

줄기세포치료제 평가 가이드라인 [민원인 안내서]

(Guideline in Quality, Non-clinical and Clinical Assessment of
Stem Cell Therapy Product)

2018. 11.



이 안내서는 줄기세포치료제 평가 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2018년 11월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대해 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료제과로 문의하시기 바랍니다.

전화 : 043-719-3537

팩스 : 043-719-3530

목 차

| | |
|---------------------------|-----------|
| 1. 서 론 | 1 |
| 1.1. 도입 | 1 |
| 1.2. 배경 | 2 |
| 2. 개요 | 3 |
| 2.1. 줄기세포의 정의와 특성 | 3 |
| 2.2. 줄기세포 종류에 따른 특성 | 4 |
| 3. 품질 고려사항 | 5 |
| 3.1. 일반적 고려사항 | 5 |
| 3.2. 원료물질 | 6 |
| 3.3. 제조공정 | 6 |
| 3.4. 제조공정 검증 | 7 |
| 3.5. 특성분석과 품질관리 | 8 |
| 3.5.1. 확인 | 8 |
| 3.5.2. 순도 | 8 |
| 3.5.3. 역가 | 9 |
| 3.5.4. 유전적 안정성 | 10 |
| 4. 비임상 고려사항 | 12 |
| 4.1. 동물모델 | 12 |
| 4.2. 생체내 분포와 미세환경 | 13 |
| 4.3. 종양원성 | 14 |
| 4.4. 생체내 분화 | 15 |
| 4.5. 면역거부와 지속성 | 15 |
| 5. 임상 고려사항 | 16 |
| 5.1. 약리학 | 16 |
| 5.2. 약동학 | 17 |
| 5.3. 용량결정시험 | 18 |
| 5.4. 임상적 유효성 | 18 |

| | |
|--------------------|----|
| 5.5. 임상적 안전성 | 19 |
| 5.6. 약물감시 | 20 |
| 6. 참고문헌 | 21 |
| 제·개정이력 | 22 |

줄기세포치료제 평가 가이드라인

1. 서론

1.1. 도입

본 가이드라인의 발간 목적은 줄기세포치료제의 품질, 비임상, 임상시험자료와 관련된 특이적인 고려사항을 제시하는데 있다.

적용대상은 「생물학적제제 등의 품목허가·심사 규정」(식품의약품안전처 고시) 제2조제14호에 따른 “세포치료제”로서, ‘줄기세포를 이용한 세포치료제’이다. 여기서 ‘줄기세포를 이용한 세포치료제’라 함은 완제품의 주성분이 줄기세포인 경우나 줄기세포로부터 분화된 세포인 경우를 포함하여 투여시점에서의 분화상태와 관계없이 모든 형태의 줄기세포에 적용될 것이다. 또한 제2조제15호에 따른 줄기세포를 이용한 유전자치료제나 줄기세포 또는 줄기세포에서 분화된 세포와 지지체 등과 결합된 복합품목의 경우에도 본 가이드라인이 적용될 수 있다.

한편, 동 규정 제2조제14호에 따라 의료기관 내에서 의사가 자가 또는 동종줄기세포를 당해 수술이나 처치 과정에서 안전성에 문제가 없는 최소한의 조작(생물학적 특성이 유지되는 범위 내에서의 단순분리, 세척, 냉동, 해동 등)만을 하는 경우는 본 가이드라인에 적용되지 않는다.

동 가이드라인에서 기술하는 품질, 비임상, 임상시험자료는 품목허가 신청이나 임상시험계획승인 신청 시 제출되는 자료이다.

품목허가 시 제출자료는 「약사법」 제31조, 제35조, 제42조 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제4조, 제8조부터 제12조에 따라 세포치료제 및 유전자치료제의 제조판매(수입)품목허가 및 변경허가를 위한 심사에 관한 세부사항은 「생물

학적제제 등의 품목허가·심사 규정」(식품의약품안전처 고시)에서 정하고 있다. 동 고시 6조에서는 품목(변경)허가 시 제출되는 심사자료의 종류를 정하고 있는데, 세포치료제에 대해서는 “[별표 2] 세포치료제의 제출자료”에서, 유전자치료제에 대해서는 “[별표 3] 유전자치료제의 제출자료”에서 그 세부사항을 정하고 있다.

또한 임상시험계획승인 시 제출되는 자료는 「약사법」 제34조제7항 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조에 따라 세포치료제 및 유전자치료제의 임상시험계획승인에 필요한 자료의 작성요령, 범위, 요건 등에 대한 세부사항은 「의약품 임상시험 계획 승인에 관한 규정」(식품의약품안전처 고시)에서 정하고 있다. 동 고시 제4조에서는 임상시험계획(변경)승인 신청시 안전성·유효성과 관련하여 제출하는 자료의 범위를 정하고 있는데, [별표 1]에 따라 세포치료제 및 유전자치료제의 특성에 따라 제출자료의 범위를 판단하게 된다.

1.2. 배경

줄기세포는 자기복제 및 분화의 특성이 있으며, 생체 내 환경에 따른 특성변화, 투여 외 장소로 이동 등의 특수성으로 이러한 사항을 고려한 줄기세포치료제에 특화된 품질, 비임상, 임상 고려사항이 필요하다는 측면에서 이 가이드라인을 제시하게 되었다.

줄기세포치료제의 재생치료에 대한 기대가 높아짐에 따라, 척수강, 피하, 근육내 등 다양한 투여경로로의 적용이 늘어나고, 줄기세포치료제 기원이 자가에서 동종, 이종을 넘어 iPS(유도만능 줄기세포)로 까지 다양화 되어가고 있다. 이러한 줄기세포치료제는 세포종류별, 제조과정 등에 따라 그 위험성의 수준이 다를 수 있으며, 임상경험에 있어서도 차이가 있어 모든 종류의 줄기세포치료제를 동일한 기준으로 평가하는 것은 어렵다.

줄기세포 특수성을 고려한 품질, 비임상, 임상 고려사항을 주 내용으로 하는 “Reflection paper on stem cell-based products”가 2011년 유럽 의약품청(EMA, European Medicines Agency)에서 발간되었으며 이를 기반으로 그간 변화된 규제환경과 기술진보 사항 등을 반영하여 동 가이드라인을 발간하게 되었다.

줄기세포치료제 임상시험승인이나 품목허가를 위한 제출자료 준비 시 또는 개발단계에서 동 가이드라인을 참고할 수 있으며, 여기에서 상세하게 기술되지 않는 부분은 “임상시험용 생물약품 품질평가 가이드라인(2013)”, “세포치료제 품질관리 시험항목 설정 가이드라인(2014)”, “줄기세포치료제 종양원성 평가 가이드라인(2014)”, “줄기세포치료제 체내분포 평가 가이드라인(2014)”, “동종줄기세포치료제 면역독성 평가 가이드라인(2014)”를 참고할 수 있다.

2. 개요

2.1. 줄기세포의 정의와 특성

줄기세포는 딸세포를 생성시킬 수 있는 자가재생능과 다양한 계열의 세포로 분화할 수 있는 다분화능을 가진 세포로 정의된다. 줄기세포는 미분화 줄기세포로서 계속 증식할 수 있는 능력이 있다. 본 가이드라인의 목적에 따라, 다음과 같은 줄기세포들이 포함된다.

- 성체줄기세포
 - 조혈줄기세포
 - 중간엽줄기세포
 - 신경, 장, 피부, 폐, 근육 등의 정상적 조직 재생 및 교체에 관여하는 좀 더 제한된 분화능을 가진 조직 특이적 전구세포
- 분화된 성체세포를 재프로그래밍하여 배아줄기세포의 줄기세포성과 분화능을

재획득할 수 있도록 유도한 유도만능줄기세포, 그 중간단계의 세포

- 배반포유래 배아줄기세포

2.2. 줄기세포 종류에 따른 특성

중간엽줄기세포는 일차적으로 골수기질, 지방조직으로부터 유래한다. 또한 중간엽줄기세포는 망막, 간, 위점막, 건, 연골, 태반, 제대혈, 혈액 등의 수많은 다른 조직에서도 분리될 수 있다. 중간엽줄기세포는 플라스틱 표면에서의 부착능, 특이적 표면항체 발현, 다능¹⁾ 분화능과 같은 특성들에 의해 정의된다. 중간엽줄기세포는 분화될 계통이 정해진 세포(lineage-committed cells)로서 중간엽 계통, 주로 지방세포, 연골세포, 골세포로 분화된다. 중간엽줄기세포는 적절한 시험관 내 배양 조건에서 건세포, 신경세포, 신경교세포, 골격근세포 등으로 분화가 가능하다는 것이 알려져 있다.

조직 특이적 줄기세포는 제한된 분화능을 가지고 있으며 정상적으로는 해당 조직에 특이적인 한 종류의 세포 또는 몇 종류의 세포로만 분화한다(예, 건세포, 근육세포, 신경교세포).

조혈줄기세포는 조직 특이적 줄기세포의 한 특정 부류이다. 조혈줄기세포는 골수와 가슴샘에 존재하는 모든 조혈계통의 세포 즉, 골수성 세포와 림프구성 세포로 분화할 수 있다. 출산 시 태반과 제대혈에는 성인 골수에서 얻을 수 있는 수준의 조혈줄기세포가 존재한다. 성인에서 조혈줄기세포는 적골수(red bone marrow)에 존재하며, 말초혈액에도 순환하는 조혈줄기세포가 낮은 빈도로 존재한다. 간, 비장, 근육 등 다른 조직에서도 낮은 빈도로 존재하지만, 이들의 기원과 정상적 조혈작용과의 관련성에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 조혈줄기세포는 고용량 화학요법 또는 성장인자 투여로 혈액 쪽으로 이동된다.

1) 다능의(multipotent): 한 가지 이상의 세포 종류가 될 수 있는 능력이 있으나 분화될 계통이 정해져 있음
만능의(pluripotent): 3개 배엽으로부터 유래된 세포 등 신체의 거의 모든 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력이 있음
전능의(totipotent): 신체의 모든 종류의 세포와 태반과 같은 배외조직(extraembryonic tissue)을 구성할 수 있는 모든 세포종류로 될 수 있는 능력이 있음

유도만능줄기세포는 인위적으로 만들어진 줄기세포이다. 이 세포는 피부의 섬유아세포와 같은 성체의 체세포로부터 재프로그래밍함으로써 만들어진다. 유도만능줄기세포는 자가재생능과 만능분화능, 기형종형성능 등 배아줄기세포의 특징 중 많은 부분을 공유한다. 다른 성체세포를 이용하여 유도만능줄기세포를 생성시키는 경우도 점점 증가하고 있으며, 생성된 줄기세포의 분화능은 원료 세포의 종류와 연령에 따라 달라지는 것으로 보인다. 이 세포는 세포 특이적 조절 경로의 변화와 유전자 발현 및 후생학적 조절에 대하여 과학적으로 밝혀진 바가 적다. 이러한 특성으로 인하여 조직 키메라증이나 세포의 기능부전 등이 발생할 수 있다.

배아줄기세포는 확립된 세포주로서 시험관내 배양을 통해 유지될 수 있다. 인간 배아줄기세포는 만능분화능 세포로서 신체내에 존재하는 거의 모든 종류의 세포로 분화가 가능하다. 인간 배아줄기세포는 만능분화능과 관련된 표지 유전자들은 물론 일군의 고유한 세포표지자들로 특징지워질 수 있다. 배아줄기세포는 허용되는 숙주에 이식될 경우 내배엽, 중배엽, 외배엽 3배엽에서 유래한 다양한 형태의 세포로 구성된 기형종(teratoma)을 형성한다. 배아줄기세포는 배양 배지에 외부 인자를 추가하거나, 유전적 변형을 통해 시험관내에서 분화될 수 있다. 그러나, 시험관내 분화는 종종 다양한 정도의 비균질성 세포군을 만든다.

3. 품질고려사항

3.1. 일반적 고려사항

줄기세포기반제제는 단일 복제 세포군 또는 여러 종류의 세포로 구성될 수 있으며, 다양한 분화능을 가진 세포들과 여러 분화 단계에 있는 세포들이 복잡하게 혼합된 상태로 구성될 수도 있다. 줄기세포의 생체내 분화능과 작용기전은 시험관내 배양의 처리방법, 배양 조건과 배양 기간에 따라 달라질 수 있다. 배지조성(예, 성장인자 또는 혈청 사용), 분리방법, 배양 세포 포화정도(cell confluence) 등

의 요인들은 세포 조성 및 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있다. 줄기세포기반제제는 이와 같은 분화유연성과 제품별 특수성을 가지고 있기 때문에, 명확히 정의되고 특성이 잘 규명된 줄기세포를 이용하여 비임상연구와 임상연구를 실시하는 것이 필수적이다. 임상치료용 줄기세포기반제제는 최종 제품의 품질을 일관되고, 재현성 있게 보장하기에 충분한 수준으로 품질관리가 이루어질 수 있도록 확고히 구축된 제조과정을 통해 생산되어야 한다.

인간 배아줄기세포와 유도만능줄기세포는 종양발생 위험이 있기 때문에 반드시 환자에게 투여하기 전에 계통 특이적으로 분화된다는 것을 확인해야 한다.

3.2. 원료물질

생산과정에서 사용된 원료(raw material)를 포함하여 세포주 확립 및 세포은행에 관한 이력은 면밀하게 문서화할 필요가 있다. 오염의 위험을 최소화하기 위해, 세포은행, 원료물질 확인 과정 및 제조 초기 단계에서 세포와 원료물질의 바이러스 및 전염성 해면상뇌증에 대한 안전성은 반드시 언급되어야 한다.

줄기세포를 분리하기 위한 원료물질(starting material)의 기원과 채취과정은 최종 세포군의 수득률과 동질성/순도와 관련하여 필수적인 부분으로 간주된다. 따라서 분리조건을 표준화하고 세포군, 이질성, 수득률을 조절하기 위해서는 적절한 표지자를 선택하는 것이 중요하다.

3.3. 제조공정

제조과정은 원료에 따라 종종 다음과 같은 단계를 포함한다.

- 명확히 정의되고 특성이 잘 규명된 세포부유액을 생산하기 위해, 다양한 단계에서 조직이나 세포를 채취하고 처리하는 과정
- 마지막 단계까지 분화된 세포의 재프로그래밍(iPS)

- 분화되지 않은 세포의 성장을 위한 조건하에서의 증식
- 시험관내 세포분화
- 의도적인 생물학적 활성을 가지는 세포군의 선별(예, 미분화 상태의 만능분화능 세포 제거, 면역선택)

생체 외에서 줄기세포를 증식 및 분화시키는 과정은 상당한 수준의 조작으로 간주된다. 증식된 줄기세포는 종종 분화된 상태로 투여된다. 그러나, 다분화능이 있는 줄기세포의 경우 증식 후 특정 계통으로의 분화가 결정되기는 하였지만 아직은 미분화상태이면서 증식가능한 세포의 형태로 투여될 수 있다는 것이 알려져 있다. 이 경우에는 종양발생 가능성이 있어 개발 중 추가적인 안전성 시험이 요구될 수 있다. 세포의 형질전환과 종양 형성의 위험을 최소화하기 위해 적절한 시험평가가 반드시 수행되어야 하며, 특히 배아줄기세포와 유도만능줄기세포의 경우에 더욱 필요하다.

해당 분화 공정이 의도한 용도에 부합되는지를 확인하기 위해 중요한 제조단계에서는 관련성 있는 표지자를 이용하여 품질관리를 실시하여야 한다. 또한 제품 특성에 따른 위험 요소가 있는 제조과정을 고려해야 한다.

3.4. 제조공정 검증

제품 공정을 개발·검증하는 과정 동안, 제품의 안전성을 보장하기 위해 핵심적인 생산 단계에서 유전적 불안정성, 종양원성, 의도된 세포군과 의도되지 않은 세포군의 분포양상 등 세포의 표현형 등의 시험관 평가(*in vitro*)가 수행되어야 한다. 기존 세포군 중 특정 세포에 영향을 미칠 수 있는 성장인자와 시약을 사용하는 경우는 특별한 주의를 기울여야 한다.

3.5. 특성분석과 품질관리

3.5.1. 확인

줄기세포의 확인은 자기복제능(증식능)과 특이적 표지자의 발현으로 정의된다. 여러 세포군의 혼합체(예, 골수, 지방조직, 제대혈)가 종종 원료물질이 되기도 하며, 원료물질의 채취 및 제조 과정은 최종 세포군에 현저한 영향을 미칠 수 있다. 따라서 의도한 세포군의 확인/치료효과를 내기 위한 최종 세포군의 불균일성 양상은 면밀하게 정의되고 특성규명이 이루어져야 한다.

세포의 종류, 만능분화능, 분화계통, 최종 분화를 나타내는 여러 종류의 세포 표지자 그리고/또는 기능성을 확인하기 위한 시험법 등이 세포의 확인에 이용될 수 있다. 그러므로 세포확인을 위한 표지자 또는 표지자 조합은 의도된 세포에 특이적이어야 하며 치료의 생물학적 또는 분자학적 기전에 대한 이해를 기초로 해야 한다. 세포의 확인에 이용되는 표지자 조합을 이용하여 세포의 종류와 다양한 분화상태를 구분할 수 있다면 가장 이상적일 것이다. 단백질 표지자 발현과의 상관성이 검증되어 있다면 mRNA 기반 표지자도 이용될 수 있다.

3.5.2. 순도

세포 유래 의약품의 순도관리는 제조과정 중 유입가능성이 있는 비세포성 불순물, 최종 제품의 전반적 기능에 필요하지 않는 세포잔해 또는 세포와 같이 바람직하지 못한 특성을 최소화하는 것과 관련되어 있다. 따라서, 활성 성분을 극대화하고 치료적 활성에 기여하지 않거나 치료 활성/안전성에 부정적 영향을 주는 부분은 최소화하는 것을 목표로 해야 한다. 적절한 순도 기준은 제품 개발과정의 일부분이기도 한 특성규명 연구를 통해 확립될 것을 기대한다. 순도라는 개념은 반드시 동질성을 의미하는 것은 아니다. 예를 들어 줄기세포는 선택적 표면 표지자가 확립되어 있지 않은 경우 세포 분리 및 농축이 쉽지 않을 수 있다. 그러나 적어도 제품의 품질에 일관성이 있다는 것은 입증해야 한다. 이를 위해서는 원료의

선택과 준비, 적절한 공정 관리, 출하 검사법의 개발 및 선택 등의 통합적 전략이 필요하다.

3.5.3. 역가

줄기세포치료제의 역가 시험법은 의약품의 과학적 근거와 의도한 용도에 맞는 세포의 분화상태 등에 근거하여 개발되어야 한다. 역가 시험법은 제품에 따라 다양하며 기능검사와 표지자에 근거한 검사가 모두 해당될 수 있다. 이상적인 역가 시험법은 최소한 준정량적 검사이면서 의도된 치료 효과와의 관련성을 보여야 한다. 기능적, 표현형적 가소성이 있는 혼합 세포군이 치료적으로 요구되는 경우, 역가시험법은 각기 다른 세포군의 표현형적 양상에 대한 자료가 보장되어야 한다. 작용 및 치료효과를 나타내는 생물학적 또는 세포 기전을 이해하는 것은 신뢰성 있는 역가 시험법을 개발하기 위한 기초가 된다.

생물학적 활성/ 역가 시험법의 예:

- 생물학적으로 관련성이 있는 물질의 발현(예, 재조합 단백질, 지단백 및 당단백, 성장인자, 효소, 싸이토카인)
- 세포/세포외기질/구조의 형성
- 세포 상호작용(예, 면역 활성/억제)
- 분화/자기복제능 / 이동의 측정

동물을 이용한 기능학적 평가법은 줄기세포치료제의 생물학적 활성에 있어서 폭넓은 시각을 제공할 수 있으며, 제품개발 단계에서 품질평가 및 비임상 연구 모두에 사용되어야 한다. 이와 같은 시험법들은 검사에 소요되는 시간적 제한이 있을 수 있으므로, 항상 출하 검사가 적합하지 않을 수도 있다. 따라서 줄기세포치료제의 역가를 확인하기 위해서는 몇 가지 다른 형태의 검사방법을 조합하는 것이 필요할 수 있다.

3.5.4. 유전적 안정성

모든 세포는 세포분열을 거듭할수록 DNA 복제기능의 불완전성으로 인해 유전적 안정성에 문제가 발생하게 될 가능성이 높아진다. 줄기세포의 경우에도 세포의 성장주기에 걸쳐 유전체에 변이가 발생하는 경향이 증가하며, 이로 인하여 발생된 유전자 변이의 축적은 종양발생의 가능성을 예측할 수 있는 주요 요인으로 알려져 있다.

줄기세포를 치료제로 개발하기 위해서는 여러 계대의 증식 등을 포함하는 체외조작이라는 과정을 거치게 되며, 체외조작 과정의 여러 환경이 줄기세포의 유전적 안정성을 감소시키는 요인으로 작용할 수 있다. 따라서 줄기세포치료제 개발을 위해서는 유전정보가 손상을 입지 않고 얼마나 안정적으로 유지되는지 확인하는 것이 품질관리에 있어서 매우 중요하다.

줄기세포치료제의 유전적 안정성을 확인하기 위해서는 아래에 소개된 전통적인 세포유전학적 분석법 또는 최신 유전체기반 분석법을 모두 이용할 수 있다. 세포유전학적 분석법과 유전체 기반 분석법 모두 장단점을 가지고 있어, 각 분석법의 한계를 보완할 수 있는 적절한 시험법의 조합을 통해 줄기세포치료제의 유전적 안정성을 확인할 것을 권장한다.

가. 세포유전학적 분석법

가장 보편적인 시험법으로 세포를 배양하여 분열중기의 세포에서 염색체의 수적, 형태학적 이상을 관찰하는 핵형분석(karyotyping)이 있다. 핵형분석은 현미경으로 관찰 가능한 약 5MB 이상의 염기서열의 변이가 있어야 검출이 가능하다.

핵형분석법의 개선된 형태인 다색상 형광제자리분석법(multicolor Fluorescence in situ hybridization)은 형광색소의 조합을 적용하여 모든 염색체를 번호에 따라 서로 다른 색으로 구분할 수 있도록 하는 방법으로 미세한 염색체 전위나 삽입, 표지 염색체를 비교적 쉽게 찾을 수 있으나, 동일 유전자 내의 이상(예:역위 등)은 찾아내기 어려운 단점도 있다. 주해상도는 약 2MB 정도로 전통적 핵형분

석법보다는 높은 편이다.

이러한 방법들은 해상도가 낮은 방법으로 줄기세포치료제의 유전적 안정성을 확인하기 위하여 단독으로 사용하기 보다는 높은 해상도를 지닌 마이크로어레이 기반 비교유전체부합법(CGH array) 등 유전체기반 분석법과 상호보완적으로 사용하는 것이 바람직하다.

나. 유전체기반 분석법

마이크로어레이 기반 비교유전체부합법(Comparative Genomic Hybridization array, CGH 어레이)은 분석하고자 하는 검체와 정상 참고검체에서 추출한 DNA를 서로 다른 형광물질로 표지하여 수천 내지 수백만 개의 탐색자에 경쟁적으로 반응시킨 후 부합된 형광 강도의 비율을 이용하여 유전자의 양적 변화(copy number variation, CNV)를 검출하는 방식이다. 300kb에서 1Mb 정도의 미세한 염기서열 이상도 검출할 수 있는 높은 해상도를 가진 분석법(400kb이상의 해상도를 사용할 것을 권장)이다. CGH 어레이는 해상도는 높으나 민감도가 낮다는 한계가 있으므로 유전적 안정성을 확인하기 위해서는 핵형분석 등과 상호보완적으로 사용하는 것이 바람직하다.

최근 차세대 염기서열 분석법이 대중화됨에 따라, 이를 이용한 유전적 안정성 분석도 가능하게 되었다. 전체엑솜염기서열분석(Whole exome sequencing, WES)은 단백질 합성 정보를 가진 엑손에 대한 염기서열을 분석하는 방법으로 전체 유전체의 약 1%(약 3Mb)가 엑손에 해당한다. 전체엑솜염기서열분석은 전장유전체염기서열분석법(Whole genome sequencing, WGS)에 비하여 경제적인 방법으로 암 및 질병 관련 유전자 발굴에 사용될 수 있다. 전장유전체염기서열분석법은 전체 유전체의 염기서열을 분석하여 세포의 돌연변이 및 복제수 변이를 분석하는 방법으로 엑손 뿐만 아니라 인트론도 분석 가능하고 추가적으로 말단부위 완전성(telomere integrity)과 미토콘드리아 유전자 분석도 가능하다. 그러나, 줄기세포치료제의 유전적 안정성 확인을 위해서는 일반적으로 염기서열 분석에 사용되는 30X 분석 심도(read depth)는 민감도가 충분하지 않으며 이보다 높은 민감도가 필요하다.

유전자 패널검사를 이용한 분석의 경우 1000X 이상의 분석심도를 확보할 수 있으며, 분석한 염기서열 데이터를 표준염기서열에 맵핑하고 기준을 정하여 신

퇴할 수 있는 염기서열 변이 정보를 추출함으로써 단일염기서열변이나 짧은 삽입/결실을 확인할 수 있다. 특히, 암유전자 및 암억제유전자에서 관찰된 변이가 암유발성을 의미하는 아미노산의 변화 및 단백질 구조에 영향을 미치는 지를 판단하여 변이의 영향력을 판단하는 방법으로, 패널에 포함되어야 하는 유전자의 타당성이 설명되어야 하며, 패널에는 종양관련유전자를 분석대상에 포함하는 것이 필수적이다.

4. 비임상 고려사항

줄기세포치료제의 비임상 평가는 분화된 세포만 포함하는 다른 세포유래 의약품의 비임상 평가에 비해 좀 더 광범위하게 실시될 필요가 있을 수 있다. 개념의 증명, 생체내 분포, 면역 거부반응과 안전성과 같은 여러가지 측면에서 적절히 평가하기 위해 타당한 경우 적절한 동물종 1종에 대해서 실시할 수 있다. 시험관내 모델(in vitro models)은 어떤 특별한 측면을 다루기 위한 목적으로 부가 시험으로서 이용될 수 있다.

비임상 평가는 임상평가에서 예상되는 충분한 독성정보를 확보하여야 하며, 임상시험에 필요한 안전한 용량 및 용법을 확보했는지를 입증하는 평가과정이다.

4.1. 동물모델

질환모델처럼 치료적 적응증을 반영하는 동물 모델이 존재한다면 이상적이겠지만 실제로 그와 같은 동물모델을 활용할 수 있는 경우는 제한적일 수 있다. 동물모델 및 동물 종을 선택할 때에는 과학적 타당성을 근거로 해야 한다. 상황에 따라 소동물 모델은 외과적 세포 이식 후 장기간에 걸친 조직의 재생과 복구, 안전성을 평가하는 목적으로는 유용하지 않을 수도 있다. 이런 경우에는 대동물 모델이 선호될 수 있다. 동물의 크기, 생리학적 측면 및 면역체계 등이 연구하고자 하는 임상적 효과(예, 조직재생)와 상관성이 있는 경우에는 대동물 모델이 필요할 수도 있다.

평가하고자 하는 특이적인 안전성 측면이 무엇인지에 따라 가장 상관성이 높

은 동물모델을 선택해야한다. 가능한 경우에는 인간세포로 만들어진 세포유래 의약품을 개념 증명연구 및 안전성 연구에 사용해야 한다. 이와 같은 연구에는 면역저하동물 그리고/또는 면역억제 동물(유전적으로 면역저하 그리고/또는 면역억제제 투여함으로써 면역억제 유도)이 종종 필요한 경우도 있다. 그러나 이식된 세포의 지속성이나 기능 등의 측면에서 이식된 세포의 생체내 활동을 예측하기 위한 목적으로는 인간세포를 이용한 방법이 최적의 방법이라고는 할 수 없다. 동종 동물모델은 개념 증명에 있어서 가장 상관성이 높은 시스템으로 활용될 수도 있다. 그러나, 동물줄기세포와 인간줄기세포가 서로 어느 정도로 유사한가 하는 문제 또는 분화과정에 관련된 인자가 불확실한 측면이 있어 이러한 모델을 이용하는 데에는 한계가 있을 수 있다. 따라서 동종 모델을 이용하여 얻은 결과는 신중하게 해석해야 한다. 만일 동종모델만을 이용하여 연구한 경우에는, 인간과 동물 줄기세포간의 차이가 있을 가능성이 남득 가능해야 하고, 결과를 해석할 때 이러한 부분이 고려되어야 한다.

인간 줄기세포치료제와 관련된 일부 안전성 문제들은 반드시 다루어져야 한다. 줄기세포 치료제가 기형종 및 종양을 형성할 가능성을 평가하는 데에는 유전적으로 면역저하된 동물모델이나 인간화 동물모델(예, 인간화 면역체계를 가진 동물)이 선호된다. 면역활성이 있는 동물모델에서는 숙주의 면역체계가 투여된 줄기세포치료제를 거부/파괴하여 체내 생착이 실패함에 따라 종양원성 연구에서 위음성 결과가 초래될 수도 있지만, 면역억제제의 투여는 면역억제제가 가진 본연의 특성 때문에 종양 형성에 영향을 미칠 수도 있다.

세포의 지속성과 기능을 고려하여 장기적 효과를 평가하기에 적절한 동물모델과 연구기간을 선택해야 한다.

비임상시험 항목에 따라 줄기세포치료제 종양원성 평가 가이드라인(2014.9), 줄기세포치료제 체내분포 평가 가이드라인(2014.9), 동종줄기세포치료제 면역독성 평가 가이드라인(2014.9) 등을 참조한다.

4.2. 생체내 분포와 미세환경(niche)

현재 방법상의 한계 때문에 인간을 대상으로 한 연구로부터 생체내 분포에 관한 충분한 정보를 얻기는 어렵다. 따라서 줄기세포의 생체내 분포에 관한 비임상 연구는 매우 중요하다. 생체내 분포 연구는 줄기세포의 운명이 다단계과정을 거친다는 것을 고려하여 설계해야 한다(특히, 이동, 미세환경, 생착, 분화, 지속성). 표지 유전자 도입 또는 세포 표지 등 줄기세포를 추적하기 위한 적절한 방법이 적용되어야 하며 가능한 정량적인 분석법을 선택해야 한다.

줄기세포의 분화와 기능은 미세환경에 의해 좌우되며 영향을 받는다. 또한 생체내 분포는 투여경로나 이식부위에 따라 크게 달라진다. 많은 종류의 줄기세포들은 귀소성 경향을 가지고 있어 원래 유래한 조직으로 이동하거나 골수유래 중간엽 세포의 경우 손상부위로 이동하는 것처럼 멀리 떨어진 장소로 이동하기도 한다. 중간엽줄기세포는 전이성 부위에 위치하는 것이 발견되기도 하였다.

이소조직(ectopic tissue)이 형성될 잠재적 위험도는 생체내 분포는 물론 줄기세포치료제의 분화 가능성과도 관련되어 있다. 대체로 세포를 전신투여하는 경우 먼 거리까지 분포할 수 있기 때문에 이와 같은 위험성이 증가하게 된다. 또한, 생체내에서 이동한 세포에 의해 이소조직이 형성될 위험성 외에도 국소적으로 발생하는 비생리적 반응이나 독성효과도 발생할 수 있다. 이소조직이 형성된 경우에는, 그 형태와 빈도, 해부학적 부위와 기원 등이 고려되어야 한다.

4.3. 종양원성

종양형성의 위험성은 세포의 기원, 조작의 정도, 투여경로 및 투여부위에 따라 다양하게 나타날 수 있다. 분화상태, 만능분화능, 분화계통 결정도, 배양조건 등은 관련 위험성을 확인하는 데에 있어서 중요한 의미를 가지고 있는 요인들이다.

내재되어 있는 종양형성 위험성에 있어서 만능분화능 줄기세포(iPSC와 hESC)

와 체세포성 줄기세포(MSC, HSC) 간에는 명백한 차이가 있다. 기형종 형성은 만능분화능 줄기세포가 가진 고유한 특성으로, 해부학적으로 민감한 부위(예, 중추신경계)에서 생성될 경우 안전성이 우려된다. 미분화 상태의 만능분화능 줄기세포는 악성 기형암종을 유발할 가능성도 있다.

품질평가 부분에서도 언급되었지만, 인간 배아줄기세포 및 유도 만능줄기세포에서 유래된 경우는 물론 상당한 수준의 체외 조작을 거친 줄기세포치료제의 경우 최초 임상연구를 실시하기 전에 종양원성과 유전적 안정성을 평가해야 한다. 종양원성 연구 수행을 위해 가장 적절하고 민감한 모델을 선택하기 위해서는 생물학적 특성과 체외 조작 조건, 세포의 지속성, 투여경로, 줄기세포치료제의 의도된 용도 등을 고려해야 한다. 종양원성의 평가는 만성 질환/독성연구에서 함께 실시할 수 있다. 잔여 만능분화능 세포가 환자에게 투여되는 경우 비임상 수준에서 얻어진 자료들을 통합하는 한편, 종양발생의 위험을 최소화하고 암발생을 피하기 위한 임상적인 전략이 제시되어야 한다.

4.4. 생체내 분화

요구되는 작용기전을 체내에서 구현하기 위해서는 생체내 분화과정과 기능이 신중하게 연구되어야 한다. 줄기세포는 의도된 부위에서 기대한 방향으로 분화하지 않을 수도 있다. 예를 들어 심장이나 혈관계통으로 분화되기를 기대했던 중간엽줄기세포가 심장에서 석회화를 유도하는 것으로 발견된 예도 있었다.

4.5. 면역거부와 지속성

배아줄기세포와 조혈줄기세포 이식에서는 공여자와 수혜자간의 조직적합항원(HLA)의 일치 여부를 면밀히 확인할 필요가 있지만, 중간엽줄기세포는 일반적으로 면역 관용을 가지고 있는 것으로 간주되고 있다. 동종 중간엽줄기세포는 면역활성이 있는 설치류 모델에서 면역원성을 가지고 있어 말초혈액으로부터 신

속하게 제거되는 것으로 알려져 있음에도 불구하고, 소수이지만 중간엽줄기세포는 수주에서 수개월까지 잔존하는 것으로 연구결과가 발표된 바 있다. 따라서, 중간엽줄기세포의 지속성을 평가하는 연구를 실시하는 것이 권장되며, 줄기세포 제거의 위험성 평가를 위해 투여된 세포 제제에 대한 염증/면역반응의 가능성은 반드시 평가되어야 한다. 줄기세포치료제에 대하여 발생할 수 있는 면역반응의 가능성을 반드시 측정하고 기술해야 한다. 예를 들어 중간엽줄기세포를 통해 일시적으로 면역이 억제되는 동안과 같이 제한된 기간 동안의 지속성을 의도한 경우에는 면역거부반응이 용인될 수도 있겠지만, 다른 경우에 있어서는 면역거부반응으로 인해 의도된 장기적 효과를 얻지 못할 수도 있다. 활성화된 면역세포가 포함되어 있을 가능성이 있는 혼합 줄기세포치료제를 특수한 부위에 혹은 면역 관용부위에 투여하는 경우 투여 결과는 신중하게 평가해야 한다.

5. 임상 고려사항

일반적으로 임상 개발 계획은 의약품 임상시험 실시에 필요한 일반 원칙을 따라야 한다.

사람에게 투여하기 전에 적절한 동물모델에서 줄기세포치료제의 안전성과 치료원리를 입증할 수 있는 비임상적 근거들이 요구된다. 이런 비임상적 근거는 체외에서 줄기세포에 많은 조작이 가해졌거나, 전신적으로 투여되는 경우에 특히 더욱 중요하다. 적합한 동물 모델을 찾기가 어려운 경우처럼 비임상 연구를 통하여 충분한 작용원리 및 안전성을 입증할 수 없을 때에는, 실제 임상연구에서 유효성과 안전성 각각에 대한 결과변수들을 더 추가함으로써 그 증거들을 확보해야 한다. 또한, 최초로 인체를 대상으로 하는 임상연구들의 경우에는 임상시험용 의약품을 처음으로 사람에게 투여하는 임상시험에서 발생할 수 있는 위험성들의 확인 및 경감 전략에 관한 원칙을 고려해야 한다.

이러한 의약품들에는 특이적 안전성과 장기 유효성이라는 두 가지의 특이적 임상 관련 문제들이 문제가 된다.

5.1. 약력학(Pharmacodynamics)

임상시험은 임상연구가 진행되는 동안 확인된 작용기전을 입증할 수 있는 근거를 제시할 수 있어야 함은 물론, 안전성과 유효성을 입증할 수 있도록 설계되어야 한다. 이러한 작용기전은 줄기세포군, 세포로부터 분비되는 물질들, 숙주 조직에서의 생착과 같은 요인들에 따라 달라질 수 있다.

줄기세포는 체내에 투여되는 시점에서 다양한 분화단계로 존재할 수 있다. 선택된 생물학적 표지자들은 줄기세포치료제가 체내에 투여된 후 생체내 모니터링을 용이하게 하는 것은 물론, 환자에게 투여하는 시점에서의 줄기세포 분화 상태 확인을 가능케 하는 것이어야 한다.

유효성과 안전성을 추적 관찰하는 방법으로 세포치료제의 경우에는 약리학적, 면역학적, 그리고/또는 대사학적인 효과와 관련되어 있으며, 다른 한편으로는 조직공학제품의 경우 재생, 복구, 그리고/또는 대체 효과와 밀접하게 관련되어 있음을 유념해야 한다.

적합하게 상응하는 동물모델이나 다른 적절한 전임상 모델이 없는 경우에는, 염증, 허혈처럼 변형된 미세환경이 줄기세포치료제에 미치는 영향을 평가하기 위한 추가적인 임상적 평가변수를 설정할 필요도 있다.

5.2. 약동학(Pharmacokinetics)

알려져 있는 것처럼 인간을 대상으로 생체 분포 연구를 수행하는 것은 적절한 기술의 부재로 어려운 실정이다. 그러나 치료제가 가지고 있는 위험성 양상, 투여 방법과 투여 부위에 따라 생체분포 연구는 중요할 수 있으므로, 생체분포연구가 실시되지 못한 경우에는 정당한 이유가 제시되어야 한다. 임상의뢰자는 임상연구 중 투여된 세포를 추적할 수 있도록, 인간을 대상으로 생체내 분포 연구를 위한 새로운 비침습적인 방법을 개발하고 검증할 것이 권장된다. 가능성이 있는 표

지자와 추적자들은 평가를 거쳐 사용의 정당성이 확인되어야 한다.

투여된 줄기세포가 의도한 부위 외의 다른 부위에 존재하는지 여부를 확인해야 한다. 투여방법, 투여 용량/세포 수에 따른 영향은 비임상연구에서 다루어져야 하고, 임상연구 기간 동안에 확실히 검증되어야 한다. 줄기세포치료제는 생체 내 효과를 나타내기 위해 필요한 세포군을 정확히 규정하기 위해서, 임상적 결과가 나타나기까지의 시간, 그리고 관련성이 있는 경우 생착되기까지의 시간 등을 평가하는 것이 중요하다.

줄기세포치료제의 특성 중 하나는 자가증식능을 가지고 있어 시간의 경과에 따라 세포 수가 증가할 수도 있다는 것이다. 따라서, 유해성을 가진 증식가능한 세포가 극소수 포함되는 경우와 같은 매우 경미한 수준의 오염도 임상적으로는 중요성을 가질 수 있기 때문에, 면역 억제 동물모델이나 구조적으로 면역 결핍된 동물을 이용한 비임상 연구, 그리고/또는 적절한 임상적 추적관찰을 통해 다루어질 필요가 있을 수도 있다는 이론적 우려가 제기되어오고 있다.

5.3. 용량결정시험

치료에 사용되는 줄기세포 또는 줄기세포 유래 세포들의 유효 투여 범위는 용량 결정 연구를 통해 정하거나, 용량 결정근거에 대한 타당성이 입증되어야 한다. 안전하고 효과적인 치료 용량이 반드시 확인되어야 하고, 가능한 경우에는 최소 유효성 용량도 결정되어야 한다.

중추신경계, 심근 등과 같은 취약한 부위에 투여되는 경우 통상적인 투여용량 결정시험을 실시하는 것은 실현 가능성이 낮으므로, 안전성에 관한 비임상 연구 결과들을 근거로 타당성이 입증된다면, 치료 효과를 나타낼 수 있는 용량으로 초기 사람대상 임상시험을 진행하는 것이 적절할 수도 있다.

5.4. 임상적 유효성

일반적으로, 유효성 연구를 위한 임상시험들은 목표로 하는 적응증과 관련하여

활용가능한 가이드라인을 따라야 한다. 또한 제품의 약력학 효과와 관련하여 임상적으로 의미있는 평가변수들이 사용되어야 한다.

재생의학 분야에서는 조직의 재생, 복구, 대체와 관련된 연구를 위해서, 적절한 구조적, 형태학적 평가변수들이 추가적으로 필요할 수도 있는 것으로 받아들여지고 있다.

만약 핵심적인 임상 연구들이 동일한 적응증의 다른 의약품 임상 연구들과 확연히 다르다면, 시판허가 신청의 관점에서 줄기세포치료제의 개발 계획을 최적화하기 위해 임상신청자(applicant)는 식약처와 함께 임상연구 설계 및 평가변수들에 대해 논의하는 것이 권장된다.

시판 후 장기 안전성과 유효성의 추적관찰 평가의 필요성과 기간은 비임상 및 임상평가 결과를 토대로 정해져야 한다.

5.5. 임상적 안전성

일반적으로 안전성 요건과 관련하여서는 다른 의약품들과 동일한 기준이 적용된다. 줄기세포치료제의 경우에는, 다음과 같은 고유한 위험 인자들을 고려하여야 한다.

인간 배아줄기세포가 가진 기형종(teratoma)형성능은 중대한 안전성 문제이다. 중추신경계, 관절, 또는 심근내 심장전도계통 등 해부학적으로 민감한 위치에 기형종이 형성될 경우 특히 심각한 위험을 초래할 수 있기 때문이다. 마찬가지로 목표했던 장소를 벗어나 다른 조직에서 생착될 수 있는 위험성에 대해서도 다루어야 한다.

종양 형성이 관찰될 경우 이것이 투여된 세포치료제 때문인지 아니면 내인적 요인으로 인해 종양이 생긴 것인지 조사되어야 한다. (예, 유전학적 분석)

또 다른 안전성 문제는 원하는 특성을 지닌 세포군으로 분화를 유도하거나 최종제품으로부터 원치않는 세포를 제거할 목적으로 아무리 효과적인 공정을 이용한다 하더라도, 유도만능줄기세포/인간배아줄기세포 등이 가지고 있는 세포들의 자가증식능으로 인하여 어떤 종류의 줄기세포치료제에도 충분한 분화유연성을 가진 일부 세포가 잔존할 수 있다는 점이다.

환자 체내에 순환하는 줄기 세포의 수는 생리학적인 수준보다 훨씬 더 많을 수 있으며, 이와 같은 세포들이 신체내 분포로 비정상적 상태가 초래되므로 과잉의 순환줄기세포는 안전성에 대한 우려를 내포하고 있을 수 있다. 정맥내 주입하는 경우 투여시기는, 전임상 생체분포연구에서 얻어진 결과를 근거로 정해져야 하고, 목표 조직/기관이 아닌 곳에서 세포치료제가 존재하는 것을 최소화할 수 있도록 최적화되어야 한다.

줄기세포치료제가 단일한 종류의 비임상 동물모델만을 이용하여 개발되고 균일한 조건에서만 모든 세포, 분자간의 상호작용이 기능을 발휘하는 것으로 확인된 경우에는 주의가 필요하다. 사람을 대상으로 한 연구가 처음으로 실시되는 단계에서는, 이론적인 고려사항들을 근거로 하여 안전성을 확인하고, 최종 제품에 함유되어 있을 가능성이 있는 오염물질로 인해 발생할 수 있는 독성을 조기에 발견하기 위해, 특정한 안전성 평가변수들이 요구될 수도 있다.

안전성 추적조사는 유효성 추적조사와 함께 실시될 수 있다. 임상적 안전성과 유효성은 몇 년이 경과한 후에나 명백하게 드러날 수 있기 때문에, 적절한 대리 평가변수들의 검증이 필요할 수도 있다.

5.6. 약물감시(Pharmacovigilance)

효능 부족을 포함하여 특이적인 안전성 문제들은 장기간의 추적 관찰조사를 통해 평가해야 한다. 추적관찰기간은 의도된 치료효과에 따라 정해져야 하며, 장기간 안전성과 줄기세포 투여 시 생길 수 있는 고유한 위험성들을 평가할 수 있는 위해성관리계획(Risk Management Plan) 등 특이적인 감시계획이 포함되어야 한

다. 장기간 효능이 요구되는 조직 공학 제품들은 연장된 기간 동안의 시판 후 추적관찰조사가 요구될 수도 있다.

6. 참고문헌

1. 첨단바이오의약품 심사평가 기반 연구(식품의약품안전평가원, 2012~2014 연구사업)
2. EMA, Guidance: Reflection paper on stem cell-based products (2011)
3. 세포치료제 품질관리 시험항목 설정 가이드라인(식품의약품안전처, 2014)
4. 줄기세포치료제 종양원성 평가 가이드라인(식품의약품안전처, 2014)
5. 줄기세포치료제 체내분포 평가 가이드라인(식품의약품안전처, 2014)
6. 동종줄기세포치료제 면역독성 평가 가이드라인(식품의약품안전처, 2014)
7. 차세대 줄기세포 기반제제 평가 연구(식품의약품안전평가원, 2014~2017 연구사업)

제·개정 이력

줄기세포치료제 평가 가이드라인

| 제 · 개정 번호 | 승인 일자 | 주요 내용 |
|---------------|----------|---------------------|
| B1-2014-3-020 | 2014. 12 | 줄기세포치료제 평가 가이드라인 제정 |
| | 2018. 11 | 3.5.4. 유전적안정성 항목 개정 |

줄기세포치료제 평가 가이드라인

| | |
|------|--|
| 발행일 | 2018월 11월 |
| 발행인 | 식품의약품안전평가원장 이선희 |
| 발행위원 | (제정) 신원 최미라 김지현 최경숙 김태균 김성민 한의리 진미령 최민정 박송희 이정은 김동윤 장미희 서수경 류승렬 이보연 (개정) 정호상 최경숙 이정은 안치영 박기대 김호 |
| 발행처 | 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료 제과 |
