 백신은 두 주차
내용이 합쳐진 결과물임

mRNA가 암 면역치료에 좋은 이유

- **면역 자극(Immune stimulation)**: mRNA 자체가 엔도솜 TLR7/8·TLR3, 세포질 RIG-I/MDA5를 자극해 제1형 인터페론 → 수지상세포 성숙 (**자가 보조제 효과**)
- **항원 제시(Antigen presentation)**: 세포 안에서 만든 항원이 MHC I(→ CD8+ T세포)과 MHC II(→ CD4+ T세포, B세포)로 모두 제시됨
- 암·팬데믹 양쪽에서 큰 잠재력. 세포독성 T세포는 구멍(pore)을 뚫는 단백질로 암세포를 죽임

강의 (2) 학습정리

- mRNA는 특정 바이러스 단백질을 만들게 하여 면역세포가 바이러스를 알아보고 싸우도록 가르치는 "설계도" 역할을 함
- 몸은 면역세포가 침입자를 알아보고 T세포 반응을 활성화하는 "항원 제시"를 통해 면역을 얻음
- mRNA 기술은 면역계가 종양 세포를 정확히 찾아 파괴하도록 도와 암 치료의 미래를 엿

강의 (3) mRNA 생산과 최적화

학습목표: mRNA 생산 과정 이해 · mRNA 안정성과 단백질 번역 효율을 높이는 핵심 최적화 기법 파악

3-1 시험관 내 전사(IVT)로 mRNA 만들기 Preparation of mRNA · In Vitro Transcription

주형 DNA 준비

- 원형 DNA 주형(플라스미드)에 **T7 프로모터 – 5' UTR – ORF(표적 단백질 서열) – 3' UTR**을 넣어 둠
- (i) **제한효소로 잘라 선형화**하거나, (ii) poly(T)를 포함한 프라이머로 **PCR**하여 끝에 poly(T) 꼬리가 달린 선형 주형을 만듦
- (iii) **시험관 내 전사(IVT)**: T7 RNA 중합효소가 선형 주형을 따라 RNA를 만들고, 주형 끝에서 떨어짐 → **5' Cap – 5'UTR – ORF – 3'UTR – Poly(A) tail** mRNA 완성

생산 공정

mRNA 서열 설계 → 유전자 합성·플라스미드 주형 → pDNA 준비·선형화 → mRNA 합성·정제 →

품질검사(QC)

공정	하는 일
무세포 합성 (cell-free synthesis)	세포 없이 DNA 주형과 효소 반응만으로 RNA 생산
정제 (purification)	남은 NTP·효소·DNA 조각 제거
TFF (접선 흐름 여과)	완충액 교환과 농축
멸균 여과	0.2 µm 필터로 세균 제거 → RNA 원료의약품(drug substance)

+ 보충

mRNA 백신이 빨리 나올 수 있었던 이유

- 단백질 백신은 세포를 키워 단백질을 뽑아야 하지만, mRNA는 **세포 없이 효소 반응**으로 만들 → 서열만 바꾸면 같은 공정을 그대로 쓸 수 있음
- 정제가 중요한 이유: IVT 과정에서 부산물로 생기는 **이중가닥 RNA(dsRNA)**가 TLR3 등 면역 센서를 강하게 자극하기 때문 (3-3과 연결)

3-2 mRNA 부위별 최적화 IVT mRNA Modification

부위	최적화 방법	효과
5' Cap	뉴클레오타이드 메틸화	안정성 ↑ · 번역 ↑ · 분해 ↓ · 면역원성 ↓
코딩 서열	코돈 최적화 (같은 아미노산을 세포가 잘 읽는 코돈으로 바꿈)	mRNA 양 ↑ · 번역 ↑

부위	최적화 방법	효과
Poly(A) tail	꼬리 늘리기	안정성 ↑ · 번역 ↑
전체 (U 자리)	뉴클레오사이드 변형: 우리딘(U) → 슈도우리딘(Ψ)	안정성 ↑ · 분해 ↓ · 면역원성 ↓

3-3 변형 우리딘 – 면역은 낮추고 번역은 높이고 Unmodified vs. Modified

비변형·비정제 mRNA

- 엔도솜 RNA 센서 **TLR3, TLR7, TLR8**이 인식
- 세포질 RNA 센서 **PKR, OAS, MDA5, RIG-I**가 인식
- → 제1형 인터페론 분비 → 번역 억제
- **면역 활성 높음, 번역 낮음**

변형·정제 mRNA (Ψ)

- 센서가 "자기 RNA"처럼 여겨 잘 반응하지 않음
- 번역이 방해받지 않아 항원 단백질이 많이 만들어짐
- → 펩타이드-MHC 제시, 본래 모양 항원 발현
- **면역 활성 낮음, 번역 높음**

근거 실험 (Karikó 외, Immunity 2005)

- 인간 수지상세포에 여러 RNA를 넣고 TNF-α(염증 사이토카인) 측정:
 - **시험관에서 전사한 RNA**, 대장균 RNA, 미토콘드리아 RNA → TNF-α **매우 높음**
 - 포유류 세포의 total·핵·세포질 RNA, tRNA → 거의 없음
 - RNase로 RNA를 분해하면(+) 반응이 사라짐 → 원인은 RNA 자체
- TLR7·TLR8 세포 실험: 비변형 RNA는 강하게 자극, **m5C, m6A, Ψ, m5U, s2U** 등 변형 염기를 넣으면 자극이 크게 줄거나 사라짐 → **비변형 U가 면역 자극의 주범**

N1-메틸슈도우리딘(m1Ψ)

- 염기쌍을 이루는 면(base pairing)은 그대로라 **번역에는 문제없음**
- 튀어나온 메틸기(steric "bump")가 **TLR7 주머니에 잘 맞지 않음** → 면역 자극 ▼, 단백질 발현 ▲
- EPO(적혈구 생성 호르몬) mRNA를 생쥐에 주사: U-mRNA는 인터페론-α를 많이 유발, Ψ-mRNA는 주사하지 않은 쥐 수준 / EPO 생산량은 Ψ-mRNA가 훨씬 높고, **코돈 최적화**까지 하면 더 높음 / Ψ-mRNA는 혈중 EPO가 **며칠 동안 유지됨**(U-mRNA·단백질 직접 주사는 하루 남짓)

+ 보충

2023년 노벨 생리의학상

- 교안 그래프의 원 논문 저자인 **커털린 커리코·드루 와이즈먼**이 "mRNA 백신 개발을 가능하게 한 뉴클레오사이드 염기 변형 발견"으로 2023년 노벨 생리의학상을 받음
- 화이자·모더나 코로나19 백신은 모든 U를 **m1Ψ**로 바꿔 만들. 특히 네트워크 그림의 UPenn(펜실베이니아대)이 이 연구가 이뤄진 곳임
- 7주차 (2)강 "후성전사체 – RNA 염기 변형"이 약으로 쓰인 사례로 연결해 기억하면 좋음

3-4 최적화 실험 결과 읽기 Optimization of mRNA

비교 항목	결과 (형광 세기 = 단백질 발현)	의미
1. 변형 vs 일반 뉴클레오타이드	Normal 약 2,000 vs Modified 약 28,000	변형 염기만으로 발현이 10배 이상
2. CAP:GTP 비율	ARCA 4 : GTP 1 (약 28,000) > ARCA 4 : GTP 3 (약 13,000)	캡 유사체 비율이 높을수록 캡이 붙은 mRNA가 많아짐
3. Poly(A) 길이	PCR로 붙인 A120 (약 1,400) < 효소로 붙인 꼬리 (약 2,500)	꼬리 길이·방식이 발현을 좌우

+ 보충

ARCA와 CAP:GTP 비율의 원리

- IVT에서 캡을 붙이려면 반응액에 **캡 유사체**를 넣음. 그런데 T7 중합효소는 첫 글자로 캡 유사체와 그냥 GTP 중 아무거나 씀 → **둘이 경쟁**
- GTP 비율이 높으면 캡이 없는 mRNA가 늘어 번역이 안 되고 면역 자극도 커짐. 반대로 캡 비율이 너무 높으면 전체 생산량이 줄어 적정 비율을 찾아야 함
- **ARCA**(Anti-Reverse Cap Analog): 캡이 거꾸로 붙는 것을 막도록 설계된 유사체. 최근에는 사람 mRNA와 같은 Cap 1 구조를 한 번에 만드는 캡 유사체가 많이 쓰임

강의 (3) 학습정리

- mRNA는 시험관 내 전사(IVT)로 생산함
- 비변형 우리딘을 화학적으로 변형된 우리딘으로 바꾸면 원치 않는 면역 활성이 크게 줄고 단백질 번역은 늘어남

강의 (4) 유전자 전달 시스템과 지질나노입자(LNP)

학습목표: 여러 유전자 전달 시스템의 종류 이해 · 지질나노입자(LNP)의 작동 원리 설명

4-1 유전자 전달 시스템의 분류 Gene delivery systems

분류	예	장점	단점
바이러스성 (생물학적)	아데노바이러스, AAV, 레트로-렌티바이러스, 백시니아	전달 효율 높음, 유전자 치료에 널리 쓰임, 다루기 쉬움	실을 수 있는 유전자 크기가 작음
비바이러스 - 물리적	유전자총, 바늘 주사, 레이저, 전기천공, 초음파천공	전달 부위 조절, 조직 침투 높음, 면역원성 낮음	조직 손상
비바이러스 - 화학적(유기)	지질나노입자(LNP), 고분자 나노입자	다양한 제형, 화물 유연성, 스스로 조립됨	독성·면역원성
비바이러스 - 화학적(무기)	금 나노입자, 탄소나노튜브, 메조다공성 실리카, 자성 나노입자, 양자점	전기·자기·광학 특성, 모양·크기 조절 쉬움	독성·용해도

4-2 LNP의 제조와 세포 전달 Lipid Nanoparticles for RNA Delivery

단계	내용
1	한쪽 관에 지질(에탄올에 녹임), 다른 관에 RNA(산성 수용액)를 흘려 넣음
2-3	미세유체 칩 안에서 층흐름 혼합(laminar flow mixing)으로 빠르고 고르게 섞임
4	RNA가 담긴 나노입자 완성
5	세포막 수용체와 만나 세포내 섭취로 흡수
6	엔도솜 안 pH 변화로 입자가 풀리며 RNA가 세포질로 방출

- 자기조립 원리: 에탄올이 물에 희석되며 용매 극성이 커지면, 물을 싫어하는 지질 꼬리끼리 모이고 양전하 이온화 지질이 음전하 mRNA를 감싸며 입자가 됨 (2주차 마이셀·리포솜 형성과 같은 원리)

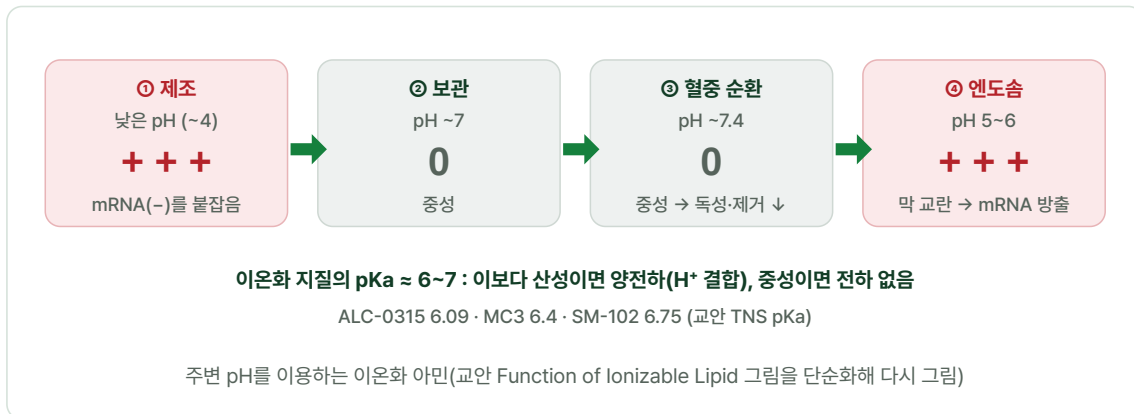
4-3 LNP의 4가지 구성 성분 Lipid Nanoparticles Technology

성분	물비 (예)	역할
이온화 지질 (ionizable lipid)	약 50%	핵심 성분. 산성에서 양전하를 띠어 mRNA를 붙잡고, 엔도솜에서 막을 흔들어 mRNA를 꺼내 줌
구조 지질 (helper/structural: DSPC, DOPE)	약 10%	입자의 막 골격. 종류에 따라 안정성·방출 효율이 달라짐

성분	물비 (예)	역할
콜레스테롤	약 38.5%	지질 사이 틈을 메워 입자를 단단하고 안정하게 함 (2주차 세포막 유동성 조절과 같은 역할)
PEG-지질 (stealth lipid)	약 1.5%	표면을 덮어 입자끼리 뭉치지 않게 하고 크기를 조절, 혈중 순환 시간 조절

물비 50 : 10 : 38.5 : 1.5는 Onpattro-모더나-큐어백 제형 기준. 화이자-바이오엔텍은 46.3 : 9.4 : 42.7 : 1.6 (4-5 표 참고)

4-4 이온화 지질 - pH에 따라 바뀌는 전하 Function of Ionizable Lipid



- 이온화 지질은 **아민(amine) + 에폭사이드(epoxide)** 반응 등으로 합성. 질소(N)가 H^+ 를 받으면 양전하(N^+-H)가 됨
- 항상 양전하인 지질(영구 양이온 지질)은 혈중에서 독성이 큼 → **필요할 때만 양전하**가 되는 이온화 지질이 핵심 혁신
- 엔도솜에서 양전하가 된 지질이 엔도솜 막의 음전하 지질과 붙어 막 구조를 무너뜨림 → **엔도솜 탈출**

+ 보충

엔도솜은 왜 산성인가 - 2주차와 연결

- 엔도솜-리소좀 막에는 ATP를 써서 H^+ 를 안으로 퍼 넣는 **양성자 펌프($V\text{-ATPase}$)**가 있음 → 2주차 2-6의 **1차 능동수송(H^+ 펌프)**임
- 엔도솜이 성숙할수록 pH가 6 → 5 → 리소좀(pH 4.5~5)으로 낮아짐. mRNA가 리소좀까지 가면 분해되므로, 그 전에 빠져나오는 것이 전달 효율을 좌우함

4-5 상용 이온화 지질과 백신 비교 Commercialized Ionizable Lipids

이온화 지질	쓰인 제품	교안 표기 회사	pKa
ALC-0315	화이자-바이오엔텍 코로나19 백신 (BNT162b2, 코미나티)	Genevant (구조식 출처는 Acuitas)	6.09

이온화 지질	쓰인 제품	교안 표기 회사	pKa
SM-102	모더나 코로나19 백신 (mRNA-1273) – "Moderna Lipid H"	Arbutus	6.75
D-Lin-MC3-DMA (MC3)	엘나일람 Onpattro (patisiran, siRNA) – 최초 승인 siRNA 약	PNI (Precision NanoSystems)	6.4
C12-200	연구용 지질 유사체(lipidoid), siRNA-mRNA 전달 비교 기준	Corden	–

+ 보충

괄호 안 회사 이름을 읽을 때

- ALC-0315는 Acuitas가 개발해 바이오엔텍에 공급했고, SM-102는 모더나가 자체 개발한 지질임 (교안 하단 구조식 캡션도 각각 Acuitas, Moderna로 표기)
- 교안 제목의 Genevant-Arbutus는 LNP 원천 특허를 주장하며 라이선스·소송으로 얽힌 회사들임 (2-3 특허 네트워크 그림 참고). "누가 만들었나"와 "누가 특허를 주장하나"를 구분해서 보면 됨

모더나 vs 화이자-바이오엔텍 코로나19 백신

	모더나 (mRNA-1273)	화이자-바이오엔텍 (BNT162b2)
용량·접종	100 µg, 근육주사 2회, 28일 간격	30 µg, 근육주사 2회, 21일 간격
포장	냉동 액체, 바이알당 10회분, 보존제 없음	냉동 액체, 바이알당 5회분, 보존제 없음, 별도 희석액과 섞어야 함
보관	-20°C 최대 6개월 / 2~8°C 7일 / 개봉 후 6시간	드라이아이스 운송, -70°C 최대 6개월 / 2~8°C 24시간 / 실온 2시간 / 희석 후 6시간
LNP 성분	SM-102, PEG2000-DMG, 콜레스테롤, DSPC	ALC-0315, ALC-0159(PEG-지질), DSPC, 콜레스테롤
완충액 등	트로메타민(Tris), 아세트산·아세트산나트륨, 수크로스	인산염 완충액, NaCl·KCl, 수크로스

교안 표 기준(초기 긴급사용 시기 정보). 이후 보관 조건 등은 제형 변경으로 달라짐. 수크로스는 얼릴 때 입자를 보호하는 동결보호제 역할

제형 종합 비교 (교안 표)

	Onpattro (siRNA)	화이자-바이오엔텍	모더나	큐어백 (후보)
용량·경로	0.3 mg/kg 정맥	30 µg 근육	100 µg 근육	12 µg 근육
몰비 (이온화:중성:콜레스테롤:PEG)	50:10:38.5:1.5	46.3:9.4:42.7:1.6	50:10:38.5:1.5	50:10:38.5:1.5
N/P 비	3	6	6	6

+ 보충

N/P 비란

- 이온화 지질의 **질소(N, 양전하가 될 수 있는 자리)** 수 ÷ RNA의 **인산기(P, 음전하)** 수
- 짧은 siRNA는 3이면 충분하지만, 길고 잘 접히는 mRNA를 안정하게 싸려면 더 많은 양전하(6)가 필요함 → 4-6의 "siRNA와 mRNA는 다르다"로 이어짐

4-6 mRNA에 맞춘 LNP 최적화 Optimization of LNPs for mRNA

siRNA vs mRNA

- **siRNA**: 약 21 bp의 짧고 단단한 이중가닥
- **mRNA**: 수천 nt의 긴 단일가닥, 5' cap-UTR-코딩 영역-3' UTR-poly(A), 스스로 복잡하게 접힘
- → siRNA용으로 개발된 LNP(MC3 등)를 그대로 쓰면 mRNA에는 최적이지 않음 → 성분을 다시 조정해야 함

구조 지질 바꾸기: DSPC → DOPE

DSPC

- 원통 모양 → 안정한 **층판상(lamellar, 이중층)**
- mRNA와 강하게 결합, 봉입 효율 **90% 이상**
- 생쥐 발광 영상: 발현 신호 보통

DOPE

- 원뿔 모양 → 덜 안정한 **역육각상(hexagonal H_{II})**
- 막이 쉽게 무너져 엔도솜 탈출에 유리
- 생쥐 발광 영상: **발현 신호가 훨씬 강함**

정리 ▶ "안정해서 잘 싸는 것"과 "세포 안에서 잘 푸는 것"은 서로 반대 방향일 수 있음. 전달체 설계는 이 균형을 맞추는 일임

LNP 내부 구조

- 극저온 전자현미경(CryoTEM) 사진: 약 100 nm 크기의 둥근 입자 안에 **전자 밀도가 높은(진한) 부분**이 보임
- 제안된 모델
 - (a) **다층막(multilamellar)** 모델: 양파처럼 여러 겹 → 진한 중심부를 설명하지 못함 ✕
 - (b)(c) **코어-셸(core-shell) 모델**: 바깥은 DSPC-PEG-지질 껍질, 안쪽은 이온화 지질이 RNA가 든 물방울을 둘러싼 구조 → **유력함**

지질 성분 최적화 실험 (Sci. Adv. 2021)

- 루시페라아제 mRNA 0.1 mg/kg 정맥주사 후 발광 세기(막대)와 봉입 효율(◆) 비교
- C12-200(기존 기준): 발광 높음, 봉입 약 40% / F1: 봉입 약 95%인데 발광 낮음 / F2: 봉입 약 95%, 발광 높음 / F3: 발광 가장 높지만 봉입 약 57%
- → **봉입 효율이 높다고 발현이 높은 것은 아님**. 둘 다 좋은 F2처럼 균형 잡힌 조합을 찾는 것이 최적화의 목표

강의 (4) 학습정리

- 유전자 전달은 바이러스성과 비바이러스성 방법으로 나뉨
- 표준 LNP는 네 가지 주성분, 즉 이온화 지질, 콜레스테롤, 구조 지질(DSPC/DOPE), PEG-지질로 이루어짐

용어 용어 정리와 교안 표기 정정

8주차 네 강의에 나온 핵심 용어

영문	국문	한 줄 정리
biopharmaceuticals	바이오의약품	단백질·유전자·세포를 이용한 의약품
pDNA	플라스미드 DNA	원형 DNA. 핵에 들어가야 발현됨
ASO	안티센스 올리고뉴클레오타이드	단일가닥, mRNA에 결합해 스플라이싱 조절·분해 유도
siRNA	작은 간섭 RNA	약 21 bp 이중가닥, RISC로 표적 mRNA 절단
aptamer	애포머	입체 구조로 단백질에 결합해 기능을 막는 RNA
5' cap / UTR / ORF / poly(A)	캡 / 비번역 부위 / 번역틀 / 아데닌 꼬리	mRNA를 이루는 다섯 부위
prophylactic / therapeutic vaccine	예방 백신 / 치료 백신	감염 전 대비 / 이미 생긴 병(암) 치료
antigen presentation · MHC	항원 제시 · 주조직적합복합체	항원 조각을 MHC에 실어 T세포에 보여 주는 과정
adjuvant	보조제	선천면역 수용체를 자극해 면역반응을 키우는 물질
TLR	톨유사수용체	병원체 패턴 인식 수용체. TLR3(dsRNA), TLR7/8(ssRNA)
immune surveillance	면역감시	면역계가 늘 몸을 살피며 악성 세포를 제거
immunoediting (3E)	면역편집	제거 → 평형 → 회피
immune checkpoint	면역관문	T세포 활성의 브레이크. CTLA-4, PD-1
neoantigen	신항원	암세포 돌연변이로 새로 생긴, 환자 고유 항원
IVT	시험관 내 전사	T7 RNA 중합효소로 DNA 주형에서 mRNA 합성
codon optimization	코돈 최적화	아미노산은 그대로 두고 잘 번역되는 코돈으로 교체
pseudouridine (Ψ) · m1Ψ	슈도유리딘 · N1-메틸슈도유리딘	U 대신 넣는 변형 염기. 면역 ↓ 번역 ↑
ARCA	역방향 방지 캡 유사체	IVT에서 캡을 올바른 방향으로 붙이게 하는 유사체
LNP	지질나노입자	이온화 지질·구조 지질·콜레스테롤·PEG-지질로 된 RNA 운반체
ionizable lipid · pKa	이온화 지질 · 산해리상수	pKa(약 6~7)보다 산성일 때만 양전하를 띠는 지질
endosomal escape	엔도솜 탈출	엔도솜에 갇힌 RNA가 세포질로 빠져나오는 단계

영문	국문	한 줄 정리
N/P ratio	N/P 비	지질 질소 수 ÷ RNA 인산 수 (siRNA 3, mRNA 6)
lamellar / hexagonal H _{II}	층판상 / 역육각상	DSPC(안정, 봉입 ↑) / DOPE(불안정, 방출 ↑)
encapsulation efficiency	봉입 효율	넣은 RNA 중 입자 안에 담긴 비율

+ 보충

교안 표기에서 헛갈릴 수 있는 부분

위치	교안 표기	바르게 읽기
(1) 치료제 표	Inotersen FDA approval in 2016	2018년 승인
(1) 치료제 표	Pegaptanib FDA approval in 2014	2004년 승인 (최초의 앵타머 약)
(1) 치료제 표	Olaptosed pegel / Crystic Fibrosis	Olaptosed pegol / Cystic Fibrosis(낭포성 섬유증)
(1) 치료제 표	Jung and pancreatic cancer	"Jung"은 오타로 보임(문맥상 lung)
(2) 3E 그림	Elimination	Elimination
(3) 학습목표·내용	Mrna / 학내용표	mRNA / 학습내용
(4) 백신 비교 표	Stroage / Ingradients	Storage / Ingredients
(4) 제형 표	mRAN dose	RNA dose (Onpattro는 siRNA 용량)

문제

4지선다 예상문제 10

정답은 각 문제 아래를 눌러 확인

1. 유전자 발현을 "켜는(Gene ON)" 도구에 해당하는 것은?

1. ASO
2. siRNA
3. mRNA
4. CRISPR-Cas9

▼ 정답 · 해설

③ mRNA(와 pDNA)는 단백질을 새로 만들게 하는 도구. ASO·siRNA·CRISPR-Cas9은 유전자 억제(Gene OFF) 도구로 분류됨.

2. 이중가닥으로 RISC에 실려 표적 mRNA를 절단하는 RNA 치료제는?

1. RNA 앵타머
2. siRNA
3. mRNA
4. ASO

▼ 정답 · 해설

② 앵타머는 단백질 결합, ASO는 단일가닥으로 스플라이싱 조절·분해 유도, mRNA는 번역됨.

3. mRNA 구조 중 실제 단백질 정보가 담겨 번역되는 부위는?

1. 5' Cap
2. 5' UTR
3. ORF
4. Poly(A) tail

▼ 정답 · 해설

③ Open Reading Frame. 나머지는 안정성·번역 효율을 조절하는 부위임.

4. 비변형 우리딘(U)이 든 mRNA를 주로 인식해 면역반응을 일으키는 엔도솜 수용체는?

1. TLR7/8
2. CTLA-4
3. PD-1
4. MHC II

▼ 정답 · 해설

㉠ TLR7/8은 단일가닥 RNA, TLR3은 이중가닥 RNA를 인식함. 변형 염기(Ψ , m 1Ψ)를 넣으면 이 자극이 크게 줄어듦.

5. mRNA의 U를 N1-메틸슈도우리딘(m 1Ψ)으로 바꿨을 때의 효과로 옳은 것은?

1. 면역 활성화 ↑, 번역 ↓
2. 면역 활성화 ↓, 번역 ↑
3. 면역 활성화 ↑, 번역 ↑
4. 면역 활성화 ↓, 번역 ↓

▼ 정답 · 해설

㉡ 염기쌍 면은 그대로라 번역은 잘 되고, 튀어나온 메틸기 때문에 TLR7이 잘 알아보지 못함 (커리코·와이스먼, 2023 노벨상).

6. 시험관 내 전사(IVT)에서 캡 유사체(ARCA)와 GTP의 비율이 중요한 이유는?

1. GTP가 poly(A) 꼬리를 만들기 때문
2. 캡 유사체와 GTP가 첫 염기 자리를 두고 경쟁하기 때문
3. GTP가 T7 프로모터를 자르기 때문
4. 캡 유사체가 우리딘을 대체하기 때문

▼ 정답 · 해설

㉢ GTP가 많으면 캡 없는 mRNA가 늘어 발현이 줄어듦. 교안 실험에서 ARCA 4 : GTP 10이 4 : 3보다 발현이 높았음.

7. LNP의 이온화 지질이 혈중(pH 7.4)에서는 중성, 엔도솜(pH 5~6)에서는 양전하를 띠는 것의 의미로 가장 알맞은 것은?

1. 혈중에서 mRNA를 방출하기 위해
2. 혈중 독성은 줄이고 엔도솜에서는 막을 교란해 mRNA를 세포질로 내보내기 위해
3. 엔도솜에서 리소좀으로 빨리 보내기 위해
4. 핵 안으로 들어가기 위해

▼ 정답 · 해설

② pKa 약 6~7인 이온화 지질이 "필요할 때만" 양전하가 되어 엔도솜 탈출을 도움.

8. 표준 LNP의 네 가지 주성분이 아닌 것은?

1. 이온화 지질
2. 콜레스테롤
3. PEG-지질
4. 히스톤 단백질

▼ 정답 · 해설

④ 네 성분은 이온화 지질, 구조 지질(DSPC/DOPE), 콜레스테롤, PEG-지질.

9. 구조 지질을 DSPC에서 DOPE로 바꾸었을 때의 설명으로 옳은 것은?

1. 더 안정한 층판상을 이뤄 봉입 효율만 높아짐
2. 역육각상(H_{II})을 이뤄 막이 쉽게 무너지고 mRNA 발현이 높아짐
3. PEG-지질 역할을 대신함
4. mRNA를 핵으로 보냄

▼ 정답 · 해설

② DOPE는 덜 안정하지만 엔도솜 탈출에 유리해 생쥐 실험에서 발현 신호가 더 강했음.

10. 림프절에서 CTLA-4가 T세포 활성화를 억제하는 방식은?

1. TCR과 MHC의 결합(신호 1)을 끊음
2. B7을 가로채 CD28 자극(신호 2)을 막음
3. 암세포의 PD-L1과 결합함
4. 항체를 분비함

▼ 정답 · 해설

② 이를 항-CTLA-4 항체(이필리무맙)로 막으면 T세포가 활성화됨. PD-1-PD-L1은 종양 환경에서 TCR 신호를 막는 다른 관문임.

자료 기준: 「생명과학의 세계」(고려대학교) 8주차 이규리 교수 강의 교안 - mRNA Therapeutics and its Delivery Systems (1)~(4).
교안 그림 출처(ResearchGate, MDPI, ScienceDirect, Nature 등)는 각 강의 교안의 "출처 및 참고문헌"을 따름. 이 문서의 그림은 교안
그림을 단순화해 새로 그린 것임.

'보충' 상자와 예상문제는 교안에 없는 참고 내용으로, 시험 범위 여부는 강의 기준을 따를 것.