

320063-02

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004133-01

동물용
세포외
소포
치료제
품질,
비임상
및
임상
평가
가이드
라인
제정

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정

(2022.07.11.)

주관연구기관 / 한국건설생활환경시험연구원
협동연구기관 / 주식회사 노터스
협동연구기관 / 주식회사 엑소코바이오

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정”(개발기간 : 2020. 04. 01 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022년 07월 11일

주관연구개발기관명 : 한국건설생활환경시험연구원  태
 공동연구개발기관명 : 주식회사 노터스 김도형 (인)
 공동연구개발기관명 : 주식회사 엑소코바이오 조병성 



주관연구책임자 : 한국건설생활환경시험연구원 이재원
 공동연구책임자 : 주식회사 노터스 김석호
 공동연구책임자 : 주식회사 엑소코 바이오 조병성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

| | | | | | | | |
|------------------------|----------------|--|---|--------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| 사업명 | | 가축질병대응기술개발사업 | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | |
| 내역사업명 (해당 시 작성) | | | | | 연구개발과제번호 | | 320063-02 |
| 기술 분류 | 국가과학기술 표준분류 | LB0710 | 50% | LC1301 | 30% | LC0317 | 20% |
| | 농림식품 과학기술분류 | RB0201 | 50% | RB0199 | 30% | RB0299 | 20% |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정 | | | | | |
| 연구개발과제명 | | | | | | | |
| 전체 연구개발기간 | | 2020. 04. 01 ~ 2021. 12. 31 | | | | | |
| 총 연구개발비 | | 총 623,000천원 (정부지원연구개발비: 467,000천원, 기관부담연구개발비 : 156,000천원) 1차년도 (정부지원연구개발비: 200,000천원, 기관부담연구개발비 : 67,000천원) 2차년도 (정부지원연구개발비: 267,000천원, 기관부담연구개발비 : 89,000천원) | | | | | |
| 연구개발단계 | | 기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[] | | 기술성숙도 (해당 시 기재) | | 착수시점 기준() 종료시점 목표() | |
| 연구개발과제 유형 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제 특성 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발 목표 및 내용 | 최종 목표 | | | | | | |
| | 전체 내용 | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 동물용 세포외치료제 품질 및 평가체계 확립을 위해 동물 세포 유래 엑소좀의 분리, 분석 방법 및 비임상시험 등 가이드라인의 제정에 필요한 자료를 생산함 ○ 기 존재하는 인체용 세포외소포치료제 가이드라인과의 비교 분석을 통한 동물용 맞춤형 가이드라인 제정 ○ 동물용 세포외소포치료제 품질 평가를 위한 자료, 비임상 및 임상시험 시 고려사항에 대한 자료를 취합하여 정책활용에 이바지하고자 함. 또한 학술발표 및 국제적인 SCI논문발표를 통해 해당 성과를 홍보하고자 함 | | | | |
| | 1차년도 | 목표 | ○ 국내외 선행사례 조사 및 분석 (공통) | | | | |
| | | 내용 | - 국내외 동물용 세포외소포치료제 가이드라인/관련 규정 현황 확인 및 문제점 분석 - 전문가 협의회 구성 및 규제영향 분석 및 의견 수렴 | | | | |
| | 1차년도 | 목표 | ○ 개 유래 줄기세포 분리방법 확립 | | | | |
| | | 내용 | - 줄기세포가 유도하는 세포외소포 확보를 위해 개 유래의 간엽 줄기세포 분리방법 확립하여 검증용으로 활용함. - 지방유래의 간엽줄기세포를 우선적으로 하되, 간엽줄기세포로서의 분화능과 증식능이 일반적인 시험 검사치에 미달할 경우 다른 장기 유래(ex: 골수, 제대혈, 태반)의 간엽줄기세포 분리하여 분리방법 확립. | | | | |
| | 1차년도 | 목표 | ○ 동물용 세포외소포치료제 시생산 및 품질기준 확립 | | | | |
| | | 내용 | - 개유래 중간엽줄기세포의 엑소좀 생산성 확인 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 품질기준 확립 | | | | |
| 1차년도 | 목표 | ○ 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시 | | | | | |
| | 내용 | - 약리작용에 관한 자료(효력시험): 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 아토피 효능 확인 | | | | | |
| 2차년도 | 목표 | ○ 개 유래 줄기세포의 기준 품질검사 | | | | | |

| | | | |
|--|------|----|--|
| | 2차년도 | 내용 | <ul style="list-style-type: none"> - 확립된 방법으로 개 유래 줄기세포를 생산하며 총 3.6×10^8 이상의 세포를 생산함. - 생산한 세포의 기준 품질검사를 위하여 분화능과 증식능, 줄기세포로서의 고유의 특성을 가지고 있는지 확인하기 위한 세포 표면표지인자를 확인함. - 배양액을 세부 참여기관인 엑소코바이오에 전달하여 엑소솜 생산. |
| | | 목표 | ○ 동물용 세포외소포치료제 독성평가를 위한 엑소솜 공급 |
| | 2차년도 | 내용 | <ul style="list-style-type: none"> - 개유래 중간엽줄기세포 엑소솜의 반복투여 독성시험을 위한 엑소솜 생산 - 1차년도에 확립된 생산 방법 및 시험법을 활용하여 독성시험에 소요될 엑소솜을 생산 |
| | | 목표 | ○ 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시 |
| | 2차년도 | 내용 | <ul style="list-style-type: none"> - 독성에 관한 자료: 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소솜의 독성평가 - 설치류 단회투여 독성시험, 4주 반복투여 독성시험 |
| | | 목표 | ○ 각 기관별 역할에 따른 가이드라인 검토 의견 작성 |
| | 2차년도 | 내용 | - 전문가 패널의 의견을 함께 고려하여 작성함 |
| | | 목표 | |

| | |
|--------|--|
| 연구개발성과 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발내용을 종합하여 학술발표 2건 및 SCI 논문 발표 1건을 수행 ○ 또한 인체용 가이드라인과는 다른 ‘맞춤형’ 동물용 가이드라인 제작을 위한 보고서 원문 <ul style="list-style-type: none"> - 향후 정책홍보 및 가이드라인 제작에 활용 |
|--------|--|

| | |
|---------------------|--|
| 연구개발성과 활용계획 및 기대 효과 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 동물용 세포외소포치료제의 가이드라인 제정을 통한 관련 기술을 가진 중소기업의 성장 및 시장 진출 가속화 ○ 신규 가이드라인 제정에 따른 관련 반려동물 산업의 동반 성장 가능성 ○ 최초가이드라인 제정을 통해 동물용 세포외소포치료제 분야의 ‘퍼스트 무버’로서의 국제적인 위상 제고 ○ 동물용 세포외소포 치료제 개발 가능성 제고 <ul style="list-style-type: none"> - 세포외소포 치료제 개발 및 임상시험 후 양산화가 가능할 것으로 예상함. ○ 기타 특수 동물의 세포외소포 치료제 개발 가능성 및 세포외소포 치료제 개발 가능성 제고 ○ 기술적 측면 : 국내 최초로 동물유래 줄기세포에서 유래한 엑소솜을 분리하고 생산하여 비임상시험(임상시험 생략) 수행 ○ 경제적·산업적 측면 : 신규 가이드라인 제정을 통해 관련 기술을 가진 기업의 시장 진출 및 매출증진에 도움을 될 것으로 예상. ○ 사회적 측면: 동물용 세포외소포치료제 분야의 국제적인 위상 제고. 반려동물의 치료제의 확장성으로 인해 보호자의 만족도를 높일 수 있음 |
|---------------------|--|

| | |
|--------------------|------|
| 연구개발성과의 비공개여부 및 사유 | 해당없음 |
|--------------------|------|

| 연구개발성과의 등록·기탁 건수 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구 시설·장비 | 기술 요약 정보 | 소프트웨어 | 표준 | 생명자원 | | 화합물 | 신품종 | |
|------------------|----|----|--------|----------|----------|-------|----|-------|-------|-----|-----|----|
| | | | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | | 정보 | 실물 |
| | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| 연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황 | 구입 기관 | 연구시설·장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | 비고 (설치장소) | ZEUS 등록번호 |
|-----------------------|-------|----------|----------|----|--------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | |
|---------------|--------------|-------|------|-------|------|
| 국문핵심어 (5개 이내) | 동물용 세포외소포치료제 | 가이드라인 | 품질관리 | 비임상시험 | 임상시험 |
|---------------|--------------|-------|------|-------|------|

| | | | | | |
|---------------|--|-----------|-----------------|-------------------|----------------|
| 영문핵심어 (5개 이내) | Extracellular Vesicle-based Therapeutics | Guideline | Quality control | Nonclinical trial | Clinical trial |
|---------------|--|-----------|-----------------|-------------------|----------------|

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료

1. 참고문헌
2. 국내 및 국제 학술회의 발표
3. 논문(국내외 전문 학술지) 제출
4. 독성평가 최종보고서
5. 가이드라인

1. 연구개발과제의 개요

○ 세포외소포의 정의

- 세포외소포(Extracellular Vesicles; EVs)는 세포에서 유래하는 이중 지질막 구조의 물질을 의미하며, 세포외소포치료제는 살아있는 세포에서 분비되는 세포외소포를 분리, 정제하여 제조하는 의약품으로 정의된다. 세포외소포는 형성 과정에 따라 1) 세포막이 세포 내부로 함입되어 엔도솜을 형성하고 다시 엔도솜막이 내부로 함입되어 작은 소포를 다수 포함하는 다소포체(multivesicular body)가 세포막과 융합하여 내부의 작은 소포를 세포 외부로 분비하여 만들어지는 엑소솜(exosome); 2) 세포막이 세포 바깥으로 돌출하여 떨어져 나와 형성되는 미세소포(또는 마이크로베지클, microvesicle); 및 3) 세포사멸(apoptosis) 과정에서 세포 분해물들이 포함된 막구조가 형성되는 세포사멸체(apoptotic body)로 나뉜다.

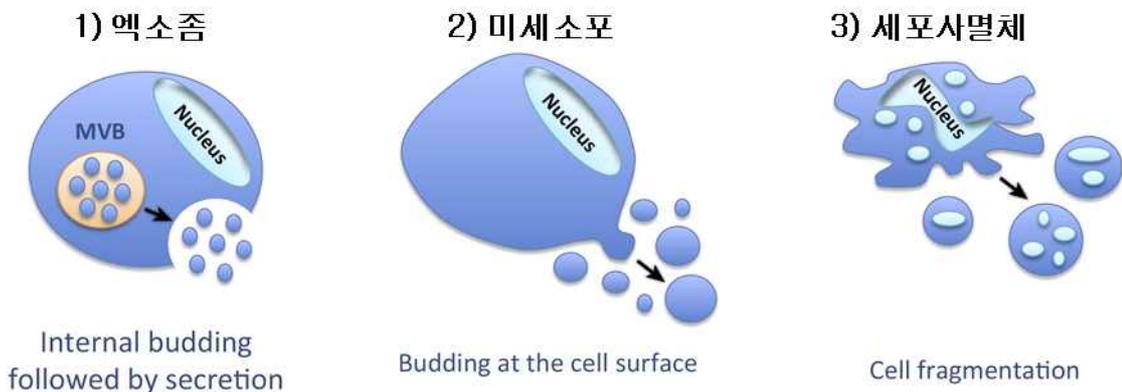


그림 2 세포외소포의 종류(Kanada et al. (2016) Trends Cancer 2:84-94.

- 세포외소포 중 세포가 사멸하며 형성되는 세포사멸체는 유익한 약리기전이 없을 것으로 이해되고 있다. 따라서 치료제를 목적으로 개발되는 세포외소포는 미세소포와 엑소솜을 포함하며, 이 중에서도 특히 연구개발이 많이 진행된 엑소솜이 차세대 치료제로서 크게 주목받고 있다^{1),2)}.
- 엑소솜 특이적인 마커로는 엑소솜 내부에 존재하는 것으로 알려진 Alix, TSG101 등과 엑소솜 표면에 존재하는 CD63, CD9, CD81 등이 알려져 있으며, 기원 세포의 종류에 따라 발현 정도에 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 줄기세포(stem cell)가 분비하는 엑소솜은 줄기세포의 재생/치유 능력, 항염증, 면역조절 능력과 관련된 물질들이 다량 함유되어 있어 차세대 비세포치료제(cell-free therapy)로 활발한 연구개발이 진행되고 있다.

○ 엑소솜 치료제 개발의 시급성

- 전세계적으로 세포외소포를 차세대 치료제로 개발하기 위한 기초 연구개발이 활발히 진행되고 있으며, 산업적으로도 다수의 국내외 기업이 세포외소포를 의약품으로 개발하기 위한 응용연구와 인프라 개발을 발빠르게 추진하는 등 세포치료제의 대안으로 부각되고 있음.
- 일례로 미국의 Codiak Biosciences와 Exosome Diagnostics, 영국의 Evox Therapeutics 및 한국의 (주)엑소코바이오 등 글로벌 4위 엑소솜 스타트업이 2018년까지 유치한 투자금의 규모는 3억8620만 달러에 달함.³⁾

1) Théry C, et al. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol 2:569-579.

2) Mathivanan S, et al. (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. J Proteom 73, 1907-1920.

3) Hildreth C. Top 4 most richly funded exosome startups. *BioInformant* Available online: <https://bioinformant.com/top-exosome-companies/>

TOP 4 EXOSOME STARTUP

ExoCoBio is the world's first and only "Regenerative Aesthetics" startup based on "Stem cell-derived Exosomes".



그림 3. 엑소코바이오는 아시아 기업으로는 유일하게 글로벌 Top 5 엑소좀 스타트업으로 소개되었으며, regenerative aesthetics 분야의 선도 회사로 인정받고 있음 (출처: BioInformant, 2018 & 2019).

- 2019년까지 엑소좀 스타트업과 다국적 제약사 간에 이미 다수의 빅딜이 진행되었으며, 최대 10억 달러에 이르는 계약 규모도 확인되고 있음.⁴⁾ 그러므로 글로벌 시장을 선도할 수 있는 엑소좀 치료제 기술의 개발이 시급함.

○ 동물용 세포외소포치료제의 현황

- 인체 치료 적용에서 보는 바와 같이 동물유래 줄기세포 역시 세포치료제로 개발되고 있으며, 줄기세포치료제의 작용 기전이 파라크라인(paracrine) 효과에 의존하고, 파라크라인 효과의 핵심은 엑소좀이므로, 동물 줄기세포 유래 세포외소포 역시 비세포(cell-free) 치료제로 개발될 것으로 전망됨.
- 그러나, 동물 줄기세포 유래 세포외소포의 치료적 효능에 대한 연구는 아직 초기 단계임. 그러므로 엑소좀을 생산하는 줄기세포치료제의 시장을 통해 동물용 세포외소포치료의 시장 및 연구동향을 간접적으로 예측하고자 함.

○ 동물용 세포치료제 시장 및 연구현황

(1) 세포치료제 시장

- 동물용세포치료제 시장은 현재 세계시장 분석 및 정산이 제대로 이루어져 있지 않음. 국내 역시 마찬가지임.
- 대표적인 세포치료제의 소재로서 줄기세포가 사용되고 있으며 엑소좀을 포함한 그 외의 소재들도 개발 및 연구 초기 단계임. 사람의 줄기세포 개발 역사에서 미뤄 보자면 미국, 영국, 일본, 중국, 한국이 중심이 되어 재생의학, 약물개발, 생물학적제제 등으로 연구할 것이며 국가 단위의 투자가 진행 될 것으로 예상됨.
- 반려동물인 개 줄기세포는 미국, 호주 등에서 이미 치료로 적용되고 있으며 미국은 Vet-Stem나 메디벳 아메리카사의 경우처럼 기업화 경향을 보임.
- 주로 개와 고양이에서 줄기세포를 이용한 치료가 적용되고 있는 것으로 보고되고 있고 줄기세포 치료제 비용은 약 2,000~4,000USD로 가격절감 문제가 시급함.
- 동물용 세포치료제 개발은 반려동물의 골손상, 시력손상 등의 난치성 질환을 치료할 수 있을 뿐만 아

4) Plieth J, Amstrom M. Exosomes start to deliver deals. *Vantage* 2019.01.28. Available online: <https://www.evaluate.com/vantage/articles/news/snippets/exosomes-start-deliver-deals>

나라 인체 질환과 유사한 질환동물 모델로서 치료제의 효능 및 독성 평가 등의 전임상 단계의 인체 적용 세포치료제에 대한 평가 지표를 마련할 수 있고, 인체질환과 비슷한 질환동물 모델의 사용을 통해 임상연구의 비용부담을 경감 시키는 등의 경제적인 효과를 볼 수 있기 때문에 연구개발이 활발히 이루어지고 있음.

- 반려동물용 골세포치료제는 2015년 기준, 국내에서는 몇몇 대학병원의 수의과나 줄기세포 관련 기업에서 시험적으로 적용하고 있는 상황이라 시장이 본격적으로 형성되어 있다고 말하기는 어려운 실정이며 해외의 경우도 미국, 호주, 유럽을 중심으로 기업화와 연구개발이 활발히 진행되고 있기는 하나 시장 초기 진입단계로 시장규모 자체는 크지 않다고 판단됨.
- 유럽에서 반려동물에 대한 치료사례를 살펴보면, 네덜란드에서 2010년 최초로 1,600유로의 비용으로 개에게 줄기세포 치료제를 적용하였다고 하며, 스페인의 바로셀로나에서는 2004년 Fat-Stem사의 치료제를 이용하여 경주용 말의 골관절염을 치료한 사례가 있다고 보고 됨.
- 이에, 국내에서도 본격적인 동물세포치료제 또는 세포외소포치료제 등의 개발이 필요하며, 해외의존성을 벗어나기 위해 서는 기술선점을 위한 노력이 필요할 것으로 판단됨.
- 해외에서는 Vet-Stem 社와 Animal Cell Therapies 社와 같은 기업형의 동물세포 치료가 시도되고 있으며 매출 규모도 연간 600억 이상으로 증가되고 있는 상황임.
- 국내에서는 건국대 수의대, 서울대 수의대등 대학병원 뿐만 아니라 군소 동물병원에서 자체 적으로 조직을 추출하여 배양한 후 병변부위에 재투입하는 동물세포치료가 이미 진행되고 있는 상황이나 규제나 가이드라인은 없으며 동물의약품으로 허가받은 경우도 전무한 상황.
- Vet-Stem 社 (참조 : <http://www.vet-stem.com/owners.php>) Vet-Stem 社は 2002년 설립되어 재생의학을 통해서 동물의 삶을 향상시키기 위한 세포 치료제를 개발하고 있는데 미국에서 첫 번째로 지방유래 줄기세포 (ADSC, adipose-derived stem cell)를 동물에 제공한 회사로써, 수의학으로의 재생 줄기세포의 사용을 개척해 나가고 있음.
- Vet-Stem 社は 지방유래 줄기세포의 사용을 위해 세계적인 동물 권리를 포함한 50개 이상의 특허 라이선스를 보유하고 있는 것으로 파악됨. Vet-Stem 社에서 동물의 치료대상으로 삼고 있는 것은 대표적인 반려동물인 개나 고양이의 관절염, 그리고 말의 관절, 힘줄 및 인대 등임. Vet-Stem 社の Vet-Stem 재생 세포 치료제는 Artecel Inc.로부터 라이선스를 취득한 임상기술을 기반으로 Univ of Pittsburgh와 Duke Univ로부터 최초 특허를 획득하였고, 자사의 지방유래 줄기세포(Vet-Stem Regenerative Cells: VSRCTM)를 이용한 자가 세포치료제 개발하여 현재 힘줄, 인대손상, 골절을 겪는 말과 관절염을 겪는 개에게 사용하고 있는데 Vet-Stem 社에 의하면 연간 4,140마리의 말을 치료하는데 평균 성공률이 80%이상이라고 함.



그림 3 Vet stem 치료 목적

- Animal Cell Therapies 社 (참조 : <http://actcells.com/>) Animal Cell Therapies 社(이하 'ACT社')는 Dr. Kathy Petrucci에 의해 설립되어 동물에게 과학이 제공하는 최고의 생명을 주는 것을 목표로 동물의 연부조직 손상(힘줄, 연골, 인대 등)을 대상으로 세포치료를 사용하고 있음.
- ACT社는 반려동물을 치료하고 세포기반 치료 지원에 초점을 맞춘 지적 재산의 포트폴리오를 개발하고 있으며 3건의 특허를 출원 보유하고 있다.



그림 4 제대혈 유래 줄기세포 치료제 회사인 ACT 소개자료

(2) 연구개발 동향

- 반려견의 세포치료제 개발에 대한 특허로서, 국가별로 살펴보면 미국이 39건, 42%로 가장 많은 출원을 하고 있는 것으로 나타났으며, 국제특허(34건, 37%), 한국(8건, 9%), 일본(7건, 8%), 유럽(4건, 4%)의 순으로 출원이 이루어지고 있는 것으로 나타남.
- 대다수의 현재 판매되는 제품들은 말과 개의 관절염을 개선하는 쪽으로 연구되었으며 세포치료제가 갖는 재생성에 주목하는 연구가 대다수임.
- 국내의 경우 건국대학교 동물 줄기세포 치료연구센터 와 강스탬바이오테 등에서 개와 말의 줄기세포 주를 연구하였으나 현재 상업적으로 사용하지 않고 확보한 수준임.



그림 5 반려견에 적용 중인 건국대학교 동물 줄기세포 치료연구센터의 줄기세포 치료제



그림 6 강스템바이오텍의 줄기세포주

○ 동물용 아토피 치료제 시장 및 연구현황

- 세부기관2((주)엑소코바이오)의 선행연구결과 설치류에서 유도된 아토피 질환에서 인체 지방줄기세포 유래 엑소솜이 치료 효능을 보인 바 있으며, 국외에서 개 지방줄기세포의 아토피 피부염 치료 효능도 연구된 바 있으므로^{5),6),7)} 개 줄기세포 유래 엑소솜을 이용하여 비임상 가이드라인의 일부 항목인 '약리작용에 관한 자료' 및 '독성에 관한 자료'의 시험을 수행하며 아토피 치료제로서의 가능성을 확인할 예정이다.

(1) 아토피 치료제 시장

- 개에게 가장 큰 건강 문제는 귀 감염이지만 세 번째, 네 번째는 피부 질환과 알레르기 반응임.
- 개 아토피 피부염은 견종의 가장 흔한 질환 중 하나이며 2017년 기준 미국, 캐나다, 유럽 등지 반려견의 10-15%가 이를 앓고 있음.
- 아토피 피부염을 앓는 개의 가려움증 심각성은 씹기, 파잉 행동, 대변 섭취, 음식 구걸 및 도둑질, 주의 집중, 흥분, 훈련 능력 감소 등을 불러일으킴.
- 완치법이 없고 아토피를 앓게 된 견종은 매년 피부가 약해져 꾸준한 치료가 필요.
- 아토피의 정확한 원인을 완벽히 다 밝혀내진 못했지만 산업화로 인한 공해가 큰 요인으로 지목됨.
- 개발도상국들의 빠른 산업화 등 세계 환경 정세로 미루어 볼 때 앞으로도 아토피 질환을 앓게 되는 견종은 더욱 늘어날 것.
- 현재 세계 개 아토피 시장 규모는 6억 달러 규모.

5) Villatoro et al. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. Vet. Rec. 2018;183:654.

6) Hall et al. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. Vet. Ther. 2010;11:E1-E14.

7) Enciso et al. Multidose intramuscular allogeneic adipose stem cells decrease the severity of canine atopic dermatitis: a pilot study. Vet. World 2019;12:1747-1754.

- 미국 투자회사인 구겐하임 파트너 (Goggenheim Partners)에 따르면 2024년에는 10억 달러 이상의 규모를 형성할 것이라 예상.
- 거기에 FMI (Future Market Insights)의 시장 예측 및 분석에 따르면 2029년에는 24억 달러로 현재의 4배 규모까지 급증할 것이라 예상.
- FMI는 이러한 호황의 이유로 생명공학, 유전자 치료, 디지털 혁신의 진보와 시장 참여자들의 투자 증가로 보고 있음.
- "수중과학의 새로운 약물 개발 혁신으로 인해 아토피성 피부염 치료약과 백신의 판매는 계속해서 인상적인 속도로 급증할 것"
- "특정 치료제들에 대한 저항력이 강화된 점으로 볼 때, 면역성 특정 백신과 약물에 대한 수요가 증가하고 있음."
- 세계 시장에서도 아토피성 피부염 치료 시장을 이끄는 지역은 유럽과 북미.
- 이유로는 특히 이 지역의 아토피성 피부염의 발생률이 높다는 것, 고급 반려동물 의료 시설의 내원이 용이, 매출 신장을 위한 지속적인 연구개발 등이 있음.
- 아시아 지역의 경우 유럽, 북미 기업의 제품을 구입하는 시장으로서만 존재함. 따라서 제대로 된 통계 및 시장 조사 자료 전무함.
- 미국에서 1년에 동물병원을 찾는 반려견은 약 5천 150만 마리. 그중 850만 마리(약 17%)의 환자가 소양증을 가지고 있음.
- 그중 21%(180만 마리)는 아토피성 피부염 진단을 받음.
- 조에티스가 미국에서 소양증을 가진 반려견 44만 3천 마리를 2년간 추적한 결과, 소양증 반려견은 1년 평균 동물병원을 3.3회 방문.
- 한 번 방문 시 314달러를 사용함. 연평균 동물병원비로 1,036달러(약 123만 5천원)를 사용.
- 2018년 국내 아포켈(아토피 경구투여제) 사용 동물병원 수는 1,461 병원이었으며 2019년 8월 기준 1,567 병원으로 전년 대비 22.6% 증가.
- 미국의 경우 아포켈이 출시된 2015~2017년 소양증 환자 비율이 증가했다고 하는데, 이는 수의사가 미처 인지하고 있지 못하던 환자군이 신약 출시와 함께 치료 및 진단을 받기 시작했다고 해석할 수 있음.
- 이처럼 국내에서도 아토피와 관련된 다양한 신약 출시로 시장 확대가 가능할 것.
- 수의학에서 승인된 최초의 단일 클론 항체 (mAb) 치료제인 “강아지의 알레르기 및 아토피성 피부염에 대한 Zoetis의 Cytopoint 치료”는 2018년 매출이 1억 달러를 넘어섬.
- 국내 경기도수의사회에서는 “건강 아토피성 피부질환은 치료가 아닌 평생관리 개념에서 접근해야 한다”는 의견을 제시한 상태임.

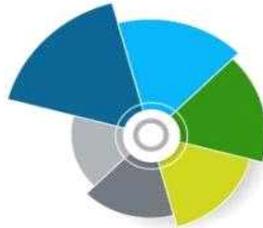
(2) 연구개발 동향

- 아토피 피부염 치료제 개발 기업은 Zoetis, Virbac, AB Science, Toray Industries, Novartis, Boehringer Ingelheim, Elanco Animal Health 등이며 이들이 세계 시장을 분할하고 있음.
- 국내에서는 Zoetis의 cytopoint 와 아포켈이 주도하고 있는 실정임.
- 제품 유형별로는 항히스타민(Antihistamines), 면역 억제제(Immunosuppressants), 코르티코 스테로이드 (Corticosteroids), 항생제(Antibiotics), 연화제(Emollient) 등을 사용하고 있으며 세포치료제 목적으로 사용되는 아토피 치료제는 없음.

Canine Atopic Dermatitis Treatment Market

2019 - 2029

Market By Drug Class



- Immunosuppressants
- Monoclonal Antibodies
- Antihistamines
- Antipruritics
- Essential Fatty Acids
- Antibiotics

“Rising increase in the adoption of pets in developed countries and increasing influx of medical information over the Internet are factors promoting the growth of the canine atopic dermatitis treatment market.”



Source: Future Market Insights
 Email: sales@futuremarketinsights.com
 Press: press@futuremarketinsights.com

futuremarketinsights future-market-insights
 futuremarketinsights FMIConsulting



그림 7 개 아토피 피부염 치료제 시장 구분표

○ 동물용 세포외소포치료제 평가 가이드라인 제정시 필요한 참고문헌

- 현재 인체용 「세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인(민원인 안내서)」이 식품의약품안전평가원에 의해 2018. 12.에 제정되어 활용되고 있음.

“세포외소포치료제는 세포치료제와 유사한 약리작용이 기대되나 살아있는 세포를 포함하고 있지 않기 때문에 현재 생물의약품 분류 상, 세포치료제에 해당하지 않음. 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 변형 이 이루어졌다면 유전자치료제로 분류될 수도 있다. 유전물질이 도입된 세포를 이용하여 제조되는 세포외소포 치료제는 본 가이드라인과 함께 유전자치료제의 심사기준이 적용될 수 있다.”

「세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인(민원인 안내서)」 일부내용 中

- 현재 인체용 세포외소포치료제의 가이드라인에 따르면 특정 분류에 속하지 않으나, 일반적인 생물의약품의 범주에 속하는 것으로 판단됨. 그러므로 「동물용 세포치료제 안전성 평가 가이드라인」과 「동물용의약품등의 독성시험지침(검역본부 고시)」도 동물용 세포외소포치료제 가이드라인제정에 활용될 수 있을 것으로 예상됨.

| | | |
|--|--|---|
| <div style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;"> 가이드라인 관리번호 안내사-0917-01 </div> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 [민원인 안내서] (Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Assessment of Extracellular Vesicles Therapy Products) </div> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> 2018. 12. </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  바이오생약심사부 세포유전자치료제과 </div> | <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> 농림축산검역본부 고시 제2016-22호 </div> <p>「동물용의약품 등 취급규칙」 제7조제1항 및 제2항, 「동물용의약품 등 안전성·유효성심사에 관한 규정」 제7조제1항제4호의 규정에 의하여 “동물용의약품 등 독성시험지침”을 다음과 같이 개정하에 고시합니다.</p> <p style="text-align: center;">2016년 3월 9일</p> <p style="text-align: right;">농림축산검역본부장</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> 동물용의약품 등 독성시험지침 </div> <p style="text-align: center;"> 제정 2007.122 국립수의과학검역원 고시 제2007-5호 개정 2008.11.20 국립수의과학검역원 고시 제2008-16호 개정 2009.12.30 국립수의과학검역원 고시 제2009-18호 개정 2011.6.15 농림축산검역검사본부 고시 제2011-11호 개정 2013.3.23 농림축산검역본부 고시 제2013-23호 개정 2016.3.9 농림축산검역본부 고시 제2016-22호 </p> <p>제1조(목적) 이 지침은 「약사법」 제31조, 제42조, 제85조제1항, 「동물용의약품 등 취급규칙」 제7조제1항·제2항, 「동물용의약품 등 안전성·유효성심사에 관한 규정」 제7조제1항제4호에 따라 제출되는 동물용의약품 등의 독성시험에 관한 세부사항을 정함을 목적으로 한다.</p> | <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> 동물약품평가과-5460 (2018.06.11)호 불입자료 </div> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> 동물용 세포치료제 안전성 평가 가이드라인 Guideline on Safety assessment of Cell-based Products for Animal Use </div> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> 2018. 6. </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  농림축산검역본부 Animal and Plant Quarantine Agency 동물질병관리부 동물약품평가과 </div> |
|--|--|---|

그림 8 참고 가이드라인

- 가이드라인 제정을 위한 개와 고양이 등 반려동물(목적동물)에 대한 내용이나 고려는 목적동물에 적용하는 부위, 제형, 적용증 등 다양한 변수를 고려하는 내용을 개발을 위한 가이드라인에 포함하여 작성하기 어려움이 있으며, 각 변수들에 해당하는 가이드라인을 추가적으로 제작하는 .

○ 동물용 세포외소포치료제 평가 가이드라인 제정 후 필요한 사항

- 가이드라인 제정을 위한 개와 고양이 등 반려동물(목적동물)에 대한 내용이나 고려는 목적동물에 적용하는 부위, 제형, 적용증 등 다양한 변수를 고려하는 내용을 개발을 위한 가이드라인에 포함하여 작성하기 어려움이 있으며, 각 변수들에 해당하는 추가적인 가이드라인이 필요함.

○ 해외 동물용 세포외소포치료제 평가 가이드라인 제정 현황

- 해외 동물용 세포외소포치료제 가이드라인은 존재하나 현재 세포외소포 치료제 가이드라인을 제정되어 있지 않음.
- 기존 세포외소포치료제의 부칙으로 제정하거나 국내 제정 케이스를 참조하여 제정할 가능성이 높을 것으로 사료됨.

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

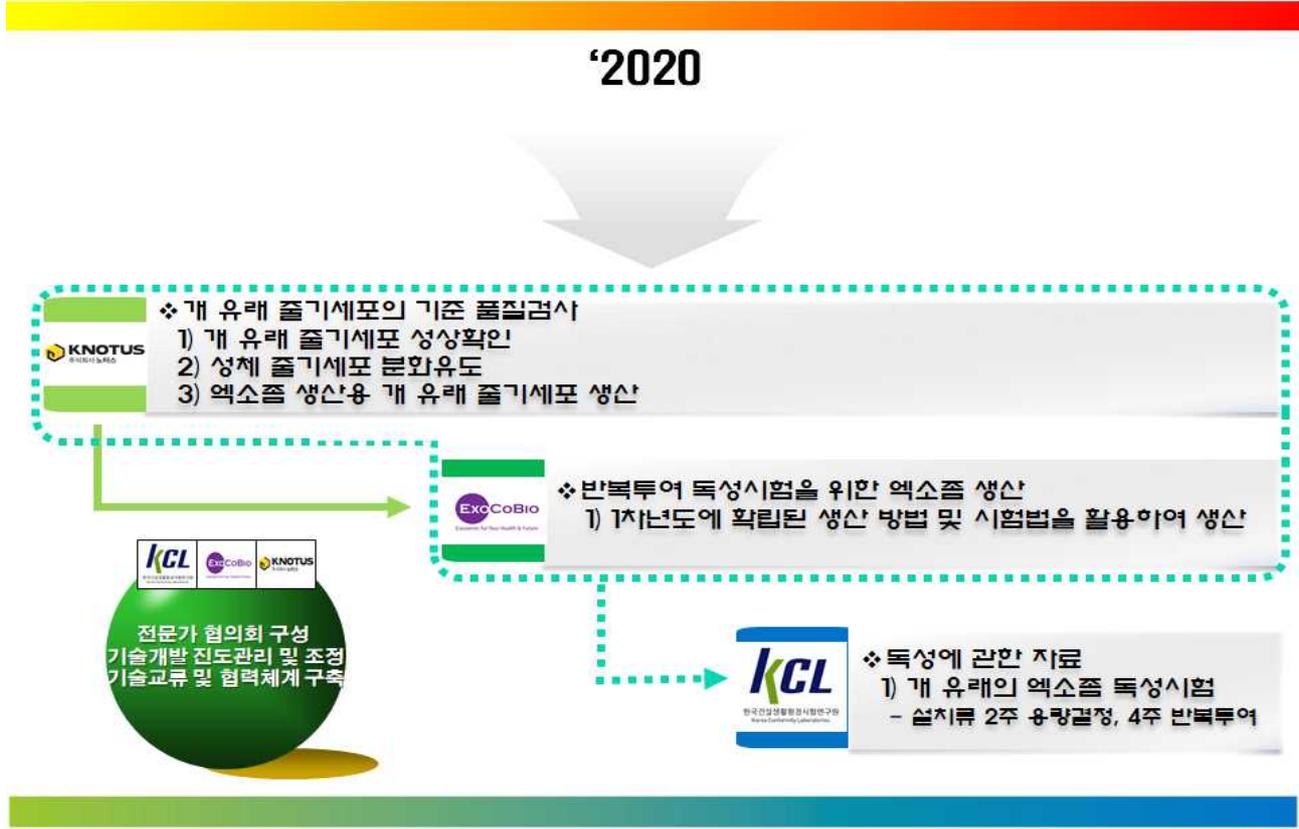
| | |
|------------------------|--|
| <p>기술현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 국내에서 발표한 엑소좀 연구 논문은 2005년 1편이 최초로 확인되며, 2018년 75편, 2019년 8월 22일 현재 60편이 발표되었음 - 현재까지 국내 연구진에 의해 발표된 줄기세포 엑소좀 논문은 50여편에 불과함 - 국내 엑소좀 치료제 개발은 주로 대학병원과 연구소에서 개념입증(proof of concept) 연구 단계로 진행되고 있음 - 최근들어 엑소좀 치료제 개발을 추진하는 회사들이 설립되어 연구개발을 진행 중임 |
| <p>시장현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 현재까지 전세계적으로 승인된 엑소좀 치료제는 없음 |
| <p>경쟁기관 현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 엑소코바이오: 줄기세포 엑소좀의 항염/재생 효능을 이용한 치료제를 개발 중임 - 엠디분: 약물 전달을 목적으로 인공 엑소좀을 종양 치료제로 개발 중임 - 로제타엑소좀: 인공 엑소좀 및 박테리아 엑소좀 유사 입자를 이용한 항암 치료제를 개발 중임 - 일리아스바이오로지스: 재조합 엑소좀 기술을 이용하여 폐혈증, 고셔병 치료제를 개발 중임 |
| <p>지식재산권 현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구의 목적과 유사하게 효능이 강화된 줄기세포 엑소좀 개발과 관련된 국내 지식재산권 현황은 아래와 같음 - (등록) 10-1843634: 삼성생명공익재단, 트롬빈 처리 줄기세포 엑소좀을 포함하는 만성폐질환 치료용 조성물 - (등록) 10-1860266: 삼성생명공익재단, 트롬빈 처리 줄기세포 엑소좀을 포함하는 피부상처 치료용 조성물 - (등록) 10-1719569: 이화여자대학교, 체외충격파를 이용한 세포로부터 세포 외소포체 생성 및 분비 촉진 방법 - (공개) 10-2019-0083933: 아산사회복지재단/울산대학교 산학협력단, 인터페론 감마로 전처리된 유도만능 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 및 이로부터 유래된 엑소좀을 포함하는 피부질환의 개선, 예방 또는 치료용 조성물 - (공개) 10-2019-0063453, 아산사회복지재단, 줄기세포 유래 엑소좀 생성 촉진용 조성물 |
| <p>표준화 현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 2018년 12월 식품의약품안전처에서 세포외소포(엑소좀) 치료제 가이드라인을 공포함 (식품의약품안전처의 가이드라인은 줄기세포 엑소좀에 포커싱되어 있음) |

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

| | |
|-----------------|--|
| <p>기술현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 엑소좀 연구는 1997년 한 해에 발표된 논문이 6편에 불과하였으나, 2000년대 중반을 기점으로 증가하기 시작하였음 - 2018년에 발표된 엑소좀 관련 논문은 2,196편에 달하며 2019년 8월 22일까지 발표된 논문은 1,900여편을 넘어섰음 - 특히 줄기세포 엑소좀에 대한 연구 논문은 2009년 2편에 불과하였으나, 2018년 247편, 2019년 8월 22일 현재 204편의 연구 논문이 발표되었음 |
| <p>시장현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 엑소좀을 이용한 진단 및 치료제의 글로벌 마켓은 2019년부터 2027년 사이 27.72% CAGR로 성장하여 2027년에는 5억 8천만 달러에 이를 것으로 전망됨 |
| <p>경쟁기관 현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 국외 줄기세포 엑소좀 치료제를 개발하는 회사 현황은 아래와 같음 - Creative Medical Technologies Holdings (미국): AminoStem 유래 엑소좀으로 뇌졸중으로 손상된 뇌의 재생 치료제 개발 중임 - Exogenous Therapeutics (포르투갈): 상처 치료제 개발 중임 - Exopharm (호주): 줄기세포 엑소좀으로 재생 치료제 개발 중임 - Kimera Labs (미국): 양수 줄기세포 엑소좀으로 화상 치료제 개발 중임 - ReNeuron (영국): 신경 줄기세포 엑소좀으로 치료제 개발 중임 |
| <p>지식재산권 현황</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구의 목적과 유사하게 기능이 강화된 줄기세포 엑소좀 개발과 관련된 국외 지식재산권 현황은 아래와 같음 - (등록) EP2745840B1: Samsung Life Public Welfare Foundation, Composition including stem cell-derived microvesicles for use in promoting neurogenesis - (등록) US10125360B2: Ewha University, Method for secretion of extracellular vesicles from cells and tissues using shock wave - (공개) US20170173113A1: Research Inst at Nationwide Childrens Hospital, Methods of delivering heparin binding epidermal growth factor using stem cell generated exosomes - (공개) US20160000699A1: Medipost, Hair growth promoting capacity of conditioned media of stimulated stem cells and use thereof - (공개) WO2017179840A1: 삼성생명공학재단, Composition for treating chronic pulmonary disease, comprising exosome derived from thrombin-treated stem cell - (공개) WO2017001649A1: Med Cell Europe Ag, Secretomes and method for producing secretomes - (공개) WO2017163132A2: Stemlab, Use of umbilical cord blood derived exosomes for tissue repair - (공개) WO2016082882A1: Med Cell Europe Ag, Secretomes and method for producing secretomes - (공개) WO2016083500A1: Med Cell Europe Ag, Secretomes and method for producing secretomes - (공개) WO2016006885A1: Medipost, Hair growth-promoting function of |

| | |
|--------|---|
| | <p>culture medium of stimulated stem cells and thereof</p> <p>- (포기) US20160160181A1: Capricor Inc, Processes for producing exosomes in reduced oxygen culture conditions</p> |
| 표준화 현황 | <p>- 2018년 11월 International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)에서 Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018)을 발표함</p> |

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용



연구 목표 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 제정에 필요한 기본사항 확립 및 고려사항 제시

2-1. 연구개발의 목표 및 내용



그림 9 연구개발의 최종 목표 및 각 기관별 업무

가. 최종목표

- 동물용 세포외치료제 품질 및 평가체계 확립을 위한 동물유래 줄기세포의 분리 및 특성 분석, 동물 세포 유래 엑소좀의 분리, 분석 방법 확립, 비임상시험시 고려사항이 포함된 가이드라인의 제정
 - 국내외 선행사례 조사 및 분석을 통해 국내외 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 개발 현황확인
 - 동물용 세포외소포치료제 품질 평가를 위한 기본사항 확립
 - 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시
- *임상시험의 경우 시험은 수행하지 않고 고려사항만 간단히 제시함*

나. 세부목표

- 정보 수집 및 전문가 자문
 - 현행 국내외 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 개발 현황 및 수집
 - 세포외소포치료제 분야 전문가 협의체 구성 및 의견 수렴
- 동물용 세포외소포치료제의 품질 평가
 - 개 유래 줄기세포 분리방법 확립 및 특성분석
 - 동물용 세포외소포치료제 생산 및 품질기준 확립
- 동물용 세포외소포치료제의 비임상시험
 - 아토피 효력 시험을 통한 약리작용 분석 및 고려사항 제시
 - 개 유래 줄기세포에서 분리한 세포외소포치료제의 독성 평가 및 고려사항 제시

다. 연차별 개발목표 및 내용

| 기관 | 참여기관 1 | 참여기관 2 | 주관기관 |
|-----|-------------------------|----------------------|--------------------|
| 기관명 | (주)노터스 | (주)엑소코바이오 | 한국건설생활환경시험연구원 |
| 역할 | 개유래 중간엽줄기세포 배양 및 배양액 생산 | 배양액 유래 엑소좀 생산 및 품질평가 | 생산된 엑소좀의 효력 및 독성평가 |
| 전문성 | 동물줄기세포 배양 전문 | 엑소좀 생산 및 품질평가 전문 | 효력 및 독성평가 전문 |

그림 10 각 기관별 역할 및 전문분야

<1차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(한국건설생활환경시험연구원) : 비임상 고려사항 제시

- (1) 국내외 선행사례 조사 및 분석
 - 국내외 동물용 세포외소포치료제 가이드라인/관련 규정 현황 확인 및 문제점 분석
 - 전문가 협의회 구성 및 규제영향 분석 및 의견 수렴
- (2) 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시
 - 약리작용에 관한 자료(효력시험): 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 아토피 효능 확인

- 협동기관 1 (주식회사 노터스) : 품질 고려사항 제시

- (1) 개 유래 줄기세포 분리방법 확립
 - 줄기세포가 유도하는 세포외소포 확보를 위해 개 유래의 간엽줄기세포 분리방법 확립하여 검증용으로 활용함.
 - 지방유래의 간엽줄기세포를 우선적으로 하되, 간엽줄기세포로서의 분화능과 증식능이 일반적인 시험 검사치에 미달할 경우 다른 장기 유래(ex: 골수, 제대혈, 태반)의 간엽줄기세포 분리하여 분리방법 확립

- 협동기관 2 (주식회사 엑소코바이오) : 품질 고려사항 제시

- (1) 동물용 세포외소포치료제 시생산 및 품질기준 확립
 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 생산성 확인
 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 품질기준 확립
- (2) 동물용 세포외소포치료제 효력시험을 위한 엑소좀 공급
 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 아토피 피부염 치료 효능 확인을 위한 엑소좀 생산

- 모든 참여 기관(한국건설생활환경시험연구원, (주)노터스, (주)엑소코바이오):

- (1) 각 기관별 역할에 따른 가이드라인 검토 의견 작성
 - 전문가 패널의 의견을 함께 고려하여 작성함 (줄기세포치료제 전문가, 안전성약리 분야 전문가, 동물용 세포치료제 적용 동물병원 의사 등 포함)

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(한국건설생활환경시험연구원) : 비임상 고려사항 제시

(1) 국내외 동물용 세포외소포치료제 관련 규정 조사 및 의견 수렴

- 국내외 동물용 세포외소포치료제 관련 규정이 부재하여 동물용 세포외소포치료제 및 엑소좀 관련 산·학·연 전문가 협의체를 구성하여 가이드라인 제정에 의견을 수렴하고자 함

(2) 엑소코바이오의 기존 아토피 피부염 치료 효능의 프로토콜을 도입

- 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 이용하여 NC/Nga 동물모델을 사용하여 주관기관인 GLP공인인증기관에서 효능실험

(3-1) 시험방법(예비시험)

- 시험목적 : 본시험에 앞서 아토피 동물모델을 제작하기 위한 최적의 조건을 찾는 시험 (SDS 투여여부, 집진드기(D. farinae)의 투여 횟수 및 간격 등을 설정하기 위함)
- 시험동물 : 5주령 수컷 NC/Nga mice (Central Lab. Animal Inc, Seoul, Korea)
- 아래 그림 11, 12의 논문참고 예정(세부참여기관2 엑소코바이오의 논문)

(3-2) 시험방법(본시험)

- 시험동물 : 5주령 수컷 NC/Nga mice (Central Lab. Animal Inc, Seoul, Korea)
- 시험방법 : 4% (w/v) SDS(sodium dodecyl sulfate)를 pinna 부위에 적용한 뒤 집진드기 (D. farinae)의 allergen을 포함한 연고 Biostir®-AD Cream (Biostir, Inc., Osaka, Japan)을 3주간 적용(3회/주)하여 아토피 동물모델을 구현함. vehicle투여군과 함께 3가지 각각 다른 농도의 엑소좀을 피하투여, 경구투여하며, 양성대조군으로 prednisolone(10mpk)를 경구투여함

| 군 (시험물질) | 동물마리수 | 투여기간 | 투여간격 |
|--------------------------|-------|------|------|
| Vehicle 투여군 | 10 | 4주 | 3회/주 |
| 저농도 (SC) 투여군 | 10 | | |
| 중간농도 (SC) 투여군 | 10 | | |
| 고농도 (SC) 투여군 | 10 | | |
| 고농도 (IV) 투여군 | 10 | | |
| 양성대조군 (prednisolone) 투여군 | 10 | | |

SC: subcutaneously, IV: intravenously

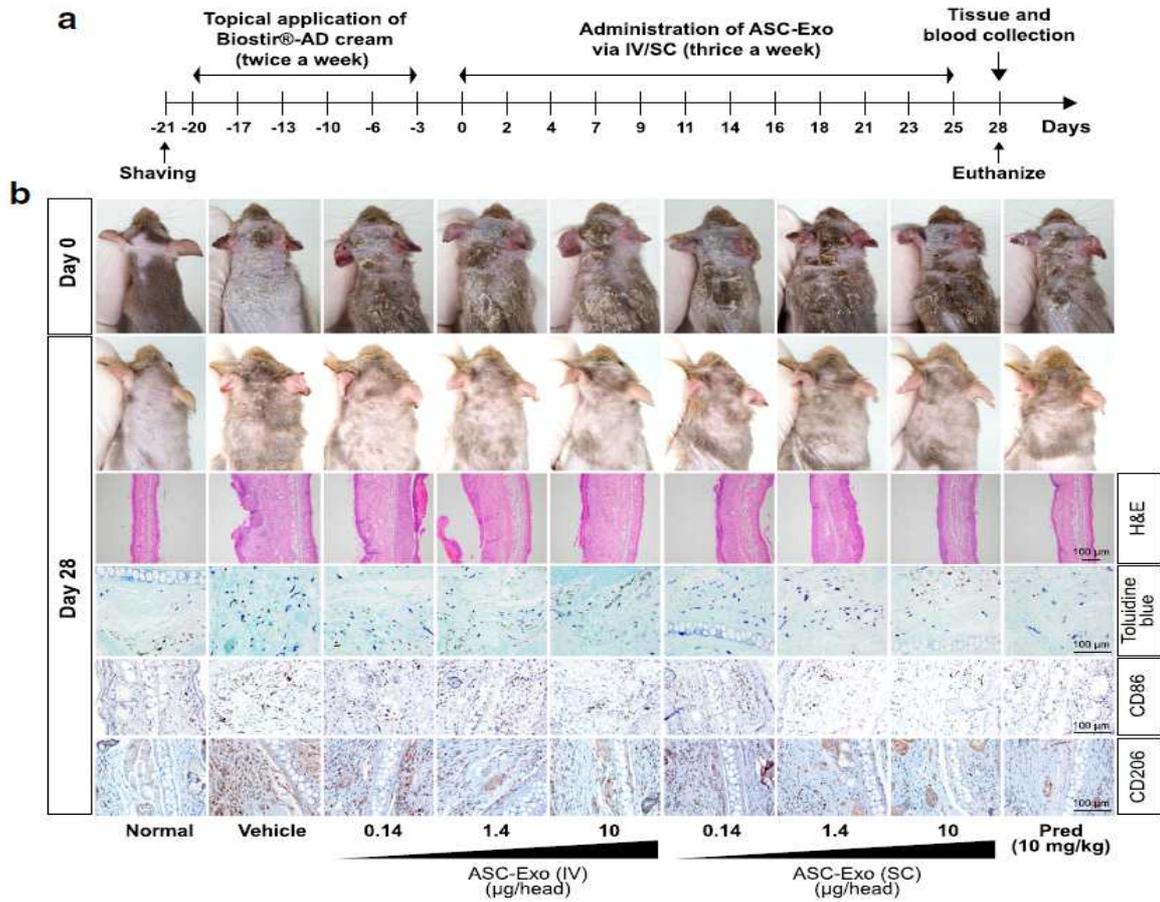


그림 11 시험디자인 및 시험결과 (SC: 피하투여, IV: 정맥투여)

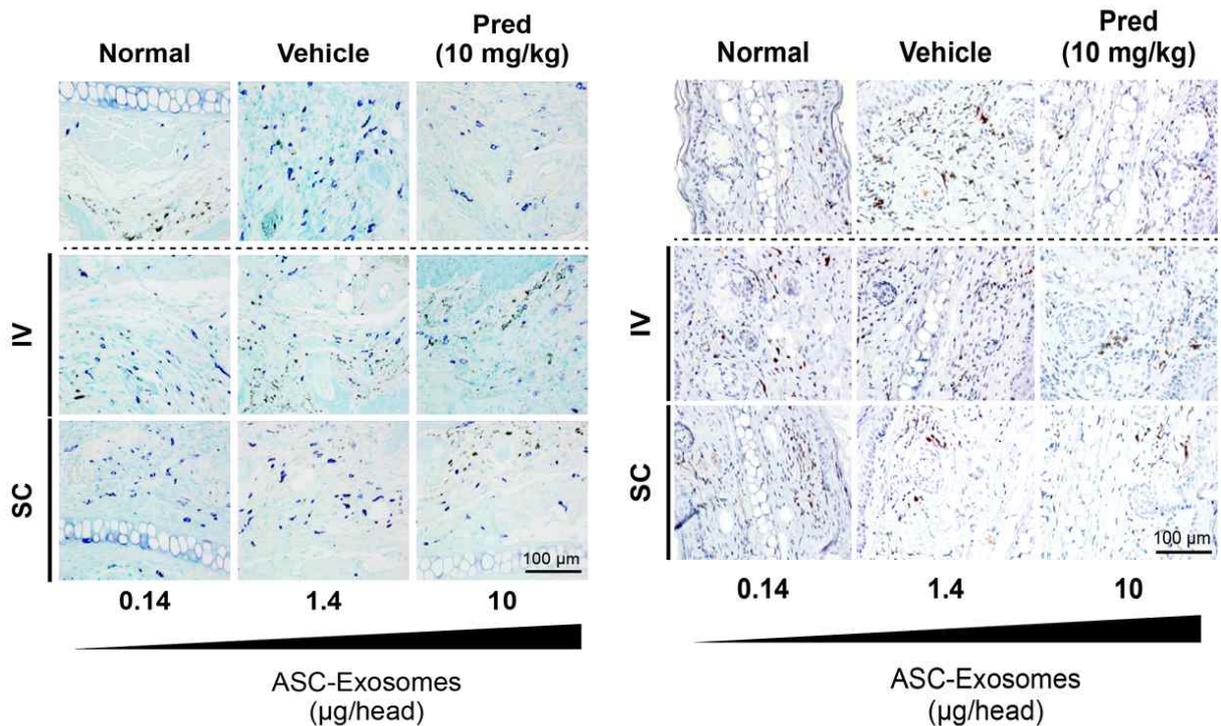


그림 12 아토피 피부염 동물모델에서 mast cell의 toluidine blue 염색양상 및 CD86 면역염색 결과⁸⁾

8) *Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis*, Cho et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2018) 9:187

- 평가항목1 - 임상증상 및 관능평가 : 임상적 관능평가는 매주 육안관찰로 시행함. 관능평가 항목으로는 홍반(erythema)/출혈(hemorrhage), edema(부종), 딱지(scaling)/건조 피부(dryness), 찰과(excoriation)/긋무름(erosion)으로 구분하여 평가함. 항목별 없음(0), 약함(1), 중증(2) 및 심함(3)으로 구별함. 모든 실험동물에 대해 일반 증상관찰은 실험 종료일까지 매일 1회씩 실시하였으며, 체중 계측은 1주 간격으로 일정한 시간에 측정하여 평가함. Vehicle투여군의 영향을 보정해줌.
- 평가항목2 - 조직병리학적 평가 : 부검된 Nc/Nga마우스의 피부의 슬라이드를 toluidine blue 염색하여 아토피피부와 직접적인 인과관계가 있는 mast cell의 침윤정도를 확인(IgE에 의해 stimulation됨). 또한 정상피부에서는 발현하지 않지만 아토피 피부에서 과발현하는 CD86+을 면역염색하여 엑소좀의 치료제로서의 효능 확인함
- 평가항목3 - 혈청학적 검사 : Serum IgE level은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) kit(Thermo Fisher Scientific)를 이용하며, Microplate에 anti-mouse IgE를 코팅하여 반응

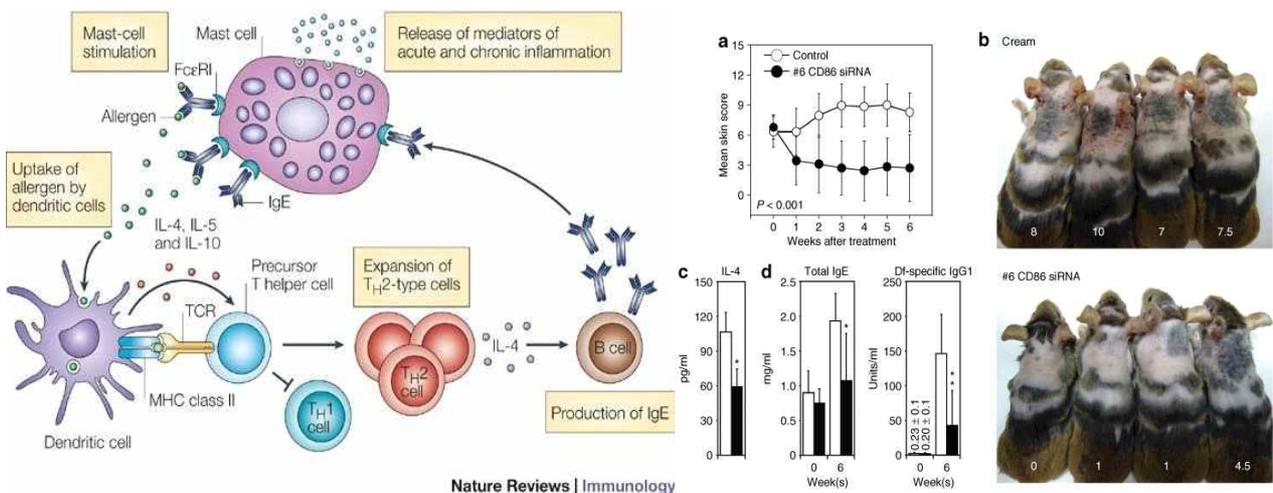


그림 13 (좌)아토피 피부염과 IgE, mast cell의 관계⁹⁾ (우) Atopic dermatitis의 바이오마커 CD86확인¹⁰⁾

- 협동기관 1 (주식회사 노터스) : 품질 고려사항 제시

(1) 품질 고려사항 제시를 위한 개 성체 줄기세포 분리 및 배양

- 재료
 - 공시동물 : 개
 - 공시세포 : Umbilical cord or Adipose tissue derived mesenchymal stem cells
 - 배 지 : DMEM low, DMEMF/12 medium (Gibco), 10% FBS
 - 기 기 : Micromanipulation microscope, Thermal cyler for RT-PCR, Image analyzer, Real time RT-PCR, confocal microscope.

9) The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium, William Cookson, Nature Reviews Immunology volume 4, pages978-988(2004)

10) Topical Application of Cream-emulsified CD86 siRNA Ameliorates Allergic Skin Disease by Targeting Cutaneous Dendritic Cells, Patcharee et al., Volume 16, Issue 7, July 2008, Pages 1323-1330

(2) 연구전략 및 방법-1차년 (2020)

- 개 성체 줄기세포 분리 및 배양 기법 확립
- 제대 혹은 지방 등 간엽줄기세포 분리
- 간엽줄기세포 유지 배양 기법 확립
 - 혈청양 (5%~30%)과 배지 배합에 따른 세포 배양 양상 확인
 - 성체 줄기세포의 계대별 세포형태, growth rate, doubling time 검증 및 colony formation unit 확인

- 협동기관 2 (주식회사 엑소코바이오) : 품질 고려사항 제시

(1) 동물용 세포외소포치료제 시생산 및 품질기준 확립

- 개유래 중간엽줄기세포의 엑소좀 생산성 확인
 - 1) ㈜노터스에서 생산한 개유래 중간엽줄기세포 배양액(CM)으로부터 엑소좀 분리
 - 2) 개유래 중간엽줄기세포의 엑소좀 생산성 평가
 - 시생산을 통해 분리된 엑소좀의 함량을 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) 등으로 평가함.
 - 총 생산된 엑소좀 함량을 배양액 부피 또는 총 세포수로 나누어 엑소좀 생산성을 평가함 (particles/L of CM)

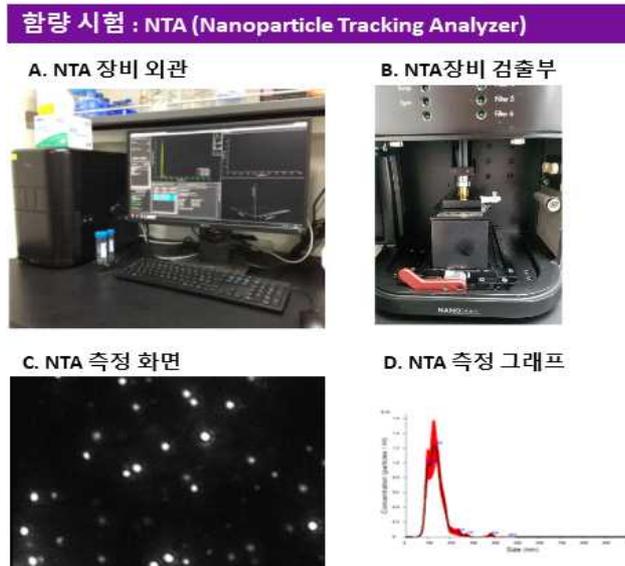


그림 14 NTA 장비를 이용한 ASC-Exosome 함량시험 예시

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 품질기준 확립
 - 1) 함량시험 구축
 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 함량을 평가할 수 있는 시험법 확립. NTA 및 단백질 함량 시험을 통하여 함량시험 구축. 단백질 함량 분석은 micro BCA protein assay 또는 이와 유사한 방법을 이용하여 수행함.
 - 2) 확인시험 구축
 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 표지자를 평가할 수 있는 시험법 확립.

- 생산된 엑소좀의 생화학적 특성 규명에는 엑소좀 특이적 표면 마커 분석이 필수적임. 국제엑소좀학회(Internation Society for Extracellular Vesicles) 및 식품의약품안전처의 가이드라인에 따라 엑소좀 특이적 마커에 대한 분석법을 수립하되, 개 유래 단백질 특이적인 항체를 활용하여 분석하고자 함. CD63, CD81, CD9, TSG101, Alix 등 엑소좀 특이적 단백질들 중에서 개 유래 단백질 특이적인 항체가 가용한 대상을 선정하여 Western 시험법 등을 구축하고자 함.

3) 순도시험 구축

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 순도(공정불순물)를 평가할 수 있는 시험법 확립.
- 세포 배양액 중 잔류할 수 있는 공정불순물(예를 들어 FBS, 항생제, 세포 대사산물) 중 선별하여 잔류량을 확인할 수 있는 분석법을 활용하여 시험법 확립. 참여기관의 선행연구 결과, ELISA 등의 방법으로 공정불순물 수준을 확인할 수 있음.

(2) 동물용 세포외소포치료제 효력시험을 위한 엑소좀 공급

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 아토피 피부염 치료 효능 확인을 위한 엑소좀 공급
 - 1) ㈜노터스(참여기관 1)이 생산한 개유래 중간엽줄기세포 배양액(CM)으로부터 효력시험을 위한 엑소좀 분리 및 생산
 - 2) 품질기준을 통과한 엑소좀은 효력시험을 위해 주관기관인 한국건설생활환경시험연구원 에 공급함.

- 모든 참여 기관(한국건설생활환경시험연구원, ㈜노터스, ㈜엑소코바이오):

(1) 인체용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인과 비교하여 ‘동물용’ 맞춤형 가이드라인 항목별 제시

- 동물용 세포외소포치료제 품질 고려사항
- 동물용 세포외소포치료제 비임상 고려사항
- 동물용 세포외소포치료제 임상 고려사항

| 대분류 | 소분류 | 인체용 가이드라인 | 동물용 가이드라인 (예시) |
|---------|--------------------|---|--|
| 품질 고려사항 | 출발물질 특성분석 | 다양한 공여자는 기능적으로 다른 특성을 갖는 세포외소포를 생산할 수 있기 때문에 공여자에 따른 차이를 고려하여 그 차이를 최소화 함 | 수행함(추후 자세히 기술) |
| | 제조방법, 분리, 정제, 특성분석 | 배양조건 표준화, 배치간 재현성 입증 세포밀도, 계대횟수, 배가시간(doubling time), 산소 농도, pH, 배양조건(배지조성, 사이토카인, 배양용기 등), 배지의 FBS 포함 유무 확인 세포외소포 생산에 사용되는 모든 시약에 대한 기원을 서술 분리 및 정제를 위해서는 한외여과 (ultrafiltration), 초원심분리, 침전, 크로마토 | 품질관리 항목 중 확인 시험의 경우 종특이적 항체가 필수적으로 요구됨 특히 품질관리 항목으로 설정이 가능한 수준의 품질이 요구됨. 대상 종에 대한 연구 수준에 따라 종특이적 |

| | | | |
|-------------|--------------|---|---|
| | | <p>그래피 등을 사용하거나 두 가지 이상의 방법을 조합하여 사용(표준화 및 재현성 입증)</p> <p>단백질, RNA, 지질의 조성 및 양에 대한 프로파일 분석이 필요</p> <p>전자현미경(Cryoelectron microscope, CryoEM) 등으로 이중지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석 필요</p> <p>불순물에 대한 특성분석도 필요</p> | <p>항체가 제한적으로 가용한 상황으로 이와 같은 경우 인체 항원에 대한 종특이적 항체의 종교차반응(cross species reaction)을 활용하여 품질관리 항목 설정이 가능한지 확인하는 대안을 고려할 수 있음.</p> |
| | 품질관리 | <p>성상시험, 세포외소포 수, 세포외소포 크기, 마이코플라스마부정시험, 외래성바이러스부정시험, 무균시험, 엔도톡신시험, 확인시험, 순도시험, 역가시험을 수행</p> | |
| | 안정성 | <p>세포외소포치료제의 저장조건(온도, 기간)에서 품질의 안정성을 평가하기 위하여 『의약품등의 안정성시험기준』(식약처 고시)에 따라 안정성시험을 수행함</p> | <p>수행함(추후 자세히 기술)</p> |
| 비임상 고려사항 | 약리작용 | <p>(효력시험) 적절한 동물종에서 용량증량연구가 수행, 독성시험 병행가능</p> <p>(ADME시험) 생체내 분포는 치료적 유효성과 함께 비표적부위의 독성에도 영향을 미침. 조직분포, 혈중 농도 등을 포함한 생체내에서의 분포와 세포외소포의 자세한 생체내 운명과 약동학적 특성에 대해 확인이 필요함</p> <p>(안전성약리시험) 원칙적으로 수행하여야 하나, 독성시험과 병행하여 시험 가능함</p> | <p>수행함(면역원성 고려)</p> |
| | 독성에 관한 자료 | <p>(단회/반복 독성시험) 적절한 동물종으로 용량증량연구를 수행하며 면역독성 필요할 수 있음</p> <p>(중양원성시험) 일반적으로 요구되지 않으나 반복투여독성시험결과 발암성이 의심되거나 임상투여기간이 길다면 필요할 수 있음</p> <p>(면역원성시험) 면역원성 시험은 필요함</p> | <p>인체용과 동일 혹은 추가로 중간차이를 고려되어야 함 (면역원성 고려)</p> |
| 임상 고려사항 | - | <p>기존 의약품과 동일</p> | <p>수행함(면역원성 고려)</p> |

<2차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(한국건설생활환경시험연구원) :

(1) 국내외 선행사례 조사 및 분석

- 전문가 협의회 구성 및 규제영향 분석 및 의견 수렴

(2) 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시

- 독성에 관한 자료: 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 독성평가
- 설치류 단회투여 독성시험, 4주 반복투여 독성시험

- 협동기관 1 (주식회사 노트스) : 품질 고려사항 제시

(1) 개 유래 줄기세포의 기준 품질검사

- 확립된 방법으로 개 유래 줄기세포를 생산하며 총 3.6×10^8 이상의 세포를 생산
- 생산한 세포의 기준 품질검사를 위하여 분화능과 증식능, 줄기세포로서의 고유의 특성을 가지고 있는지 확인하기 위한 세포표면표지인자를 확인함
- 기준 품질검사가 완료된 개 유래 줄기세포를 총 3.6×10^8 이상 생산하여 그로부터 얻은 배양액을 세부 참여기관인 엑소코바이오에 전달하여 엑소좀 생산

- 협동기관 2 ((주)엑소코바이오): 품질 고려사항 제시

(1) 동물용 세포외소포치료제 독성평가를 위한 엑소좀 공급

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 반복투여 독성시험을 위한 엑소좀 생산
 - 1차년도에 확립된 생산 방법 및 시험법을 활용하여 독성시험에 소요될 엑소좀을 생산

- 모든 참여 기관(한국건설생활환경시험연구원, (주)노트스, (주)엑소코바이오):

(1) 각 기관별 역할에 따른 가이드라인 검토 의견 작성

- 전문가 패널의 의견을 함께 고려하여 작성함

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(한국건설생활환경시험연구원) :

동물용 세포치로제 안전성 평가 가이드라인(2018.06.11) 및 동물용의약품등 독성시험지침(제 2016-22호)에 의거 다음과 같이 2개의 독성시험을 진행

(1) 설치류 단회투여 독성시험

- **시험목적** : 시험물질을 ICR mouse에 단회 피하투여하였을 때 나타나는 독성증상과 개략의 치사량을 조사하기 위해 실시한다.
- **시험계** : 특정병원균 부재(SPF) ICR 마우스
- **시험군의 구성**

| 군 | 성별 | 동물수 (마리) | 투여용량(mg/kg/day) |
|----|--------|-------------|-----------------|
| G1 | Male | 5 | Vehicle control |
| | Female | 5 | |
| G2 | Male | 5 | Low-dose |
| | Female | 5 | |
| G3 | Male | 5 | Middle-dose |
| | Female | 5 | |
| G4 | Male | 5 | High-dose |
| | Female | 5 | |

G1 : 대조군, G2 ~ G4 : 시험물질 투여군

• **시험방법**

- ① 투여방법 : 임상예정경로인 피하투여시의 독성을 알아보기 위하여 시험동물을 배면이 위로 향하게 보정하고 소독용 알코올 솜으로 투여 부위를 소독한 후 피하 내 투여를 한다.
- ② 투여횟수 및 시각 : 투여 당일 오전 중에 단회 투여함을 원칙으로 한다.

• **시험항목**

- ① 일반증상관찰 : 투여 당일에는 투여 후 30 분 이내에 적어도 1 회 관찰하고 6 시간까지 매시간 마다 관찰한다. 이후 투여 후 14 일까지 매일 1 회 이상 일반증상관찰을 실시한다.
- ② 체중측정 : 모든 동물에 대하여 입수 시, 군분리 시, 투여 직전, 투여 후 1, 4, 7 및 14 일째(부검 전)에 측정한다.
- ③ 부검 : 투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 CO₂ 가스를 이용하여 마취시킨 후 회복하여 복대 동맥과 후대정맥을 절단하는 방법으로 방혈 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사한다. 투여 후 사망한 동물도 회복하여 육안적으로 모든 장기를 검사하며 이상장기의 조직은 필요한 경우에 10 % 중성완충 포르말린액에 고정하고 조직병리검사를 실시한다.

④ 자료의 평가 및 통계학적 검정

시험동물의 체중은 평균 및 표준편차로 정리하여 경향을 분석하고, 부형제 대조군과 시험물질 투여군 간의 체중변화는 일반적으로 일원배치 분산분석(One-way ANOVA) 방법으로 군간 비교한다. 발생율의 표기는 백분율로 나타내고 $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정한다.

통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 12.0 K 프로그램으로 본 시험기관의 통계처리에 관한 표준작업지침서에 따라 실시한다.

(2) 설치류 4주 반복투여 독성시험 : 현재 임상에서 가장 많이 사용되고, 1차년도 효능시험에서 확인한 투여경로가 동일한 Cytopoint® (피하투여)를 기준으로 독성시험을 디자인함. 현재 Cytopoint는 SC투여로 1회 투여시 4-8주의 효과를 보이는 것으로 확인되었음. 임상 예정 용량 이상으로 충분한 독성을 보이는 최대량으로 시험 진행 예정. 임상투여예정기간을 고려하여 만성시험인 13주보다는 4주로 기간을 설정하였음.

- **시험목적** : 시험물질을 ICR mouse에 4주 반복 피하투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위해 실시한다.
- **시험계** : 특정병원균 부재(SPF) ICR 마우스
- **시험군의 구성**

| 군 | 성별 | 동물수(마리) | 투여용량(mg/kg/day) |
|----|--------|---------|-----------------|
| G1 | Male | 10 | Vehicle control |
| | Female | 10 | |
| G2 | Male | 10 | Low-dose |
| | Female | 10 | |
| G3 | Male | 10 | Middle-dose |
| | Female | 10 | |
| G4 | Male | 10 | High-dose |
| | Female | 10 | |

G1 : 부형제 대조군, G2~G4 : 시험물질 투여군

- **투여용량의 설정** : 엑소코바이오와 논의하여 고농도 투여군을 기준으로 적절한 공비를 사용하여 용량을 설정한다.

• **시험방법**

- ① 투여방법 : 임상예정경로인 피하투여시의 독성을 알아보기 위하여 시험동물을 배면이 위로 향하게 보정하고 소독용 알코올 솜으로 투여 부위를 소독한 후 피하 내 투여를 한다.
- ② 투여횟수 및 시각 : 1 회/일, 3 일/주, 4 주간, 투여 당일 오전 중에 투여함을 원칙으로 한다.

• **시험항목**

- ① 일반증상관찰 : 투여 전 기간에 걸쳐 1 일 1 회 일반증상을 관찰한다. 일반증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개체별로 기록한다. 일반증상이 악화된 동물은 1 일 2 회(오전 1 회, 오후 1 회) 일반증상을 관찰하며 필요한 경우 격리하여 관찰한다. 투여 개시일을 day 1으로 설정한다.
- ② 체중측정 : 모든 동물에 대하여 입수 시, 군분리 시, 투여 개시일, 투여 후 주 1 회 및 부검일에 측정한다.
- ③ 사료 및 음수섭취량 측정 : 투여개시 전 및 투여 후 주 1 회 사료 및 음수섭취량을 측정한다. 측정방법은 체중측정일 전날에 사료 및 음수급여량 및 체중측정일 당일에 잔량을 측정하여 1 일간의 사료 및 음수섭취량을 측정하며, 마리 당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출한다.
- ④ 임상병리검사
 - 채뇨 : 투여 마지막 주에 시험군당 암·수 각 5 마리의 동물을 대사케이지에 수용하여 신선뇨를 채집한 후 요검사를 실시한다.
 - 채혈 : 모든 동물에 대하여 실시한다. 계획부검 동물을 하룻밤 절식한(단, 음수는 제공) 후 부검 당일 동물을 Isoflurane으로 흡입마취한다. 마취가 확인되면 개복하여 복대동맥으로부터 채혈을 실시한다. 채혈한 혈액은 EDTA-K2 Tube(BD, Microtainer), 3.2 % Sodium citrate Tube(Greiner bioone, Vacuette), Serum separating Tube(Sekisui, Insepack)에 넣어

검사에 사용한다.

- 요검사 : 채집한 신선뇨를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, Germany)에 묻힌 후, 요자동분석장치(Clinitek Advantus, SIEMENS, Germany; MAI-050-01)를 이용하여 아래의 항목을 측정한다.

| 검 사 항 목 | |
|-----------------------|----------------------|
| 요당(glucose) | pH |
| 빌리루빈(bilirubin) | 단백질(protein) |
| 케톤체(ketone body) | 유로빌리노겐(urobilinogen) |
| 요비중(specific gravity) | 아질산염(nitrite) |
| 잠혈(Occult blood) | 백혈구(leukocyte) |

- 혈액학적 검사 : EDTA-K2 Tube의 전혈로 혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, Germany)를 이용하여 측정한다. 검사항목은 아래와 같다.

| 검 사 항 목 | |
|-----------------------------|---|
| WBC(White blood cell count) | LUP(Percent of large unstained cell) |
| NE(Neutrophil) | RBC(Red blood cell count) |
| EO(Eosinophil) | Hb(Hemoglobin conc.) |
| BA(Basophil) | RDW(Red cell distribution width) |
| LY(Lymphocyte) | HCT(Hematocrit) |
| MO(Monocyte) | MCV(Mean corpuscular volume) |
| LUC(Large unstained cells) | MCH(Mean corpuscular hemoglobin) |
| NEP(Percent of neutrophil) | MCHC(Mean corpuscular hemoglobin conc.) |
| EOP(Percent of eosinophil) | Reti(Reticulocyte) |
| BAP(Percent of basophil) | PLT(Platelet) |
| LYP(Percent of lymphocyte) | MPV(Mean platelet volume) |
| MOP(Percent of monocyte) | |

- 혈액생화학적 검사 : Serum separating Tube의 혈액을 원심분리(3,000 rpm, 10 분)하여 얻어진 혈청으로 혈액생화학검사기(Hitachi7180, HITACHI, Japan)를 이용하여 측정한다. 검사항목은 아래와 같다.

| 검 사 항 목 | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| AST(Aspartate aminotransferase) | ALB(Albumin) |
| ALT(Alanine aminotransferase) | A/G ratio |
| ALP(Alkaline phosphatase) | LDH(Lactate dehydrogenase) |
| BIL(Total bilirubin) | CPK(Creatine phosphokinase) |
| BUN(Blood urea nitrogen) | Ca(Calcium) |
| CRE(Creatinine) | IP(Inorganic phosphorus) |
| UA(Uric acid) | Mg(Magnesium) |
| GLU(Glucose) | Na(Sodium) |
| CHO(Total cholesterol) | K(Potassium) |
| TG(Triglyceride) | Cl(Chloride) |
| PRO(Total protein) | |

OECD TG 408 개정된 시험법 일부 반영 (2018. 06.)

- ⑤ 부검 : 투여종료 후에 부형제 대조군 및 모든 시험군의 생존동물에 대하여 최종계획부검을 실시하여 내부장기의 소견을 관찰한다. 사망개체는 발견 직후 속히 부검하고, 빈사동물은 시험책임자의 판단에 따라 Isoflurane으로 흡입마취한 후 회복하여 채혈하고 부검소견을 관찰한다.

- ⑥ 장기중량측정 : 투여 종료 후 부검 시 아래의 장기를 적출하여 전자저울을 이용하여 장기중량을 측정하고 부검 시 체중을 기준으로 상대장기중량을 산출한다.

| 측정 항목 | |
|---------------|-------------|
| 고환(Testes) | 신장(Kidneys) |
| 전립선(Prostate) | 심장(Heart) |
| 난소(Ovaries) | 폐(Lung) |
| 비장(Spleen) | 뇌(Brain) |
| 간장(Liver) | |

OECD TG 408 개정된 시험법 일부 반영 (2018. 06.)

- ⑦ 기관 및 조직의 보존 : 모든 동물에 대해서 아래의 장기를 고정하며 양측성 장기는 모두 고정한다. 또한 부검 시 이상소견이 관찰된 장기와 시험도중 사망한 동물 또는 안락사한 동물의 장기에 대해서도 고정을 실시한다. 10 % 중성완충 포르말린 액으로 고정하고 고환 및 부고환은 Bouin's 액에, 안구는 Davidson's 액에 고정한다.

OECD TG 408 개정된 시험법 일부 반영 (2018. 06.)

| 장기 항목 | | |
|---------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 뇌(brain) | 부신(adrenal) | 결장(colon) |
| 뇌하수체(pituitary gland) | 식도(esophagus) | 직장(rectum) |
| 심장(heart) | 대동맥(aorta) | 대퇴골(femur) |
| 폐(lung) | 척수(spinal cord) | 흉골 및 골수(sternum and bone marrow) |
| 간(liver) | 좌골신경(sciatic nerve) | 기관(trachea) |
| 신장(kidney) | 골격근(skeletal muscle) | 혀(tongue) |
| 방광(urinary bladder) | 피부(skin) | 전립선(prostate gland) |
| 장간막림프절(mesenteric lymph node) | 암컷유선(mammary gland) | 고환(testis) |
| 흉선(thymus) | 안구(eye) | 부고환(epididymis) |
| 비장(spleen) | 위(stomach) | 정낭(seminal vesicle) |
| 췌장(pancreas) | 십이지장(duodenum) | 난소(ovary) |
| 침샘(salivary gland) | 공장(jejenum) | 자궁(uterus) |
| 턱밑림프절(submandibular lymph node) | 회장(ileum) | 질(vagina) |
| 갑상선 (thyroid gland) | 맹장(cecum) | 적용부위(Application sites) |

- ⑧ 조직병리학적 검사 : 부형제 대조군 및 고용량군의 모든 고정장기에 대해 조직표본을 제작하여 검경한다. 또한 시험도중 사망한 동물, 빈사상태 동물 및 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 대해서도 조직표본을 제작하여 검경한다. 이상소견이 관찰되었을 시에 그 소견이 시험물질에 의한 변화로 인정되는 경우 모든 투여군의 해당 장기에 대하여 조직병리학적 검사를 실시하며, 필요에 따라 peer review를 실시할 수 있다.

- ⑨ 통계학적 방법 : 부형제 대조군과 시험물질 투여군간의 비교는 일반적으로 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하고 $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정한다. 발생율의 표기는 백분율로 나타낸다.

통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 12.0 K 프로그램으로 본 시험기관의 통계처리에 관한 표준작업지침서에 따라 실시하며, 사용된 통계학적인 방법은 최종 보고서에 상세히 기술한다.

<개발내용 변경전.후 비교표>

| 개발내용 | 변경전 | 변경후 |
|-------------|--|---------------|
| 독성시험 디자인 변경 | - 2주 용량결정시험(DRF study) | - 2주 단회투여독성시험 |
| 변경 사유 | 사람의약품 기준 단회투여독성시험은 GLP 수준으로 수행되어야 하는 필수 시험임. DRF study는 non-GLP시험이기 때문에 적절한 타당성이 인정되면 생략 가능한 시험임. 협동기관인 엑소코바이오와 논의하여 적절한 기준을 사용하여 반복투여 독성시험의 용량을 설정하였음 | |

(3) 전문가 자문 회의 개최 : 최소 1회/년 이상 의약품 개발 CMC, Non-clinical, Clinical 분야의 전문가들을 초청하여 세포외소포 치료제 가이드라인 작성에 필요한 주요 코멘트 및 자료를 받고자 함. 사전에 관련 정보를 공유하여 1차년도보다 좀 더 심도 깊은 논의의 장이 될 수 있도록 준비할 예정.

| 전문가 협의체 회의 일정(안) | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|--------------------------------|
| 일련번호 | 연구내용 | 월별 추진 일정 | | | | | | | | | | | | 비고 | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| 1 | 전문가 선정 및 관련 내용 공유 | ■ | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 전문가 회의 1차 | | | ■ | | | | | | | | | | | 가이드라인에 필요한 내용 작성 요청 |
| 3 | 서면 의견 취합 | | | | ■ | | | | | | | | | | |
| 4 | 전문가 회의 2차 | | | | | | ■ | | | | | | | | CMC part 전문가 회의 |
| 5 | 서면 의견 취합 | | | | | | | ■ | | | | | | | CMC part 마무리 |
| 6 | 전문가 회의 3차 | | | | | | | | | | ■ | | | | Nonclinical /clinical part |
| 7 | 서면 의견 취합 | | | | | | | | | | | ■ | | | Nonclinical /clinical part 마무리 |
| 8 | 가이드라인 최종(안) 작성 | | | | | | | | | | | | ■ | | |

* 본 전문가 협의체는 농림축산검역본부의 과제활용담당관과 논의하여 그 내용과 방향을 결정할 예정임

- 협동기관 1 (주식회사 노터스) : 품질 고려사항 제시

- (1) 개 유래 줄기세포 성장확인, 분화유도 및 유지배양 기법 확립 및 특이 표지인자발현 간엽줄기세포 생산
 - 개 유래 줄기세포 성장확인
 - 1) Specific cell markers (CD 4, 8A, 14, 25, 29, 33, 34, 44, 54, 61, 73, 80, 90, 105, 117, 184, FLK-1, HMGA2, HLA-DR) 분석 : Mesenchymal stem cells (MSCs) specific markers 분석, RT- PCR 에 의한 gene 발현 분석, FACS에 의한 발현 분석
 - 2) Early stem cell transcript factors(Oct 3/4, Sox 2, Nanog) 분석 : Immunocyto-staining에 의한 분석, RT- PCR 에 의한 gene 발현 분석
 - 성체 줄기세포 분화유도
 - 1) 지방세포 분화 전후 분화능 비교 : Oil Red Oil staining 의한 분석, Real time-PCR에 의한 FAS, SREBP-1 발현 분석
 - 2) 골세포 분화 전후 분화능 비교 : Alizarin Red stain 의한 분석, Real time- PCR 에 의한 BMP2, Osteopontin 발현 분석
 - 3) 연골세포 분화 전후 분화능 비교 : Alcian blue stain 의한 분석, Real time- PCR 에 의한 Sox9, Aggrecan 및 COL2A 발현 분석
 - 엑소좀 생산용 개 유래 줄기세포 생산
 - 1) 확립된 방법으로 생산한 개 유래 줄기세포를 총 3.6×10^8 이상 세부 참여기관인 엑소코바이오에 전달하여 개 유래의 세포외소포-엑소좀을 생산하여 다음 단계에 활용하게 함.

<개발내용 변경전.후 비교표>

| 개발내용 | 변경전 | 변경후 |
|-------------------|---|--|
| 개 유래 줄기세포 성장확인 지표 | CD 4, 8A, 4, 25, 29, 33, 34, 44, 54, 61, 73, 80, 90, 105, 117, 184, FLK-1, HMGA2, HLA-DR) | CD 4, 14, 8A, 25, 29, 44, 45, 54, 61, 80, 90, 105, 184 |
| 변경 사유 | 현재 상업적으로 유통중인 개 고유의 cell surface marker로 변경. 개 유래 줄기세포의 경우 종 특이성이 강해 제조사의 항체 수율이 차이가 나는 것으로 보임. 명확한 결과가 보이는 항체만으로 시도하여 지속적인 수정 변경하여 지표 확정할 계획임. | |

- 협동기관 2 ((주)엑소코바이오)

- (1) 동물용 세포외소포치료제 독성평가를 위한 엑소좀 공급
 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 4주 반복투여 독성시험을 위한 엑소좀 공급
 - 1) (주)노터스(협동기관 1)이 생산한 개유래 중간엽줄기세포 배양액(CM)으로부터 독성평가를 위한 엑소좀 분리 및 생산
 - 2) 품질기준을 통과한 엑소좀은 독성평가를 위해 주관기관에 공급함

- 모든 기관(한국건설생활환경시험연구원, (주)노티스, (주)엑소코바이오): 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 작성

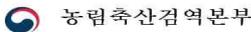
| | |
|--|---|
| <div style="border: 1px solid black; width: 80px; margin: 0 auto; padding: 2px;">가이드라인 관리번호</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 80%; text-align: center;"> 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인(안) <small>(Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Assessment of Extracellular Vesicles Therapy Products)</small> </div>  | <h3 style="margin: 0;">목 차</h3> <ul style="list-style-type: none"> 1. 적용 범위 4 2. 관련 규정 4 3. 세포외소포치료제 품질 고려사항 5 <ul style="list-style-type: none"> 3.1. 세포외소포치료제 생산을 위한 출발물질의 특성분석 5 3.2. 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석 6 3.3. 세포외소포치료제 품질관리 9 4. 세포외소포치료제 비임상시험 고려사항 14 <ul style="list-style-type: none"> 4.1. 약리작용에 관한 자료 14 4.2. 독성에 관한 자료 16 5. 세포외소포치료제 임상시험 고려사항 17 6. 참고문헌 18 계·개정이력 19 |
| <p>위 예시와 같이 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인(안) 작성에 필요한 세부 내용을 종료보고서에 포함할 예정임</p> | |

그림 15 가이드라인 예시

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 주관연구기관(한국건설생활환경시험연구원)

(1) 전문가 협의회 구성 및 규제영향 분석 및 의견 수렴

- 연구 방향 전문가 의견
 - 현재 마우스 시험이 진행 중이지만 실제 환동물(개, 고양이)의 이종간의 적용가능성 여부를 고려해야함
 - 질환의 대표성을 고려하여 작성 되어야하며 아토피로 설정한 것은 적절함
 - 최종 가이드라인을 작성하기 위해서는 목적동물을 이용한 임상시험(개)에 시험이 필요하다고 판단됨
 - 임상시험 시 필요한 엑소좀 공급(생산량) 가능여부를 확인해야함
 - 엑소좀 생산 시 lot별로 생산된 물질을 tracking 할 수 있는 시스템 구축이 필요함
- 가이드라인 작성 논의
 - 참고문헌 조사를 철저히 하여 가이드라인에 적용해야함
 - 이종간의 적용 여부를 고려하여 작성 되어야함
 - 사람의 세포외소포 치료제 가이드라인과 동물용 세포외소포 치료제 가이드라인을 참고해서 작성해야 함

[2차년도] 1차 자문회의

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포체 표지 물질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의

일시: 21.5.21(금요일) 회의

- 전반적인 공통사항
 - 가이드라인, 지침의 경우 수동태 문장 사용보다는 능동태 문장 사용 권장함
 - 예) 제출되어야 한다, 고려되어야 한다. → 제출하여야 한다, 고려해야 한다. 등
 - 1년차 실험결과내용을 바탕으로 아토피 모델의 경우, 관련 시험항목등에 예시(내 모 상처로 표시)로 제시 필요
 - 예) 시험물질 제조사 확인시험, 순도시험 실험한 항목, 약리작용에 관한 자료에서 유효성 확인한 CD marker 등
- 항목 수정사항
 1. 가이드라인 7쪽 3. 관련 규정
 - 제형분류의 1)-4) 분류사항 삭제 요망: 해당사항은 약사법을 운영하는 식약처의 경우 첨단바이오의약품중 생물학의약품중 기타 제형으로 분류하고 있으며 줄기 세포 가이드라인과 세포외소포체 표지 물질 가이드라인을 동시에 준용하도록 하고 있어 명확한 제형 분류가 어려움
 - 세포외소포체 표지 물질의 경우 현재 별도의 제형으로 분류된 바는 없으며, 식약처의 분류기준을 준용한다 등으로 문구 수정고려하시기 바람
 2. 가이드라인 14쪽 4.4.6 무균시험
 - '동물용의약품 국가허용승인검정 기준 일반시험법' 시험방법 문구 삽입 요망
 3. 가이드라인 19쪽 5.1.2.2 분석방법
 - 세포외소포체의 분포를 확인하기 위하여---두가지 이상의 방법을 병행하여 분포시험을 수행하는 것이 적절하다는 문구의 현실적인 실험상 한계점이 있으므로 기술입제 등 참여 연구자들의 의견을 반영하여 실질적인 문구로 수정 요망

성명 : 김 연 희

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포체 표지 물질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내

1. 가이드라인 page 3
 - 2. 적용 범위에서 '세포외소포'를 규정하는 국내의 세부기준 또는 가이드라인이 있으면 제시 바랍니다.
 - 기 기재되어 있는 정의로는 '세포외소포는 세포에서 분비되는 이중 지질막 구조의 물질로 설명하고 있는데, 보다 자세한 기준 또는 분류가 있으면 추가로 기재하여 주시기 바랍니다.
2. 가이드라인 page 5
 - 3. 관련 규정에서 세포외소포체 표지 물질의 분류에 대하여 식약처의 제형 분류 예시가 있으면 기재 바랍니다.
 - 유사 제품 예시가 없거나 제형 분류를 하기 어려운 경우에는 현재 기재한 분류는 준용을 줄 수 있으므로 삭제 바랍니다.

성명 : 박 나 래

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포체 표지 물질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내

1. 가이드라인 part 5.1.3 (안전성/약리시험)
 - 안전성 약리시험이 반드시 필요한 것인지 여부가 불명확한 것 같습니다.
 - 안전성 약리시험을 필수적으로 수행해야 하는 경우, 해당 동물종에 병합하여 수행할 수 있으며, 일반독성시험에서 이상이 발견될 경우 개별 안전성 약리 시험을 통해 확인하는 방향으로 수정하면 좋을 것 같습니다.
 - 분포 시험을 통해 치료제에 BBB를 통과하는 세포외소포를 함유하는 것으로 확인된 경우, 중추신경계에 대한 안전성 약리시험이 필요할 것으로 생각합니다.
2. 가이드라인 part 5.2.1 (급성/아급성/만성 독성시험)
 - 급성, 아급성 또는 만성 독성시험을 수행해야 하는 조건을 명확하게 할 필요가 있을 것으로 생각합니다. 실제 동물에 투여할 기간을 고려하여 중등 이상의 기간에 해당하는 독성시험을 수행해야 하는 것으로 기술해야 할 것 같습니다.
 - 가이드라인에서 권고하는 적절한 시험계를 제안하는 것이 좋을 것 같습니다. 동물용의약품 특성상 대상 동물이 1차적으로 권고되는 동물종일 것으로 생각합니다. 대상동물을 선택하지 않고 다른 동물종에서 일반독성시험을 수행하는 경우, 해당 동물종을 선정하는 것에 대한 근거가 필요하다는 문구의 약리학적 활성이 없는 동물종에서의 독성시험은 의미가 없다는 문구가 추가되어야 할 것 같습니다.
 - 질환모델에서의 독성시험이 갖는 이점은 아메지딘, 질환모델의 경우 독성학적 변화를 판단할 수 있는 여러 평가 지표들에 개체 variation이 클 수 있으며, historical data가 부족하기 때문에 독성 평가가 제대로 되기 힘들 것으로 생각합니다. 질환모델에서 효력시험과 독성시험을 병행할 수 있는 조합은 단지 조합이 필요할 것 같습니다. (ex. 정상 동물에서는 약리학적 활성이 없거나 질환 동물에서의 약리학적 활성과 현저한 차이를 보일 경우)
3. 가이드라인 part 5.2.3 (면역원성 시험)
 - 면역원성 시험을 실시해야 하는 경우 동물용의약품종의 독성시험지침 중 관련 시험방법에 준하여 실시하여야 한다는 기술이 필요합니다.
4. 가이드라인 part 5.2.4 (면역계상 시험)
 - 면역계상시험이 필요한 경우에 대해 동종세포유래에 한정하는 특별한 이유가 있는 것인지 궁금합니다. 이종세포유래 세포외소포체도 면역 계통에 영향을 줄 경우 면역독성이 필요할 것으로 사료됩니다.
 - 면역계상시험이 필요한 경우에 대한 기준이 명확하지 않을 것 같습니다. 일반독성시험 결과 면역 계통에 독성이 의심되는 경우 수행하는 것으로 수정하는 것이 좋을 것 같습니다.

5. 가이드라인 part 5.2.5 (중량원성/발생시험)
 - 동물용의약품종의 독성시험지침에는 '암원성'으로 되어 있는데, 용어 수정이 필요하지는 않을지 문의 드립니다.
 - 시험 기간이 '12주 이상'으로 제시되어 있는데, 발암성을 확인하기에는 너무 짧은 기간인 것 같습니다. 일반적으로 많이 사용되는 동물종 (마우스, 랫드)에 따라 적절한 시험 기간 (마우스 18개월, 랫드 24개월 이상)을 설정해야 할 것 같습니다.
6. 가이드라인 part 5.2.6.1 (면역원성시험)
 - 대상동물이 아닌 동물종에서의 면역원성시험은 임상학적으로 의미를 갖기 힘들기에 원칙적으로 면역원성시험은 대상동물에서 수행되어야 합니다.
 - 대상동물이 아닌 다른 동물종에서의 면역원성 시험은

7. 가이드라인 part 6 (동물용 세포외소포체 표지 물질 고리사항)
 - '대상동물에 대한 안전성 시험방법'에서 제시하는 시험법과 반복하여 일반독성시험의 자기가 명확하지 않은 것 같습니다. 대상동물에서 반복독성시험을 수행할 경우 임상 1상을 면제해 줄 수도 있을 것 같습니다.
 - 인체용의약품과 달리 동물용의약품은 비임상과 임상의 경계가 명확하지 않은 것으로 생각됩니다. 비임상에서는 인위적으로 만든 질환 모델에서의 유효성 평가, ADME 특성 규명, 독성 확인 등을 목적으로 하고, 임상에서는 실제 질환을 가진 동물에서의 유효성과 내역성을 확인하는 방향으로 진행하는 것이 어릴까합니다.

8. 비임상 전반
 - 세포외소포체 표지 물질의 특이성이 어느 정도일지 알 수는 없으나, 원칙적으로 약리학적 활성이 있는 동물종에서 비임상 시험을 수행할 것을 명확히 하는 것이 좋을 것 같습니다.

성명 : 김 연 희

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포체 표지 물질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내

| Section (Page) | 현재 가이드라인 조안 내용 | 조기속 의견 |
|-------------------|--|--|
| 일반사항 | 많은 부분이 수동태로 기재되어 있음. | 명령형으로 기재할 것을 제안 드립니다. |
| 4.1 (Page 6) | 포함해야 하는 증발물질 관련 정보에 아래 자료에 대한 언급 없음. - 균주 또는 세포의 특성 확인 - 세포은행 관리 (MCB, WCB) | 미생물 유래라면 사용 균주, 동물세포 유래라면 사용 세포에 대하여 특성 확인을 위해 수행한 시험과 그 결과 해석내용, 세포은행 관리 (MCB, WCB) 내용을 포함할 것을 제안 드립니다. |
| 4.2 (Page 8-9) | 이러 분장 중 증발물질과 무관한 제조공정에 관한 내용이 포함되어 있음(적색부분). 동물세포 유래 세포외소포체 표지 물질 경우 아래와 같은 세포에 대한 정보가 필요하다. (1) 세포의 기원, 세포채취 및 수급, 동결, 해동 및 밀자배양, 이차배양, 세포 증진과 관련한 제조공정 및 품질관리(보관조건 및 기간 등) | 적색 분장 삭제 바랍니다. |
| 4.2.1 (Page 8-9) | 동물용 세포외소포체 표지 물질의 제조공정 및 관리 외에 원료의약품 (Drug Substance; DS) 해당 내용인 배양 및 회수, 분리 및 정제공정에 대한 기술내용은 기재되어 있으나 완제품의약품 (Drug Product; DP) 해당 내용인 제형화, 증진공정에 대한 기술내용은 기재되어 있지 않음. | DS 뿐만 아니라 DP 공정에 대한 기술 내용도 포함할 것을 제안 드립니다. |
| 4.2.1 (Page 8 하단) | 이러 분장 중 적색부분 용어 확인 필요함. 세포외소포의 기원 외에도 세포외소포 상단에 사용되는 모든 시약에 대한 기원을 서술하여야 한다. | 아래와 같이 수정해야 하지 않을까요? 세포외소포 → 증발물질 |
| 4.3 (Page 9) | 이러 분장 중 적색부분 용어 확인 필요함. 4.3 세포외소포체 표지 물질의 특성분석 | 아래와 같이 수정해야 하지 않을까요? 세포외소포체 표지 물질 → 세포외소포 |
| 4.3 (Page 9-10) | 세포외소포 특성 분석에 필요한 시험의 내용이 구체적이지 않음. | 세포외소포 구성 성분 별(예: 단백질, 핵산, 지질 및 기타 대사물질) 특성 분석에 필요한 시험 내용을 간결하면서도 구체적으로 기재해 주면 좋겠습니다. |
| 4.3 (Page 10) | 세포외소포체 표지 물질의 특성분석 외에 불순물의 특성분석에 대한 내용이 포함되어 있음. | "불순물의 특성" 보다 "순도 관리"라고 기재하는 것은 어떨까요? |
| 4.4 (Page 10-15) | 본 가이드라인의 적용범위가 미생물 유래 및 세포 유래 세포외소포체 표지 물질 관리시험항목이 증발물질 기원 구분 없이 | 증발물질 기원 (미생물 유래, 세포 유래)에 따라 포함여부 고려하여 할 품질관리 시험항목은 없을가요? |

- 동일함.
- (예) 미생물 유래 세포외소포체 표지 물질의 경우 예도 마이크로플라스마부정시험과 외래성 바이러스부정시험을 수행해야 하는지? (자가 정제한 미생물 발효로 제조하는 생물학적 체제의 경우 사용한 동물유래 배지에 대해서는 TSE/BSE Free임을 입증하였으나 제품 기준에 마이크로플라스마 부정시험과 외래성 바이러스 부정시험은 포함되지 않아서 의견 드러 바랍니다.)

성명 : Pharma S&C 조 기 속



자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내

1. 가이드라인 page 19 part 5.1.3.
- 시험항목 용어를 동물용의약품등 안전성유효성 심사에 관한 규정(농림축산검역본부 고시 제2019-69호)의 용어를 따라, 일반약리시험으로 수정 요청
2. 가이드라인 page 19 part 5.1.3.
- *일부 세포외소포의 경우, * 개별 시험에서 수행되거나 독성시험 설계 시 포함할 수 있다
* 문구는 5.2.6.3 특수독성 시험으로 이동 요청
3. 가이드라인 page 6 Part 4.1.
- EMA CVMP 가이드스 Questions and answers on allogenic stem cell-based products for veterinary use: specific questions on sterility(15 June, 2017) 및 EMA CVMP assessment report for Arti-Cell Forte(21 June, 2018)를 참고하여 줄기세포 채취자의 자격 및 품질 관리 등에 관한 내용 추가 요청

성명 : 전 병 석 

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내

1. 가이드라인 page 3
- 1. 사본, 4째줄 '최근 인의 의약품'에서 '인'이 사람을 의미하는 것 같은데 사람 또는 인체 등의 용어로 변경되면 이해가 쉬울 것 같습니다.
- 2. 적용범위에서 세포외 소포 분비체의 종류 중 세균, 고세균, 진핵성을 부분이 포함될지 여부에 대해 의견이 있었는데, 아래줄에서 '포유류 세포 (동물세포) 및 미생물 유래 세포 외소포체로 한정한다'로 기술되어있고, 여기서 미생물에 세균을 포함한 원핵세포, 진핵 세포, 바이러스가 모두 포함됩니다. 인체용 세포외소포치료제 가이드라인 내용을 참고하여 '동물세포 또는 미생물에서 분비되는 세포에서 생산되는 세포외소포를 이용하여 개발되는 세포외소포치료제에 적용되고, 그 이외의 유래 세포는 추가고려사항이 필요하다'는 내용으로 기술되는 방안으로 의견 제안합니다.
2. 품질관리 항목에 제시된 시험법에 대해 참고할 수 있는 기준 (예: 생물학약품 외래성 바이러스 부정시험 가이드라인 등)이나 공인된 시험항목이 추가 되면 좋겠습니다.
3. 서두에서 개와 고양이를 주 대상으로 한정하였기 때문에 개나 고양이를 대상으로 세포 치료제에서 연구된 마커나 시험법이 있으면 예시로 제시하는 것이 좋겠습니다. 또한 인체 유래 세포외소포체 연구를 위하여 중대동물 수준에서 이루어진 비임상 연구가 있다면 그런 자료를 활용하여 가이드로 제시하는 것도 좋을 것 같습니다.

성명 : 최혜인 

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내

- 3. 관련 규정
- 세포외소포치료제는 현재 품목 분류가 되지 않은 상태이며, 세포배양의약품, 생물학적제제 등 기존 품목 분류에 속하기 어려울 것으로 판단됨
- 따라서 향후 인체용 세포외소포치료제의 품목분류를 준용하거나 참고하는 내용으로 변경이 필요해 보임
- 4.1 ~출발 물질
- 제조와 관련된 출발물질의 채취에 대해 기술이 필요함
- 인체용 치료제의 경우 첨단재생바이오법의 적용을 받으며 원료관리의 일환으로 중요성이 강조되고 있음
- 따라서 채취기관을 별도 지정하지 않더라도 무균적 채취가 가능하도록(수의사가 채취, 일정 시설을 갖춘 동물병원 등) 수준을 정하고 제조업자가 평가하도록 해야 함

성명 : 김진원 

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포체류제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내(2차)

1. 가이드라인 part 5.1.2.2
 - 세포외소포체는 하나의 특정 성분으로 구성된 물질이 아닌 여러 물질들이 섞인 혼합 물질로 알고 있는데, 특성상 ELISA를 이용한 정량 분석이 힘들 것 같습니다. ELISA를 이용하여 세포외소포 정량 분석하기 위한 지표 물질의 선정 등에 관한 가이드가 필요할 것 같습니다. (재가 세포외소포에 대한 이해도가 낮아 드리는 의견일 수 있습니다.)

2. 가이드라인 part 5.2.3
 - "동물용의약품등의 독성시험방법" -> "동물용의약품등의 독성시험지침 중 관련 시험방법"으로 수정 필요함.

3. 가이드라인 part 5.2.6.1
 - 동종 세포에서 생산된 물질이라도 면역 반응은 일어날 수 있습니다. 현재 가이드라인은 이종 또는 특수한 면역환경의 공여 동물 세포를 이용하여 생산한 경우에 면역원성 시험의 필요성을 언급하고 있는데, 이렇게 한정할 필요는 없을 것 같습니다.
 - 기본적으로 세포외소포에 대한 비임상시험은 적용 동물종에서 수행이 될 것 같습니다. 하지만, 세포외소포에 대한 비임상시험이 적용 동물종이 아닌 동물종에서 수행될 경우, 해당 시험에서 얻어진 면역원성에 대한 정보는 적용 동물종에서 세포외소포의 면역원성을 예측하는데 도움이 되지 못합니다. 따라서, 적용 동물종이 아닌 다른 동물종에서의 면역원성 평가는 해당 시험의 결과를 해석하는데 이용될 뿐 해당 물질의 면역원성을 예측하는데 이용될 수 없다는 제한이 필요할 것 같습니다.
 - 여러가지 단백질, 펩타이드, 핵산 등의 물질이 혼합되어 있는 세포외소포의 특성상 면역원성이 발생했다 하더라도 그것을 실험적으로 입증하기는 현실적으로 힘든 부분이 있을 것 같습니다. 가이드라인에서 구체적인 방법을 제안해야 할 이유는 없지만, 면역원성을 어떻게 평가할 수 있을지에 대한 고민이 필요할 것 같습니다.
 - 임상병리 검사 결과에서 globulin 수치 변화, 조금 더 나아가면 globulin subclass들의 수치 변화를 통해 간접적으로 면역원성을 평가할 수 있겠지만, 정확한 평가는 힘들 수 있습니다.

4. 가이드라인 part 6
 - 가이드라인에서 제시한 VICH GL43 가이드라인의 안전성시험 방법은 비임상 안전성 평가 시험 방법에 대한 가이드라인인 것 같습니다.
 - 실험군당 1군 3마리 이상, 안전역을 확보하기 위해 최고 투여용량의 배수 용량 투여, 최장 투여기간을 초과하는 시험군의 포함, 등의 가이드는 임상시험에는 적합하지 않을 것으로 보입니다.

5. 비임상전반
 - 1차 검토 때 드셨던 의견으로 약리학적 활성이 있는 동물종에서 비임상 시험을 수행해야 한다는 의견에 대해 추가 의견 드립니다.
 - 세포외소포체류제에 대한 비임상시험은 원칙적으로 약리학적 활성이 있는 동물종 또는 대상 동물종에서 수행해야 하지만, 이러한 동물종에서 비임상시험 수행이 불가능할 경우 주관 부처 (검역원)와 논의 후 결정할 수 있는 것으로 예외 조항을 둘 수 있을 것 같습니다.
 - 물질 특성상 약리학적 활성이 있는지 여부를 명확히 할 수 없는 경우를 대비하여 '대상 동물종'을 추가하면 어떨까합니다.
 - 약리학적 활성이 없는 동물종에서의 독성 시험도 시험 물질의 비독이적 특성, 세포외소포체 물질 특성을 고려했을 때, 그 안에 포함된 여러 알 수 없는 물질들에 의한 이상 반응 등을 평가할 수 있다는 의의도 있겠지만, 기본적으로 약리학적 활성이 없는 동물종에서의 시험 결과는 물질의 독성학적 특성에 대한 잘못된 판단을 내리게 만들 수 있을 것 같습니다.

성명 : 정명호 

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포체류제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가축질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내(2차)

1. 가이드라인 4 페이지 2. 적용 범위
 1) 첫 번째 문단은 세포외소포체류제의 제조방법, 두 번째 문단은 생물학적 분류 체계에 따른 유래 세포, 세 번째 문단은 치료제 적용 대상, 네 번째 문단은 공여자와 수여자와의 관계에 따른 적용 범위에 대한 내용이 기술되어 있습니다. 흐름 상 각 문단에 분류 기준에 대한 기술이 있으면 좋겠습니다.
 2) 두 번째 문단에서 '포유류 세포 및 미생물 유래 세포외소포체로 한정한다' 에서 굳이 '한정' 이란 용어를 쓰지 않고 좀 더 포괄적으로 기술하면 좋겠습니다.
 - 수정 제안 내용: 세포외소포의 유래 세포 적용 범위는 세균(bacteria), 고세균(Archaea), 진핵생물(Eukarya) 등 살아있는 모든 세포가 그 대상이 될 수 있으나, 이 가이드라인에서는 현재 가장 많은 연구가 진행된 포유류 세포 (동물세포) 및 미생물 (세균)에서 생산되는 세포외소포체류제에 적용되고, 그 이외의 유래 세포는 각각의 세포 특성에 따라 추가적인 고려사항이 필요할 수 있다.
 3) 적용 대상은 개와 고양이가 주 대상으로 기술되어 있는데, 실제적으로 세포외소포체를 적용하여 치료한 대상이 있다면 실제 치료 사례를 기반으로 주요 대상을 기술하는 것을 제안드립니다. 회의 시 언급하신 것처럼 말도 실제적으로는 주요 대상이 될 것으로 생각됩니다.

2. 가이드라인 12페이지 4.4.4 마이코플라즈마 부정시험
 1) 미생물 유래 세포외소포체는 마이코플라즈마 부정시험이 필요하지 않으나, 주사제에 개발될 경우 시험이 요구되는 경우가 있습니다.
 - 수정 제안 내용: 출발물질 기원이 미생물(세균) 유래일 경우 마이코플라즈마 부정시험은 필요하지 않으나 투여 경로에 따라 요구될 수 있다.

3. 가이드라인 13페이지 4.4.8 확인시험
 1) 두 번째 문단 미생물 유래 세포외소포의 경우-에서 기술된 바와 같이 미생물은 특이적으로 알려진 마커가 적기 때문에 세포외소포 농축단백질, RNA 또는 지질의 프로파일 분석 이외에도 미생물 유래 세포외소포의 세포막 단백질질을 자체적으로 규정하는 방안이 대한 제안이 들어가는 것도 좋겠습니다.

4. 가이드라인 15페이지 ②공정 불순물
 1) 본 가이드라인이 다양한 범주의 범령의 규정을 받으나, 기본적으로는 동물용 의약품의 규정이 적용될 것으로 보아, 동물용 의약품에 규정된 불순물 리스트나 관련 시험법, 잔류량 기준 등이 있다면 해당 규정이나 지침, 가이드라인을 참고로 제시하는 방안 제안드립니다.

미생물 유래 세포외소포체는 포스텍 고순도 교수님이 많이 연구하시기 때문에 교수님 또는 교수님 연구실 박사님들께 자문을 구하는 방안도 제안드립니다.

성명 : 최혜연 

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가족질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내(2차)

1. 가이드라인 p3 및 문서 전체
 - '세포외소포' 및 '세포외소포체' 등 용어 혼재
 - > 기본적으로 '세포외소포'로 통일
2. 가이드라인 p3 part 2. 적용범위
 - 세포외소포치료제는 살아있는 세포 분비 세포외소포로 제조한 의약품 정의가 있으나 변형된 (예, 유전자 도입 또는 운반체로 이용됨) 세포외소포가 해당하는지 명확하지 않음
 - > 변형된 세포외소포에 대해 포함되는지 여부를 기술하고, 개별 변이에 따라 관련 규정을 고려해야 한다 등의 적절한 문구가 포함되는 것이 필요함.
3. 가이드라인 p4 part 2. 적용범위
 - 포유류 세포(동물세포) 및 미생물로 한정하는 사유가 다소 미흡함.
 - > 식물 유래 등도 포함할 수 있게 표현하거나 다른 종 유래에 대한 적용에 대해서는 완곡한 기술 필요해 보임.
4. 가이드라인 p4 part 2. 적용범위 5행줄
 - 반려동물(개, 고양이)로 한정 -> 개념적으로 일반 동물로 하고 주메시나 자료가 반려동물(개, 고양이)이라는 것을 언급하는 것이 필요함.
 - 5행줄 '그 대상으로는 -' 문구에서 두는 대상임이 모호함
 - > '세포외소포치료제 대상' 등 명확한 용어 기술 필요함.
5. 가이드라인 p6 part 4.1 (2)
 - '세포 공여동물에 대한 구체적인 스크리닝 정보(동물의 감염성질병 유무 및 유전자 변이 등) 에 대한 부연설명 박스에서 '유전자 변이'에 대한 설명이 없음
 - > '유전자 변이' 관련 스크리닝 예시가 필요해 보임.
6. 가이드라인 p11-16 part 4.4 품질관리
 - 원료의약품, 완제의약품에 있어서 시험해야 할 항목 등에 대한 품질사항이 모호함
 - > 원료의약품, 완제의약품에 필요한 항목은 각각 구분하여 기술하는 것이 필요함.
7. 가이드라인 p16 part 6 임상 고려사항
 - 임상1상 및 2상에 대해 필요성 및 성략 가능 여부 등의 언급이 없음.
 - > 비임상에서 관련 중에서 반복독성 및 용량에 따른 독성시험 등이 진행된 경우, 동물용 치료제임을 감안하여 임상 1상 및(또는) 임상2상 시험이 생략될 수 있는 지에 대한 가이드라인 제시나 관련 사항 처리에 대한 기술이 필요해 보임.

8. 일반사항: 문구 및 오타 수정
 - 가이드라인 p2 part 1. 오타 수정 필요: D63 -> CD63
 - 가이드라인 p4 첫줄 '또한' 문구는 불필요 -> 삭제 권장.
 - 가이드라인 p9 part 4.2.2 마지막 줄 띄워쓰기: 작업에대해 -> 작업에 대해

성명 : 김 정 섭

자 문 확 인 서

- 과제명: 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정
- 회의명: 2021 가족질병대응기술개발사업 점검 및 전문가 회의 안내(2차)

- 4. 동물용 세포외소포치료제의 개발 및 제조 시 고려사항
 - 4.1 동물용 세포외소포치료제의 출발물질
 - (1) 세포의 기원 및 세포채취
 - 의견: 출발물질은 무균적 채취를 원칙으로 하고, 전문적 교육 또는 자격이 부여된 인원이 채취를 하도록 안내 필요
 - 의견: 채취시 항생물질 사용에 대한 내용이 불명확함. 조직 채취 후 transport bottle 등에 항생제등을 첨가하는 경우 개발단계에서 항생물질이 제품에 영향을 미치는 영향을 평가하고, 최종 완제품에서 불순물 시험으로 잔류량을 평가하면 될 것으로 보임.
- 4. 동물용 세포외소포치료제의 개발 및 제조 시 고려사항
 - 4.4 동물용 세포외소포치료제 품질관리
 - 의견: 가이드라인에 제시된 시험은 세포외소포(주사제)의 기준에 맞춰져 있음. '생물학적 체제 등의 품목허가심사 규정', '세포외소포체 품질관리 시험항목 설정 가이드라인 (2019.12, 식약처)'에 따라 제제학적 시험 추가가 필요해 보임. 또한 엑소좀 치료제의 주사제의 제형에 대해 제제학적 시험항목을 설정할 필요가 있음

[세포외소포체 품질관리 시험항목 설정 가이드라인(2019.12, 식약처)]

3.11 제제학적 시험

생물학적체제 등의 품목허가심사 규정 제26조제10호에 따라 필요한

제제학적 시험항목을 설정해야 한다. 예를 들어 주사제의 경우에는 불용성이 물시험, 주사제의 불용성미립자시험, 주사제의 실용항시험 등을 설정해야 한다. 합리적인 근거를 제시하는 경우 제제학적 시험 중 일부 시험을 설정하지 않을 수도 있다. 밀레로 주성분인 세포의 크기가 10 μ m이상이라면 주사제의 불용성미립자시험을 수행하는 것이 무의미하므로 해당 시험을 설정하지 않을 수 있다. 이 경우 최종제품에서 시험을 수행하지 못하는 것에 대한 보완조치(예, 첨가제에 불용성미립자시험 설정)가 필요하다.

성명 : 김 장 훈

그림 16 전문가 협의체 의견 일부

(2) 동물용 세포외소포치료제의 비임상시험

- 아토피 효력 시험을 통한 약리작용 분석

* 본 시험은 한국건설생활환경시험연구원 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 받아 진행하였음(승인번호: IA20-01980)

- 엑소좀을 이용한 아토피 효력시험

- (주)엑스코바이오로부터 공급받은 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 이용하여 NC/Nga 동물모델을 사용하여 효능실험을 진행하였음.

- 예비시험과 본시험으로 나누어 수행
- 본시험 방법
 - 시험동물 : 5주령 수컷 NC/Nga mice (Central Lab. Animal Inc, Seoul, Korea)
 - 시험방법 : 4% (w/v) SDS(sodium dodecyl sulfate)를 pinna 부위에 적용한 뒤 집진드기 (*D. farinae*)의 allergen을 포함한 연고 Biostir®-AD Cream (Biostir, Inc., Osaka, Japan)을 3주간 적용(2회/주)하여 아토피 동물모델을 구현하였음.
- vehicle 투여군 및 엑소좀 투여군은 피하투여하였으며, 양성대조군 (prednisolone)은 경구 투여하였음.

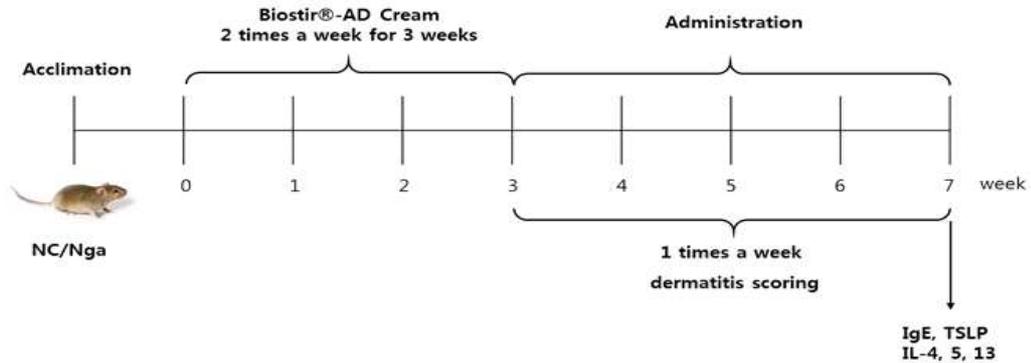


그림 17 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 아토피 효력 시험

- vehicle 투여군 및 엑소좀 투여군은 피하투여하였으며, 양성대조군 (prednisolone)은 경구 투여하였음.

| 투여 경로 | 시험군 정보 | | 시험물질 정보 | | 투여 정보 | |
|-------|--------|--------|------------------|----------------------|-----------------------|---------------|
| | 군 | 군당 마리수 | 물질명 | 물질 농도 (particles/mL) | 투여량 (particles /head) | 투여량 (mL/head) |
| | G1 | 10 | | - | - | |
| SC | G2 | 8 | Vehicle | - | - | 0.264 |
| SC | G3 | 8 | Exosome | 1.00E+09 | 2.64E+08 | 0.264 |
| SC | G4 | 8 | Exosome | 3.33E+09 | 8.80E+08 | 0.264 |
| SC | G5 | 8 | Exosome | 1.00E+10 | 2.64E+09 | 0.264 |
| PO | G6 | 8 | Prednisolone(양성) | 10 mg/kg | - | 1.0 |

그림 18 아토피 효력 시험 군구성

- 피부 병변의 관능 평가 : The index of dermatitis scoring 방법에 따라 피부 병변의 정도는 인설/건조(scaling/dryness), 부종(edema), 찰과상/미란(excoriation/erosion)의 총 4가지 항목에 대해 육안적으로 관찰하여 각 항목별로 0 (변화없음), 1 (약한변화), 2 (중등도 변화), 3 (심한변화)으로 최소 0 점에서, 최고 9 점 사이의 점수를 scoring함. 측정은 투여개시일, 투여 후 주 1 회 실시하여 평가함.

: 피부 관능평가 결과, 2 주차 부터 관능평가 수치가 AD 유도 vehicle 투여군에 비하여 엑소좀 투여군은 감소함.

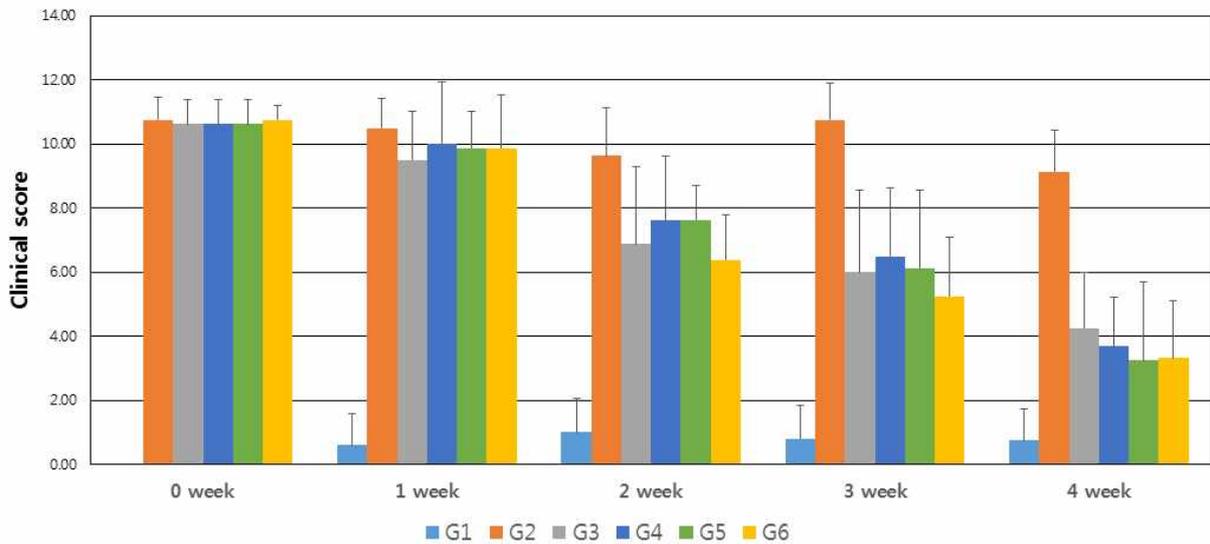
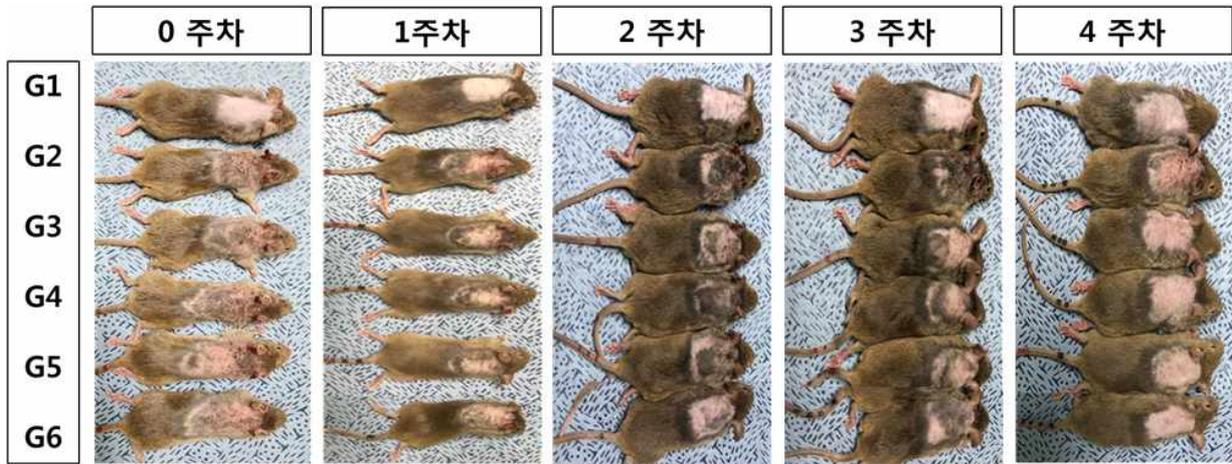


그림 19 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 피부 병변의 관능 평가

- 귀 두께 측정(Ear Thickness) : Dial thickness gauge를 이용하여 최종투여 후 부검전 귀의 두께를 측정하고 아토피 피부염에 의한 부종정도를 관찰하였음.

: 귀 두께 측정 측정결과, AD 유도 vehicle 투여군에 비하여 엑소좀 투여군은 감소함.

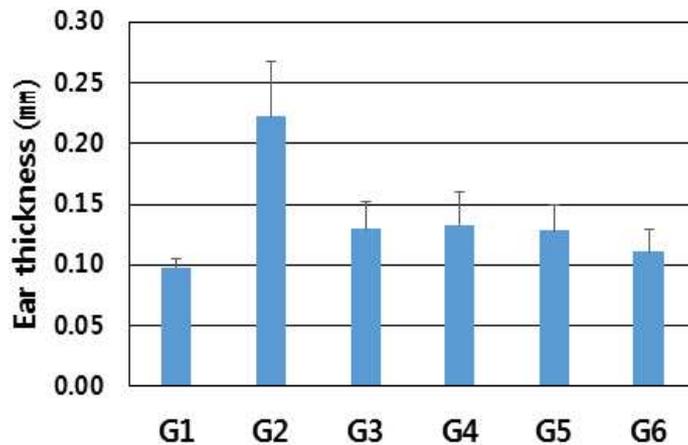


그림 20 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 귀 두께

- 혈액학적 검사 : 부검당일 동물을 Isoflurane으로 흡입마취하고 개복하여 후대동맥으로부터 채혈을 실시하였음. 채혈한 혈액은 EDTA-K2 Tube(BD, Microtainer)에 넣어 전혈로 혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, Ireland)를 이용하여 WBC(White blood cell count), Neutrophils 및 Eosinophil을 측정하였음.
- : 혈액학적 검사결과, AD 유도 투여군의 WBC(White blood cell count), Neutrophils 및 Eosinophil의 수치가 AD 유도 vehicle 투여군에 비하여 엑소좀 투여군은 감소함.

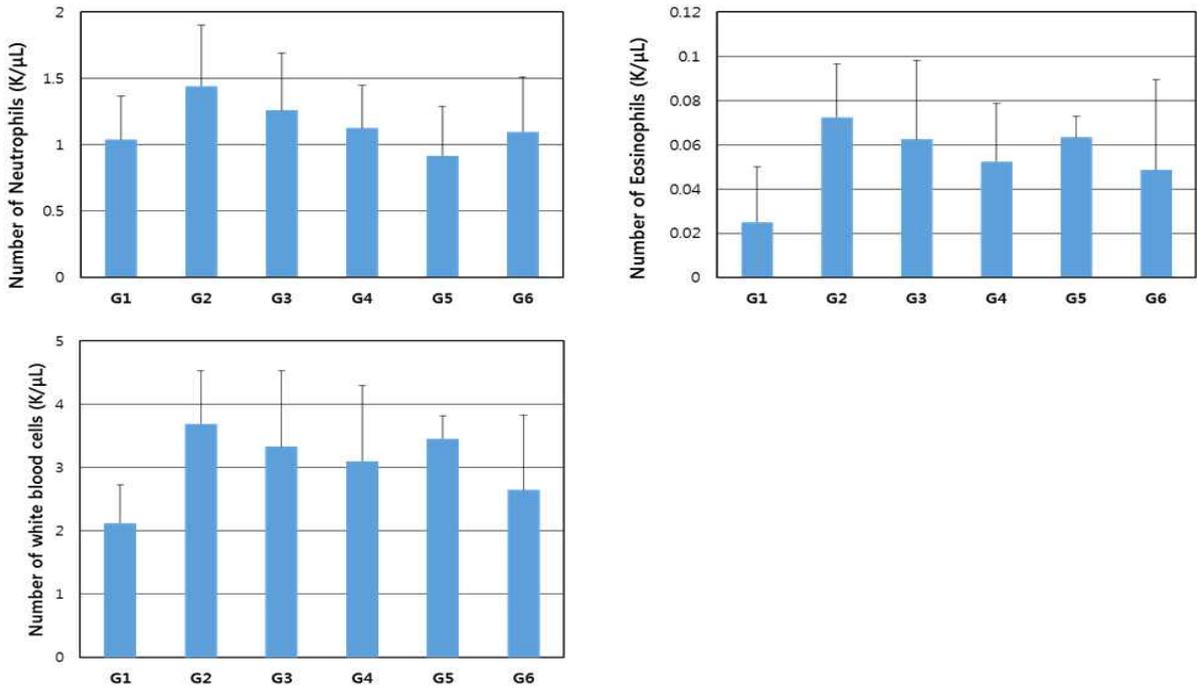


그림 21 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 혈액학적 검사

- 혈청 중 IgE 측정 : 부검 후 채혈한 혈청과 IgE Mouse ELISA kit (abcam, Lot No. ab157718)를 이용하여 IgE의 양을 측정
- : IgE 측정 결과, AD 유도 vehicle 투여군에 비하여 엑소좀 투여군은 감소함.

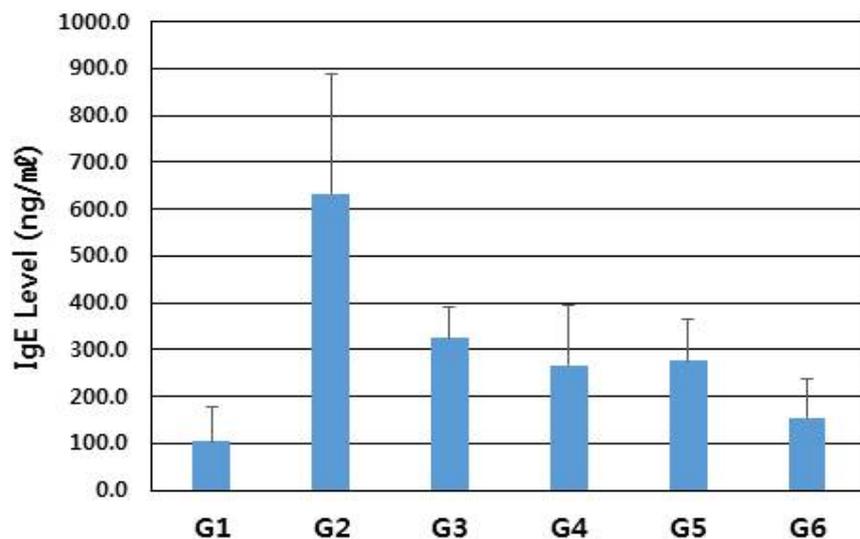


그림 22 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 혈청 중 IgE

- 조직병리학적 검사 : 부검 후 피부조직을 절취하여 조직병리학적 검사를 실시함. 피부조직의 병변을 확인하기 위하여 hematoxylin & eosin stain을 실시하고, toluidine-blue 염색을 하여 mast cell의 침윤 정도를 확인한다. H&E 염색 상에서는 표피과다형성(hyperplasia, dermal), 진피염증(inflammtion, dermal), 표피의 미란/궤양(erosion/ulcer, epidermal), 각화과다증(hyperkeratosis) 및 진피섬유화(fibrosis, dermal)를 확인함
- : 조직병리학적 검사 결과, AD 유도 vehicle 투여군(G2)은 정상군(G1)의 피부조직에 비해 표피의 두께가 확장되고, 과형성, 과각화, 가피(crust), 염증세포 침윤이 확인되었음. 투여군과 양성대조군은 증상이 완화되는 경향을 확인함
- : Mast cell과 TSLP의 수치는 AD 유도 vehicle 투여군(G2)에서 증가된 수치는 투여군에서 감소하는 경향을 보임 (CD86은 진행중)

| | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
|-------------------|----|----|----|----|----|----|
| H&E* (x100) | | | | | | |
| TB** (x200) | | | | | | |
| TSLP***(x100) | | | | | | |

* H&E : haematoxylin/eosin stain, **TB: Toluidine blue, ***TSLP: Thymic stromal lymphopietin
G1: Normal, G2: Vehivle control, G3 - G5: Low, Mid, High concentration of exosome, G6: Positive control

그림 23 피부조직 병리학적 검사

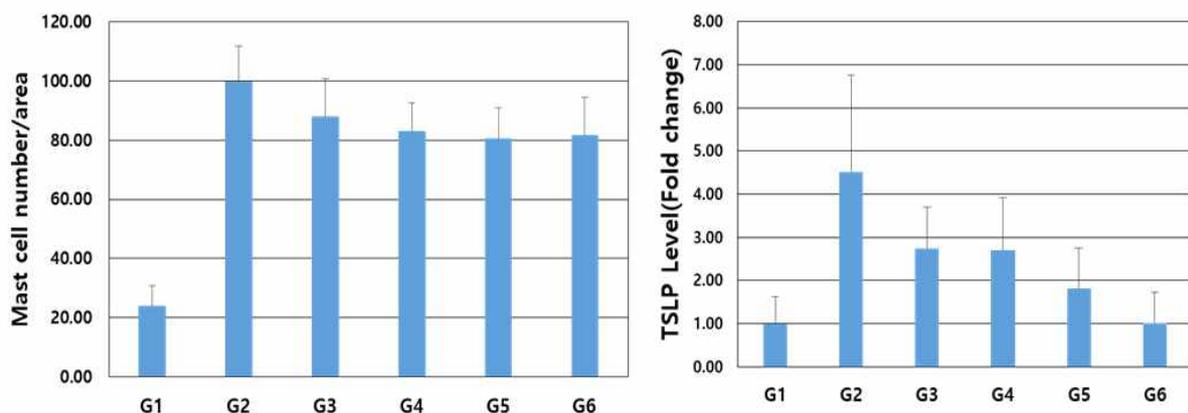


그림 24 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 효능 평가 a) Mast cell number, b) TSLP level

- 마우스 피부조직에서 mRNA의 발현양 조사 : 마우스 피부조직에서 mRNA의 발현양 조사 하기 위하여 20 mg 이하의 피부조직을homogenizer로 파쇄 후 AccuPrep Universal RNA Extraction Kit (Bioneer, Cat.K-3140)을 이용하여 RNA extraction 수행하였으며 DNase treatment는 RNase-Free-DNase Set (Qiagen, Cat.79254)으로 수행하였음.

RNA 농도 및 purity는 NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific)으로 측정하였으며 18s/28s peak는 5200 Fragment Analyzer (Agilent)으로 확인함.

RNA 48ng이 tamplate으로 사용되었으며 AccuPower GreenStar™ RT-qPCR Master Mix(Cat.K-6403)와 Exicycler™384 Real-Time Quantitative Thermal Block(Cat.A-2061)으로 수행함.

: 검사결과, AD 유도 투여군의 Interleukin(IL)-4, 5, 13 및 Interferon-gamma(IFN- γ)의 수치가 AD 유도 vehicle 투여군(G2)에 비하여 엑소좀 투여군(G3-5)은 감소하는 경향을 보임

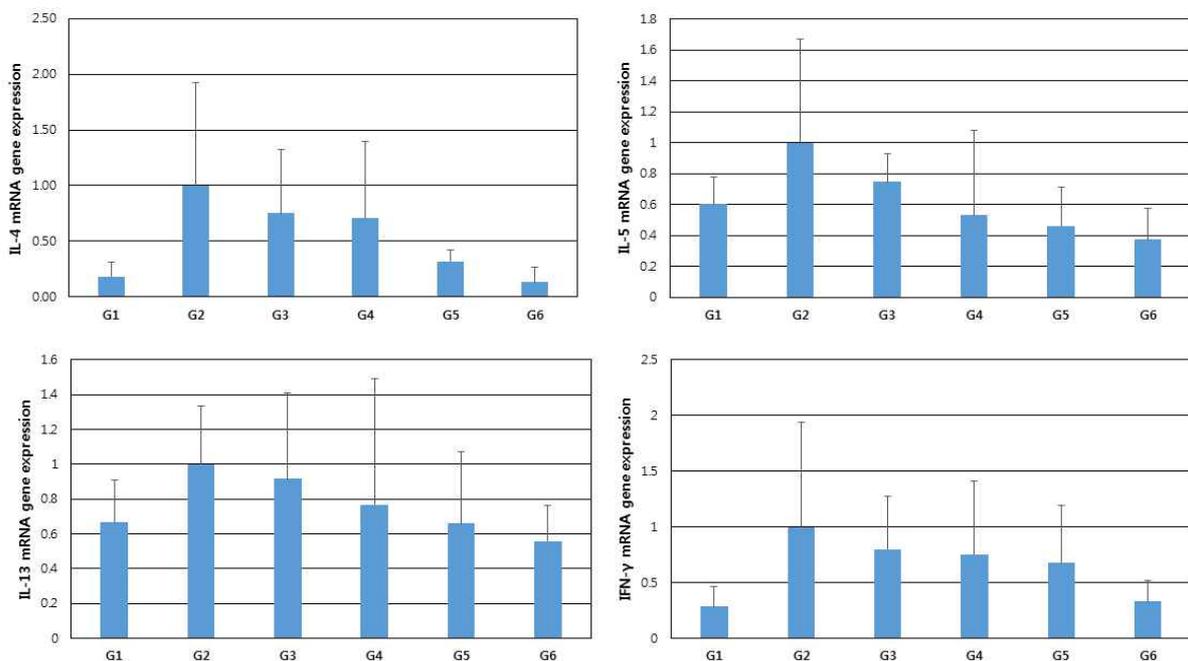


그림 25 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 mRNA의 발현양

- 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 아토피 피부염 치료 분자 기전
 - 아토피 피부염에 있어 가려움증 발생기전은 1) 알레르겐(allergen)과 같은 외부 자극원(trigger)에 의해 피부염증 발생, 2) 가려움증에 의해 피부장벽손상(skin barrier defect)과 동시에 외부 염증유발물질이 투과하여 피부에 도달하게 되면, 피부 내 알레르기염증 반응(inflammation)이 일어남. 3) 피부장벽 손상 심화로 염증반응에 의해 만들어진 히스타민(histamine) 등을 비롯한 여러 매개체(mediator)에 의해 가려움증(itching/pruritus)을 야기 시킴. 이렇게 시작된 가려움증은 4) 긁는 행동(scratch)을 유발시키고, 긁으면서 발생한 조직 손상 등의 결과 다시 체내 전신 피부염증이 악화되면서 “가려움증 - 피부장벽 손상 - 염증’ 악순환 고리(vicious cycle)”가 형성됨.
 - 엑소코바이오의 선행연구에 따르면, 인간지방줄기세포유래 엑소좀은 1) 염증(inflammation), 2) 피부장벽손상(skin barrier defect), 3) 가려움증(itching/pruritus)” 악순환(Vicious cycle)의 아토피 피부염을 치료할 것으로 예상됨 (참고문헌 1, 2).
 - 위와 같이 3가지 병인요인 중 엑소좀의 항염기전을 규명하고자 함. 피부장벽이 손상된 아토피 피부염 동물모델에서 엑소좀 투여군 피부조직의 유전자 프로파일링 결과, 염증 사이

토카인 1) IL-6 억제 유전자 4종의 발현 증가 확인됨. 또한, 2) 마우스 대식세포 LP 유도모델(in vitro)실험 2) 엑소좀 처리군에서의 IL-6 억제능 확인됨 (참고문헌 2, 3).

- 또한, 타 연구팀의 보고에 의하면, 아토피 피부염 환자의 혈액 내 IL-6 염증성 사이토카인 분비가 정상인에 비해 약 80% 이상 높은 것으로 확인되어 아토피 피부염의 중요한 지표임 확인함 (그림 1A). 또한, IL-6 억제제 항체약물 (Tocilizumab)에 의해 아토피 임상 증상완화 됨 확인함 (그림 2B).
- 이를 토대로 자체적으로 염증 사이토카인 (IL-6)에 대한 역가시험을 선정하여 진행하고 있음.

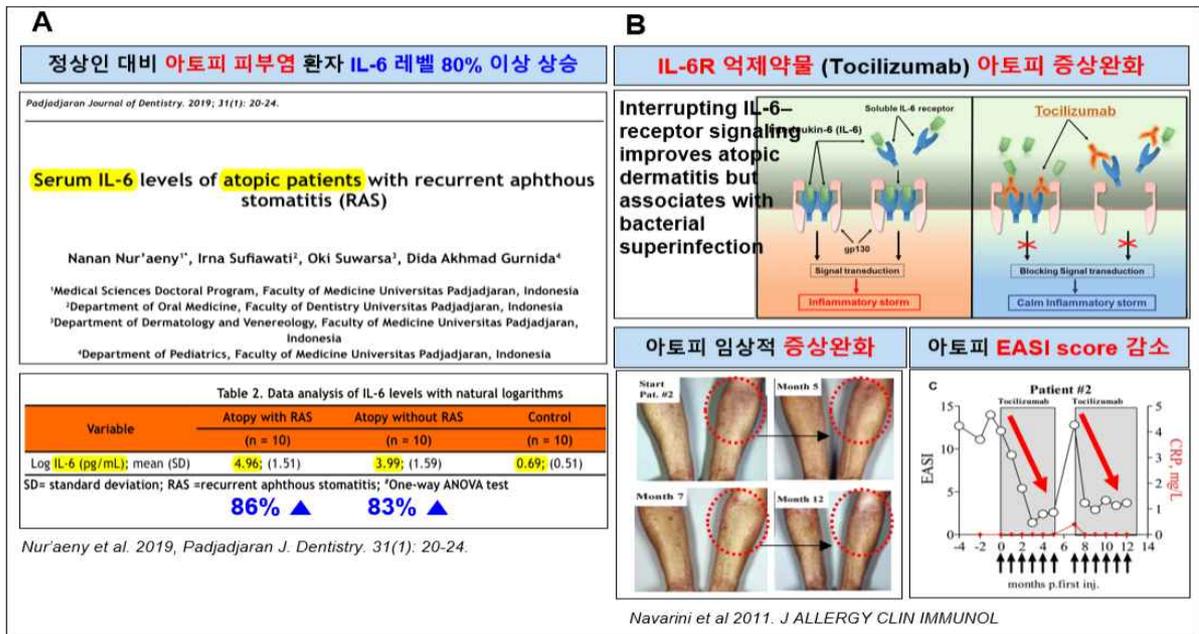


그림 26. IL-6 (염증 사이토카인) 억제에 의한 아토피 피부염 임상증상 완화 (출처: Nur'aeny et al. 2019, Navarini et. al 2011, J ALLERGY CLIN IMMUNOL)

- 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 독성평가
 - (주)엑스코바이오로부터 공급받은 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 이용하여 설치류 단회투여 독성시험, 4주 반복투여 독성시험 진행하였음.
 - 단회투여 독성시험 방법
 - 시험동물 : 7주령 ICR mice
 - 시험방법 : 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 ICR mouse에 단회 피하투여에 의한 독성증상과 개략의 치사량을 조사하기 위하여 실시되었다. 시험물질은 7.45E+08(저용량군), 2.98E+09(중용량군) 및 1.19E+10(고용량군) particles/20g 용량으로 시험군을 설정하고 부형제 대조군과 비교하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.
 - 사망동물 및 일반증상 : 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.
 - 체중변화 : 체중측정 결과, 수컷 1일차 1군 2례, 2군 5례, 3군 3례 및 4 일차 1군 1례에서 체중 감소가 관찰되었으며, 암컷 1 일차 1군 1례, 2군 4례, 3군 4례, 4군 2례, 4일차 1군 1례, 7 일차 2군 1례, 3군 1례, 4군 2례, 및 14 일차 1군 1례에서 체중 감소가 관찰되었다. 하지만, 통계학적 검정결과, 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 체중차이는 관찰되지 않았으며 개체간의 일시적인 변화로 판단되며, 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다.

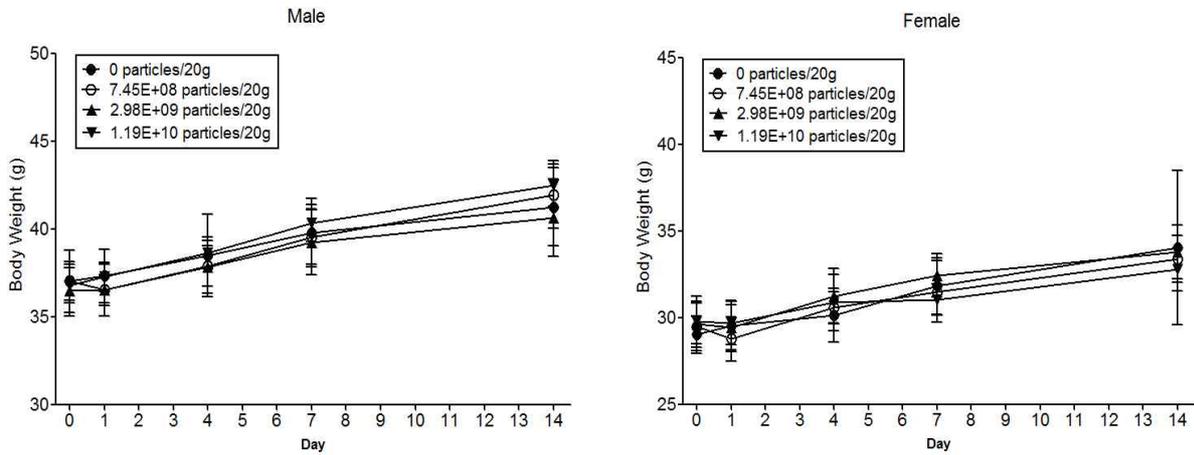


그림 27 Body weights

- 부검소견 : 실험종료 시 부검결과, 모든 시험동물에서 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아, ICR mouse를 이용하여 시험물질을 단회 피하투여 하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 따라서 본 시험조건에서 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀의 개략의 치사량은 1.19E+10 particles/20g 이상으로 판단된다.

| 단회투여 독성시험 최종보고서 | 신뢰성보증확인서 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--------------|--------------|-------------|-------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| <p>최종 보고서</p> <p>ICR mouse를 이용한 EXO301의 단회 피하투여 독성시험</p> <p>(시험번호 : NT21-00046)</p> <p>KCL</p> <p>2021년 12월</p> <p>the way to trust KCL 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> | <p>신뢰성보증확인서</p> <p>시험번호 : NT21-00046</p> <p>시험제목 : ICR mouse를 이용한 EXO301의 단회 피하투여 독성시험</p> <p>이 보고서에 기술된 시험을 독립적으로 아래와 같이 점검하였으며 각 점검결과를 표준작업지침서에 따라 시험책임자와 운영책임자에게 통보 및 보고하였다. 본 시험은 농림축산검역본부 고시 제 2019-65 호 (2019년 10월 10일) '동물용의약품 중 비일상시험 실시기관 지정에 관한 규정' 및 농림축산검역본부 고시 제 2016-22 호 (2016년 03월 09일) '동물용의약품 중 독성시험지침'에 따라 수행되었으며, 보고서의 작성 및 결과의 기술이 시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료들 바탕으로 정확히 반영되었음을 확인하였다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>점검내용</th> <th>실시일</th> <th>시험책임자에게 통보일</th> <th>운영책임자에게 보고일</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>시험계획서</td> <td>2021. 05. 26</td> <td>2021. 05. 26</td> <td>2021. 05. 26</td> </tr> <tr> <td>시험기초자료 및 최종보고서(안)</td> <td>2021. 12. 28</td> <td>2021. 12. 28</td> <td>2021. 12. 28</td> </tr> <tr> <td>최종보고서</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> </tr> </tbody> </table> <p>한국건설생활환경시험연구원 바이오본부 신뢰성보증책임자 김기영 (인) 신뢰성보증담당자 한백희 (인) 2021년 12월 31일</p> <p>the way to trust KCL 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> <p>NT21-00046</p> | 점검내용 | 실시일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | 시험계획서 | 2021. 05. 26 | 2021. 05. 26 | 2021. 05. 26 | 시험기초자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 |
| 점검내용 | 실시일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험계획서 | 2021. 05. 26 | 2021. 05. 26 | 2021. 05. 26 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험기초자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | | | | | | | | | | | | | | |

그림 28. 단회투여 독성시험 최종보고서

- 4주 반복투여 독성시험 방법

- 시험동물 : 5주령 ICR mice
- 시험방법 : 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 ICR mouse에 4 주간 반복 피하투여 하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 실시하였다. 시험물질은 7.45E+08(저용량군), 2.98E+09(중용량군) 및 1.19E+10(고용량군) particles/20g 용량으로 시험군을 설정하여 부형제 대조군과 비교하였다. 실험기간 동안 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 및 조직병리학적 소견을 관찰하였다.
- 일반증상 및 사망률 : 실험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화 : 체중 측정결과, 실험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

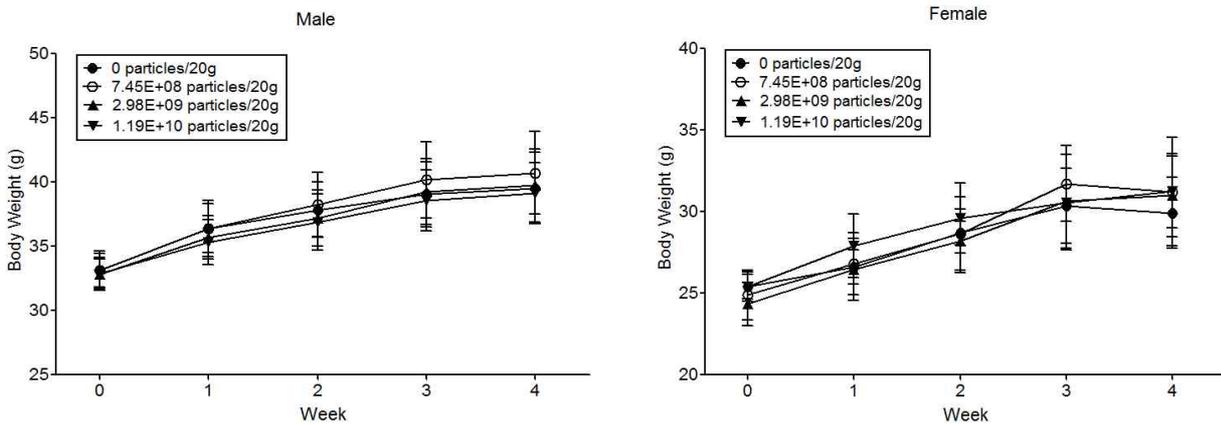


그림 29 Body weights

- 사료섭취량 : 사료섭취량 측정 결과, 실험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

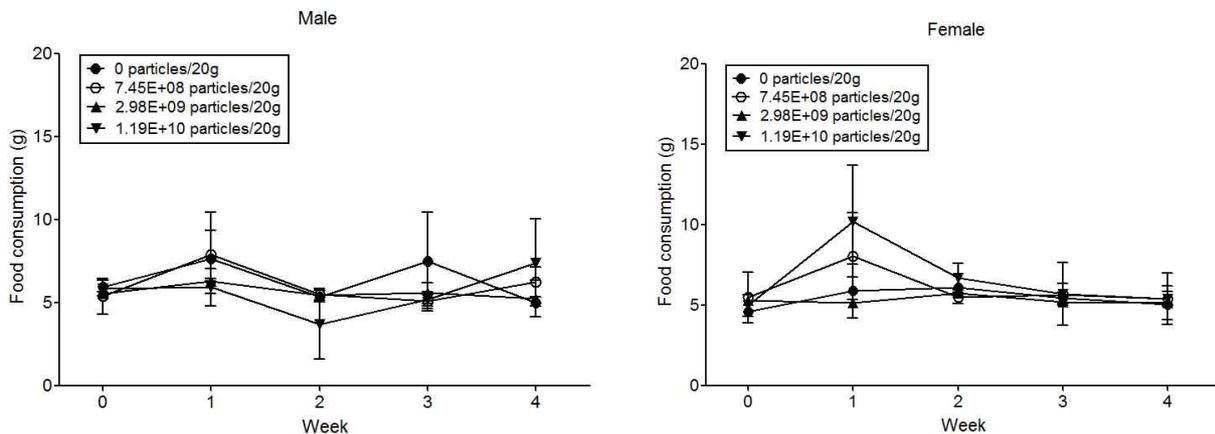


그림 30 Food consumption

- 음수섭취량 : 음수섭취량 측정 결과, 실험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

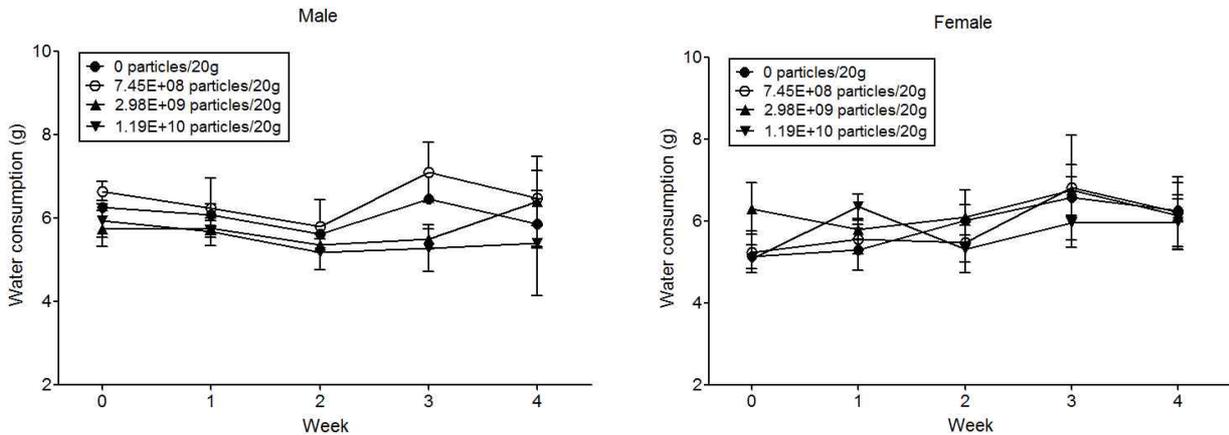


그림 31 Water consumption

- 요검사 : 요검사 결과, 암·수 모든 시험군에서 군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.
- 혈액학적 검사 : 혈액학적 검사 결과, 수컷 7.45E+08, 2.98E+09 particles/20g 투여군의 EO(Eosinophil), EOP(Percent of eosinophil) 및 1.19E+10 particles/20g 투여군의 LUP(Percent of large unstained cell) 수치가 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였고(EO: $p < 0.01$, EOP: $p < 0.01$, LUP: $p < 0.05$), 수컷 2.98E+09 particles/20g 투여군의 RBC(Red blood cell), Hb(Hemoglobin) 및 HCT(Hematocrit) 수치가 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다(Hb: $p < 0.05$ HCT: $p < 0.05$, RBC $p < 0.01$). 암컷 7.45E+08, 2.98E+09, 1.19E+10 particles/20g 투여군의 EO(Eosinophil), 암컷 2.98E+09 particles/20g 투여군의 LUC(Large unstained cell), 및 암컷 2.98E+09, 1.19E+10 particles/20g 투여군의 MPV(Mean platelet volume) 수치가 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 그 외 모든 항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.
- 혈액생화학적 검사 : 혈액생화학적 검사결과, 수컷 2.98E+09 particles/20g 투여군의 PRO(Total protein) 수치가 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였고($p < 0.05$), 수컷 2.98E+09, 1.19E+10 particles/20g 투여군의 Cl(Chloride) 수치가 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). 암컷 1.19E+10 particles/20g 투여군의 Na(Sodium) 수치가 대조군보다 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 그 외 모든 항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.
- 부검 : 계획부검 결과, 모든 생존 동물에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 장기중량 : 장기중량 측정결과, 상대장기중량 암컷 2.98E+09 particles/20g 투여군의 난소(우) 수치가 대조군보다 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 그 외 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 조직병리학적 검사 : 암·수 대조군 및 1.19E+10 particles/20g 투여군의 장기·조직에 대한 조직병리 검사결과, 갑상선에 이소성 흉선(Ectopic thymus, thyroid gland)이 수컷 1.19E+10 particles/20g 투여군, 암컷 대조군, 암컷 1.19E+10 particles/20g 투여군에서 각각 1례씩 관찰되었다. 또한 피부에 국소성의 궤양(Ulcer, focal)이 암컷 1.19E+10

particles/20g 투여군에서 1 레 관찰되었다.

- 이상의 결과로 보아, 본 시험 조건에서 시험물질인 시험물질인 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 설치류인 ICR 마우스를 이용하여 4 주간 반복 피하 투여하였을 때, 시험물질 피하투여와 관련된 전신적인 독성학적 변화와 이상변화는 관찰되지 않았다.

| 4주 반복 독성시험 최종보고서 | 신뢰성보증확인서 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--------------|--------------|-------------|-------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">ICR mouse를 이용한 EXO301의 4주 반복 피하투여 독성시험</p> <p style="text-align: center;">(시험번호 : NT21-00047)</p> <p style="text-align: center;">2021년 12월</p> <p style="text-align: center;"><i>the way to trust</i> KCL 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> | <p style="text-align: center;">신뢰성보증확인서</p> <p>시험번호 : NT21-00047</p> <p>시험제목 : ICR mouse를 이용한 EXO301의 4주 반복 피하투여 독성시험</p> <p>이 보고서에 기술된 시험을 독립적으로 아래와 같이 점검하였으며 각 점검결과를 표준작업지침서에 따라 시험책임자와 운영책임자에게 통보 및 보고하였다.</p> <p>본 시험은 농림축산검역본부 고시 제 2019-65 호 (2019년 10월 10일) '동물용의약품등 비임상시험 실시기관 지정에 관한 규정' 및 농림축산검역본부 고시 제 2016-22 호 (2016년 03월 09일) '동물용의약품등 독성시험지침' 에 준하여 수행되었으며, 보고서의 작성 및 결과의 기술이 시험의 실시과정에서 발생한 시험기준 자료를 바탕으로 정확히 반영되었음을 확인하였다.</p> <table border="1" data-bbox="826 721 1378 936"> <thead> <tr> <th>점검내용</th> <th>실시일</th> <th>시험책임자에게 통보일</th> <th>운영책임자에게 보고일</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>시험계획서</td> <td>2021. 07. 07</td> <td>2021. 07. 07</td> <td>2021. 07. 07</td> </tr> <tr> <td>시험기준자료 및 최종보고서(안)</td> <td>2021. 12. 30</td> <td>2021. 12. 30</td> <td>2021. 12. 30</td> </tr> <tr> <td>최종보고서</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: right;">한국건설생활환경시험연구원 바이오본부 신뢰성보증책임자 김기영 (인) 신뢰성보증 담당자 송병희 (인) 2021년 12월 31일</p> <p style="text-align: center;"><i>the way to trust</i> KCL 한국건설생활환경시험연구원 NT21-00047 Korea Conformity Laboratories</p> | 점검내용 | 실시일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | 시험계획서 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | 시험기준자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 |
| 점검내용 | 실시일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험계획서 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험기준자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | | | | | | | | | | | | | | |

그림 32 4주 반복투여 최종보고서

- 개유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 ICR mouse에 단회 및 4 주간 반복 피하투여 하였을 때 나타나는 독성을 실시하였으며, 제품의 안정성과 같은 허가요건 필요사항과 원인별 아토피에 대한 효능시험과 장기독성의 보완이 필요함.

- 협동기관 1 (주)노티스

(1) 개 유래 줄기세포 분리방법 확립

- 줄기세포가 유도하는 세포외소포 확보를 위해 개 유래의 간엽줄기세포 분리방법 확립하여 검증용으로 활용.
- 병적 증상 없는 비글 견 입수하여 호흡 마취 (isoflurane) 후 멸균 환경에서 복강 절개 후 복부 지방 조직 50 g 내외/횃수 채취
- 채취한 조직을 오염 되지 않게 무균 트레이에 담아 무균작업대로 옮겨 세포 분리 작업을 진행하였다. 그 방법은 다음과 같다.

- ① 백색 지방 조직을 PBS로 세 번 수세한다.
- ② 1% collagenase in PBS에 백색 지방 조직 50 g을 1:1 의 비율로 넣어 가위로 잘게 자른다.

- ③ 37 °C water bath 에 넣어 1 시간 동안 진탕한다.
- ④ 진탕 후 용해 된 지방 용액을 원심분리기에서 1,000 RPM, 5 분간 원심분리 한다.
- ⑤ 원심분리하여 얻은 pellet을 DMEM/F-12 1:1 비율로 혼합한 배지에 풀어 준 뒤, 0.7 μm cell strainer에서 single cell 만 수득한다.
- ⑥ cell strainer를 통과한 배지를 Co2 인큐베이터에 24 시간 배양한다.
- ⑦ 24 시간 배양 후 세 번 PBS 수세한다.
- ⑧ 배양 Dish 바닥에 세포가 부착하여 점상으로 배양 되면 증식율을 확인하여 계대배양 하여 증식시킨다.

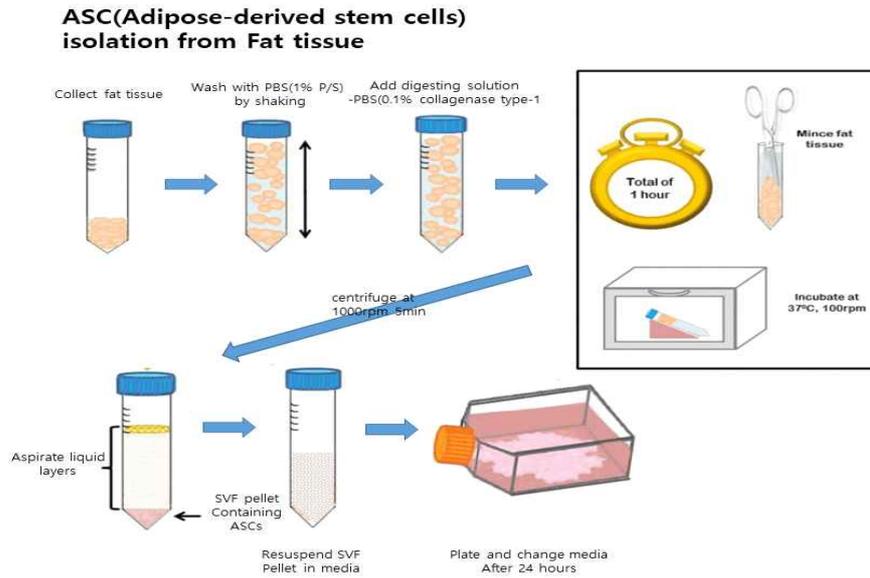


그림 33 지방 줄기세포 분리 배양 모식도

- 지방유래의 간엽줄기세포의 증식 배양에 성공함. 이후 일반적인 세포의 고유 기능이 보장되는 passage 3~6 번의 세포를 사용하기로 결정
- 엑소좀 생산용의 개유래 중간엽줄기세포로 passage number 3을 3회 제공하여 엑소좀 생산 준비함.

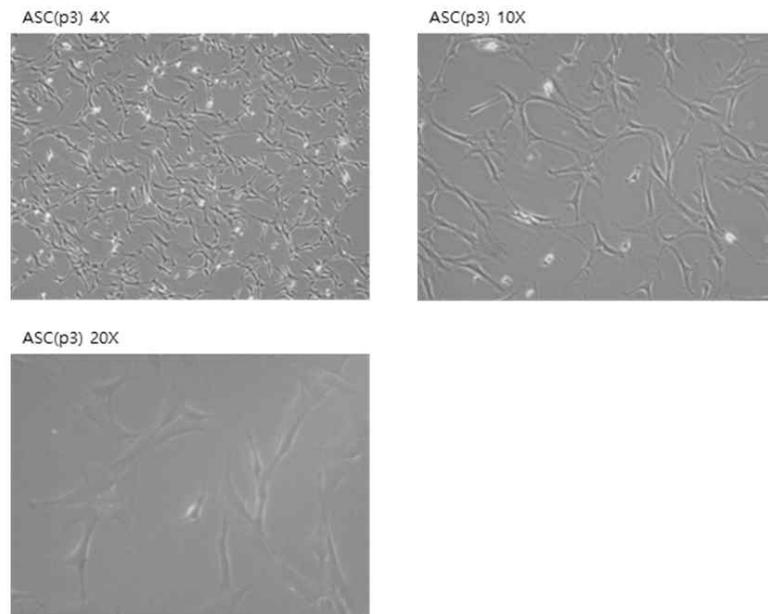
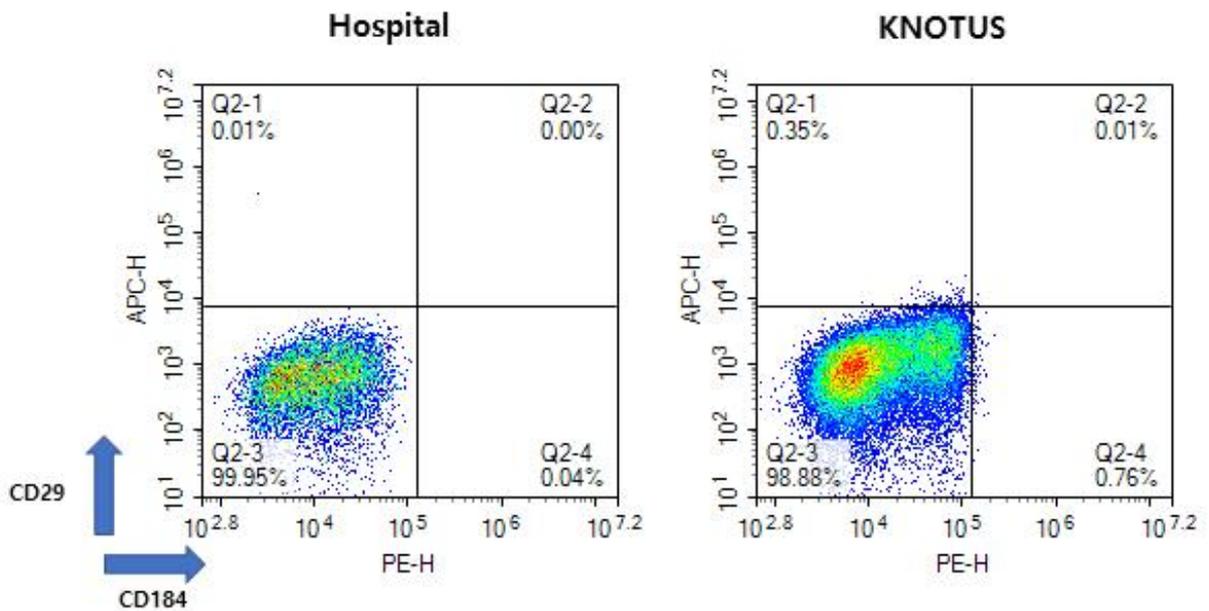


그림 34 개유래 지방 중간엽줄기세포의 3 번째 계대배양한 세포의 형태

▪ 개유래 중간엽줄기세포의 특성 검사

- 개유래 중간엽줄기세포의 특성을 검사하기 위하여 줄기세포 여부를 판별하는 세포 표면 지표 단백질을 반응시켜 유세포 분석 시작하였다.
- 가장 대표적인 CD29 와 CD184의 형광항체를 이중 염색하여 유세포분석기 (novocyte)에 서 분석하였고, 그 결과는 아래와 같다.
- 지방유래 중간엽줄기세포를 나타내는 CD29 양성과 CD184 음성 결과가 확인되었고 이어서 그 외에 가능한 많은 세포 표면 지표 단백질을 확인하였음.

UnStaining



Staining

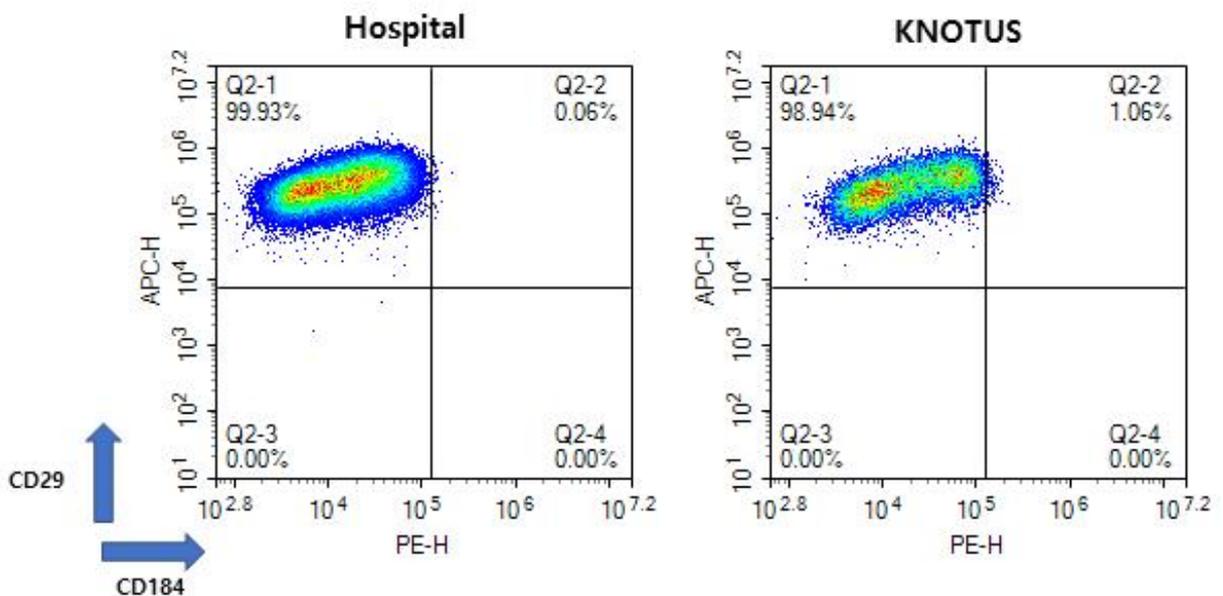


그림 35 개유래 지방 중간엽줄기세포의 phenotype을 확인하기 위해 CD29+, CD184- 확인

(2) 개 유래 줄기세포 성장확인

- Specific cell markers (CD 4, 8A, 14, 25, 29, 44, 45, 80, 90, 184) 분석 : Mesenchymal stem cells (MSCs) specific markers 분석, RT- PCR 에 의한 gene 발현 분석, FACS에 의한 발현 분석

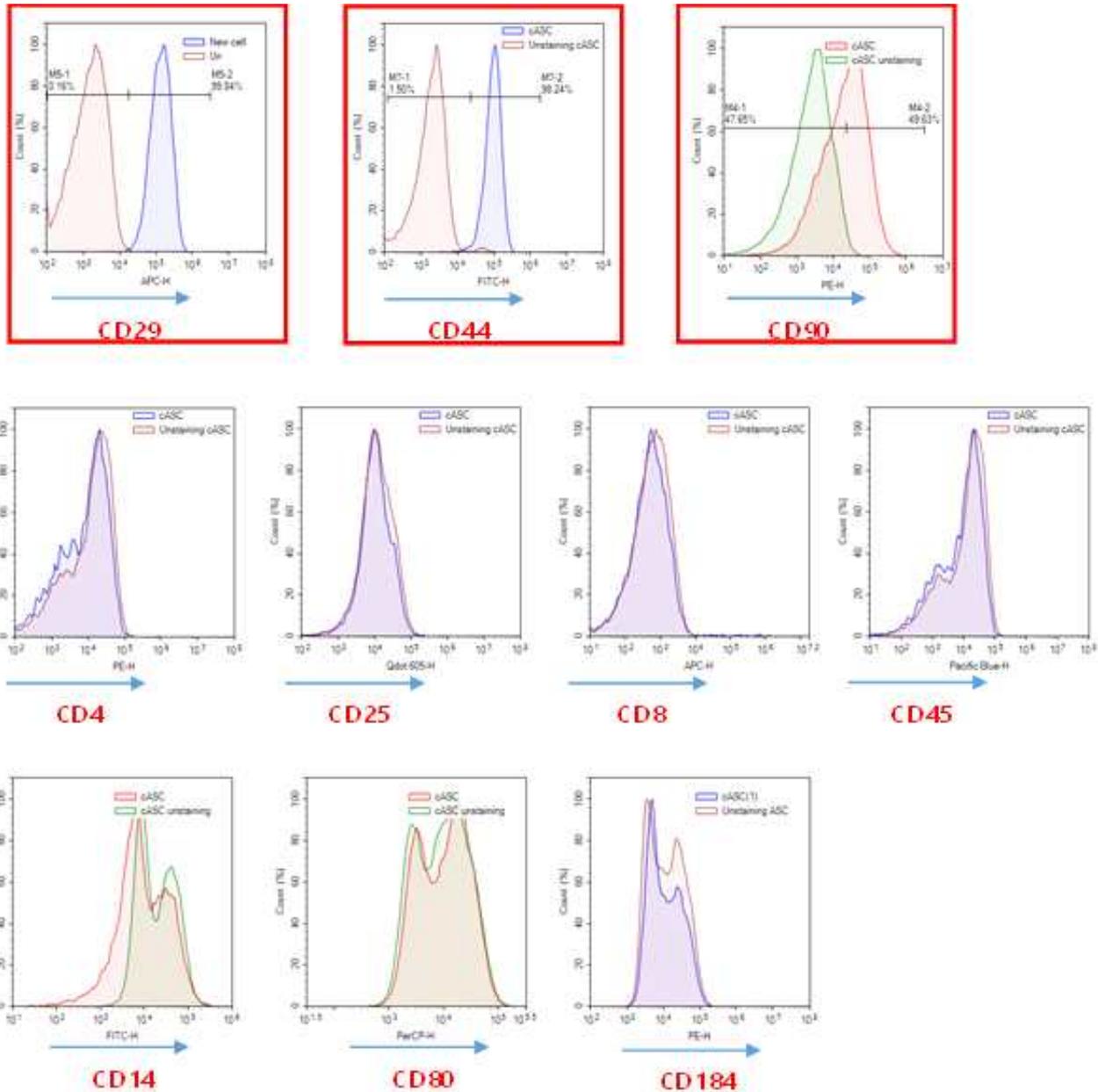


그림 36 개유래 지방 중간엽줄기세포의 phenotype을 확인하기 위해 세부 세포표면 단백질 확인

- 개유래 중간엽줄기세포의 특성 결과
 - 기존 계획단계에서 확인하고자 한 모든 세포표면 단백질을 확인하였으나 시험 반복에 경향의 재현이 확인 되지 않은 세포표면 단백질을 제외한 10 개의 세포 표면 단백질을 선정 하였음
 - CD29, CD44, CD90 이 양성으로 확인되며 다른 CD4, CD8, CD14, CD25, CD45, CD80, CD184 등은 음성으로 확인. 대부분의 개유래 지방 중간엽줄기세포의 세포표면 단백질 특성은 위와 같은 것으로 결론내림.

- Early stem cell transcript factors(Oct 3/4, Sox 2, Nanog) 분석 : I
- 아래 결과와 같이 Nanog의 명확한 발현이 확인 되었으며 Sox2 의 경우 계대 반복시 발현 이 감소 되는 것으로 확인 됨. CMT-U27의 경우 개 종양암세포로서 대조하기 위해 확인하였다.

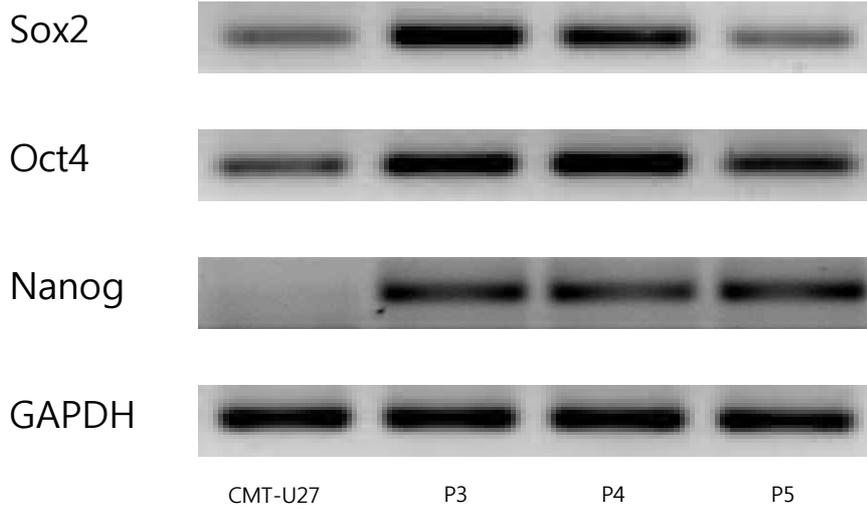


그림 37 개유래 지방 중간엽줄기세포의 초기 전사 인자 확인을 위한 웨스턴 블로팅 결과

(3) 성체 줄기세포 분화유도

- 골세포 분화 전후 분화능 비교 : Alizarin Red stain 의한 분석, Real time- PCR 에 의한 BMP2, Osteopontin 발현 분석
- 확립한 개유래 지방 중간엽줄기세포가 정상적인 분화능을 가지고 있는지 확인하기 위해 각각의 분화 배지에 배양하여 분화능을 확인하였다.
- 골분화배지에 넣은 개유래 지방 중간엽줄기세포의 경우 정상적으로 골세포로 분화가 되었고, 이것을 확인하기 위해 alizarin red 염색을 하여 아래와 같이 확인하였다.



그림 38 개유래 지방 중간엽줄기세포의 각 주차별 골분화 모습 및 alizarin red 염색상

- 연골세포 분화 전후 분화능 비교 : Alcian blue stain 의한 분석, Real time- PCR 에 의한 Sox9, Aggrecan 및 COL2A 발현 분석
- 연골분화배지에 넣은 개유래 지방 중간엽줄기세포의 경우 정상적으로 연골세포로 분화가 되었고, 이것을 확인하기 위해 alcian blue 염색을 하여 아래와 같이 확인하였다.



그림 39 개유래 지방 중간엽줄기세포의 각 주차별 연골분화 모습 및 alcian blue 염색상

- 지방세포 분화 전후 분화능 비교 : Oil Red Oil staining 의한 분석, Real time-PCR에 의한 FAS, SREBP-1 발현 분석
- 지방세포분화배지에 넣은 개유래 지방 중간엽줄기세포의 경우 정상적으로 지방세포로 분화가 되었고, 이것을 확인하기 위해 oil-red-O 염색을 하여 아래와 같이 확인하였다.

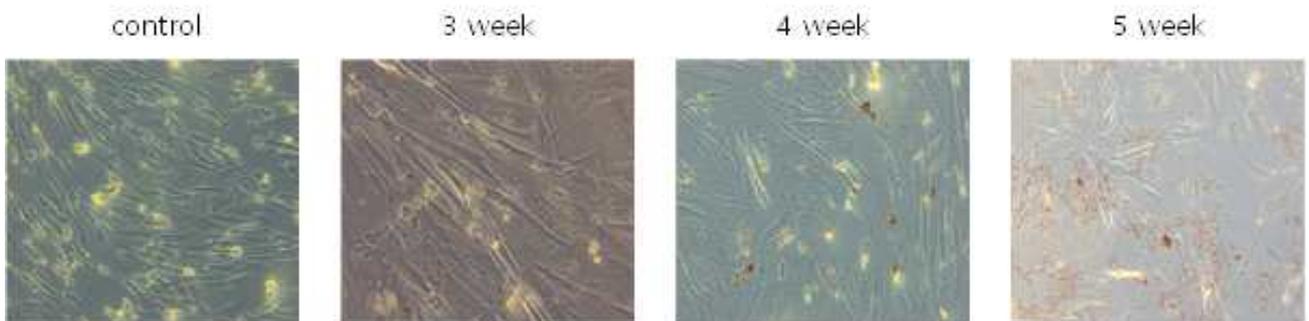


그림 40 개유래 지방 중간엽줄기세포의 각 주차별 지방세포분화 모습 및 Oil-red-O 염색상

- 세포 분화 전후 분화능 유전자 비교 : 골세포, 연골세포, 지방세포 관련 분화 유전자를 Real time RT-PCR을 이용해 분석하였고, 그 조건과 결과는 아래와 같다. 분화 배지를 넣었을 때 각 유전자 발현량이 넣지 않았을 때 비교하여 상승한 것이 확인되었다.

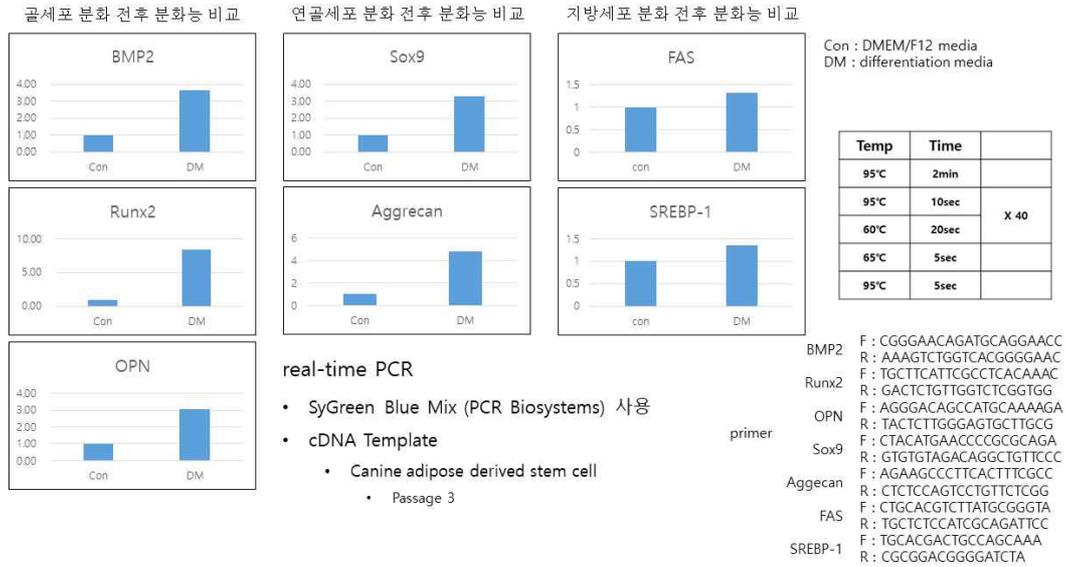


그림 41 세포 분화 전후 분화능 유전자 비교

- 협동기관 2 ((주)엑소코바이오)

(1) 동물용 세포외소포치료제 시생산 및 품질기준 확립

- 개유래 중간엽줄기세포의 엑소좀 생산성 확인

1) ㈜노터스(협동기관 1)이 생산한 개유래 중간엽줄기세포 배양액(Condition Media, CM)으로부터 엑소좀 분리

- ㈜노터스로부터 총 3회에 걸쳐 공급받은 개유래 중간엽줄기세포 배양액으로부터 엑소좀을 각각 분리하였음.

2) 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 생산성 평가

- 분리된 엑소좀의 함량을 나노입자추적분석법(Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) 및 단백질 함량시험으로 평가하고, 총 생산된 엑소좀 함량을 배양액 부피 또는 총 세포수로 나누어 엑소좀의 생산성을 평가하였음.

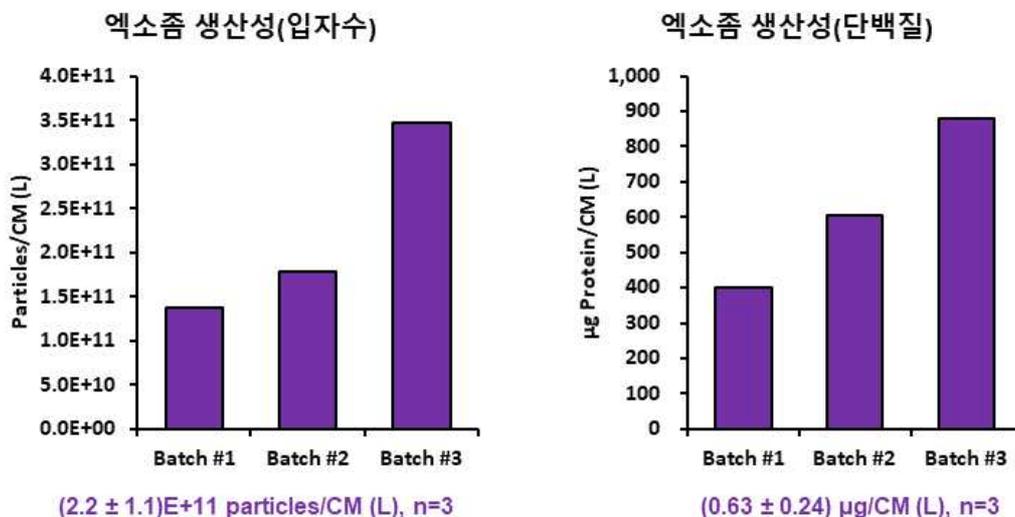


그림 42 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 생산성 평가

▪ 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 품질기준 확립

1) 함량시험

- 나노입자추적분석법(Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) : 세포외소포체의 함량 분석에 널리 사용되는 NTA를 활용하여 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 입자수를 평가함.
- 단백질 정량 분석법 : Micro BCA protein assay kit를 사용하여 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 단백질 함량을 평가함.
- 국제 세포외소포체 학회(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 및 식품의약품안전처의 가이드라인에 따른 세포외소포체의 함량시험법을 확립함.

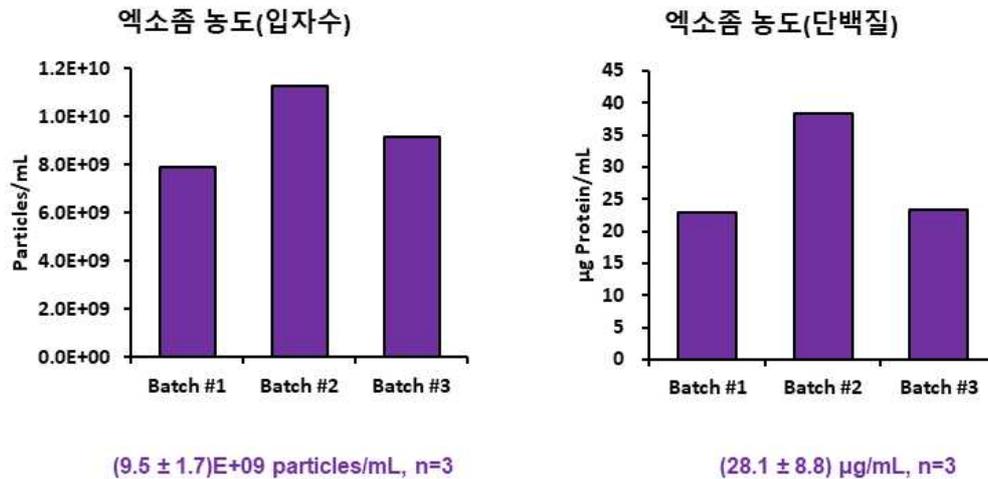


그림 43 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 함량시험법

2) 세포외소포체의 크기

- 함량시험에 사용되는 나노입자추적분석법(Nanoparticle Tracking Analysis, NTA)을 통해 엑소좀의 크기분포를 평가하였음.
- 국제 세포외소포체 학회(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 및 식품의약품안전처의 가이드라인에 따른 세포외소포체 크기 분포 시험법을 확립함.

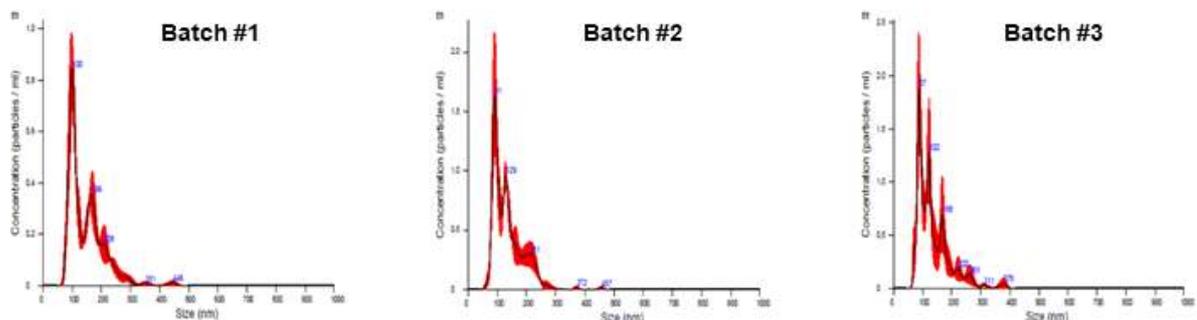


그림 44 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 크기분포 평가

3) 확인시험

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 특이적 표지자를 평가함.
- 유세포분석을 이용한 엑소좀 표면 마커 분석 : 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀에 엑소좀 표면 마커로 알려진 CD9 및 CD81이 존재함을 확인함.

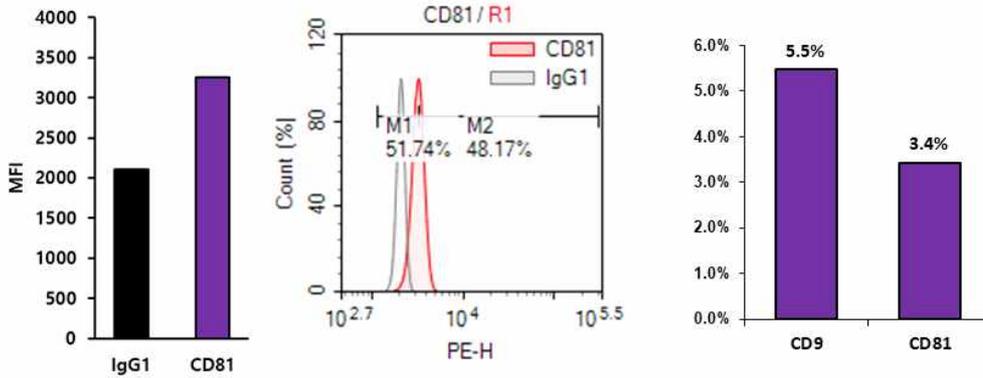


그림 45 엑소좀 표면 마커 분석

- 국제 세포외소포체 학회(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 및 식품의약품안전처의 가이드라인에 따른 세포외소포체의 함량시험법을 확립하였으며, 세포 공여 동물과 반응성이 우수한 항체를 발굴할 필요가 있음.

4) 순도 시험

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 순도 평가

세포 유래 불순물 평가 : 세포질 단백질 또는 핵단백질과 같이 세포외소포체에 농축되지 않을 것으로 기대되는 단백질(residual host cell protein)을 평가함.

- : 세포외소포체에 존재하지 않는다고 알려진 endoplasmic reticulum 유래 단백질인 Calnexin 잔존량 평가를 수행하였음.

공정 유래 불순물 평가 : 공정 사용 물질에 대한 잔존량을 평가함.

- : 세포배양 공정에 사용되는 FBS의 잔류량을 평가하기 위해 BSA (Bovine Serum Albumin) 잔존량을 효소결합 면역침강 분석법 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)으로 평가하였음.

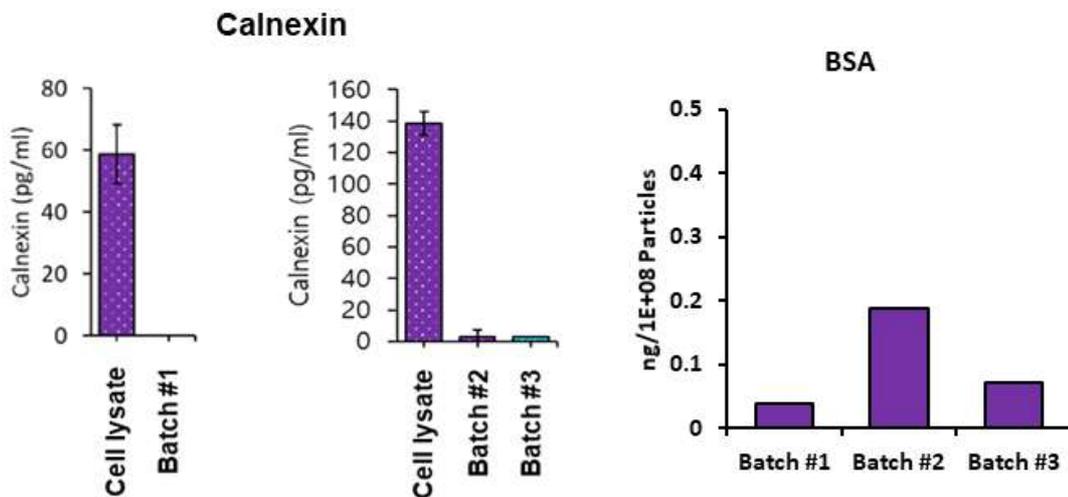


그림 46 엑소좀의 순도 평가

- 국제 세포외소포체 학회(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 및 식품의약품안전처의 가이드라인에 따른 세포외소포체의 함량시험법을 확립하였음.

5) 무균 시험 (적합, 적합기준 - 균 증식 유무(탁도)를 대조군과 비교하여 확인)

- 한천 배지 및 액체 배지를 이용하여 혐기적과 호기적 조건에서 14일 배양하여, 개유래 중간엽줄기세포의 엑소솜에서 미생물의 오염여부를 확인함.

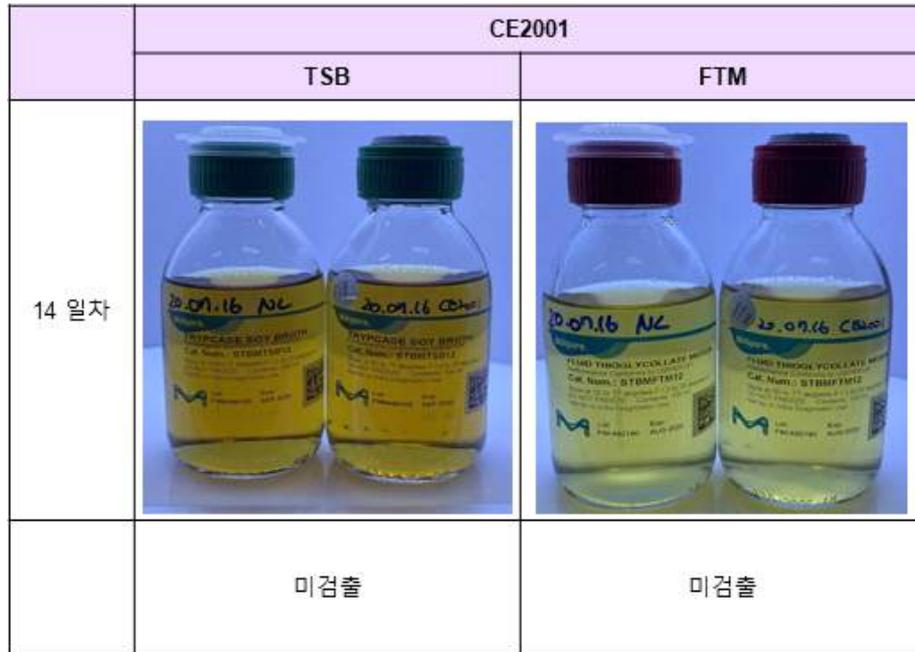


그림 47 엑소솜의 무균 시험

6) 마이코플라즈마 부정시험 : 적합

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소솜의 마이코플라즈마 오염여부를 평가함.

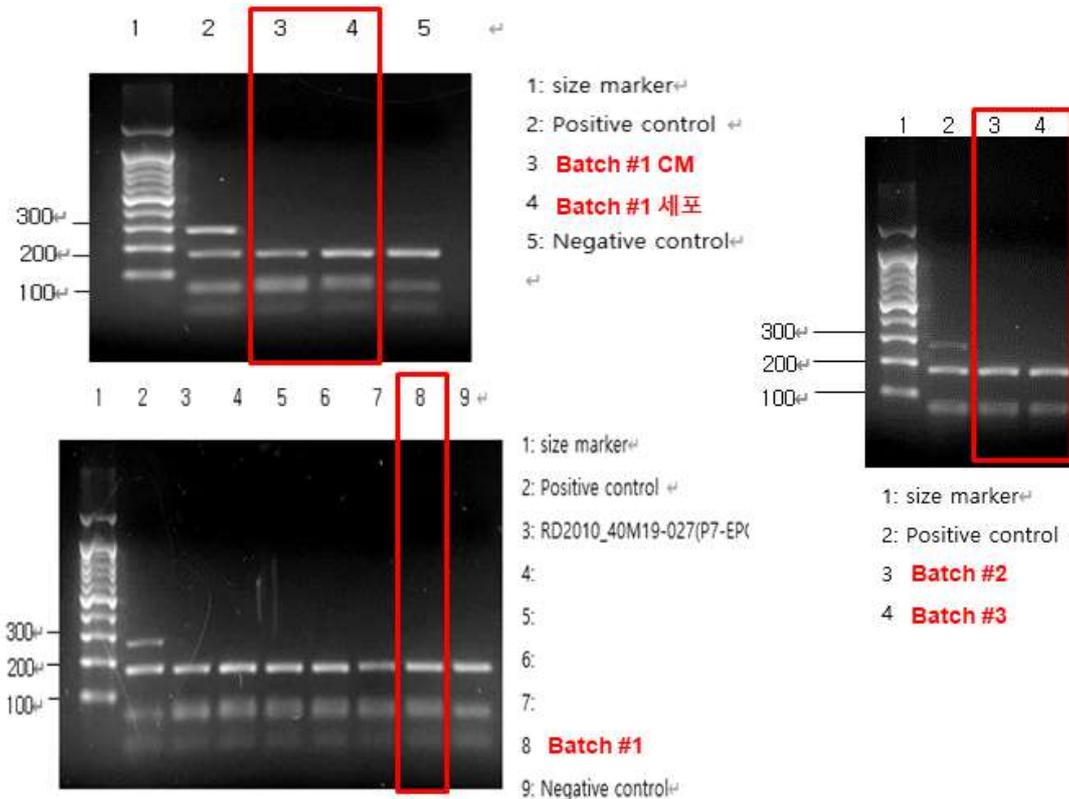


그림 48 개유래 중간엽줄기세포 엑소솜의 마이코플라즈마 부정 시험

7) 엔도 독신 부정 시험

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 엔도독신 오염여부를 평가함

| 검체명 | 시험결과 | 판정 |
|----------|---------------------------------------|----|
| Batch #1 | 0.029 EU/ 10 ⁸ particles | 적합 |
| Batch #2 | < 0.01 EU/ 10 ⁸ particles | 적합 |
| Batch #3 | < 0.009 EU/ 10 ⁸ particles | 적합 |

8) 역가 시험

- LPS로 자극 유도 된 대식세포에서 분비하는 염증성 싸이토카인이 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀에 의해 억제됨을 평가함.

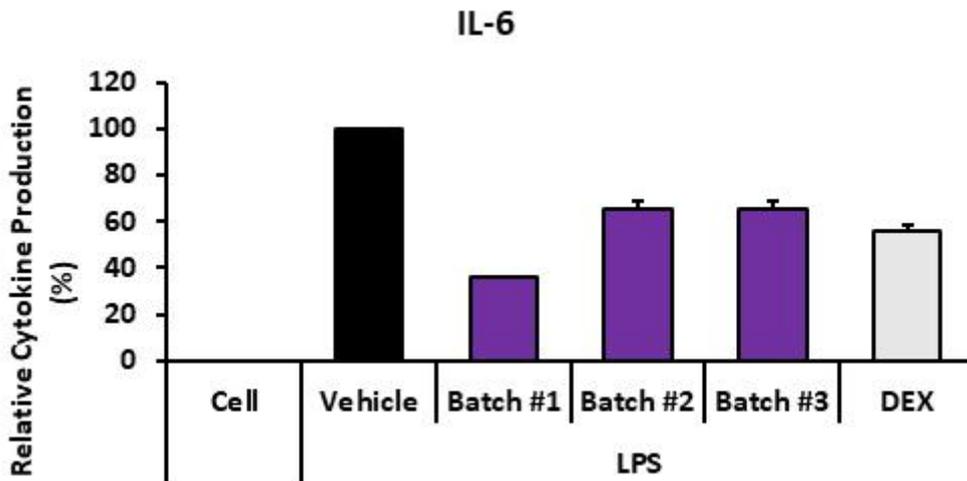


그림 49 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 항염 효능 확인

(2) 동물용 세포외소포치료제 효력시험을 위한 엑소좀 공급

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 아토피 피부염 치료 효능 확인을 위한 엑소좀 공급
 - (주)노터스(협동기관 1)이 생산한 개유래 중간엽줄기세포 배양액(CM)으로부터 효력시험을 위한 엑소좀을 분리 및 생산함.
 - 품질 기준을 통과한 엑소좀은 효력 시험을 위해 주관기관인 한국건설생활환경시험연구원에 공급함.
- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 안전성 시험을 위한 엑소좀 공급
 - (주)노터스(협동기관 1)이 생산한 개유래 중간엽줄기세포 배양액(CM)으로부터 효력시험을 위한 엑소좀을 분리 및 생산함.
 - 품질 기준을 통과한 엑소좀은 효력 시험을 위해 주관기관인 한국건설생활환경시험연구원에 공급함(그림 49).

Certificate of Analysis

| | | | |
|----------------------|------------|--------------------|-----------------------|
| Product Name | EXO301 | Lot No. | CE2101 |
| Mfg. Date | 2021.04.02 | Exp. Date | N/A |
| Storage temperatures | -80°C | Storage conditions | Avoid direct sunlight |

| Test | Result |
|-----------------------|--------------------------------------|
| Physical Appearance | Clear liquid |
| Concentration | 2.65 x 10 ¹⁰ particles/mL |
| Size * | 139.57 nm |
| Protein Concentration | 66.63 µg/mL |
| pH | 7.17 |
| Endotoxin | < 0.174 EU/mL |
| Sterility Test | Negative |
| Mycoplasma Test | Negative |

* Mean size

| | |
|-------------------|---|
| | <p>04. 16. 2021 _____ (Month/Date/Year)</p> |
| QA Manager: _____ | <p>하 매 현 _____ (Print Name)</p> |
| | <p>_____ (Signature)</p> |

그림 50 시험물질의 품질 성적서

(3) 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 특성분석

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 miRNA 프로파일 분석

1) small RNA-Sequencing 방법을 이용한 miRNA 프로파일을 확인함.

- 엑소좀을 small RNA-Sequencing 방법을 이용한 RNA 프로파일을 확인하였음(그림 50, ExoCoBio-6, 엑소좀 배치1; ExoCoBio-7, 엑소좀 배치2).

| Sample | Total Read Count | Trimmed Read Count | nonAdapter Read Count | Short Read Count | Low Quality Read Count |
|------------|------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| ExoCoBio-6 | 25,418,564 | 16,342,147 (64.29%) | 5,521,607 (21.72%) | 3,552,723 (13.98%) | 2,087 (0.01%) |
| ExoCoBio-7 | 30,807,809 | 20,148,238 (65.4%) | 6,260,006 (20.32%) | 4,397,186 (14.27%) | 2,379 (0.01%) |

그림 51 Summary of read preprocessing

- RNA 프로파일 분석 결과 중 miRBase v22.1기준(총 453 miRNA) 두 엑소좀 배치에서 각각 96, 102개의 miRNA가 동정되었음(그림 51).

| Sample | Processed reads | Mapped reads | Known miRNA in Sample | Known miRNA in Species (miRBase v22.1) |
|------------|-----------------|---------------|-----------------------|--|
| ExoCoBio-6 | 17,356,698 | 4,642 (0.03%) | 96 | 453 |
| ExoCoBio-7 | 20,798,246 | 5,670 (0.03%) | 102 | 453 |

그림 52 Mapped reads to miRBase precursor

- 특히 동정된 miRNA 중, 상위 20개 miRNA가 전체 miRNA의 87% 이상을 차지함을 확인하였음(그림 52A).
- 동정된 miRNA 중 상위 3개를 대상으로 qPCR 방법을 이용해 엑소좀 내 miRNA가 존재함을 확인하였음(그림 52B).

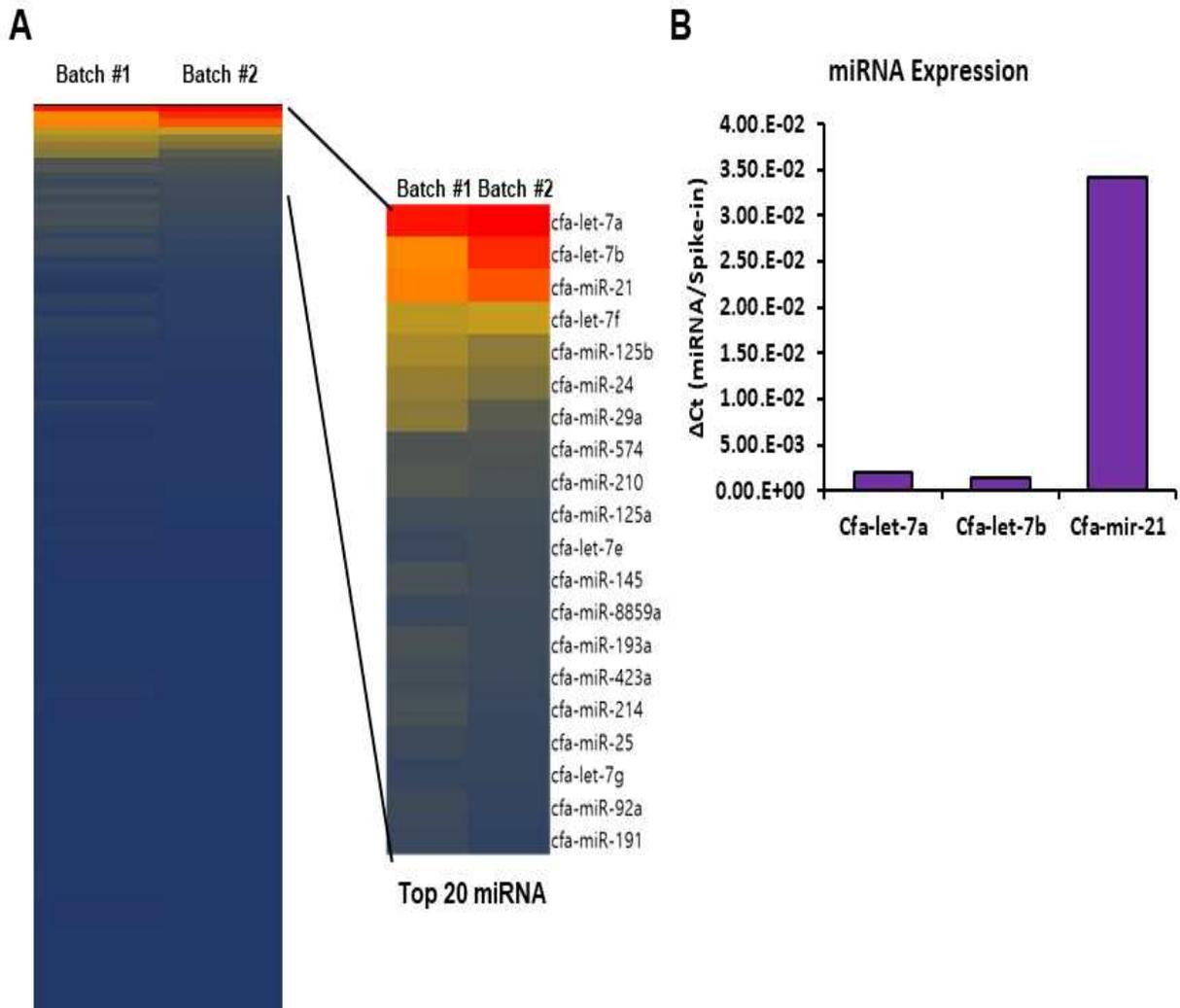


그림 53 (A) 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 miRNA 프로파일 heat map, (B) 상위 3개 miRNA의 qPCR 확인 시험 결과.

- 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 특성 규명 방법
 - 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 특성분석 및 품질시험은 기본적으로 “세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 (식품의약품안전평가원, 2018)에 준하여 아래와 표와 같이 수행함.

| | |
|---------------------|---|
| 엑소좀 수율 (입자크기 및 입자수) | 나노입자추적분석법 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) |
| 엑소좀 수율 (단백질) | BCA 시험법 |
| 엑소좀 확인시험 | 유세포분석법 (엑소좀 표면 마커 CD81) |
| 엑소좀 순도시험 | ELISA 측정법 (Calnexin, BSA) |
| 항염효능시험 | 세포기반분석법 (LPS 유도 대식세포를 이용한 IL-6 분비량 검증시험) |

- 모든 기관(한국건설생활환경시험연구원, (주)노티스, (주)엑소코바이오): 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 작성

- 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 작성
- 농림축산검역본부 가이드라인 제정 등에 활용할 수 있도록 정책 건의함

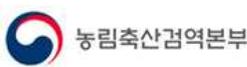
| 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 | |
|--|--|
| <p>동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인</p> <p>(Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Assessment of Extracellular Vesicles Therapy Products for Animal Use)</p> <p>2022</p>  <p>농림축산검역본부</p> <p>- 1 -</p> | <p>목차</p> <p>1. 서론 3</p> <p>2. 적용 범위4</p> <p>3. 관련 규정5</p> <p>4. 동물용 세포외소포치료제의 개발 및 제조 시 고려사항.....6</p> <p>4.1 동물용 세포외소포치료제 출발물질6</p> <p>4.2 동물용 세포외소포치료제 제조공정 및 관리8</p> <p>4.3 동물용 세포외소포치료제 특성분석10</p> <p>4.4 동물용 세포외소포치료제 품질관리11</p> <p>4.5 동물용 세포외소포치료제 안정성17</p> <p>5. 동물용 세포외소포치료제 비임상 고려사항18</p> <p>5.1. 약리작용에 관한 자료18</p> <p>5.2. 독성에 관한 자료21</p> <p>6. 동물용 세포외소포치료제 임상 고려사항25</p> <p>7. 참고문헌29</p> |

그림 54 최종 제출된 가이드라인

- 아래는 농림축산검역본부에 정책건의한 내용 전문임. 총 3차례의 전문가 협의체(1차년도 1회, 2차년도 2회)에서 논의된 내용을 충실히 반영하였으며, 기존 인체용 가이드라인에서 동물용 의약품의 특성을 반영하여 차별화하였음. 각 소제목 하단에 가이드라인 작성시 고려한 사항을 간단히 작성하였음.

1. 서론

본 가이드라인은 세포 또는 유전물질이 도입된 세포가 분비하는 세포외소포(Extracellular Vesicles, EV)를 동물용의약품으로 개발 시 고려사항을 제시하고자 마련하였다. 세포외소포는 단백질, 지질, 핵산 등을 포함하며 세포 간 정보교환이 가능한 지질 이중층 소포체이다. 이 중 포유류 세포외소포의 경우 공통적으로 테트라스판닌 (tetraspanins: CD9, CD63, CD81), 인테그린 (integrin), 엔도솜 정렬 복합체 (endosomal sorting complex), 세포골격 단백질 (cytoskeleton protein), 열 충격 단백질(heat shock protein)등으로 구성되며, 미생물 유래 세포외소포의 경우 그람 음성 박테리아 유래 세포외소포로서 외막, 세포바깥영역, 주변세포질 유래의 단백질이 확인 되었으나, 그람 양성 박테리아 유래 세포외소포의 구성 등은 자세하게 규명되지 않았다. 최근 인체 의약품 관련 개발뿐만 아니라 동물용의약품에서도 세포외소포를 활용한 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 이 가이드라인은 일관성 있는 품질과 안전성, 유효성을 가진 동물용 세포외소포치료제 개발을 위해 품질, 비임상, 임상시험 시 고려사항에 대한 원칙을 제시하고 있다. 여기서 규정하지 않은 세부사항은 농림축산검역본부의 승인을 받아 시험을 실시하는 것을 원칙으로 하며, 본 가이드라인은 법적 의무규정이 아닌 권고사항을 제안하는 데 의미가 있다.

고려사항 : 서론에서는 인체용 의약품 가이드라인과 비슷한 내용으로 세포외소포에 대한 간단한 소개를 하고, 동물용 의약품을 허가 관리하는 농림축산검역본부임을 명시하고 있음.

2. 적용 범위

2.1 제조방법

세포외소포는 세포에서 분비되는 이중 지질막 구조의 물질을 의미하며 세포외소포치료제는 살아 있는 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 개발하거나 유전적으로 변이된 세포외소포를 통해 개발하고자 한다면 이 가이드라인을 적용할 수 있으나, 제품 특성에 따라 추가적인 고려사항이 있을 수 있다.

2.2 생물학적 분류체계

세포외소포의 유래 세포 적용범위는 세균(bacteria), 고세균(Archaea), 진핵생물(Eukarya) 등 살아 있는 모든 세포가 그 대상이 될 수 있으나, 이 가이드라인에서는 현재 가장 많은 연구가 진행된 포유류 세포(동물세포) 및 미생물(세균)에서 생산되는 세포외소포치료제에 대해 적용하고, 그 이외의 유래 세포는 각각의 세포 특성에 따라 추가적인 고려사항이 필요하다.

2.3 적용 대상

세포외소포치료제의 적용동물로는 반려동물로 가장 높은 비율을 차지하는 개와 고양이를 주 대상으로 하되 다른 동물의 경우에도 농림축산검역본부의 승인을 받아 해당 가이드라인을 일부 적용할 수 있으며 종과 질병에 따라 추가 자료가 필요할 수 있다.

2.4 기원 세포의 종류

이 가이드라인은 살아있는 자가¹¹⁾, 동종¹²⁾, 이종¹³⁾ 세포에서 분비되는 세포외소포를 이용하여 개발되는 세포외소포치료제에 적용되며, 이 가이드라인에서 제시하는 내용 외에도 각각의 세포 특

11)자가 세포 : 공여동물로부터 적출된 세포를 다시 동일한 개체가 활용한 목적으로 만들어진 세포

12)동종 세포 : 공여동물로부터 적출된 세포를 동일한 종의 수여동물로 제공하기 위해 만들어진 세포

13)이종 세포 : 특정목적을 위해 수여동물과는 다른 종의 공여동물로부터 제공된 세포

성에 따라 추가적인 고려사항이 필요할 수 있다.

고려사항 : 본 가이드라인의 적용대상동물로는 개와 고양이를 주 대상으로 제한하였으나, 다른 동물에도 농림축산검역본부와 사전에 논의하여 일부 적용할 수 있음을 명시함.

3. 관련 규정

현행 「동물용의약품등 안전성·유효성 심사에 관한 규정 제2조(용어의 정의)」에 따르면 동물용 의약품 생물학적제제 등에 해당하는 품목의 제형은 생물학적제제, 유전자재조합의약품, 세포배양의약품, 세포치료제, 유전자치료제로 분류된다.

동물용 세포외세포치료제는 동물용 세포치료제와 유사한 약리작용이 기대되나 살아있는 세포를 포함하지 않기 때문에 현재 동물용의약품 분류 상, 세포치료제에 해당하지 않는다. 그러나 세포외세포치료제는 세포에서 유래된 형태로 세포치료제와 유사한 품질, 안전성, 유효성 평가가 필요하며, 만약 세포외세포 제조를 위하여 유전적 변형이 이루어졌다면 유전자치료제로 분류될 수도 있다. 유전물질이 도입된 세포를 이용하여 제조되는 세포외세포치료제는 본 가이드라인과 함께 유전자치료제의 심사기준이 적용될 수 있다. 이처럼 동물용 세포외세포치료제의 경우 현재 별도의 제형으로 분류될 수 없으며, 현재로서는 해당 품목의 특성에 따라 식품의약품안전처의 분류기준을 준용하는 것이 적절하다.

세포외세포치료제 평가 시 약사법, 동물용의약품등 취급규칙 및 그 하위 규정뿐만 아니라 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련된 법률 및 그 하위규정의 적용을 받는다.

고려사항 : 동물용 세포외세포치료제의 인허가를 위해 적용할 만한 국내외의 관련 규정은 없는 것으로 확인됨. 그러므로 세포외세포의 제조방법이나 해당 품목의 특성에 따라 개별의 규정을 적용해야 할 것으로 판단됨.

4. 동물용 세포외세포치료제의 개발 및 제조 시 고려사항

동물용 세포외세포치료제 생산을 위해서는 다음 사항에 대하여 광범위하게 고려하여야 한다.

- (1) 세포외세포치료제 출발물질
- (2) 세포외세포치료제 제조공정 및 관리
- (3) 세포외세포치료제 특성분석
- (4) 세포외세포치료제 품질관리
- (5) 세포외세포치료제 안정성

4.1 동물용 세포외세포치료제 출발물질

4.1.1 미생물 유래 세포외세포치료제

아래와 같은 사용 균주에 대한 상세한 정보가 필요하며, 이외에도 추가적인 출발물질에 대한 정보가 있다면 제출하여야 한다.

- (1) 기원, 균주명, 계대수, 유전자 정보, 분양증 등
- (2) 유전자 vector(벡터), 재조합 부위 유전 정보

4.1.2 동물세포 유래 세포외세포치료제

동물용 세포외세포치료제의 제조와 관련하여 그 기원이 되는 세포의 생산 및 품질관리를 통해 우

선적으로 안전성을 확보하여야 한다. 따라서, 「동물용의약품등 안전성 유효성 심사에 관한 규정 (검역본부 고시)」 중 세포치료제 관련 조항에 따라 다음의 사항을 입증하여야 한다.

(1) 세포의 기원 및 세포채취

- 출발물질의 오염을 방지하기 위하여, 살아있는 조직과 세포는 무균적으로 채취하여야 하며 오염을 줄이기 위한 노력이 필요하다. 채취 과정은 전문적인 교육을 받은 인력 혹은 수 의사, 동물보건사가 적절한 시설(동물병원 등)에서 수행하여야 한다.
- 채취 시 미생물에 대한 오염을 줄이기 위해 페니실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신 등의 항생물질을 사용할 수 있고, 이동 중 미생물의 증식을 방지하기 위해서도 항생물질을 사용할 수 있다. 하지만 이러한 항생물질의 사용이 무균제조공정 요건을 대체할 수 없다. 추가적으로 항생제 또는 항생물질이 무균시험에 간섭영향을 주지 않으며, 완제품에 이들이 남아있지 않음을 보장하는 것이 필요하다.

(2) 세포 공여동물에 대한 구체적인 스크리닝 정보(동물의 감염성질환 유무 및 유전자 변이 등)

- 감염성질환의 경우 바이러스, 세균, 진균을 구분지어 정보를 제공해야 하며, 병력 및 치료 사항이 있다면 완치 여부 및 치료 진행 사항 등을 기재하여야 한다.
 - 다음은 개와 고양이에서 스크리닝 시 고려해야 할 대표적인 바이러스, 세균, 진균을 기술하였으나, 이 외에도 다른 외인성 감염에 의한 질환을 추가하여 고려하여야 한다.
1. 개 바이러스 ; Canine Herpesvirus, Canine adenovirus, Canine coronavirus, Canine distemper virus, Canine oral papilloma virus, Canine parainfluenza 2 virus, Canine parvovirus, Rabies virus, Suid herpesvirus 1, Canine influenza virus
 2. 개 세균 : Brucella canis, Leptospira
 3. 고양이 바이러스 : Feline parvovirus, Feline herpesvirus, Feline calicivirus, Feline infectious peritonitis virus
 4. 고양이 진균성 질환 : Candidosis, Feline dermatophytosis, Cryptococcosis, Sporotrichosis, Aspergillosis
- 유전자 변이의 경우 해당 동물에 보고된 정보를 제공해야 하며 기본 검사법 (Basic Screening)을 통한 돌연변이 지도 (Mapping mutants)를 제공해야 한다.

(3) 제조공정 전 단계에서 세균, 진균, 마이코플라스마, 엔도톡신, 혹은 외래성 바이러스가 없다는 증명

- 세포외세포의 특성분석에서 중요한 점은 세포외세포를 생산하는 조직이나 세포의 기원, 공여동물과 수여동물과의 관계(자가, 동종, 이종 등)이다. 세포외세포를 생산하는데 사용되는 세포의 수집절차, 환축/공여동물 적합성 기준, 건강상태와 의학적 병력이 문서화되어야 한다. 공여동물로부터 조직을 수집하기 전에 감염의 징후를 스크리닝하는 것은 필수적이다.

세포외세포를 생산하는데 사용되는 다양한 공여동물은 기능적으로 다른 특성을 갖는 세포외세포를 생산할 수 있기 때문에 공여동물에 따른 차이를 고려하여야 한다. 마스터 세포은행을 구축하는 것이 공여동물에 따른 차이를 최소화하는데 도움을 줄 수 있다.

마스터 세포은행의 세포관리와 관련해 불멸화된 클론성 세포주(immortalized clonal cell lines)에서 세포외세포를 생산한다면 유전형, 표현형의 안정성을 엄격하게 시험하여야 한다. 줄기세포에서 세포외세포를 생산한다면 세포표면단백질형태를 유세포분석 장치를 통해 분석하고, 정상적인 줄기세포 분화능을 보유하고 있는지 확인하기 위해 연골세포, 골세포, 지방세포 등으로의 분화시험을

하여 그 결과를 확보하여야 한다. 미생물에서 세포외소포를 생산한다면 기원 미생물의 정확한 배양 조건하에 배양한 후 순수배양을 확인하기 위해 colony를 연속적으로 희석하여 현미경 관찰 또는 유전자 검사를 통해 기원 미생물 및 다른 미생물의 오염여부 결과를 확보하여야 한다.

고려사항 : 출발 물질 부분에서는 동물용 세포외소포의 기원에 따라 미생물유래와 동물세포유래로 나누어서 고려하였으며, 특히 동물세포의 경우 세포채취시에 고려해야 할 사항, 공여 동물에서의 스크리닝 정보(개, 고양이) 등을 중점적으로 기술하였음

4.2 동물용 세포외소포치료제 제조공정 및 관리

동물용 세포외소포치료제의 제조는 배양, 회수, 분리 및 정제, 제형화, 충전 등의 공정으로 이루어지며, 각 제조공정별 제조방법을 상세히 기술하여야 한다.

4.2.1 배양 및 회수

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

세포외소포는 주로 세포배양 상등액으로부터 분리, 정제되기 때문에 배양조건이 표준화되어야 하며, 배치(batch) 간 재현성이 입증되어야 한다. 세포밀도, 계대횟수, 배가시간(doubling time), 산소농도, pH, 배양조건(배지조성, 사이토카인, 배양용기, 배양규모 등) 등은 세포외소포의 양이나 품질에 큰 영향을 미칠 수 있다. 또한 소태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 배지와 비교하여 무혈청배지(serum-free media) 또는 소 유래 세포외소포가 제거된 배지에서 자라는 세포는 세포자체의 특성이 달라진다는 보고가 있으며, 분비되는 세포외소포의 양이나 질에도 영향을 미칠 수 있다.

세포외소포를 생산하는데 있어서 죽어가는 세포는 apoptotic body나 세포내 성분들을 분비할 수 있기 때문에 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. 동물 유래 시약은 수역동물에서 이중의 감염성 인자 그리고/또는 바람직하지 않은 면역반응을 증가시킬 수 있다. 배양배지에 소태아혈청을 사용하게 되면 분리된 개나 고양이 세포외소포에 소 유래 세포외소포가 포함되게 되며, 이는 의도하지 않은 생물학적 영향을 일으키게 된다. 따라서 세포외소포 생산에서 소태아혈청을 사용한다면, 소 유래 바이러스가 없음을 입증하고, 엄격하게 관리된 소태아혈청만을 사용할 것을 권장한다. 가능하면 명확히 알려진 성분 또는 목적동물 유래 성분의 시약을 사용할 것을 권장한다.

4.2.2 분리 및 정제

세포외소포 분리 및 정제를 위해 널리 사용되는 기술에는 한외여과(ultrafiltration), 초원심분리(ultracentrifugation), 침전(precipitation), 접선흐름여과법(Tangential Flow Filtration, TFF), 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등이 있으며, 이를 단독 또는 두 가지 이상의 방법을 조합하여 사용하여 세포외소포를 분리 및 정제한다. 현재의 분리기술들은 세포소기관, 지질단백질(lipoprotein), 기타 단백질, 또는 의도하지 않은 나노입자 등의 오염 등에 취약하다는 보고가 있으며, 세포외소포를 분리 및 정제하는 방법에 따라 이러한 불순물의 오염 정도, 세포외소포의 생물학적, 물리화학적 특성, 기능 및 체내분포 등에 영향을 미칠 수 있다는 보고가 있다. 또한 세포는 서로 다른 생물학적, 물리화학적 특성, 또는 기능이 구별되는 이질성(heterogeneity)

을 지닌 세포외소포를 분비하며, 세포외소포 집단 내에서도 하위집단이 존재할 수 있음을 시사하는 보고가 있다.

따라서 분리 방법에 대해 재현성, 순도, 불순물, 세포외소포의 특성과 관련하여 분리 및 정제과정을 표준화하여야 하며, 재현성을 입증하기 위하여 분리 및 정제에 사용되는 원자재, 분리 조건 및 공정변수들에 대해 상세한 기술이 필요하다.

현재의 세포외소포의 제형화 및 보존 기술들은 세포외소포의 특성 및 안정성에 대해 미치는 영향이 잘 알려져 있지 않다. 세포외소포의 품질 및 제조방법의 일관성 보장을 위해 세포외소포의 제형화, 충전 포장 및 보존을 포함한 제조 작업에 대해 상세히 기술하여야 한다.

4.3. 동물용 세포외소포치료제 특성분석

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. 일반적으로 세포 종류에 따라 지질의 조성은 다르지만, 동일한 세포에서 얻어진 지질의 조성 및 함량은 유사하다고 알려져 있다. 프로파일 분석을 위해서는 최대한 많은 수의 단백질, RNA, 지질 등이 분석될 수 있도록 최신의 기술(예를 들어, miRNA 프로파일 분석의 경우 small RNA sequencing 방법, 단백질 또는 지질 프로파일 분석은 LC-MS/MS 방법)을 이용하여 분석하는 것이 필요하다. 또한 개발자들은 ExoCarta나 Vesiclepedia와 같은 데이터베이스를 통하여 분리한 세포외소포에서 확인된 단백질과 다른 세포외소포에서 확인된 단백질과 비교하는 것이 필요하다. 또한 생산공정 중 동물 유래 물질이 사용되는 경우, 프로파일 분석에서 확인된 단백질, RNA 등이 사용된 동물 유래 물질에서 유래된 것이 아님을 확인하는 것을 고려하여야 한다.

세포외소포 및 단일 소포에 대하여 극저온 전자현미경(Cryo electron microscope, Cryo EM), 나노입자 트래킹 분석(nanoparticle tracking analysis, NTA) 등으로 이중지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석이 필요하다.

또한 용량 증량에 따른 세포외소포의 기능적 활성화에 대한 정량적인 분석이 필요하다. 이 때 최소한의 기능적 효과를 나타낼 수 있는 대조군을 설정하는 것이 중요하다. 예를 들어 세포가 추가되지 않은 배양배지에서 동일한 제조공정(동일한 플라스크, 배양배지, 배양조건, 분리 및 정제 등)을 거쳐 획득한 모의(mock) 세포외소포를 사용할 수 있다. 분리 및 정제된 세포외소포는 기능적 활성을 지닌 생산공정 사용 물질 유래의 세포외소포, 단백질, RNA 또는 기타 불순물을 포함할 수 있기 때문에 이러한 모의 세포외소포는 세포외소포의 기능적 활성화의 '배경(background)효과'에 대한 정보를 제공하며, 기능적 활성화에서 차지하는 비세포외소포 성분과 세포외소포에 포함된 성분의 비율에 대한 정보를 제공한다.

성분 프로파일 분석자료 등 특성분석자료는 제조방법, 분리방법 등 제조공정 변경 시 비교동등성을 입증할 때에도 중요하다.

불순물에 대한 순도 관리도 필요하다. 사용되는 물질 중 잔류물(serum albumin, 항생제 등)에 대하여 잔류물의 제거방법과 잔류물질의 농도에 대한 자료를 제출하여야 한다.

4.4 동물용 세포외소포치료제 품질관리

4.4.1 성장시험

'성장' 시험은 해당 품목의 외형적 특성과 형상이 잘 나타날 수 있도록 기준을 설정하여야 한다. 성장시험은 제품에 대한 기본적인 외형의 적합여부를 시험하는 것으로 육안으로 관찰한다. 주사제

인 경우에는 약물이 충전된 직접용기(바이알, 시린지, 팩 등)를 포함하고 해동해서 사용하는 경우에는 해동 전후의 원료(완제)의약품의 색, 형상 등을 포함하여야 한다.

4.4.2 세포외소포 수

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

세포외소포의 수는 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) 등을 이용하여 측정한다. NTA가 세포외소포와 함께 분리된 유사한 크기의 입자를 구분할 수 없기 때문에 세포외소포 특이적인 마커 또는 단백질량 등의 시험결과와 비교가 필요하다.

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

4.4.3 세포외소포 크기

세포외소포의 크기 분포는 NTA, resistive pulse sensing 등을 이용하여 측정하며, 그 결과를 전자현미경으로 확인한 세포외소포의 크기 결과와 비교하는 것이 필요하다.

4.4.4 마이코플라스마 부정시험

동물세포 유래 세포외소포치료제는 완제품에 세포를 포함하고 있지 않으나 세포로부터 생산, 분리, 정제되는 공정 중 동물 유래 원료·시약 또는 시설·환경에 의해 오염될 수 있다. 세포외소포에 존재하는 마이코플라스마는 수여동물에 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 경우에는 공정서 배양법과의 동등성을 확보하여야 한다.

출발물질 기원이 미생물 유래일 경우 마이코플라스마 부정시험은 필요하지 않으나, 투여 경로에 따라 요구될 수 있다.

4.4.5 외래성바이러스 부정시험

동물세포 유래 세포외소포치료제는 세포를 이용하여 제조하므로 바이러스에 오염될 가능성이 존재하며, 이러한 바이러스는 수여동물의 안전과 직결되므로 제품에서 바이러스 오염이 없음을 입증하는 것은 매우 중요하다.

외래성바이러스 부정시험은 세포외소포를 분리·정제하기 전단계인 마지막 배양이 완료된 시점에서 모은 배양액과 세포를 함께 사용하는 것이 바람직하다. 출발물질 기원이 미생물 유래일 경우 외래성바이러스 부정시험은 필요하지 않다.

4.4.6 무균시험

무균시험은 완제품에서 미생물(세균 및 진균) 오염여부를 확인하는 시험으로 동물용의약품 국가출하승인검정 기준(별표 5 동물용 생물학적제제 일반검정기준) 등 농림축산검역본부장장이 인정

하는 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.

4.4.7 엔도톡신시험

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

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

4.4.8 확인시험

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

일반적인 세포외소포 특이적인 마커는 동물세포 유래 세포외소포의 경우, 세포외소포 표면에 CD9, CD63 또는 CD81 등이, 세포외소포 내부에 TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101), ALIX (ALG-2 interacting protein X)등이 알려져 있다. 미생물 유래 세포외소포의 경우, 특이적으로 알려진 마커는 적기 때문에 세포외소포 농축단백질, RNA 또는 지질의 프로파일 분석이 필요하다. 그러나 세포외소포는 세포의 상태나 제조공정 등에 따라 영향을 받기 때문에 특성분석 결과를 바탕으로 적절한 단백질, RNA 등의 지표를 선정하고 선정된 물질에 대하여 반정량적인 방법으로 확인하는 것이 필요하다.

- (예시) 동물세포 유래 세포외소포를 분리하였을 때 고려해야 할 대표적인 세포외소포 특이적 마커를 기술하였으나, 기원 세포의 종류, 공정 및 특성분석 결과를 반영하여 적절한 지표를 설정하여야 한다.

- 1) 표면 단백질: CD9, CD63, CD81, PTGFRN (Prostaglandin F2 receptor negative regulator), LAMP-1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1), MHC I 또는 MHC II
- 2) 내부 단백질: TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101), ALIX (ALG-2 interacting protein X), HSP70, HSP90, 또는 HSC70

이러한 물질은 분리하고자 하는 세포외소포에 존재할 것으로 기대하는 막단백질과 막에 결합할 수 있는 능력이 있는 세포질 내 단백질, 이중지질막 성분, miRNA 등이다. 생산공정 중 동물 유래 물질이 사용되는 경우, 확인시험에 사용되는 지표물질은 생산공정에서 사용된 동물 유래 물질에서 유래된 것이 아님을 확인하는 것을 고려하여야 한다. 예를 들어, 세포가 추가되지 않은 배양배지에서 동일한 제조공정(동일한 플라스크, 배양배지, 배양조건, 분리 및 정제 등)을 거쳐 획득한

모의 세포외소포를 사용할 수 있다. 분리 및 정제된 세포외소포는 기능적 활성을 지닌 생산공정 사용 물질 유래의 세포외소포, 단백질, RNA 또는 기타 불순물을 포함할 수 있기 때문에 확인 시험에 사용되는 지표물질이 모의 세포외소포에서 검출되지 않는 것이 필요하다.

4.4.9 순도시험

① 세포질 단백질(cytosolic protein) 또는 핵단백질

세포질 단백질과 같이 세포외소포에서 농축되지 않을 것으로 기대되는 단백질(예를 들어 동물세포 유래의 경우, 핵단백질, 미토콘드리아 마커, 골지체 마커, 면역글로불린(IgG), 지질단백질) 몇 종에 대하여 잔존량에 대한 자료를 제출하여야 한다.

• (예시) 동물세포 유래 세포외소포를 분리하였을 때, 고려해야 할 대표적인 기원세포 유래 단백질을 기술하였으나, 이 외에도 다른 기원세포 유래 물질을 추가하여 고려하여야 한다.

1) 핵단백질: Histone family 등

2) 미토콘드리아 마커: Cytochrome C 등

3) 소포체 마커: Calnexin 등

4) 골지체 마커: GM130 (Golgi matrix protein of 130 kDa) 등

5) 지질단백질: ApoB (apolipoprotein B) 등

② 공정 불순물

배양 또는 세포외소포 분리 및 정제 공정에 사용되는 물질(혈청, 항생제, 또는 기타 첨가물 등)의 세포외소포 잔류를 평가하고, 필요한 경우 적절한 기준을 설정하여 관리하여야 한다. 이러한 잔류물은 세포외소포 내부에 포함될 수 있으므로 이를 고려해야 한다.

4.4.10 역가시험

세포외소포에 있는 단백질이나 miRNA와 같은 RNA가 세포외소포치료제의 작용기전을 포함한 여러 생물학적 기능에 영향을 미친다는 연구결과가 제시되고 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 다음 역가시험법으로 사용될 수 있으며, 이러한 방법은 예상되는 세포외소포의 작용기전을 반영해야 한다. 예를 들어 세포외소포가 생체 내에서 면역억제기능을 한다면 생체 외에서 세포외소포의 면역조절특성을 평가하기 위하여 T세포 증식시험을 역가시험으로 설정할 수 있다. 세포외소포를 이용하여 생체 외에서 역가시험을 수행할 때에는 용량에 따른 활성평가가 수행하여야 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.

또한 적절한 대조군을 설정하는 것이 중요하다. 예를 들어 세포가 추가되지 않은 배양배지에서 동일한 제조공정(동일한 플라스크, 배양배지, 배양조건, 분리 및 정제 등)을 거쳐 획득한 모의 세

포외소포를 사용할 수 있다. 분리 및 정제된 세포외소포는 기능적 활성을 지닌 생산공정 사용 물질 유래의 세포외소포, 단백질, RNA 또는 기타 불순물을 포함할 수 있기 때문에, 모의 세포외소포는 세포외소포의 생물학적 기능에 대한 배경(background) 효과에 대한 정보를 제공할 수 있다.

4.4.11 제제학적 시험

‘생물학적제제 등의 품목허가·심사 규정(2021.04, 식약처)’ 및 ‘세포치료제 품질관리 시험항목 설정 가이드라인(2019.12, 식약처)’를 참고하여 동물용 세포외소포치료제 제제의 특성 또는 기능 등을 규정하기 위한 제제학적 시험을 고려할 필요가 있다. 예를 들어, 주사제의 경우 불용성미립자시험, 불용성이물시험, 또는 실용량시험 등을 고려하여야 한다.

4.5 동물용 세포외소포치료제 안정성

원료 및 완제의약품에 해당하는 세포외소포치료제는 저장(보관)조건에서 품질의 안정성을 평가하기 위하여 『동물용의약품등 안정성 시험지침』(검역본부 고시) 중 장기보존 시험기준에 따라 안정성시험을 수행하여야 한다.

세포외소포치료제의 특성상 일반적 안정성 시험지침을 적용하는 것이 어려울 수 있으므로 각 제품의 특성을 고려하여 타당한 시험방법으로 실시할 수 있다.

동결보관 및 해동을 할 경우에는 동결 및 해동 조작에 의한 제품의 안정성이나 규격에 미치는 영향이 없는지를 확인하여야 한다.

고려사항 : 세포외소포치료제의 지정된 용기가 해당하는 세포외소포치료제의 빛 안전성, 열변성 등에 일정기간동안 안정한지 확인하여야 한다.

5. 동물용 세포외소포치료제 비임상 고려사항

세포외소포의 다양한 출발물질, 종 특이성, 면역원성 및 그 밖에 예측하지 못하는 생물학적 성질 때문에 통상적인 일반의약품 대상 독성시험법이 적절하지 않은 경우가 일부 있을 수 있으나, 비임상평가 항목은 일반의약품의 비임상평가 항목과 원칙적으로 동일하다. 비임상평가의 목적은 의약품의 약리작용 및 독성작용을 밝히는 것이며, 다음의 항목에 대해 고려하여야 한다: 1) 적절한 동물 종의 선택, 2) 투여방법, 3) 투여량, 4) 투여경로, 5) 투여일정, 6) 시험물질의 안정성 등

세포외소포 투여가 효력, 분포, 일반독성, 면역원성, 면역독성, 안전성약리 또는 종양원성 등에 미치는 영향을 평가하여야 하며, 농림축산검역본부에서 지정한 비임상시험 실시기관에서 수행하여야 한다.

5.1 약리작용에 관한 자료

5.1.1 효력시험

세포외소포치료제의 작용기전을 확인하기 위해 시험관 내(in vitro) 또는 생체 내(in vivo) 효력시험이 수행되어야 한다. 작용기전 설명 등의 약리 작용을 평가하기 위한 생체 내 시험은 임상시험에서 치료제의 이용 근거를 제공하기 위해 종종 사용된다. 생체 내 효력시험 시 사용목적에 적절한 동물종(목적동물종 혹은 질환동물모델 포함)에서 용량증량연구가 수행되어야 하며, 독성시험을 병행할 수도 있다.

5.1.2 약동학/흡수·분포·대사·배설시험(PK/ADME study)

5.1.2.1 일반 사항

기존 의약품과는 달리 출발물질 의존적으로 세포외소포의 물리화학적/생물학적 특성이 변화할 수 있기 때문에 생체 내 약동학적 결과에 영향을 미칠 수 있다. 또한 분석법 개발과 이종 간 면역원성 반응 등 동물용 세포외소포치료제로서의 다양한 고려사항이 있기 때문에 약동학 시험을 수행할 때 충분한 고려가 필요하다.

세포외소포의 생체 내 분포는 치료적 유효성과 함께 비표적부위의 독성에도 영향을 미칠 수 있다. 따라서 조직분포, 혈중 농도 등을 포함한 생체 내에서 분포와 세포외소포의 자세한 생체 내 운명과 약동학적 특성에 대해 자세히 이해하는 것이 향후 치료적 적용에 매우 중요하다.

생체 내 존재하는 세포외소포를 정량 분석하기 위해서 표면 마커(surface marker)와 고유한 내부물질에 대한 분석법 개발이 선행되어야 하며, 밸리데이션을 통해 전임상시험 및 임상시험 샘플 분석 방법의 적정성을 확인하여야 한다. 이를 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성 등 적절한 민감도를 가지며, 재현성있는 결과를 도출함을 보여줄 수 있는 자료를 확보하여야 한다. 또한 투여된 세포외소포의 반감기와 분해에 대한 시험이 필요할 수 있다. 모든 동물모델에 대해서는 결과 해석에 있어서 과학적인 해석이 가능하도록 그룹 간 실험 수가 충분하여야 하고 적절한 대조군이 반드시 포함되어야 한다.

투여된 세포외소포치료제는 전신으로 흡수될 경우, 간, 신장, 비장과 같은 세망내피계(Reticuloendothelial system, RES)에 축적되기 때문에 장기의 표적화 및 반감기에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다. 최근 세포외소포 표면에 특정 단백질 또는 펩타이드(peptide)를 발현하는 유전적 변형을 통하여 이와 같은 단점을 극복하려는 기술이 개발되고 있으므로 체 내 약동학적 특성에 미치는 영향을 면밀히 관찰하여야 한다. 대사과정은 주로 지방, 지방산, 아미노산 등으로 분해될 것으로 예상되기 때문에 일반적인 대사과정은 잘 알려져 있다. 그러므로 화학의약품에 적용되는 일반적인 대사체 분석은 필요하지 않다.

고려사항 : 세포외소포의 약동학 및 흡수, 분포, 대사, 배설 시험시 일반적으로 고려해야 할 사항을 기술 하였음. 세포외소포치료제는 정량분석이 어렵기 때문에 체내 노출도를 확인할 수 있는 약동학 시험이 매우 중요하며 RES에 많이 축적됨. 유전적으로 변형된 세포외소포의 기술이 많이 개발되고 있고 흡수를 포함하여 체내 분포에 많은 영향을 미칠 것으로 예상되기 때문에 이에 대해 고려가 필요함.

5.1.2.2 분석 방법

대부분의 세포외소포의 생체분포연구는 염색시약이나 유전자조작(예, GFP 또는 luciferase 발현), 방사선 동위원소로 표지 또는 나노입자로 표지된 세포외소포를 검출하는 영상기법을 이용하여 관찰할 수 있다. 그러나 이러한 방법들은 민감도가 낮고 정량 분석이 어렵다는 단점이 있다.

따라서 세포외소포의 분포를 확인하기 위하여 형광 염색과 세포외소포 유래 RNA 또는 단백질을 정량적으로 확인하는 시험(예, qPCR 또는 ELISA)을 병행할 수 있으나, 세포외소포 유래 RNA 또는 단백질의 생체 내 분포를 정량적으로 평가하는 방법들 또한 현재의 기술로는 민감도가 낮고 정량 분석하는데 어려움이 있으므로 이를 고려해야 한다.

5.1.2.2.1 형광 표지(Fluorescent labeling)

형광 표지법은 세포외소포로부터 형광 염료가 유리될 수 있어 생체 내 분석에 약점을 가지고 있으나, 조직으로 분포되는 세포외소포를 확인하는데 여전히 일반적으로 많이 사용되고 있는 방법이다. 세포외소포의 생체 내 추적에 흔히 쓰이는 PKH67은 저분자 친유성 형광물질이다. 또한 DiD, DiR과 같은 근적외선 흡수성 친유성 형광염색시약은 세포외소포의 막 지질층에 삽입된다.

이러한 형광염색은 질환동물모델에서 세포외소포의 분포를 확인함으로써 치료제로서의 유효성을 밝히는데 사용될 수 있다. 하지만 이러한 염색시약의 가장 큰 문제는 염색시약의 생체 내 반감기가 5일에서 100일 이상으로 길다는 점이다. 염색시약으로 염색된 세포외소포가 분해된 후에도 염색시약은 남아서 반감기 등 세포외소포의 분포와 관련하여 정확하지 않은 정보를 줄 수 있기 때문이다. 또한 이러한 막 염색은 알데히드 매개 고정이나 지질 추출 후에 사라지기 때문에 면역염색(immunocytochemistry/immunohistochemistry)을 통한 분석에 제한이 있다. 표지나 유전적 변형이 세포외소포의 기능에 영향을 미치지 않음을 증명하는 자료가 추가로 요구될 수 있으며, 응집된 염료에 의해서 형광이 억제되는 것도 주의해서 확인하여야 한다.

종합적으로 염색 기반 시스템은 염색된 세포외소포가 아닌 염색시약 자체가 투여될 가능성이 있으며, 투여된 염색시약은 혈청 단백질, 순환하는 세포, 혈관 등에 결합할 수 있기 때문에 결과 해석에 어려움을 야기할 수 있다. 따라서 결합하지 않은 염색시약이 제거되었음을 보여주는 시험들이 수행되어야 한다.

5.1.2.2.2 발광 표지(Luminescent labeling)

발광표지를 하면 형광 표지보다 상대적으로 높은 민감도를 가지며, 시간에 따른 세포외소포의 분포양상을 분석할 수 있다. 일반적으로 Gaussia luciferase (gLuc)과 lactadherin(LA)의 결합 단백질을 발광 표지자로 많이 사용하지만, 심부장기에서는 신호가 감소되는 단점이 있다. 발광표지에 사용되는 단백질은 유전자 조작의 방법을 사용한다. 이 과정에서 세포와 세포외소포의 변형을 유발할 수 있으며, 세포외소포에 일정하게 삽입되지 않아 약동학적 성질에 영향을 줄 수 있기 때문에 결과 해석에 주의가 필요하다.

5.1.2.2.3 방사성동위원소 표지(Radiolabeling)

고가의 장비를 사용하여야 하며, 처리과정에서 위험성이 있다는 단점을 제외하면 방사성 동위원소 표지자는 형광표지자와 발광표지자에 비해 높은 민감도와 안정성을 가지고 있으므로 세포외소포치료제의 생체 내 심부 장기의 정량분석에 적합한 방법이다.

SAV-LA(streptavidin-lactadherin)와 ¹²⁵I-labeled biotin 유도체를 사용할 수 있으며, 최근에는 ^{99m}Tc와 ¹¹¹In을 사용하여 생체 내 분포에 활용하고 있다. 또한 ¹⁴C과 같은 반감기가 긴 방사성 동위원소를 이용한 mass balance study 등 추가적인 방법을 고려할 수 있다.

고려사항: 세포외소포 관련 최신 논문을 리뷰하여 총 3개의 분석방법을 정리하고 가이드라인에 반영하였음. 가장 많이 사용되는 형광 표지를 포함하여 발광 표지, 방사성동위원소 표지 등 여러 가지 방법이 있으나 아직까지 표준화된 방법은 없고 정량화가 어렵다는 단점이 있어 이에 대한 보완이 필요할 것으로 사료됨

5.1.3 일반약리시험

세포외소포가 체 내에 투여되면 대상동물에서 안전과 관련이 있을 수 있는 바람직하지 않은 생리학 특성(심혈관계, 호흡기계, 중추신경계 등)을 나타낼 수 있다. 이와 같은 약력학적 지표는 개별 시험에서 수행되거나 독성시험 설계 시 포함할 수 있다. 일부 세포외소포의 경우, 혈액뇌장벽(Blood-Brain Barrier, BBB)을 통과할 수 있는 것으로 확인되어 신경계에 미치는 영향에 대한 면밀한 분석이 필요할 수 있다. 그러므로 일반독성시험에서 관련된 독성이 관찰되거나 분포시험을 통해 BBB를 통과하여 중추신경계에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되는 경우는 독립적인 안전성 약리시험을 수행하여야 한다.

고려사항 : 최신의 논문을 참고하여 유전적 변형을 거친 세포외소포는 신경계에 영향을 미칠 수 있음을 고려하여 이를 가이드라인에 반영함

5.2 독성에 관한 자료

원칙적으로 「동물용의약품등의 독성시험지침(검역본부 고시)」와 「동물용 세포치료제 안전성 평가 가이드라인(검역본부 가이드라인)」에 따라 의약품 관련 규정과 제품의 특성 및 임상디자인을 고려하여 실시한다. 세포외세포치료제의 독성시험을 위해서는 사용목적에 적절한 동물종에서 용량증량연구가 수행되어야 한다. 시험결과 면역계의 이상이 의심될 경우, 면역독성시험이 수행되어야 한다. 또한 일반 동물용의약품과는 달리 약리작용 시험과 독성시험을 병합하여 실시하는 것도 고려될 수 있다.

5.2.1 급성/아급성/만성 독성시험

동물용 세포외세포치료제의 특성을 고려하여 시험동물(설치류 등) 1종 이상에 대해 급성, 아급성 또는 만성 독성시험을 실시한다. 이 경우 대상동물 또는 적절한 질환동물 모델을 이용하여 실시할 수도 있다. 다만 질환동물모델 사용은 대상동물로 시험할 경우보다 비교우위에 있는 경우로 제한한다(대상 동물에서는 약리학적 활성이 없거나, 질환동물모델에서의 약리학적 활성과 현저한 차이를 보이는 경우 등). 또한 대상동물이 아닌 다른종에서 일반독성시험을 수행하는 경우, 해당 동물종을 선정한 것에 대한 근거를 제시해야 하며, 약리학적 활성이 없는 동물종에서의 독성시험은 농림축산 검역본부와 사전에 논의 후에 수행되어야 한다. 시험방법(투여경로, 용량단계, 투여횟수 및 관찰기간 등)은 동물용 세포외세포치료제의 임상적용 방법 및 체내 분포·동태 등을 종합적으로 고려하여 설정하며, 평가항목은 독성, 면역원성 등 부작용을 예측할 수 있도록 설정한다. 구체적인 시험방법은 동물용의약품등의 독성시험지침 중 관련 시험방법에 준하여 실시하여야 하나 대상동물의 안전성 시험방법을 준용할 수도 있다.

5.2.2 생식독성 시험

동물용 세포외세포치료제를 이용한 급성, 아급성 또는 만성 독성시험에서 세포외세포가 생식선 및 생식기관에 분포하거나 생식기계 이상이 확인되는 경우, 생식독성 시험을 실시하여야 한다. 구체적인 시험방법은 동물용의약품등의 독성시험지침 중 관련 시험방법에 준하여 실시한다.

5.2.3 변이원성 시험

세포외세포치료제는 제품의 특성상 일반 동물용의약품의 변이원성 시험을 실시하는 것이 무의미하지만, DNA 또는 염색체에 직접 작용 가능성이 있는 경우 동물용의약품등의 독성시험지침 중 관련 시험방법에 준하여 변이원성 시험을 실시하여야 한다.

5.2.4 면역계이상 시험

일반독성시험 결과 세포외세포치료제가 면역계 이상(혈액학적 수치, 면역글로불린, 면역계통 장기 중량 등)을 일으킬 가능성이 있는 경우, 면역독성시험을 실시하여야 한다. 구체적인 시험방법은 동물용의약품등의 독성시험지침 중 관련 시험방법에 준하여 실시한다. 이 시험의 경우에 적절한 동물 모델이 없는 경우, 시험관 내 또는 생체 외 시험을 고려할 수 있으며, 최종적으로는 대상동물에 대한 안전성 시험의 평가항목에 포함시켜 실시하는 것이 필요하다.

5.2.5 암원성 시험

세포외세포는 세포가 없으므로 일반적으로 암원성이 요구되지는 않는다. 그러나 불멸화된 세포 또는 외래유전자가 도입된 세포의 경우에는 발암유전자의 단백질이나 유전물질이 세포외세포에 포함될 가능성이 있어 기원 세포의 종류 및 도입유전자에 따라 암원성 시험이 필요할 수도 있다(동물용 세포치료제 안전성 평가 가이드라인의 별표 2 참조). 또한 반복투여독성시험결과 암원성

이 의심되거나 임상적으로 장기간 사용된다면 압원성시험이 필요하다. 이 경우, 면역결핍 동물 또는 이와 동등하다고 판단되는 조건 등의 적절한 동물을 이용하여 중앙형성 여부를 충분히 관찰할 수 있는 기간으로 압원성 시험을 실시하여야 한다.

5.2.6 기타독성시험

5.2.6.1 면역원성시험

동물용 세포외소포치료제의 경우, 기원 세포의 공여동물의 동물종과 목적동물의 동물종이 상이하거나 특수한 면역환경의 공여동물에게서 제조한 세포외소포의 경우, 이러한 차이에 따른 면역반응을 예측할 수 없기에 면역원성 시험이 필요할 수 있다. 또한 목적동물과 동종의 공여동물에서 생산된 세포외소포라 할지라도 면역원성 반응이 일어날 가능성이 있기 때문에, 다른 독성시험의 결과를 고려하여 면역원성 시험의 진행 여부를 판단하여야 한다. 그리고 표적 장기의 설정 및 약물 반감기 증가와 같은 특정 목적을 위해 유전자 조작된 세포에서 세포외소포를 생산한다면 이에 따른 면역원성에 대한 영향 등이 고려되어야 한다.

목적동물과 동종의 동물에서 면역원성 평가를 수행하는 것을 우선적으로 고려하여야 한다. 불가피하게 이종의 동물에서 수행한 결과는 해석할 때에만 이용될 뿐, 면역원성을 예측할 경우에는 주의 기울여야 한다.

5.2.6.2 국소독성 시험(또는 국소내성 시험)

세포외소포치료제 투여에 의한 주사부위의 임상 및 조직병리학적 평가를 실시한다. 이 경우 급성/아급성/만성 독성시험의 평가항목으로 포함하여 실시할 수 있다.

5.2.6.3 특수독성 시험

일반독성시험에서 확인된 독성에 따라 세포외소포치료제의 특성을 고려하여 필요하다고 인정되는 추가적인 독성시험을 실시한다. 예를 들어, 혈액뇌장벽을 통과할 수 있는 것으로 확인된 일부 세포외소포의 경우 신경독성이 필요할 수 있다.

고려사항 : 독성시험의 경우 동물용의약품등 독성시험지침과 세포치료제의 독성평가 가이드라인을 준용하였으며, 세포외소포의 특성에 맞는 내용을 전문가회의를 거쳐 추가 작성하였음. 2019년 새로 제정된 규정에 따라 동물용 의약품 시험실시기관에서 시험해야 함을 추가로 작성함.

6. 동물용 세포외소포치료제 임상 고려사항

세포치료제와 달리 세포가 배제되어 있는 형태이므로 기존의 동물용의약품 임상시험과 동일한 기준과 방법이 적용 가능하다. 원칙적으로 「동물용의약품등의 임상시험 관리지침(검역본부 고시)」에 따라 대상동물 또는 불가피한 경우, 적절한 질환동물 모델(효능 적합성/면역 적합성 등 고려)을 이용하여 농림축산검역본부에서 지정한 임상시험실시기관에서 시험을 실시한다. 이러한 경우, 세포외소포치료제의 유효성 확인 및 안전성을 평가하는 것이 가능한 결과를 얻기 위해 타당성이 인정된 임상시험계획서에 따라 실시하는 것이 권장된다.

대상동물을 이용하여 안전성시험을 실시하는 경우는 각 제품의 특성 및 동물약품국제기술조정위원회(Veterinary International Conference on Harmonization, VICH)의 생물학적제제를 제외한 동물용의약품의 대상동물 안전성시험 가이드라인(VICH GL43)을 고려하여 적절한 시험계획과 평가항목을 설정하여야 하며, 표준시험방법은 아래 방법을 참조하며 개별 세포외소포치료제의 특성에 맞게 추가적인 고려사항이 필요하다.

고려사항 : 동물용 세포외소포치료제의 임상시험가이드라인은 기존 동물용의약품 임상시험과 동일하게 적용 가능함을 명시함. 다만 2019년 신규 제정된 동물용의약품 임상시험실시기관에서 시

협을 실시해야 함을 기술하였고, 동물약품국제기술조정위원회(VICH)의 가이드라인을 고려하여 시험 디자인을 설정하고 진행해야 함을 강조함. 또한 가이드라인에 추가로 작성한 부분은 다양한 세포외소포치료제의 특성에 맞는 추가적인 사항들을 기술하였음.

▪ **인체용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인과 비교하여 `동물용` 맞춤형 가이드라인 항목별 제시**

| 대분류 | 소분류 | 인체용 가이드라인 | 동물용 가이드라인 |
|------------|--------------------------|---|--|
| 품질 고려사항 | 출발물질 특성분석 | - 다양한 공여자는 기능적으로 다른 특성을 갖는 세포외소포를 생산할 수 있기 때문에 공여자에 따른 차이를 고려하여 그 차이를 최소화 함 - 공여자의 적합성 기준 「세포치료제 공여자 적합성 평가 가이드라인」을 적용함 | - 동물용 세포외소포치료제의 제조와 관련하여 그 기원이 되는 세포의 생산 및 품질관리를 통해 우선적으로 안전성을 확보하여야 함. - 따라서, 「동물용 의약품 등 안전성 유효성 심사에 관한 규정」 중 세포치료제 관련 조항에 따라 다음의 사항을 입증 |
| | 제조방법, 분리, 정제, 특성분석 | - 배양조건 표준화, 배치간 재현성 입증 - 세포밀도, 계대횟수, 배가시간 (doubling time), 산소 농도, pH, 배양 조건(배지 조성, 사이토카인, 배양용기 등), 배지의 FBS 포함 유무 확인 - 세포외소포 생산에 사용되는 모든 시약에 대한 기원을 서술 - 분리 및 정제를 위해서는 한외여과 (ultrafiltration), 초원심분리, 침전, 크로마토그래피 등을 사용하거나 두 가지 이상의 방법을 조합하여 사용(표준화 및 재현성 입증) - 단백질, RNA, 지질의 조성 및 양에 대한 프로파일 분석이 필요 - 전자현미경(Cryoelectron microscope, CryoEM) 등으로 이중지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석 필요 - 불순물에 대한 특성분석도 필요 | - 채취 과정은 전문적인 교육을 받은 인력 혹은 수의사, 동물보건사가 적절한 시설(동물병원 등)에서 수행-개와 고양에서 스크리닝시 고려해야 할 대표적인 바이러스, 세균, 진균 및 다른 외인성 감염에 의한 질환을 추가하여 고려 |
| | 품질관리 | 성상시험, 세포외소포수, 세포외소포 크기, 마이코플라스마 부정시험, 외래성 바이러스 부정시험, 무균시험, 엔도톡신시험, 확인시험, 순도시험, 역가 시험을 수행 | - 항체가 제한적으로 가용한 상황으로 이와 같은 경우 인체 항원에 대한 종 특이적 항체의 종교차반응(cross species reaction)을 활용하여 품질관리 항목 설정이 가능한지 확인하는 대안을 고려할 수 있음.-(확인시험) 세포외소포 특이적인 마커는 동물 세포 유래 세포외소포의 경우, 세포외소포 표면에 CD9, CD63 또는 CD81 등이, 세포외소포 내부에 TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101), ALIX (ALG-2 interacting protein X) 등 확 |

| | | | |
|-----------------|------------------|--|---|
| | | | 인함-(순도시험) 동물세포 유래 세포 외소포를 분리하였을 때, 고려해야 할 대표적인 기원세포유래 단백질을 기술하였으나, 이 외에도 다른 기원세포 유래 물질을 추가하여 고려-(제제학적시험) ‘생물학적제제 등의 품목허가·심사 규정(2021.04, 식약처)’ 및 ‘세포치료제 품질관리 시험항목설정 가이드라인(2019.12, 식약처)’를 참고하여 동물용 세포외소포치료제 제제의 특성 또는 기능 등을 규정하기 위한 제제학적시험을 고려할 필요가 있음 |
| | 안정성 | 세포외소포치료제의 저장조건(온도, 기간)에서 품질의 안정성을 평가하기 위하여 『의약품등의안정성시험기준』(식약처고시)에 따라 안정성시험을 수행함 | 세포외소포치료제는 저장(보관)조건에서 품질의 안정성을 평가하기 위하여 『동물용의약품등 안정성 시험지침』(검역본부고시) 중 장기보존시험 기준에 따라 안정성시험을 수행함 -특성상 일반적 안정성 시험지침을 적용하는 것이 어려울 수 있으므로 각 제품의 특성을 고려하여 타당한 시험 방법으로 실시-동결보관및 해동을 할 경우에는 동결 및 해동 조작에 의한 제품의 안정성이나 규격에 미치는 영향이 없는지를 확인 |
| 비임상 고려사항 | 약리작용 | - (효력시험) 적절한 동물종에서용량증량연구가 수행, 독성시험 병행가능 - (ADME시험) 생체내 분포는 치료적 유효성과 함께 비표적부위의 독성에도 영향을 미침. 조직분포, 혈중 농도 등을 포함한 생체내에서의 분포와 세포외소포의 자세한 생체내 운명과 약동학적 특성에 대해 확인이 필요함 - (안전성약리시험) 원칙적으로 수행하여야 하나, 독성시험과병행하여 시험 가능함 | - (효력시험) 시험관 내(in vitro) 또는 생체 내(in vivo) 효력시험이수행되어야 함-분석방법을 좀더 구체적으로 기술 |
| | 독성에 관한 자료 | - (단회/반복 독성시험) 적절한 동물종으로용량증량연구를 수행하며 면역독성 필요할 수 있음 - (중양원성시험) 일반적으로 요구되지 않으나 반복투여독성시험결과발암성이 의심되거나 임상투여기간이 길다면 필요할 수 있음 - (면역원성시험) 면역원성시험은 필요함 - (단회/반복 독성시험) 적절한 동물종으로용량증량연구를 수행하며 면역독성필요할 수 있음 | 원칙적으로 「동물용의약품등의 독성 시험지침(검역본부고시)」와 「동물용 세포치료제 안전성 평가 가이드라인(검역본부가이드라인)」에 따라 의약품 관련 규정과 제품의 특성 및 임상디자인을 고려하여 실시 (급성/아급성/만성 독성시험) 1종 이상에 대해 급성, 아급성또는 만성 독성시험을실시 (생식독성시험) 급성, 아급성또는 만성 독성시험에서 세포외소포가 생식 |

| | | | |
|---|---|---|--|
| | | <ul style="list-style-type: none"> - (중양원성시험) 일반적으로 요구되지 않으나 반복투여독성시험결과발암성이 의심되거나 임상투여기간이 길다면 필요할 수 있음 - (면역원성시험) 면역원성시험은 필요함 | <p>선 및 생식기관에 분포하거나 생식기계 이상이 확인되는 경우, 생식독성시험을 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> - (변이원성시험) 제품의 특성상 일반 동물용의약품의 변이원성시험을 실시하는 것이 무의미하지만, DNA 또는 염색체에 직접 작용 가능성이 있는 경우 동물용의약품등의 독성시험지침 중 관련 시험방법에 준하여 변이원성시험을 실시 - (면역계이상시험) 면역계이상(혈액학적 수치, 면역글로불린, 면역계통장기 중량 등)을 일으킬 가능성이 있는 경우, 면역독성시험을 실시 - (암원성시험) 세포외세포는 세포가 없으므로 일반적으로 암원성이 요구되는 않음 - (면역원성시험) 기원 세포의 공여동물의동물종과목적동물의동물종이 상이하거나 특수한 면역환경의공여동물에게서제조한 세포외세포의 경우, 이러한 차이에 따른 면역반응을 예측할 수 없기에 면역원성시험이 필요 - (국소독성시험(또는 국소내성시험) 투여에 의한 주사부위의임상 및 조직병리학적 평가를 실시 - (특수독성시험)일반독성시험에서 확인된 독성에 따라 세포외세포치료제의 특성을 고려하여 필요하다고 인정되는 추가적인 독성시험을 실시 |
| <p style="text-align: center;">임상 고려사항</p> | - | <ul style="list-style-type: none"> - 세포치료제와 달리 세포가 배제되어 있는 형태이므로 기존의 의약품 임상시험과 동일한 기준과 방법이 적용 가능 | <ul style="list-style-type: none"> - 기존의 동물용의약품 임상시험과 동일한 기준과 방법이 적용 가능. 원칙적으로 「동물용의약품등의임상시험 관리지침(검역본부고시)」에 따라 대상동물또는 불가피한 경우, 적절한 질환동물모델(효능 적합성/면역 적합성 등 고려)을 이용하여 농림축산검역본부에서 지정한 임상시험실시기관에서 시험을 실시 - 대상동물에대한 안전성시험방법 기술 |

(2) 정량적 연구개발성과

- 주관기관 한국건설생활환경시험연구원

(1) 개 유래 줄기세포 엑소좀의 아토피 효력시험

- 본 과제의 진행을 위해 확립된 개 유래 중간엽줄기세포 배양액에서 엑소좀을 협동기관 2((주)엑소코바이오)로부터 제공받아 아토피 피부염 유효성 평가시험을 진행하였으며 대한면역학회에 포스터 발표 1 회 함.

(2) 개 유래 줄기세포 엑소좀의 독성시험

- 본 과제의 진행을 위해 확립된 개 유래 중간엽줄기세포 배양액에서 엑소좀을 협동기관 2((주)엑소코바이오)로부터 제공받아 단회투여 독성시험 및 4주 반복투여 독성시험을 진행하여 GLP 준하는 보고서 2 회 작성함.

- 협동기관 1 (주)노터스

(1) 개 유래 줄기세포 제공

- 본 과제의 진행을 위해 확립된 개 유래 중간엽줄기세포를 1년차 3회, 2년차 3회 총 6 회 협동기관 2((주)엑소코바이오)에 공급하였고, 각 회차당 1×10^{11} 이상의 세포를 제공하였음.

(2) 확립된 줄기세포 방법 공개

- 본 과제의 진행을 위해 확립된 개 유래 중간엽줄기세포의 분리 방법을 학술 발표를 위해 정리하여 Korean Society for Molecular and Cellular Biology 에 포스터 발표 1 회 함.

- 협동기관 2 (주)엑소코바이오

(1) 개 유래 줄기세포 엑소좀의 제공

- (1차년도) 엑소좀의 아토피 피부염 유효성 시험을 위해 협동기관 1((주)노터스)로부터 제공 받은 개 유래 중간엽줄기세포 배양액에서 엑소좀을 분리하여 6.94×10^{11} particles을 주관기관(한국건설생활환경시험연구원)에 제공하였음.
- (2차년도) 엑소좀의 안정성 시험을 위해 (주)노터스로부터 제공받은 개 유래 중간엽줄기세포 배양액에서 엑소좀을 분리하여 4.64×10^{12} particles을 주관기관(한국건설생활환경시험연구원)에 제공하였음.

(2) 개 유래 줄기세포 엑소좀의 연구 결과 발표

- 본 과제의 진행과정 중 개 유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 특성 분석 및 아토피 피부염 유효성 결과를 정리하여 International Journal of Molecular Sciences 지에 투고 함. 현재 리뷰 중

- 모든 기관(한국건설생활환경시험연구원, (주)노터스, (주)엑소코바이오)

동물용 세포외소포치료제 가이드라인 제시

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재(리뷰중)

| 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | SCIE 여부 (SCIE/비SCIE) | 게재일 |
|---|-------------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|
| Canine mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate atopic dermatitis | International Journal of Stem Cells | 하대현, 김성배, 김진형 | SCIE | Under review |

Article type: Original article

Canine mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate atopic dermatitis

Hyungtaek Jeon^{1,†}, Sung-Bae Kim^{2,†}, CHANGFAN JIN^{3,†}, Kyung Seuk Song², Jin Hyoung Kim³, Byong Seung Cho^{1,*}, Sokho Kim^{3,*}, and Jae Won Lee^{2,*}

¹ ExoCoBio Exosome Institute (EEI), ExoCoBio Inc., Seoul, 08594, Republic of Korea; (H.T.J.);

² Korea Conformity Laboratories, Incheon, 21999, Republic of Korea; (S.B.K.); (K.S.S.);

³ KNOTUS Co., Ltd., Research Center, Incheon, 22014, Republic of Korea; (J.H.K.); (C.F.J.)

⁴ Department of Veterinary Medical Imaging, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea; (C.F.J.)

Keywords: canine atopic dermatitis, extracellular vesicles, mesenchymal stem cells, adipose tissue

Abstract

Background and Objectives: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease that is associated with systemic inflammation and immune modulation. Previously, we showed that extracellular vesicles derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASC-EVs) attenuated AD-like symptoms by reducing the levels of multiple inflammatory cytokines. Here, we aimed to investigate the improvement of canine AD upon using canine ASC-exosomes on a biostir-induced AD model.

Methods and Results: First, we isolated canine ASCs (cASCs) from the adipose tissue of canine and characterized the cASCs-EVs. Interestingly, we found that cASC-EVs improved AD-like dermatitis and markedly decreased the levels of serum IgE, ear thickness, inflammatory cytokines, and chemokines, such as IL-4 and IFN- γ , in a dose-dependent manner. In addition, we analyzed miRNA arrays from cASC-EVs by next-generation sequencing (NGS) to investigate the role of miRNAs in improving inflammatory responses.

Conclusions: Collectively, our results suggest that cASC-EVs effectively attenuate AD by carrying anti-inflammatory miRNAs to atopic lesions, resulting in a promising cell-free therapeutic option for treating canine AD.

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

| 번호 | 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|----|--------------------|-----|---------------|-----------------|------|
| 1 | 대한면역학회 | 이재원 | 2020년 11월 11일 | virtual meeting | 대한민국 |
| 2 | 한국분자세포생물학회 국제학회 | 김석호 | 2021년 11월 05일 | 제주 ICC | 대한민국 |

- 주관연구기관(한국건설생활환경시험연구원)

초록

포스터

Poster Presentation

Allergy, Hypersensitivity and Autoimmunity

EP-005

Exosomes derived from canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells attenuate atopic dermatitis in mouse model

SungBae Kim¹, SoMin Lee¹, HyeonYeol Ryu¹, KyungSeuk Song¹, SangChul Kim¹, Dae Hyun Ha² and Yong Weon Yi², Sokho Kim³, JaeWon Lee^{1*}

¹Bio Division, Korea Conformity Laboratories (KCL), Incheon, 21999, Korea, ²ExoCoBio Exosome Institute (EEI), ExoCoBio Inc., STE 306, 19 Gasan digital 1-ro, Geumcheon-gu, Seoul 08594, Republic of Korea, ³Knotus Co. Ltd., Incheon 22014, Korea

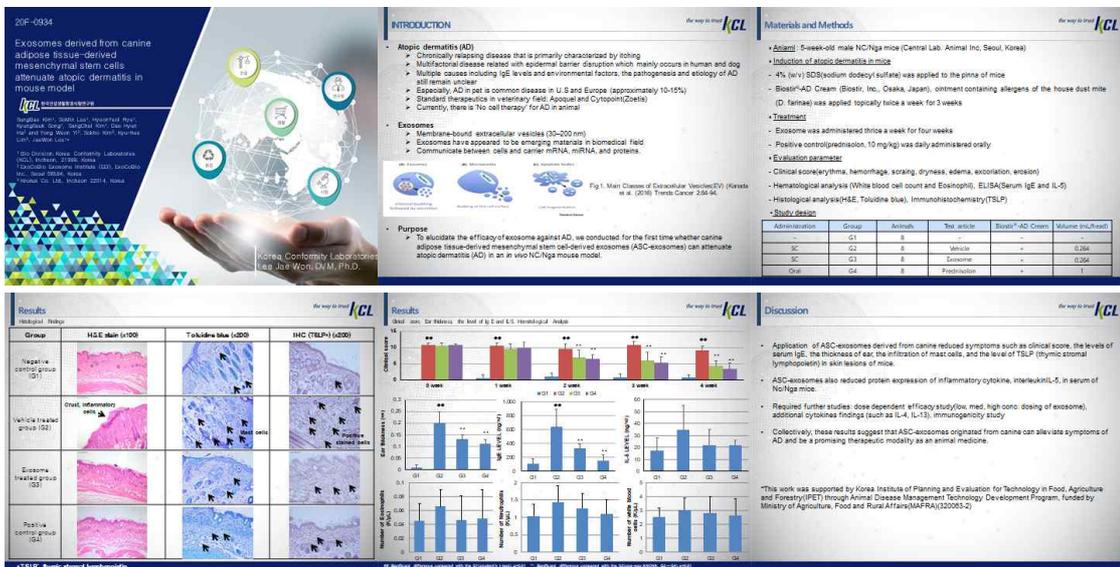
Atopic dermatitis (AD) is a chronically relapsing disease that is primarily characterized by itching. This is a multifactorial disease related with epidermal barrier disruption which mainly occurs in infancy and childhood. Although AD is usually associated with multiple causes including IgE levels and environmental factors, the pathogenesis and etiology of AD still remain unclear. Exosomes are membrane-bound extracellular vesicles (30-200 nm) released by almost eukaryotic cells. Currently, exosomes have appeared to be emerging and appealing materials to treat a variety of diseases in biomedical field, because they can communicate between cells and carrier mRNA, miRNA, and proteins. To elucidate the efficacy of exosome against AD mouse model, we conducted for the first time whether canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes (ASC-exosomes) can attenuate atopic dermatitis (AD) in an *in vivo* NC/Nga mouse model. When applied subcutaneously (SC) into NC/Nga mice treated with house dust mite antigens (Joongang Experimental Animal Co.) repeatedly, it was demonstrated that ASC-exosomes were able to reduce symptoms such as clinical score, the levels of serum IgE, the thickness of ear, the infiltration of mast cells, and the level of TSLP (thymic stromal lymphopoietin) and CD86+ cells in skin lesions. ASC-exosomes also significantly reduced protein expression of various inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13 in serum of Nc/Nga mice. Collectively, these results suggest that ASC-exosomes originated from canine can alleviate symptoms of AD and be a promising therapeutic modality as an animal medicine.

Keywords: Exosome, Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, Atopic dermatitis, Canine, Inflammation

***This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (320063-2).**

초록

포스터



- 협동기관 1 (주식회사 노트스)

| | |
|------------|---|
| <p>초록</p> | <p>Animal stem cells for therapeutic purposes have received a lot of attention in parallel with human stem cell research recently. Adipose tissue may represent a potential source of adult stem cells for tissue engineering applications in veterinary medicine. Adipose tissue can be obtained in large quantities, under local anesthesia, and with minimal discomfort. In this study, we perform establishment of canine adipose-derived stem cells (cASCs) from subcutaneous adipose tissue of healthy beagle. These cASCs can be maintained in vitro for extended periods with stable population doubling and low levels of senescence under hygiene condition. We confirmed our cASCs have potential to differentiate in vitro into adipogenic, chondrogenic, myogenic, and osteogenic cells in the presence of lineage-specific induction factors via real time RT-PCR and specific stain of cells. Here, we described protocol of cASCs preparation method from subcutaneous adipose tissue of beagle and suggested verifying method of cASCs. According to this study, we will develop therapeutic agent using these cASCs.</p> |
| <p>포스터</p> | <p>KNOTUS Isolation and characterization of canine adipose-derived stem cells Kyu-Han Lim^{1,2}, Byou-Kang¹, An-Hyung Kim¹, Dae-Hyun Ha¹, Sung-Ha Kim¹, Joo-Won Lee¹, Hyung-Seung Cho¹, Chul-Oun Kim¹, and Seokho Kim^{1*}</p> <p>¹KNOTUS Co., Ltd. Research Center, Taejeon, Jeoncheong, Gyeonggi-do, South Korea; ²Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul, South Korea; *Corresponding author: skim@knotus.com</p> <p>Abstract: Animal stem cells for therapeutic purposes have received a lot of attention in parallel with human stem cell research recently. Adipose tissue may represent a potential source of adult stem cells for tissue engineering applications in veterinary medicine. Adipose tissue can be obtained in large quantities, under local anesthesia, and with minimal discomfort. In this study, we perform establishment of canine adipose-derived stem cells (cASCs) from subcutaneous adipose tissue of healthy beagle. These cASCs can be maintained in vitro for extended periods with stable population doubling and low levels of senescence under hygiene condition. We confirmed our cASCs have potential to differentiate in vitro into adipogenic, chondrogenic, myogenic, and osteogenic cells in the presence of lineage-specific induction factors via real time RT-PCR and specific stain of cells. Here, we described protocol of cASCs preparation method from subcutaneous adipose tissue of beagle and suggested verifying method of cASCs. According to this study, we will develop therapeutic agent using these cASCs.</p> <p>FIG. 1 Cell surface markers: Flow cytometry plots showing expression of CD31, CD44, CD90, and CD133 on cASCs.</p> <p>FIG. 2 Expression of multipotency markers: RT-PCR analysis of osteogenic (Runx2, ALP), chondrogenic (COL2A1, aggrecan), and adipogenic (PPARγ, FABP4) markers in cASCs.</p> <p>FIG. 3 Multi-lineage differentiation ability: Micrographs showing differentiation of cASCs into osteogenic (A), chondrogenic (B), and adipogenic (C) lineages under specific induction conditions.</p> <p>FIG. 4 Multi-lineage differentiation ability: Bar graphs quantifying the expression levels of lineage-specific markers in differentiated cells.</p> |

기술 요약 정보

해당사항없음

보고서 원문

| 연도 | 보고서 구분 | 발간일 | 등록 번호 |
|------|--------|-----|-------|
| 2021 | 가이드라인 | 미정 | - |

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

해당사항없음

[기술적 성과]

해당사항없음

[경제적 성과]

해당사항없음

[사회적 성과]

해당사항없음

[인프라 성과]

해당사항없음

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

해당사항없음

2) 목표 달성 수준

| 추진 목표 | 달성 내용 | 달성도(%) |
|---------------------------|--|--------|
| ○ 동물용 세포외치료제 품질 및 평가체계 확립 | ○ 개유래 간엽줄기세포의 분리방법 확립 ○ 개유래 중간엽줄기세포의 엑소좀 생산성 확인 ○ 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 품질기준 확립 | 100 |
| ○ 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 개발 | ○ 전문가 협의회 구성 및 규제영향 분석 및 의견 수렴하여 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 제정 | 100 |

4. 목표 미달 시 원인분석

해당사항없음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 개의 지방에서 유래한 지방줄기세포의 분리방법과, 분리된 지방세포의 특성을 분석하는 연구는 대학교 연구실 단위에서 진행한 논문만 존재함.
- 전문실험연구기관에서 기존 참고문헌을 참조하여 분리방법을 확립하였고, 분리된 지방세포의 특성을 객관성 있게 분석하여 후발연구자들이 연구방향에 신뢰성을 갖는데 기여함.
- 국내외 전무한 동물용 세포외소포 치료제의 가이드라인을 제정하였다는 의의 및 일관성 있는 품질과 안전성, 유효성을 가진 동물용 세포외소포치료제 개발의 발판을 마련함.
- 개지방줄기세포 유래 엑소좀의 아토피 피부염 치료적 효능을 확인하여, 향후 심화 연구 및 제품 개발로 이어질 수 있는 초석을 마련함.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 개의 지방에서 유래한 지방줄기세포의 분리방법의 경우 추후 동물용 의약품에 사용될 세포 치료제 또는 세포외소포치료제의 기준 분리 배양법으로 활용할 예정이며 분리방법의 공개 및 연구하고자 하는 연구자들의 시험에 활용할 예정임.
- 개줄기세포 유래 엑소좀의 아토피 피부염 치료제 개발을 위한 심화 연구

< 연구개발성과 활용계획표 >

| 구분(정량 및 정성적 성과 항목) | | 연구개발 종료 후 5년 이내 |
|--------------------|-------|-----------------|
| 국외논문 | SCIE | 1 |
| | 비SCIE | - |
| | 계 | 1 |

< 별첨 자료 >

| 중앙행정기관 요구사항 | 별첨 자료 |
|-------------|-----------------------------------|
| 1. | 1) 자체평가의견서 |
| | 2) 연구성과 활용계획서 |
| | 3) 정책건의 공문 |
| | 4) 최종 가이드라인 원문 |
| | 5) 유효성 평가 보고서, 독성 평가 보고서 (단회, 반복) |
| | 6) 논문 리뷰1건, 학회발표 2건 |

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

| | | | | | |
|---|---|-----------|------------------|---------------------------------|-----|
| 과 제 명 | (국문) 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정 | | | | |
| | (영문) Established guidelines for quality, nonclinical and clinical evaluation of extracellular vesicle based therapeutics for animal | | | | |
| 주관연구기관 | 한국건설생활환경시험연구원 | | 주 관 연 구 책 임 자 | (소속)한국건설생활환경시험연구원 | |
| 참 여 기 업 | 주식회사 노터스 주식회사 엑소코바이오 | | | (성명) 이 재 원 | |
| 총연구개발비 (623,000천원) | 계 | 623,000천원 | 총 연구 기간 | 2020.04.01. ~ 2021.12.31(1년9월) | |
| | 정부출연 연구개발비 | 467,000천원 | 총 참 여 연구 원 수 | 총 인원 | 19명 |
| | 기업부담금 | 156,000천원 | | 내부인원 | 19명 |
| | 연구기관부담금 | | | 외부인원 | |
| <p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전세계적으로 세포외소포를 차세대 치료제로 개발하기 위한 기초 연구개발이 활발히 진행되고 있으며, 동물유래 줄기세포 역시 세포치료제로 개발되고 있음 - 그러나, 동물 줄기세포 유래 세포외소포의 치료적 효능에 대한 연구는 아직 초기 단계임. 그러므로 엑소좀을 생산하는 줄기세포치료제의 시장을 통해 동물용 세포외소포치료제의 시장 및 연구동향을 간접적으로 예측하고자 함. - 동물용 세포외치료제 품질 및 평가체계 확립을 위한 동물유래 줄기세포의 분리 및 특성 분석, 동물 세포 유래 엑소좀의 분리, 분석 방법 확립, 비임상시험시 고려사항이 포함된 가이드라인의 제정 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개 유래 줄기세포 분리방법 확립 : 줄기세포가 유도하는 세포외소포 확보를 위해 개 유래의 간엽줄기세포 분리방법 확립 - 동물용 세포외소포치료제 시생산 및 품질기준 확립 : 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 생산성 확인 및 품질기준 확립 - ‘동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시 : 개유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 아토피 효능 확인 - 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 독성평가 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 동물용 세포외소포치료제의 품질 및 비임상 관련 학회에서 총 2회 발표 - 아토피 질환 치료제로서의 가능성을 확인한 내용을 포함한 SCI 논문을 1편 리뷰중 - 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 작성하여 농림축산검역본부 가이드라인 제정 등에 활용할 수 있도록 정책 건의함 | | | | | |

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

| | | | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------|-----------|-----------|
| | | 과제번호 | 320063-02 | | |
| 사업구분 | 동물의약품개발사업 | | | | |
| 연구분야 | | | | 과제구분 | 단위 |
| 사업명 | 가축질병대응기술개발사업 | | | | 주관 |
| 총괄과제 | 기재하지 않음 | | | 총괄책임자 | 기재하지 않음 |
| 과제명 | 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정 | | | 과제유형 | (개발) |
| 연구개발기관 | 한국건설생활환경시험연구원 | | | 연구책임자 | 이재원 |
| 연구기간 연구개발비 (천원) | 연차 | 기간 | 정부 | 민간 | 계 |
| | 1차년도 | 2020.04.01 ~ 2020.12.31 | 200,000천원 | 67,000천원 | 267,000천원 |
| | 2차년도 | 2021.01.01 ~ 2021.12.31 | 267,000천원, | 89,000천원 | 356,000천원 |
| | 계 | 2020.04.01 ~ 2021.12.31 | 467,000천원 | 156,000천원 | 623,000천원 |
| 참여기업 | (주)노터스, (주)엑소코바이오 | | | | |
| 상대국 | 상대국연구개발기관 | | | | |

2. 평가일 : 2021.12.20

3. 평가자(연구책임자) :

| | | |
|---------------|----|-----|
| 소속 | 직위 | 성명 |
| 한국건설생활환경시험연구원 | 책임 | 이재원 |

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

| | |
|----|-----|
| 확약 | 이재원 |
|----|-----|

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

- 신규 가이드라인 제정을 통해 기술규제 완화 및 국제적인 위상 제고
- 동물용 세포외소포 치료제 개발 가능성 가속화
 - 세포외소포 치료제 개발 및 임상시험 후 양산화가 가능할 것으로 예상함.
- 기타 특수 동물의 세포치료제 개발 가능성 및 세포외소포 치료제 개발 가능성 제고
 - 고양이를 포함한 기타 다른 반려동물의 세포치료제 개발 가능성 및 세포외소포 치료제 개발이 가능할 것으로 예상함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

- 기술적 측면 : 국내 최초로 동물유래 줄기세포에서 유래한 엑소솜을 분리하고 생산하여 비임상시험(임상시험 생략) 수행
- 경제적·산업적 측면 : 신규 가이드라인 제정을 통해 관련 기술을 가진 기업의 시장 진출 및 매출증진에 도움을 될 것으로 예상.
- 사회적 측면: 동물용 세포외소포치료제 분야의 국제적인 위상 제고. 반려동물의 치료제의 확장성으로 인해 보호자의 만족도를 높일 수 있음

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 동물용 세포외소포치료제의 가이드라인 제정을 통한 관련 기술을 가진 중소기업의 성장 및 시장 진출 가속화
- 신규 가이드라인 제정에 따른 관련 반려동물 산업의 동반 성장 가능성
- 최초가이드라인 제정을 통해 동물용 세포외소포치료제 분야의 '퍼스트 무버'로서의 국제적인 위상 제고

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

- 연구기간동안 연구과제 목표달성을 위해 최선을 다하여 연구개발 성과를 달성함
- 엑소솜의 생산부터 약리효능, 독성시험 평가 등에 대한 기준을 설정하고, 그에 적합한 연구를 수행하였음.
- 본 과제의 주요 연구목표 수준을 모두 달성하였으며, 동물용세포외소포치료제에 대한 추가적인 연구 등을 통해 새로운 치료제로서의 개발 가능성을 더욱 높였다고 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

- 동물용 세포외소포치료제의 품질 및 비임상 관련 결과는 관련 학회에서 총 2회 발표
- 아토피 질환 치료제로서의 가능성을 확인한 내용을 포함한 SCI 논문을 1편 리뷰중

II. 연구목표 달성도

| 세부연구목표 (연구계획서상의 목표) | 비중 (%) | 달성도 (%) | 자체 평가 |
|------------------------------|-----------|------------|---|
| 동물용 세포외소포치료제의 가이드라인 제정 | 20 | 100 | · 전문가 협의회 구성 및 규제영향 분석 및 의견 수렴하여 가이드라인 제정 |
| 개 유래 줄기세포 분리방법 확립 | 20 | 100 | 간엽줄기세포 분리하여 분리방법 확립 |
| 동물용 세포외소포치료제 시생산 및 품질기준 확립 | 20 | 100 | 개유래 중간엽줄기세포의 엑소좀 생산성 확인 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 품질기준 확립 |
| 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시 | 10 | 100 | 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 아토피 효능 확인 |
| 개 유래 줄기세포의 기준 품질검사 | 10 | 100 | 확립된 방법으로 개 유래 줄기세포를 생산함. 생산한 세포의 기준 품질검사를 위하여 분화능과 증식능, 줄기세포로서의 고유의 특성을 가지고 있는지 확인하기 위한 세포표면표지인자를 확인함. |
| 동물용 세포외소포치료제 독성평가를 위한 엑소좀 공급 | 10 | 100 | 개유래 중간엽줄기세포 엑소좀의 반복투여 독성시험을 위한 엑소좀 생산 1차년도에 확립된 생산 방법 및 시험법을 활용하여 독성시험에 소요될 엑소좀을 생산 |
| 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시 | 10 | 100 | 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 얻어진 엑소좀의 독성평가를 완료함 |
| 합계 | 100점 | 100 | |

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 개 유래 줄기세포 분리방법 확립하고 동물용 세포외소포치료제 시생산 및 품질기준 확립하여 동물용 세포외소포치료제 비임상시험시 고려사항 제시함으로서 과제목표를 우수히 수행하였음
- 현재 농림축산검역본부에 최종 작성된 가이드라인을 첨부하여 정책건의하였음(2021.11.10.)

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 세포외소포치료제는 최근 전 세계적으로 주목하는 물질로, 인의를 포함하여 동물분야에서도 아직 승인되어 치료제로 시판된 사례가 없음. 그러므로 세포외소포관련 내용은 인의용 세포외소포치료제 식약처 가이드라인과 2018년 11월 에 발표된 International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)에서 Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018)와 동물에 적용된 세포외소포를 참고하여 작성하였음, 그러므로 제한된 정보를 활용하여 국내에서 세포외소포 전문가들과 함께 논의하여 최대한 수의분야에서 활용될 수 있는 내용을 가이드라인에 반영하고자 노력하였음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 현재 농림축산검역본부에 최종 작성된 가이드라인을 첨부하여 정책건의하였음(2021.11.10.)
- 농림축산검역본부와 추후 논의하여 가이드라인의 적용 여부 등을 결정할 예정임
- 또한 연구비 확보가 마련되면 임상시험 결과 확보와 관련하여 추가 연구를 진행하고, 이를 가이드라인에 반영하도록 노력할 예정임

IV. 보안성 검토

해당사항없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

| | | | | |
|----------|---|-----------|-----------|---------|
| 사업추진형태 | <input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제 | 분 야 | 동물의약품개발사업 | |
| 연구과제명 | 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 제정 | | | |
| 주관연구개발기관 | 한국건설생활환경시험연구원 | 주관연구책임자 | 이재원 | |
| 연구개발비 | 정부지원 연구개발비 | 기관부담연구개발비 | 기타 | 총연구개발비 |
| | 467,000 | 156,000 | - | 623,000 |
| 연구개발기간 | 2020. 4. 29. - 2021. 12. 31. (21개월) | | | |
| 주요활용유형 | <input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(가이드라인 제공) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:) | | | |

2. 연구목표 대비 결과

| 당초목표 | 당초연구목표 대비 연구결과 |
|---|--|
| ① 정보 수집 및 전문가 자문 - 현행 국내외 동물용 세포외소포치료제 가이드라인 개발 현황 및 수집 - 세포외소포치료제 분야 전문가 협의체 구성 및 의견 수렴 | 본 연구진은 세포치료제 혹은 세포외소포치료제의 전문가 집단 및 담당 공무원들과 함께 전문가 협의체를 구성하여 작성된 가이드라인을 공유하고 의견을 청취하여 반영하고자 노력하였음 |
| ② 동물용 세포외소포치료제의 품질 평가 - 개 유래 줄기세포 분리방법 확립 및 특성분석 - 동물용 세포외소포치료제 생산 및 품질기준 확립 | 개 유래의 중간엽 줄기세포로부터 세포외소포를 생산하였음. 이에 대한 전주기적 생산 및 품질 관리 기준을 마련하고자 다양한 평가를 수행하였으며, 이를 가이드라인에 반영하였음 |
| ③ 동물용 세포외소포치료제의 비임상시험 - 아토피 효력 시험을 통한 약리작용 분석 및 고려사항 제시 - 개 유래 줄기세포에서 분리한 세포외소포치료제의 독성 평가 및 고려사항 제시 | 생산된 세포외소포를 적용하여 유효성 평가를 수행하였으며, 동물용의약품 등 독성시험지침 및 동물용 의약품 안전성 유효성평가 가이드라인에 따라 독성 평가를 수행하였으며, 이에 필요한 고려사항을 가이드라인에 포함하였음 |

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

| 성과 목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | | |
|------------------------|-----------|----------|----------|-----------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|-------------|------------------|-----|----------|----------|----------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | 지식 재산권 | | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | 기술 인증 | 학술성과 | | | 교육 지도 | 인력 양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타연구 활용비) | |
| | 특허 출원 | 특허 등록 | 품종 등록 | S M A R T | 건 수 | 기술 료 | 제 품 화 | 매 출 액 | 수 출 액 | 고 용 창 출 | | 투 자 유 치 | 논문 | | | | 학 술 발 표 | 정 책 활 용 | | 홍 보 전 시 |
| | | | | | | | | | | | | | SCI | 비 SCI | | | | | | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 평 인 건 수 | 건 | 백 만 원 | 건 | 백 만 원 | 백 만 원 | 명 | 백 만 원 | 건 | 건 | 건 | 명 | 건 | 건 | | | |
| 가중치 | | | | | | | | | | | | | | 50 | | 50 | | | | |
| 최종 목표 | | | | | | | | | | | | | | 2 | | 1 | | | | |
| 당해 년도 달성률 (%) | | | | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | | | | |
| 달성률 (%) | | | | | | | | | | | | | | 100 | | 100 | | | | |

4. 핵심기술

| 구분 | 핵심기술명 |
|----|--------------------------------|
| ① | 개 지방 유래 줄기세포 분리 기술 |
| ② | 개 지방 유래 줄기세포 엑소좀 분리 및 품질 관리 기술 |
| ③ | 동물용 세포외소포치료제의 독성평가 |

5. 연구결과별 기술적 수준

| 구분 | 핵심기술 수준 | | | | | 기술의 활용유형(복수표기 가능) | | | | |
|-------|----------|----------|-------------|---------------|---------------|-------------------|----------------|-------------|----------|----|
| | 세계 최초 | 국내 최초 | 외국기술 복 제 | 외국기술 소화·흡수 | 외국기술 개선·개량 | 특허 출원 | 산업체이전 (상품화) | 현장애로 해 결 | 정책 자료 | 기타 |
| ①의 기술 | | | | √ | | | | √ | | |
| ②의 기술 | | | | √ | | | | √ | | |
| ③의 기술 | | | | √ | | | | √ | | |

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

| 핵심기술명 | 핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과 |
|-------|---|
| ①의 기술 | 개의 지방에서 유래한 지방줄기세포의 분리방법의 경우 추후 동물용 의약품에 사용될 세포치료제 또는 세포외소포치료제의 기준 분리 배양법으로 활용할 예정이며 분리방법의 공개 및 연구하고자 하는 연구자들의 시험에 활용할 예정임. |
| ②의 기술 | 동물용 세포외소포치료제를 개발하고자 하는 연구자 및 업체에 대한 생산 및 품질기준에 대한 가이드라인 제시 |
| ③의 기술 | 세포외소포치료제를 생산하고자 하는 업체에 대한 안전성 및 유효성 평가 가이드라인 제시 |

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

| 성과 목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | |
|---------------------|-----------|----------|------------------|-----------------------|------------------|---------|-------------|-------------|-------------|------------------|------------------|----------|----------|------------------|----------------------------|------------------|----------|------------------|------------------|----------------|
| | 지식 재산권 | | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | | 기술 인증 | 학술성과 | | | 교육 지도 | 인력 양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타연구활용액) |
| | 특허 출원 | 특허 등록 | 품 종 등 록 | S M A R T | 건 수 | 기술 료 | 제 품 화 | 매 출 액 | 수 출 액 | 고 용 창 출 | 투 자 유 치 | | 논 문 | | 논 문 평 가 I F | | | 학 술 발 표 | 정 책 활 용 | |
| | | | | | | | | | | | | SCI | 비 SCI | 정 책 활 용 | | 홍 보 전 시 | | | | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 건 | 건 | 건 | 백만원 | 백만원 | 백만원 | 명 | 백만원 | 건 | 건 | 건 | 건 | 명 | 건 | 건 | | |
| 가중치 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종목표 | | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | | | | | | |
| 연구기간내 달성실적 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 연구종료후 성과창출 계획 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

해당사항없음

1. 참고문헌

- 1) Théry C, et al. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2:569-579.
- 2) Mathivanan S, et al. (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteom* 73, 1907-1920.
- 3) Hildreth C. Top 4 most richly funded exosome startups. *BioInformant* Available online: <https://bioinformant.com/top-exosome-companies/>
- 4) Plieth J, Amstrom M. Exosomes start to deliver deals. *Vantage* 2019.01.28. Available online: <https://www.evaluate.com/vantage/articles/news/snippets/exosomes-start-deliver-deals>
- 5) Villatoro et al. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. *Vet. Rec.* 2018;183:654.
- 6) Hall et al. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet. Ther.* 2010;11:E1-E14.
- 7) Enciso et al. Multidose intramuscular allogeneic adipose stem cells decrease the severity of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet. World* 2019;12:1747-1754.
- 8) Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis, Cho et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2018) 9:187
- 9) The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium, William Cookson, *Nature Reviews Immunology* volume 4, pages978-988(2004)
- 10) Topical Application of Cream-emulsified CD86 siRNA Ameliorates Allergic Skin Disease by Targeting Cutaneous Dendritic Cells, Patcharee et al., Volume 16, Issue 7, July 2008, Pages 1323-1330
- 11) Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis. *Stem Cell Research & Therapy* 2018;9:187
- 12) Exosomes from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Epidermal Barrier Repair by Inducing de Novo Synthesis of Ceramides in Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:665
- 13) Toxicological evaluation of exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2020;115:104686

2. 국내 및 국제 학술회의 발표

| | | | | |
|-----------------|------------|------------------------|-----------------------|------------|
| 회의 명칭 대한면역학회 | 발표자 이재원 | 발표 일시 2020년 11월 11일 | 장소 virtual meeting | 국명 대한민국 |
|-----------------|------------|------------------------|-----------------------|------------|

초록

Poster Presentation

Allergy, Hypersensitivity and Autoimmunity

EP-005 Exosomes derived from canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells attenuate atopic dermatitis in mouse model

SungBae Kim¹, SoMin Lee¹, HyeonYeol Ryu¹, KyungSeuk Song¹, SangChul Kim¹, Dae Hyun Ha² and Yong Weon Yi², Sokho Kim³, JaeWon Lee^{1*}

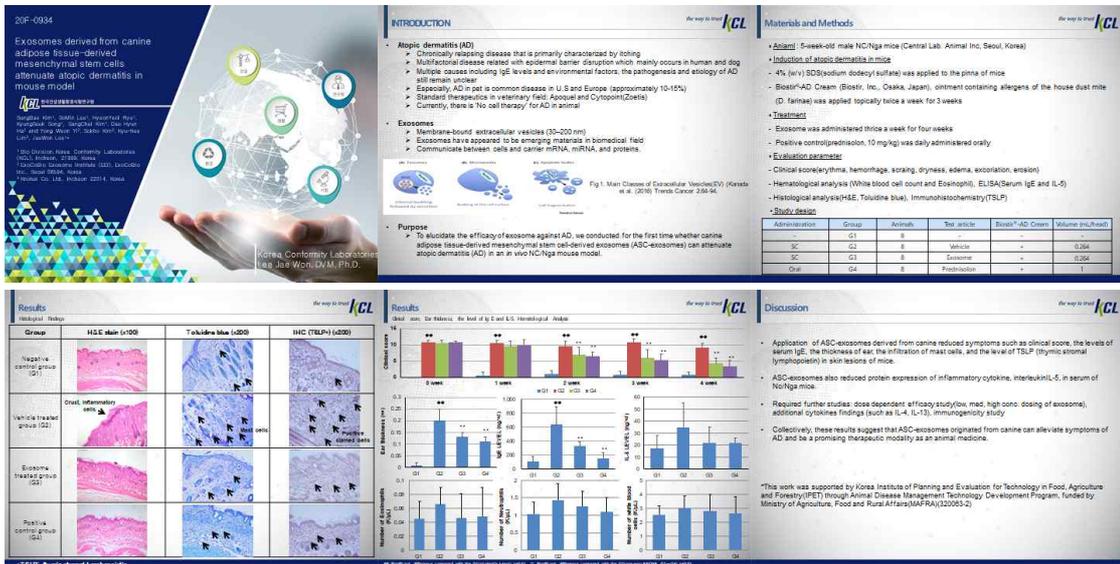
¹Bio Division, Korea Conformity Laboratories (KCL), Incheon, 21999, Korea, ²ExoCoBio Exosome Institute (EEI), ExoCoBio Inc., STE 306, 19 Gasan digital 1-ro, Geumcheon-gu, Seoul 08594, Republic of Korea, ³Knotus Co. Ltd., Incheon 22014, Korea

Atopic dermatitis (AD) is a chronically relapsing disease that is primarily characterized by itching. This is a multifactorial disease related with epidermal barrier disruption which mainly occurs in infancy and childhood. Although AD is usually associated with multiple causes including IgE levels and environmental factors, the pathogenesis and etiology of AD still remain unclear. Exosomes are membrane-bound extracellular vesicles (30–200 nm) released by almost eukaryotic cells. Currently, exosomes have appeared to be emerging and appealing materials to treat a variety of diseases in biomedical field, because they can communicate between cells and carrier mRNA, miRNA, and proteins. To elucidate the efficacy of exosome against AD mouse model, we conducted for the first time whether canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes (ASC-exosomes) can attenuate atopic dermatitis (AD) in an *in vivo* NC/Nga mouse model. When applied subcutaneously (SC) into NC/Nga mice treated with house dust mite antigens (Joongang Experimental Animal Co.) repeatedly, it was demonstrated that ASC-exosomes were able to reduce symptoms such as clinical score, the levels of serum IgE, the thickness of ear, the infiltration of mast cells, and the level of TSLP (thymic stromal lymphopoietin) and CD86+ cells in skin lesions. ASC-exosomes also significantly reduced protein expression of various inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13 in serum of Nc/Nga mice. Collectively, these results suggest that ASC-exosomes originated from canine can alleviate symptoms of AD and be a promising therapeutic modality as an animal medicine.

Keywords: Exosome, Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, Atopic dermatitis, Canine, Inflammation

*This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (320063-2).

포스터



2. 국내 및 국제 학술회의 발표

| 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|---------------------|-----|---------------|--------|------|
| 한국분자세포생물학회 국제 학회 | 김석호 | 2021년 11월 05일 | 제주 ICC | 대한민국 |

초록

Animal stem cells for therapeutic purposes have received a lot of attention in parallel with human stem cell research recently. Adipose tissue may represent a potential source of adult stem cells for tissue engineering applications in veterinary medicine. Adipose tissue can be obtained in large quantities, under local anesthesia, and with minimal discomfort. In this study, we perform establishment of canine adipose-derived stem cells (cASCs) from subcutaneous adipose tissue of healthy beagle. These cASCs can be maintained in vitro for extended periods with stable population doubling and low levels of senescence under hygiene condition. We confirmed our cASCs have potential to differentiate in vitro into adipogenic, chondrogenic, myogenic, and osteogenic cells in the presence of lineage-specific induction factors via real time RT-PCR and specific stain of cells. Here, we described protocol of cASCs preparation method from subcutaneous adipose tissue of beagle and suggested verifying method of cASCs. According to this study, we will develop therapeutic agent using these cASCs.

포스터

KNOTUS
Korea National Open University

Isolation and characterization of canine adipose-derived stem cells

Kyu-Han Lim^{1,2}, Allys Kang¹, An Hyoung Kim¹, Dae Hyeon Ha¹, Sung-Ho Kim¹, Jae Won Lee¹, Tryung Seung Cho¹, Chul Geun Kim¹, and Seokho Kim^{1,4*}

¹KNOTUS (Korea National Open University), Research Center
²Seoul National University (SNU), Seoul, Korea
³Seoul National University (SNU), Seoul, Korea
⁴Department of Life Science and Biotechnology, School of Natural Science, Hanyang University
⁵Department of Laboratory Physiology, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, Korea

Animal stem cells for therapeutic purposes have received a lot of attention in parallel with human stem cell research recently. Adipose tissue may represent a potential source of adult stem cells for tissue engineering applications in veterinary medicine. Adipose tissue can be obtained in large quantities, under local anesthesia, and with minimal discomfort. In this study, we perform establishment of canine adipose-derived stem cells (cASCs) from subcutaneous adipose tissue of healthy beagle. These cASCs can be maintained in vitro for extended periods with stable population doubling and low levels of senescence under hygiene condition. We confirmed our cASCs have potential to differentiate in vitro into adipogenic, chondrogenic, myogenic, and osteogenic cells in the presence of lineage-specific induction factors via real time RT-PCR and specific stain of cells. Here, we described protocol of cASCs preparation method from subcutaneous adipose tissue of beagle and suggested verifying method of cASCs. According to this study, we will develop therapeutic agent using these cASCs.

FIG. 1 cASCs Isolation

Subcutaneous adipose tissues of the beagle were collected from dogs using aseptically designed procedures. The adipose tissues were washed and then digested and dispersed using the enzymatic method (digestion at 37°C for 4 hours). The dispersed tissue was filtered and centrifuged at a speed of 1000 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded and the cell-containing supernatant was washed repeatedly. The residual cells were cultured in DMEM/F12 medium at 1% FBS until 80% confluence. Cells were trypsinized (10% FBS) and reseeded (100 cells/ml). The cell concentration was reduced every 2 to 3 days. The cultured cell media was completely replaced with fresh adipogenic medium (10% FBS) and replaced in a dilution of 1:1. Subsequent experiments were carried out using this passage cells.

FIG. 2 Cell self-renewal

Fig. 1. Flow cytometric analysis showed that cASCs isolated after passage into the basic medium (DMEM/F12) and FBS (1%) in addition to expression of CD44⁺, CD133⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD166⁺, and CD200⁺ were not detected. The change in cell number and morphology of pass cells isolated from the same sources and their self-renewal and self-renewal cell lines.

FIG. 3 Expression of multipotency markers

Fig. 3. Expression of multipotency markers (Bmi-1, Flk1 and E-cadherin) in cASCs using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) after 24 hours. The results were presented as the mean values. GAPDH (housekeeping gene) was used as a control gene in a real-time PCR.

FIG. 3 A. Chondrogenesis

Fig. 3 (A) Differentiation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells (cASCs) into chondrogenic lineage and adipogenic lineage (A) indicated cell staining for chondrogenic lineage (stained cells in blue) (a). Generated by chondrogenic (cASCs) (B). (b) showed characteristic for chondrogenic lineage (blue stain staining) (cASCs) (C). (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l) (m) (n) (o) (p) (q) (r) (s) (t) (u) (v) (w) (x) (y) (z) (aa) (ab) (ac) (ad) (ae) (af) (ag) (ah) (ai) (aj) (ak) (al) (am) (an) (ao) (ap) (aq) (ar) (as) (at) (au) (av) (aw) (ax) (ay) (az) (ba) (bb) (bc) (bd) (be) (bf) (bg) (bh) (bi) (bj) (bk) (bl) (bm) (bn) (bo) (bp) (bq) (br) (bs) (bt) (bu) (bv) (bw) (bx) (by) (bz) (ca) (cb) (cc) (cd) (ce) (cf) (cg) (ch) (ci) (cj) (ck) (cl) (cm) (cn) (co) (cp) (cq) (cr) (cs) (ct) (cu) (cv) (cw) (cx) (cy) (cz) (da) (db) (dc) (dd) (de) (df) (dg) (dh) (di) (dj) (dk) (dl) (dm) (dn) (do) (dp) (dq) (dr) (ds) (dt) (du) (dv) (dw) (dx) (dy) (dz) (ea) (eb) (ec) (ed) (ee) (ef) (eg) (eh) (ei) (ej) (ek) (el) (em) (en) (eo) (ep) (eq) (er) (es) (et) (eu) (ev) (ew) (ex) (ey) (ez) (fa) (fb) (fc) (fd) (fe) (ff) (fg) (fh) (fi) (fj) (fk) (fl) (fm) (fn) (fo) (fp) (fq) (fr) (fs) (ft) (fu) (fv) (fw) (fx) (fy) (fz) (ga) (gb) (gc) (gd) (ge) (gf) (gg) (gh) (gi) (gj) (gk) (gl) (gm) (gn) (go) (gp) (gq) (gr) (gs) (gt) (gu) (gv) (gw) (gx) (gy) (gz) (ha) (hb) (hc) (hd) (he) (hf) (hg) (hh) (hi) (hj) (hk) (hl) (hm) (hn) (ho) (hp) (hq) (hr) (hs) (ht) (hu) (hv) (hw) (hx) (hy) (hz) (ia) (ib) (ic) (id) (ie) (if) (ig) (ih) (ii) (ij) (ik) (il) (im) (in) (io) (ip) (iq) (ir) (is) (it) (iu) (iv) (iw) (ix) (iy) (iz) (ja) (jb) (jc) (jd) (je) (jf) (jg) (jh) (ji) (jj) (jk) (jl) (jm) (jn) (jo) (jp) (jq) (jr) (js) (jt) (ju) (jv) (jw) (jx) (jy) (jz) (ka) (kb) (kc) (kd) (ke) (kf) (kg) (kh) (ki) (kj) (kk) (kl) (km) (kn) (ko) (kp) (kq) (kr) (ks) (kt) (ku) (kv) (kw) (kx) (ky) (kz) (la) (lb) (lc) (ld) (le) (lf) (lg) (lh) (li) (lj) (lk) (ll) (lm) (ln) (lo) (lp) (lq) (lr) (ls) (lt) (lu) (lv) (lw) (lx) (ly) (lz) (ma) (mb) (mc) (md) (me) (mf) (mg) (mh) (mi) (mj) (mk) (ml) (mm) (mn) (mo) (mp) (mq) (mr) (ms) (mt) (mu) (mv) (mw) (mx) (my) (mz) (na) (nb) (nc) (nd) (ne) (nf) (ng) (nh) (ni) (nj) (nk) (nl) (nm) (nn) (no) (np) (nq) (nr) (ns) (nt) (nu) (nv) (nw) (nx) (ny) (nz) (oa) (ob) (oc) (od) (oe) (of) (og) (oh) (oi) (oj) (ok) (ol) (om) (on) (oo) (op) (oq) (or) (os) (ot) (ou) (ov) (ow) (ox) (oy) (oz) (pa) (pb) (pc) (pd) (pe) (pf) (pg) (ph) (pi) (pj) (pk) (pl) (pm) (pn) (po) (pp) (pq) (pr) (ps) (pt) (pu) (pv) (pw) (px) (py) (pz) (qa) (qb) (qc) (qd) (qe) (qf) (qg) (qh) (qi) (qj) (qk) (ql) (qm) (qn) (qo) (qp) (qq) (qr) (qs) (qt) (qu) (qv) (qw) (qx) (qy) (qz) (ra) (rb) (rc) (rd) (re) (rf) (rg) (rh) (ri) (rj) (rk) (rl) (rm) (rn) (ro) (rp) (rq) (rr) (rs) (rt) (ru) (rv) (rw) (rx) (ry) (rz) (sa) (sb) (sc) (sd) (se) (sf) (sg) (sh) (si) (sj) (sk) (sl) (sm) (sn) (so) (sp) (sq) (sr) (ss) (st) (su) (sv) (sw) (sx) (sy) (sz) (ta) (tb) (tc) (td) (te) (tf) (tg) (th) (ti) (tj) (tk) (tl) (tm) (tn) (to) (tp) (tq) (tr) (ts) (tt) (tu) (tv) (tw) (tx) (ty) (tz) (ua) (ub) (uc) (ud) (ue) (uf) (ug) (uh) (ui) (uj) (uk) (ul) (um) (un) (uo) (up) (uq) (ur) (us) (ut) (uu) (uv) (uw) (ux) (uy) (uz) (va) (vb) (vc) (vd) (ve) (vf) (vg) (vh) (vi) (vj) (vk) (vl) (vm) (vn) (vo) (vp) (vq) (vr) (vs) (vt) (vu) (vv) (vw) (vx) (vy) (vz) (wa) (wb) (wc) (wd) (we) (wf) (wg) (wh) (wi) (wj) (wk) (wl) (wm) (wn) (wo) (wp) (wq) (wr) (ws) (wt) (wu) (wv) (ww) (wx) (wy) (wz) (xa) (xb) (xc) (xd) (xe) (xf) (xg) (xh) (xi) (xj) (xk) (xl) (xm) (xn) (xo) (xp) (xq) (xr) (xs) (xt) (xu) (xv) (xw) (xx) (xy) (xz) (ya) (yb) (yc) (yd) (ye) (yf) (yg) (yh) (yi) (yj) (yk) (yl) (ym) (yn) (yo) (yp) (yq) (yr) (ys) (yt) (yu) (yv) (yw) (yx) (yy) (yz) (za) (zb) (zc) (zd) (ze) (zf) (zg) (zh) (zi) (zj) (zk) (zl) (zm) (zn) (zo) (zp) (zq) (zr) (zs) (zt) (zu) (zv) (zw) (zx) (zy) (zz)

Fig. 3 (A) Differentiation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells (cASCs) into chondrogenic lineage and adipogenic lineage (A) indicated cell staining for chondrogenic lineage (stained cells in blue) (a). Generated by chondrogenic (cASCs) (B). (b) showed characteristic for chondrogenic lineage (blue stain staining) (cASCs) (C). (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l) (m) (n) (o) (p) (q) (r) (s) (t) (u) (v) (w) (x) (y) (z) (aa) (ab) (ac) (ad) (ae) (af) (ag) (ah) (ai) (aj) (ak) (al) (am) (an) (ao) (ap) (aq) (ar) (as) (at) (au) (av) (aw) (ax) (ay) (az) (ba) (bb) (bc) (bd) (be) (bf) (bg) (bh) (bi) (bj) (bk) (bl) (bm) (bn) (bo) (bp) (bq) (br) (bs) (bt) (bu) (bv) (bw) (bx) (by) (bz) (ca) (cb) (cc) (cd) (ce) (cf) (cg) (ch) (ci) (cj) (ck) (cl) (cm) (cn) (co) (cp) (cq) (cr) (cs) (ct) (cu) (cv) (cw) (cx) (cy) (cz) (da) (db) (dc) (dd) (de) (df) (dg) (dh) (di) (dj) (dk) (dl) (dm) (dn) (do) (dp) (dq) (dr) (ds) (dt) (du) (dv) (dw) (dx) (dy) (dz) (ea) (eb) (ec) (ed) (ee) (ef) (eg) (eh) (ei) (ej) (ek) (el) (em) (en) (eo) (ep) (eq) (er) (es) (et) (eu) (ev) (ew) (ex) (ey) (ez) (fa) (fb) (fc) (fd) (fe) (ff) (fg) (fh) (fi) (fj) (fk) (fl) (fm) (fn) (fo) (fp) (fq) (fr) (fs) (ft) (fu) (fv) (fw) (fx) (fy) (fz) (ga) (gb) (gc) (gd) (ge) (gf) (gg) (gh) (gi) (gj) (gk) (gl) (gm) (gn) (go) (gp) (gq) (gr) (gs) (gt) (gu) (gv) (gw) (gx) (gy) (gz) (ha) (hb) (hc) (hd) (he) (hf) (hg) (hh) (hi) (hj) (hk) (hl) (hm) (hn) (ho) (hp) (hq) (hr) (hs) (ht) (hu) (hv) (hw) (hx) (hy) (hz) (ia) (ib) (ic) (id) (ie) (if) (ig) (ih) (ii) (ij) (ik) (il) (im) (in) (io) (ip) (iq) (ir) (is) (it) (iu) (iv) (iw) (ix) (iy) (iz) (ja) (jb) (jc) (jd) (je) (jf) (jg) (jh) (ji) (jj) (jk) (jl) (jm) (jn) (jo) (jp) (jq) (jr) (js) (jt) (ju) (jv) (jw) (jx) (jy) (jz) (ka) (kb) (kc) (kd) (ke) (kf) (kg) (kh) (ki) (kj) (kk) (kl) (km) (kn) (ko) (kp) (kq) (kr) (ks) (kt) (ku) (kv) (kw) (kx) (ky) (kz) (la) (lb) (lc) (ld) (le) (lf) (lg) (lh) (li) (lj) (lk) (ll) (lm) (ln) (lo) (lp) (lq) (lr) (ls) (lt) (lu) (lv) (lw) (lx) (ly) (lz) (ma) (mb) (mc) (md) (me) (mf) (mg) (mh) (mi) (mj) (mk) (ml) (mm) (mn) (mo) (mp) (mq) (mr) (ms) (mt) (mu) (mv) (mw) (mx) (my) (mz) (na) (nb) (nc) (nd) (ne) (nf) (ng) (nh) (ni) (nj) (nk) (nl) (nm) (nn) (no) (np) (nq) (nr) (ns) (nt) (nu) (nv) (nw) (nx) (ny) (nz) (oa) (ob) (oc) (od) (oe) (of) (og) (oh) (oi) (oj) (ok) (ol) (om) (on) (oo) (op) (oq) (or) (os) (ot) (ou) (ov) (ow) (ox) (oy) (oz) (pa) (pb) (pc) (pd) (pe) (pf) (pg) (ph) (pi) (pj) (pk) (pl) (pm) (pn) (po) (pp) (pq) (pr) (ps) (pt) (pu) (pv) (pw) (px) (py) (pz) (qa) (qb) (qc) (qd) (qe) (qf) (qg) (qh) (qi) (qj) (qk) (ql) (qm) (qn) (qo) (qp) (qq) (qr) (qs) (qt) (qu) (qv) (qw) (qx) (qy) (qz) (ra) (rb) (rc) (rd) (re) (rf) (rg) (rh) (ri) (rj) (rk) (rl) (rm) (rn) (ro) (rp) (rq) (rr) (rs) (rt) (ru) (rv) (rw) (rx) (ry) (rz) (sa) (sb) (sc) (sd) (se) (sf) (sg) (sh) (si) (sj) (sk) (sl) (sm) (sn) (so) (sp) (sq) (sr) (ss) (st) (su) (sv) (sw) (sx) (sy) (sz) (ta) (tb) (tc) (td) (te) (tf) (tg) (th) (ti) (tj) (tk) (tl) (tm) (tn) (to) (tp) (tq) (tr) (ts) (tt) (tu) (tv) (tw) (tx) (ty) (tz) (ua) (ub) (uc) (ud) (ue) (uf) (ug) (uh) (ui) (uj) (uk) (ul) (um) (un) (uo) (up) (uq) (ur) (us) (ut) (uu) (uv) (uw) (ux) (uy) (uz) (va) (vb) (vc) (vd) (ve) (vf) (vg) (vh) (vi) (vj) (vk) (vl) (vm) (vn) (vo) (vp) (vq) (vr) (vs) (vt) (vu) (vv) (vw) (vx) (vy) (vz) (wa) (wb) (wc) (wd) (we) (wf) (wg) (wh) (wi) (wj) (wk) (wl) (wm) (wn) (wo) (wp) (wq) (wr) (ws) (wt) (wu) (wv) (ww) (wx) (wy) (wz) (xa) (xb) (xc) (xd) (xe) (xf) (xg) (xh) (xi) (xj) (xk) (xl) (xm) (xn) (xo) (xp) (xq) (xr) (xs) (xt) (xu) (xv) (xw) (xx) (xy) (xz) (ya) (yb) (yc) (yd) (ye) (yf) (yg) (yh) (yi) (yj) (yk) (yl) (ym) (yn) (yo) (yp) (yq) (yr) (ys) (yt) (yu) (yv) (yw) (yx) (yy) (yz) (za) (zb) (zc) (zd) (ze) (zf) (zg) (zh) (zi) (zj) (zk) (zl) (zm) (zn) (zo) (zp) (zq) (zr) (zs) (zt) (zu) (zv) (zw) (zx) (zy) (zz)

FIG. 4 Multi-lineage differentiation ability

Fig. 4. RT-PCR analysis of transcription factors in the differentiation of cASCs. (A) Chondrogenic lineage (B) Myogenic lineage (C) Adipogenic lineage. (D) GAPDH analysis as a control. Data: Chondrogenic lineage (n=3).

3. 논문(국내외 전문 학술지) 리뷰중

| 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | SCIE 여부 (SCIE/비SCIE) | 게재일 |
|---|-------------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|
| Canine mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate atopic dermatitis | International Journal of Stem Cells | 하대현, 김성배, 김진형 | SCIE | Under review |

Article type: Original article

Canine mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate atopic dermatitis

Hyungtaek Jeon^{1,†}, Sung-Bae Kim^{2,†}, CHANGFAN JIN^{3,†}, Kyung Seuk Song², Jin Hyoung Kim³, Byong Seung Cho^{1,*}, Sokho Kim^{3,*}, and Jae Won Lee^{2,*}

¹ ExoCoBio Exosome Institute (EEI), ExoCoBio Inc., Seoul, 08594, Republic of Korea; (H.T.J.);

² Korea Conformity Laboratories, Incheon, 21999, Republic of Korea; (S.B.K.); (K.S.S.);

³ KNOTUS Co., Ltd., Research Center, Incheon, 22014, Republic of Korea; (J.H.K.); (C.F.J.)

⁴ Department of Veterinary Medical Imaging, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea; (C.F.J.)

Keywords: canine atopic dermatitis, extracellular vesicles, mesenchymal stem cells, adipose tissue

Abstract

Background and Objectives: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease that is associated with systemic inflammation and immune modulation. Previously, we showed that extracellular vesicles derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASC-EVs) attenuated AD-like symptoms by reducing the levels of multiple inflammatory cytokines. Here, we aimed to investigate the improvement of canine AD upon using canine ASC-exosomes on a biostir-induced AD model.

Methods and Results: First, we isolated canine ASCs (cASCs) from the adipose tissue of canine and characterized the cASCs-EVs. Interestingly, we found that cASC-EVs improved AD-like dermatitis and markedly decreased the levels of serum IgE, ear thickness, inflammatory cytokines, and chemokines, such as IL-4 and IFN- γ , in a dose-dependent manner. In addition, we analyzed miRNA arrays from cASC-EVs by next-generation sequencing (NGS) to investigate the role of miRNAs in improving inflammatory responses.

Conclusions: Collectively, our results suggest that cASC-EVs effectively attenuate AD by carrying anti-inflammatory miRNAs to atopic lesions, resulting in a promising cell-free therapeutic option for treating canine AD.

4. 독성평가 최종보고서

| 단회투여 독성시험 최종보고서 | 신뢰성보증확인서 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--------------|--------------|-------------|-------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| <p>최종 보고서</p> <p>ICR mouse를 이용한 EXO301의 단회 피하투여 독성시험</p> <p>KCL</p> <p>(시험번호 : NT21-00046)</p> <p>2021 년 12 월</p> <p><i>the way to trust</i> KCL 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> | <p>신뢰성보증확인서</p> <p>시험번호 : NT21-00046</p> <p>시험제목 : ICR mouse를 이용한 EXO301의 단회 피하투여 독성시험</p> <p>이 보고서에 기술된 시험을 독립적으로 아래와 같이 점검하였으며 각 점검결과를 표준작업지침서에 따라 시험책임자와 운영책임자에게 통보 및 보고하였다.</p> <p>본 시험은 농림축산검역본부 고시 제 2019-65 호 (2019 년 10 월 10 일) '동물용의약품등 비임상시험 실시기관 지정에 관한 규정' 및 농림축산검역본부 고시 제 2016-22 호 (2016 년 03 월 09 일) '동물용의약품등 독성시험지침' 에 따라 수행되었으며, 보고서의 작성 및 결과의 기술이 시험의 실시과정에서 발생한 시험기초 자료를 바탕으로 정확히 반영되었음을 확인하였다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>검 검 내 용</th> <th>실 시 일</th> <th>시험책임자에게 통보일</th> <th>운영책임자에게 보고일</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>시험계획서</td> <td>2021. 05. 25</td> <td>2021. 05. 26</td> <td>2021. 05. 26</td> </tr> <tr> <td>시험기초자료 및 최종보고서(안)</td> <td>2021. 12. 28</td> <td>2021. 12. 28</td> <td>2021. 12. 28</td> </tr> <tr> <td>최종보고서</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> </tr> </tbody> </table> <p>한국건설생활환경시험연구원 바이오본부 신뢰성보증책임자 김기영 (인) 신뢰성보증담당자 한보리 (인) 2021 년 12 월 31 일</p> <p><i>the way to trust</i> KCL 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> <p>NT21-00046</p> | 검 검 내 용 | 실 시 일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | 시험계획서 | 2021. 05. 25 | 2021. 05. 26 | 2021. 05. 26 | 시험기초자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 |
| 검 검 내 용 | 실 시 일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험계획서 | 2021. 05. 25 | 2021. 05. 26 | 2021. 05. 26 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험기초자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | 2021. 12. 28 | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | | | | | | | | | | | | | | |

| 4주 반복 독성시험 최종보고서 | 신뢰성보증확인서 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--------------|--------------|-------------|-------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| <p>최종 보고서</p> <p>ICR mouse를 이용한 EXO301의 4주 반복 피하투여 독성시험</p> <p>KCL</p> <p>(시험번호 : NT21-00047)</p> <p>2021 년 12 월</p> <p><i>the way to trust</i> KCL 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> | <p>신뢰성보증확인서</p> <p>시험번호 : NT21-00047</p> <p>시험제목 : ICR mouse를 이용한 EXO301의 4주 반복 피하투여 독성시험</p> <p>이 보고서에 기술된 시험을 독립적으로 아래와 같이 점검하였으며 각 점검결과를 표준작업지침서에 따라 시험책임자와 운영책임자에게 통보 및 보고하였다.</p> <p>본 시험은 농림축산검역본부 고시 제 2019-65 호 (2019 년 10 월 10 일) '동물용의약품등 비임상시험 실시기관 지정에 관한 규정' 및 농림축산검역본부 고시 제 2016-22 호 (2016 년 03 월 09 일) '동물용의약품등 독성시험지침' 에 준하여 수행되었으며, 보고서의 작성 및 결과의 기술이 시험의 실시과정에서 발생한 시험기초 자료를 바탕으로 정확히 반영되었음을 확인하였다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>검 검 내 용</th> <th>실 시 일</th> <th>시험책임자에게 통보일</th> <th>운영책임자에게 보고일</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>시험계획서</td> <td>2021. 07. 07</td> <td>2021. 07. 07</td> <td>2021. 07. 07</td> </tr> <tr> <td>시험기초자료 및 최종보고서(안)</td> <td>2021. 12. 30</td> <td>2021. 12. 30</td> <td>2021. 12. 30</td> </tr> <tr> <td>최종보고서</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> <td>2021. 12. 31</td> </tr> </tbody> </table> <p>한국건설생활환경시험연구원 바이오본부 신뢰성보증책임자 김기영 (인) 신뢰성보증담당자 한보리 (인) 2021 년 12 월 31 일</p> <p><i>the way to trust</i> KCL 한국건설생활환경시험연구원 Korea Conformity Laboratories</p> <p>NT21-00047</p> | 검 검 내 용 | 실 시 일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | 시험계획서 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | 시험기초자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 |
| 검 검 내 용 | 실 시 일 | 시험책임자에게 통보일 | 운영책임자에게 보고일 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험계획서 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | 2021. 07. 07 | | | | | | | | | | | | | | |
| 시험기초자료 및 최종보고서(안) | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | 2021. 12. 30 | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종보고서 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | 2021. 12. 31 | | | | | | | | | | | | | | |

5. 가이드라인

| 동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 | |
|---|--|
| <p>동물용 세포외소포치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인</p> <p>(Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Assessment of Extracellular Vesicles Therapy Products for Animal Use)</p> <p>2022</p>  <p>농림축산검역본부</p> <p>- 1 -</p> | <p>목차</p> <p>1. 서론 3</p> <p>2. 적용 범위4</p> <p>3. 관련 규정5</p> <p>4. 동물용 세포외소포치료제의 개발 및 제조 시 고려사항.....6</p> <p>4.1 동물용 세포외소포치료제 출발물질6</p> <p>4.2 동물용 세포외소포치료제 제조공정 및 관리8</p> <p>4.3 동물용 세포외소포치료제 특성분석10</p> <p>4.4 동물용 세포외소포치료제 품질관리11</p> <p>4.5 동물용 세포외소포치료제 안정성17</p> <p>5. 동물용 세포외소포치료제 비임상 고려사항18</p> <p>5.1. 약리작용에 관한 자료18</p> <p>5.2. 독성에 관한 자료21</p> <p>6. 동물용 세포외소포치료제 임상 고려사항25</p> <p>7. 참고문헌29</p> |

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.