

**세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상
평가 가이드라인
[민원인 안내서]**

**(Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical
Assessment of Extracellular Vesicles Therapy Products)**

2023. 12. 21.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 세포유전자치료제과

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭 세포외소포치료제의 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인(민원인 안내서)

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.
	<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"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 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"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용) <input type="checkbox"/> 예(☞ 지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 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.

2023년 12월 21일

담당자
확 인(부서장)

정 은 용, 이 재 린
신 인 수

이 안내서는 세포외소포치료제 개발 시 고려사항에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2023년 12월 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 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료제과로 문의하시기 바랍니다.

- 전화 : 043-719-3536
- 팩스 : 043-719-3530



【공직자 부조리 및 공익신고안내】

**** 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.**

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 "국민신문고 > 공직자 부조리 신고" 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 "국민소통 > 신고센터 > 부패·공익신고 상담" 코너

제·개정 이력

세포외소포치료제의 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인(민원인 안내서)

제·개정번호	승인일자	주요내용
안내서-0917-01	2018. 12. 21.	세포외소포치료제의 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 제정
안내서-0917-02	2023. 12. 21.	세포외소포치료제의 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 개정

목 차

1. 적용 범위	1
2. 관련 규정	2
3. 세포외소포치료제 품질 고려사항	2
3.1. 세포외소포치료제 생산을 위한 출발물질의 특성분석	3
3.2. 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석	4
3.3. 세포외소포치료제 품질관리	7
3.4. 세포외소포치료제 안정성	13
4. 세포외소포치료제 비임상 고려사항	13
4.1. 약리작용에 관한 자료	13
4.2. 독성에 관한 자료	15
5. 세포외소포치료제 임상 고려사항	17
6. 참고문헌	18

1. 적용 범위

이 가이드라인은 세포 또는 유전물질이 도입된 세포가 분비하는 세포외소포(extracellular vesicles, EV)를 치료제로 개발 시 고려사항을 제시하고자 마련하였다. 이 가이드라인은 일관성 있는 품질과 안전성, 유효성을 가진 세포외소포치료제 개발을 위해 품질, 비임상, 임상시험 시 고려사항에 대한 원칙을 제시하고 있다.

세포외소포는 세포에서 분비되는 이중 지질막 구조의 물질을 의미하며 세포외소포치료제는 살아있는 세포에서 분비되는 세포외소포를 분리, 정제하여 제조하는 의약품으로 정의한다. 따라서, 분리·정제되지 않은 세포 배양액이나 세포 파쇄물(cell lysate)은 이 가이드라인에서 정의하는 세포외소포치료제에 해당하지 않는다. 또한 세포의 물리적 파쇄에 의해 만들어지는 세포외소포 모사체(mimetics)는 세포외소포치료제의 정의에 해당하지 않는다. 다만 세포외소포 모사체 등을 이용하여 의약품으로 개발하고자 한다면 이 가이드라인을 적용할 수 있으며 제품 특성에 따라 추가적인 고려사항이 있을 수 있다.

이 가이드라인은 사람, 동물 또는 미생물 유래 세포에서 생산되는 세포외소포를 이용하여 개발되는 세포외소포치료제에 적용되며, 그 외의 세포(예. 식물세포)에서 분비되는 세포외소포치료제를 개발할 경우에는 이 가이드라인에서 제시하는 내용 외에도 각각의 세포 특성에 따라 추가적인 고려 사항이 필요할 수 있다.

2. 관련 규정

세포외소포치료제는 세포치료제와 유사한 약리작용이 기대되나 살아 있는 세포를 포함하고 있지 않기 때문에 현재 생물의약품 분류 상, 세포치료제에 해당하지 않는다. 그러나, 사람이나 다른 생물체에서 유래된 것을 원료 또는 재료로 하여 제조한 의약품으로서 보건위생상 특별한 주의가 필요한 의약품으로 생물의약품의 기타 식품의약품안전처장이 인정하는 제제로 분류된다. 세포외소포치료제는 세포에서 유래된 형태로 세포치료제와 유사한 품질, 안전성 유효성 평가가 필요하며, 만약 세포외소포 제조를 위하여 유전적 변형이 이루어졌다면 유전자치료제로 분류될 수 있다. 유전 물질이 도입된 세포를 이용하여 제조되는 세포외소포치료제는 본 가이드라인과 함께 「첨단재생의료 및 첨단바이오의약품 안전 및 지원에 관한 법률」에 따른 유전자치료제의 심사기준이 적용될 수 있다.

세포외소포치료제 평가 시 「약사법」과 그 하위 규정 뿐만 아니라 「생명윤리 및 안전에 관한 법률」, 「제대혈 관리 및 연구에 관한 법률」, 「혈액관리법」 등 관련된 법률 및 그 하위규정의 적용을 받는다.

3. 세포외소포치료제 품질 고려사항

세포외소포치료제 생산을 위해서는 다음 사항에 대하여 광범위하게 고려되어야 한다.

- (1) 세포외소포 생산을 위한 출발물질의 특성분석
- (2) 세포외소포의 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석

(3) 품질관리

(4) 안정성

3.1 세포외소포치료제 생산을 위한 출발물질의 특성분석

세포외소포의 특성분석에 있어서 중요한 점은 세포외소포를 생산하는 조직이나 세포의 기원, 공여자와 수여자와의 관계(자가, 동종, 이종 등)이다. 만약 세포외소포를 생산하는데 있어 사용되는 세포의 수집절차, 환자/공여자 적합성 기준, 건강상태와 의학적 병력이 문서화되어야 한다. 공여자로부터 조직을 수집하기 전에 감염의 징후를 스크리닝하는 것은 필수적이다. 세포외소포 생산을 위한 세포 또는 조직을 제공하는 공여자의 적합성 기준은 '세포치료제 기증자 적합성 평가 가이드라인'을 적용한다.

세포외소포를 생산하는데 있어 다양한 공여자는 기능적으로 다른 특성을 갖는 세포외소포를 생산할 수 있기 때문에 공여자에 따른 차이를 고려하여야 한다. 세포외소포치료제의 품질을 확보하기 위해서는 적절한 제조용 세포의 분리 또는 세포주의 수립과 그 관리가 중요하며, 생산 배양 기간 동안 제품 품질에 영향을 미치는 각종 특성을 적절한 범위로 유지하는 것이 중요하다. 세포외소포치료제 제조에는 사람 자가유래세포, 중간엽줄기세포 등 사람 동종유래세포, 유도만능줄기세포(iPS)/배아줄기세포(ES) 유래세포, 세포주 등이 사용된다. 이 가운데 자가유래세포를 제외하고는 '세포치료제 세포은행 평가 가이드라인'을 참고하여 그 적격성을 평가한 후 제조에 사용해야 한다.

만약, 불멸화된 클론성 세포주(immortalized clonal cell lines)에서 세포외소포를 생산한다면 생산 동안 유전형, 표현형의 안정성을 엄격하게 시험하여야 한다. 왜냐하면 세포주 수립 시 장기간에 걸쳐 계대배양을

반복했을 때 표현형의 안정성에 관한 정보가 없기 때문이다. 또한, iPS/ES 유래 세포 또는 불멸화된 세포주에서 유래한 세포외소포를 생산하는 경우 세포 유래 DNA나 세포은행 중의 불순물로 혼입된 종양형성세포에서 유래한 세포외소포가 제품에 혼입되어 발생할 수 있는 종양형성을 고려해야 한다.

3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석

세포외소포치료제 제조를 위해서는 살아있는 세포를 이용하게 된다. 따라서 세포 배양에서의 작은 변화가 세포외소포 생산공정과 세포외소포의 생물학적 성질에 큰 영향을 미칠 수 있으며 따라서 특성(물리화학적, 생물학적)을 변화시킬 수 있다.

세포외소포는 주로 세포배양 상등액으로부터 분리, 정제되기 때문에 배양조건이 표준화되어야 하며 배치 간 재현성이 입증되어야 한다. 공정 중 계대배양 시 접종 및 수확 당시 세포밀도(density/confluence), 생존율(viability), 세포성장, 계대배양 방법, 계대횟수, 배가시간(doubling time), 산소 및 이산화탄소 농도, 배양온도, 배지첨가물, 배지조성, 배양용기 등은 세포외소포의 양이나 품질에 큰 영향을 미칠 수 있다. 또한 소태아혈청(FBS)이 포함된 배지와 비교하여, 무혈청배지(serum-free media) 또는 소유래 세포외소포가 제거된 배지에서 자라는 세포는 세포자체의 특성이 달라진다는 보고가 있으며 분비되는 세포외소포의 양이나 질에도 영향을 미칠 수 있다.

세포외소포를 생산하는데 있어서 죽어가는 세포가 분비하는 세포사멸체(apoptotic body)나 세포내 성분들은 불순물이 될 수 있으므로 세포외소포 생산세포의 생존율을 관리하는 것은 매우 중요하다.

세포외소포의 기원 외에도 세포외소포 생산에 사용되는 모든 시약에 대한 기원을 서술하여야 한다. 가능한 한 소태아혈청 등과 같이 동물유래

성분의 사용을 피하여야 한다. 동물유래시약은 수혜자에서 이종의 감염성 인자 그리고/또는 바람직하지 않은 면역반응을 증가시킬 수 있다. 배지 첨가물로 소태아혈청을 사용할 경우 소혈청 유래 세포외소포가 혼입되어 의도하지 않은 생물학적 영향을 일으킬 우려가 있다. 따라서 세포외소포 생산에서 소태아혈청을 사용하고자 한다면, 소유래바이러스가 없음을 입증하는 등 엄격하게 관리된 소태아혈청만을 사용할 것을 권장한다. 가능하면 동물 유래 성분을 포함하지 않는 시약이나 재조합 단백질 사용을 권장한다.

세포외소포의 분리 및 정제를 위해서는 한외여과(ultrafiltration), 초원심분리, 침전, 크로마토그래피 등을 사용하거나 두 가지 이상의 방법을 조합하여 사용할 수 있다. 세포외소포를 분리하는 방법에 따라 형태학적, 단백질 및 핵산 프로파일을 포함한 정량적 측면 등, 세포외소포의 완전성(integrity), 기능적인 특성에 영향을 미칠 수 있으며 동물시험에서 체내 분포에 영향을 미칠 수 있다는 실험적인 보고가 있다. 따라서, 분리 방법에 대해 재현성, 순도, 불순물, 세포외소포의 기능적 특성과 관련하여 표준화하여야 하며 재현성을 입증하기 위하여 분리방법에 대해 상세한 기술이 필요하다. 특히, 정제 후에도 잔존하는 목적 세포외소포 이외 성분의 혼입에 주의하여야 한다. 주요 정제과정에서 공정 유래 불순물 및 제품 관련 불순물에 대한 지표를 정한 제조법을 확립할 필요가 있으며, 정제 전후 불순물 제거 정도의 비교를 공정중 관리항목으로 설정하는 것을 고려해야 한다. 또한 제조공정이나 보존기간 중 세포외소포의 안정성(분해 및 변화체 생성)에도 주의해야 한다.

세포외소포는 세포의 상태나 제조공정 등에 따라 영향을 크게 받기 때문에 특정 제조공정으로 분리 정제된 세포외소포가 일관된 특성을 가짐을 보여주기 위하여 단백질, RNA, 지질의 조성 및 양에 대한 프로파일 분석이 필요하다. 단백질, RNA, 지질의 양은 입자수 대비 단백질, RNA, 지질 등과 같은 비율로 총 양과 함께 분석할 필요가 있다. 프로파일분석을 위해서는

최대한 많은 수의 단백질, RNA, 지질 등이 분석될 수 있도록 최신의 기술 (예. LC-MS/MS)을 이용하여 분석하는 것이 필요하다. 또한 개발자들은 EV 데이터베이스를 통하여 분리한 세포외소포에서 확인된 단백질과 다른 세포외소포에서 확인된 단백질을 비교하는 것이 필요하다. 세포외소포 마커로서는 CD9, CD63, CD81과 같은 테트라스패닌, Tsg101 및 Alix의 후기 엔도솜 관련 인자 등이 알려져 있으나, 현재까지 세포외소포 마커로 특징지어진 것은 없으므로 목적에 맞는 마커 분자를 복수 조합하여 분석하는 것이 중요하다. 또한, 세포외소포 특이적 단백질 뿐만 아니라, 세포외소포와 관련없는 성분을 포함하여 적어도 3종류는 반정량적으로 분석하는 것이 권장된다.

세포외소포에 대하여 극저온 전자현미경(cryoelectron microscope, Cryo EM)과 같은 고해상도 이미지 분석법 및 나노입자추적분석(nanoparticle tracking analysis, NTA)과 같은 단일입자분석법으로 이중 지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석이 필요하다. 고해상도 이미지 분석 시에는 클로즈-업(close-up)과 광시야(wild-field)의 정보를 모두 확인하는 것이 필요하다.

세포외소포의 생물학적 활성 분석은 작용기전을 검토하여 약리작용을 바탕으로 복수의 역가 시험을 설정하여 다면적으로 실시하는 것이 권장된다. 세포외소포의 활성성분(miRNA, mRNA, 단백질 등)의 정량 또는 활성 측정, 세포증식 및 이동, 독성, 면역세포 활성 및 억제, 유전자 발현 조절, 신호 전달 등에 대한 평가도 고려할 수 있다. 활성값은 입자수나 단백질양으로 표준화하여 평가하는 것이 권장된다. 또한 용량 증량에 따른 세포외소포의 기능적 활성에 대한 정량적인 분석이 필요하다. 이때 최소한의 기능적 효과를 나타낼 수 있는 대조군을 설정하는 것이 중요하다. 예를 들면, 세포가 추가되지 않은 배양배지(제조에 사용되는 것처럼 37°C에서 배양된 것)에서 얻은 mock 세포외소포가 될 수 있다. 이러한 대조군은 세포외소포의 기능적

활성의 '배경(background)효과'에 대한 정보를 제공하며 기능적 활성에서 차지하는 수용성 성분과 세포외소포에 부착된 성분의 비율에 대한 정보를 제공한다.

세포외소포의 조성, 물리화학적 특성 및 생물학적 활성을 포함하는 특성분석자료는 제조방법, 분리방법 등 제조공정 변경 시 비교동등성을 입증할 때에도 중요하다.

불순물에 대한 특성분석도 필요하다. 사용되는 물질 중 잔류물 (serum albumin, 항생제 등)에 대하여 잔류물의 제거방법과 잔류물질의 농도에 대한 자료가 제출되어야 한다. 또한, 유효성분을 가진 세포외소포 뿐만 아니라 활성성분을 가지지 않은 세포외소포나 제조·보존과정에서 변화·분해된 세포외소포 변화체가 포함되어 있을 수 있어, 목적 이외의 세포외소포나 변화체를 최대한 제거하는 적절한 제조공정을 확립하여야 한다. 또한, 세포배양 및 정제농축 공정, 제제화 공정 등에서 바이러스, 미생물, 마이코플라스마, 배지성분, 시약 등이 혼입될 가능성이 있다. 따라서, 예상되는 불순물에 대한 정성·정량적 시험법 설정 및 불순물의 허용한도를 검토하여야 한다. 목적 이외의 성분 혼입을 평가하기 위한 지표로 입자의 프로파일 분석을 통한 목적 세포외소포의 비율을 평가하거나 생물학적 시험으로 역가를 측정하고 입자수 등으로 표준화하여 비교 평가하는 방법이 권장된다.

3.3 세포외소포치료제 품질관리

3.3.1 정상시험

'정상'시험은 해당 품목의 외형적 특성과 형상이 잘 나타날 수 있도록 기준을 설정하여야 한다. 정상시험은 제품에 대한 기본적인 외형의 적합여부를

시험하는 것으로 육안으로 관찰한다. 주사제인 경우, 약물이 충전된 직접용기(바이알, 시린지, 백 등)를 포함하고, 해동해서 사용하는 경우에는 해동 전후의 원료(완제)의약품의 색, 형상 등을 포함하여야 한다.

3.3.2 세포외소포 수

세포외소포치료제에서 세포외소포의 수는 제품의 용량을 확인할 수 있는 가장 직접적인 시험으로 다른 의약품의 함량시험과 유사하다. 용기에 충전된 세포외소포 수는 제품의 '원료약품 및 그 분량'을 대변할 수 있어야 한다.

세포외소포 수는 나노입자추적분석, 저항성펄스센싱법(resistive pulse sensing, RPS), 유세포분석법(flow cytometry)등과 같은 단일입자 분석법들을 이용하여 크기 분포와 함께 분석이 가능하며, 기존의 산란광 측정 기반의 나노입자추적분석법이 세포외소포와 함께 분리된 유사한 크기의 입자를 구분할 수 없기 때문에 단백질량 등의 시험결과와 비교가 필요하다.

시험검체는 최대한 균질하게 채취하는 것이 중요하며 매 로트 시험 시 반복시험을 통하여 시험결과의 정확성을 높이는 것이 중요하다.

3.3.3 세포외소포 크기

세포외소포의 크기 분포는 나노입자추적분석, 동적광산란법(dynamic light scattering, DLS), 저항성펄스센싱법, 유세포분석 등을 이용하여 측정할 수 있다. 단일입자분석에서는 세포외소포의 크기는 통계값(평균값, 최빈값, 중앙값 등)으로 한정하지 않고 직경(diameter)의 분포로 나타내는 것이 바람직하다.

3.3.4 마이코플라스마부정시험

세포외소포치료제는 완제품에 세포를 포함하고 있지 않으나 세포로부터 생산, 분리, 정제되는 공정 중 동물유래 원료·시약 또는 시설·환경에 의해 오염될 수 있다. 세포외소포에 존재하는 마이코플라스마는 피험자의 안전에 영향을 미칠 수 있으므로 관리가 필요하다.

마이코플라스마부정시험에 사용되는 검체는 마이코플라스마 검출이 가장 용이한 시점에서 채취하는 것이 적절하다. 일반적으로 세포외소포를 분리·정제하기 전단계인 마지막 배양이 완료된 시점에서 모은 배양액과 세포를 함께 사용하는 것이 바람직하다. 만약 신속법(예. 핵산증폭검사법)을 사용하는 경우 공정서 배양법과의 동등성을 확보하여야 한다.

3.3.5 외래성바이러스부정시험

세포외소포치료제는 세포를 이용하여 제조하게 되므로 바이러스에 오염될 가능성이 존재하며, 이러한 바이러스는 환자의 안전과 직결되므로 제품에서 바이러스의 오염이 없음을 입증하는 것은 매우 중요하다.

외래성바이러스부정시험은 세포외소포를 분리·정제하기 전단계인 마지막 배양이 완료된 시점에서 모은 배양액과 세포를 함께 사용하는 것이 바람직하다. 세포외소포 정제 공정에서는 바이러스 제거가 어렵고, 농축 공정에서 바이러스도 농축될 가능성이 높기 때문에 농축 후 제품의 바이러스 시험 실시를 고려하여야 한다.

3.3.6 무균시험

무균시험은 완제품에서 미생물(세균 및 진균) 오염여부를 확인하는 시험으로 대한민국약전 등 식약처장이 인정하는 공정서에 수록된 시험방법에 따라 시험을 실시하는 것이 원칙이다. 또한 측정법 및 배지의 적합성시험을 실시하여야 한다.

세포외소포치료제는 완제품에 세포를 포함하고 있지 않으나 세포로부터 생산, 분리, 정제되는 공정 중 원료·시약 또는 시설·환경에 의해 오염될 수 있으며 이는 세포외소포의 품질을 떨어뜨릴 수 있다. 따라서, 환경모니터링과 함께 공정 중 관리(in process control)시험으로 무균시험을 적절하게 수행할 것을 권장한다.

3.3.7 엔도톡신시험

세포외소포치료제 제조공정 중에 작업자 또는 사용되는 다양한 종류의 배지·시약(예. 혈청, 세포성장인자, 분화 유도물질) 등을 통해서 엔도톡신이 오염될 수 있어 세포외소포치료제의 원료의약품, 완제의약품 단계에서 오염여부를 확인하는 것이 필요하다.

원료의약품 및/또는 완제의약품의 투여방법, 투여시간, 체중 등을 고려하여 시험기준을 설정하여야 하며, 대한민국약전에 수재된 바와 같이 겔화법, 비탁법 및 비색법 중 하나를 선택하여 시험한다.

각 방법에 따라 대한민국약전에 따른 시험의 정밀도와 유효성을 보증하기 위한 밸리데이션 시험을 수행한 후 유효희석배수가 결정된 시험법을 사용하여 매 제조로트마다 엔도톡신시험을 실시한다.

3.3.8 확인시험

확인시험은 원료의약품 또는 완제의약품에 있는 물질이 주성분 세포의 세포가 맞는지를 검증하는 것이 목적이며, 세포외세포의 종류나 활성 등 세포외세포가 가지는 본질을 다양한 지표와 시험방법을 이용하여 확인할 수 있도록 한다. 확인시험은 세포외세포의 본질을 규명할 수 있는 시험항목으로 형태학적, 면역학적, 생물학적 시험 등을 설정하여, 각각의 특성별로 서로 다른 지표를 설정하는 것을 권장한다.

현재까지 세포외세포 특이적인 마커로 알려진 것은 없기 때문에 세포외세포 농축단백질, RNA 또는 지질을 측정하는 것이 필요하다. 세포외세포 구성에 대한 특성분석 결과를 바탕으로 몇 개의 단백질, RNA 또는 지질을 선정하고, 선정된 물질에 대하여 적어도 반정량적인 방법으로 시험한 결과를 제시하는 것이 필요하다.

이러한 물질은 분리하고자 하는 세포외세포에 존재할 것으로 기대하는 막단백질과 막에 결합할 수 있는 능력이 있는 세포질내 단백질, 이중 지질막 성분, miRNA 등이다.

3.3.9 순도시험

① 세포외세포와 무관한 세포 내 단백질

핵단백질과 같이 세포외세포에서 농축되지 않을 것으로 기대되는 단백질(예. 핵, 미토콘드리아, 골지체, 소포체(endoplasmic reticulum) 등의 구성물질) 몇 종에 대하여 기준을 설정하여 관리하여야 한다.

② 공정 불순물

사용되는 물질 중 잔류물(혈청 알부민, 항생제 등)에 대하여 적절한 기준을 설정하여 관리하여야 한다.

3.3.10 역가시험

세포외소포치료제의 작용기전을 포함하여 생물학적 기능과 관련하여 세포외소포에 있는 단백질이나 miRNA와 같은 RNA가 역할을 한다는 연구결과가 있다.

그러나 구성성분의 복잡성 때문에 세포외소포는 복합적인 방법으로 작용할 것으로 예상된다. 치료적 효과가 특성분석을 위한 프로파일 분석만으로 설명될 수 없기 때문에 세포외소포의 기능적 특성을 예측할 수 있는 생물학적 분석법을 확립하는 것이 필요하다.

시험방법의 적합성을 확인한 후, 역가시험법으로 사용될 수 있으며 이러한 방법은 예상되는 세포외소포의 작용기전을 반영해야 한다. 예를 들어 세포외소포가 생체 내에서 면역억제기능을 한다면, 생체 외에서 세포외소포의 면역조절특성을 평가하기 위하여 T 세포 증식시험을 역가시험으로 설정할 수 있다. 세포외소포를 이용하여 생체 외에서 역가시험을 수행할 때에는 용량에 따른 활성평가가 수행되어야 한다. 역가시험 기준의 적절성은 비임상과 임상시험 동안 평가되어야 한다.

in vitro 기능분석을 할 때에는 용량-반응관계의 정량적인 분석이 이루어져야 한다. 만약 세포외소포의 특정 치료 효과를 입증하기 위하여 *in vivo* 역가시험을 사용한다면 선택된 동물종의 적절성에 대하여 기술하여야 한다.

3.4 세포외소포치료제 안정성

세포외소포치료제의 저장조건(온도, 기간)에서 품질의 안정성을 평가하기 위하여 「의약품등의 안정성시험기준」(식약처 고시)에 따라 안정성 시험을 수행하여야 한다.

4. 세포외소포치료제 비임상 고려사항

원칙적으로 세포외소포치료제의 비임상평가는 생물의약품 비임상 평가의 기본 원칙에 따른다. 세포외소포치료제가 효력, 안전성약리, 분포, 일반독성, 유전독성, 면역원성 또는 종양원성/발암성 등에 미치는 영향을 평가하여야 한다.

4.1 약리작용에 관한 자료

4.1.1 효력시험

세포외소포치료제의 효력을 평가하기 위해서는 사용목적에 적절한 동물종에서 용량증량 연구가 수행되어야 하며 독성평가를 병행할 수도 있다.

세포외소포치료제 특이적인 활성을 입증하기 위해 적절한 대조군을 포함한 비교 시험이 권장된다. 음성대조군으로서 배양 배지, 비자극세포분리 세포외소포, 세포외소포가 제거된 시료 등을 고려할 수 있다.

4.1.2. 안전성약리시험

세포외소포는 농축되어 투여되고 분해되면 내·외부 물질들이 전

장기에 분포될 수 있기 때문에 환자의 안전성과 관련된 바람직하지 않은 약력학적 특성을 가질 수 있다. 따라서 세포외소포치료제는 원칙적으로 안전성약리시험을 수행하는 것이 필요하다. 가능한 경우 독성시험에 안전성 약리 평가지표를 포함하여 평가할 수 있다.

4.1.3 흡수·분포·대사·배설시험

세포외소포의 생체 내 분포는 치료적 유효성과 함께 비표적부위의 독성에도 영향을 미칠 수 있다. 따라서 혈중 농도, 조직 분포 등을 포함한 생체내 흡수, 분포, 지속 및 소실과 같은 약동학적 특성에 대해 자세히 이해하는 것이 임상시험 설계 시 매우 중요하다. 대부분의 세포외소포의 생체분포 연구는 염색시약이나 유전자조작(예. GFP 또는 luciferase 발현), 방사성 동위 원소 또는 나노입자로 표지된 세포외소포를 검출하는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

세포외소포의 생체내 추적에 흔히 쓰이는 PKH67, DiD, DiR 등과 같은 저분자 친유성 형광염색시약은 세포외소포의 막 지질층에 삽입된다. 이러한 염색시약의 가장 큰 문제는 염색시약의 생체내 반감기가 5일에서 100일 이상으로 길다는 점이다. 이로 인해 염색시약으로 염색된 세포외소포가 분해된 후에도 염색시약은 남아서 세포외소포의 분포에 대한 부정확한 정보를 줄 수 있다.

또한 이러한 막 염색은 알데히드 매개 고정이나 지질 추출 후에 사라지기 때문에 면역염색(immunocytochemistry/immunohistochemistry)을 통한 분석에 제한이 있다.

염색 기반 방법은 염색된 세포외소포가 아닌 염색시약 자체가 투여될 가능성이 있으며, 투여된 염색시약은 혈청 단백질, 순환하는 세포, 혈관 등에 결합할 수 있기 때문에 결과해석에 어려움을 야기할 수 있다. 따라서 슈크

로스 구배 원심분리(sucrose gradient centrifugation), 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography) 등의 방법을 사용하여 결합하지 않은 염색시약이 제거되었음을 보여주는 시험들을 수행하여야 한다. 전자 현미경, 형광발현과 세포외소포 표지자와의 상관성 확인 등이 표지 방법 신뢰성 확인을 위한 방법으로 사용할 수 있다.

이와 같은 표지방법의 단점을 고려하여 세포외소포의 분포를 확인하기 위하여 형광 염색 방법과 함께 RNA 또는 단백질을 확인하는 PCR 또는 면역염색방법 등 두 가지 방법을 병행하여 분포시험을 수행하는 것이 적절하다. 또한, 방사성 동위원소를 이용한 추가적인 방법을 고려할 수 있으며 방사선표지 효율, 순도, 안정성에 대한 자료가 결과 해석에 도움이 될 수 있다.

생체 내 분포시험 결과의 타당성을 확보하기 위해, 표지나 유전적 변형이 세포외소포의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않음을 증명하는 자료가 추가로 요구될 수 있다. 사용한 시험방법에 대해서는 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성 등 적절한 민감도를 가지며 재현성 있는 결과를 도출함을 보여줄 수 있는 밸리데이션 자료가 필요하다. 또한 투여된 세포외소포의 반감기 산출과 분해에 대한 시험이 필요할 수 있다. 모든 동물시험에 대해서는 과학적인 결과 해석이 가능하도록 균의 크기가 충분히 커야 하고 적절한 대조군을 반드시 포함하여야 한다.

4.2 독성에 관한 자료

4.2.1 단회/반복 독성시험

세포외소포치료제의 독성시험을 위해 적절한 동물종에서 용량증량

연구를 수행하여야 한다. 시험결과 면역계의 이상이 의심될 경우 면역독성 시험을 수행하여야 한다.

4.2.2 유전독성

세포외소포는 단백질, 지질, 핵산 등 다양한 물질을 함유하고 있어 유전물질 또는 염색체에 이상을 유발할 가능성이 있다. 세포외소포 함유 물질에 대한 프로파일 분석 등이 유전독성을 예측하는데 도움이 될 수 있으며, 세포외소포의 특성을 고려하여 「의약품 등의 독성시험기준」에 따라 유전독성시험을 수행한다.

4.2.3 종양원성/발암성시험

세포외소포는 (줄기)세포가 없으므로 일반적으로 종양원성/발암성 시험이 요구되지는 않는다. 그러나 불멸화된 세포 또는 외래유전자가 도입된 세포의 경우에는 발암 유전자나 그 단백질이 세포외소포에 포함될 가능성이 있어 기원 세포의 종류 및 도입유전자에 따라 종양원성/발암성시험이 필요할 수도 있다. 또한 반복투여 독성시험 결과나 임상 투여기간을 고려하여 필요한 경우 종양원성/발암성시험을 실시할 수 있다.

4.2.4 면역원성시험

일반적으로 세포외소포의 면역원성 유발가능성을 배제할 수 없으므로 면역원성시험이 요구된다. 세포외소포치료제 제조과정 중 소태아혈청 등과 같이 동물유래성분을 사용한 경우 수혜자에서 바람직하지 않은 면역반응을 증가시킬 수 있음이 보고되었다. 또한, 유전자 조작된 세포에서 세포외소포를 생산한다면 이에 따른 면역원성에 대한 영향이 고려되어야 한다.

5. 세포외소포치료제 임상 고려사항

세포치료제와 달리 세포가 배제되어 있는 형태이므로 기존의 의약품 임상시험과 동일한 기준과 방법이 적용 가능하다.

6. 참고문헌

1. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015
2. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the international Society for Extracellular Vesicles, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014
3. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2017
4. 세포치료제 품질관리 시험항목 설정 가이드라인, 2023
5. 세포치료제 기증자 적합성 평가 가이드라인, 2021
6. 세포치료제 세포은행 평가 가이드라인, 2023
7. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015
8. Therapeutic Potential of Engineered Extracellular Vesicles, *The AAPS Journal*, 2018
9. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, 2018
10. 科学委員会報告書 「エクソソームを含む細胞外小胞 を利用した治療用製剤に関する報告書」 の掲載について, 2023.



세포외소포치료제의 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인

발 행 일 2023년 12월

발 행 인 박윤주

편 집 위 원 장 최영주

편 집 위 원 신인수 백대현 강진욱 최경숙 박정연 백정희
정은용 이가영 박동현 유혜선 이재린 안난영
홍영기

발 행 처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부
세포유전자치료제과



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원