

AITOX의 신약 개발 및 비임상 컨설팅보고서

**"All models are wrong, but some are useful.
And more useful when integrated"**

George E. P. BOX & AITOX

Prepared for:

Prepared by: AITOX

Yeong-Chul Park (Ph.D. in Toxicology)

detox35@hanmail.net

+82-10-5502-3388

www.aitoxkorea.com

Business registration number: 227-09-52576

Address: (18467) 1219-ho, 102-dong, Hillstate Dongtan Station Multifryer, 676
Dongtan-daero, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Repulic of Korea

(18467) 경기도 화성시 동탄대로 676 힐스테이트 동탄역 멀티프라이어 102동 1219호

<차례>

1. 성공적인 IND와 Gap analysis에 대한 이해 - 1
2. 다양한 약물 모달리티와 비임상시험에서 고려할 사항 - 3
3. 바이오로직스의 출현에 따른 비임상시험에서 고려할 사항 - 7
4. 바이오로직스의 출현으로 독성학의 혼란스러운 미래 - 8
5. 독성학의 2가지 가설과 독성학의 추구 방향 - 11
6. 파라셀수스 가설에 대한 반론과 증명 - 12
7. 기전독성학(mechanistic toxicology) 측면에서 파라셀수스 가설에 대한 반론 - 13
8. 친전자성대사체로 전환되는 모든 물질은 신약으로의 개발이 불가능할까? - 20
9. 파라셀수스 가설에 대한 기전독성학(mechanistic toxicology) 측면의 결론 - 22
10. 규제독성학 측면에서의 파라셀수스 가설에 대한 반론 - 23
11. 기술독성학(descriptive toxicology) 측면에서의 파라셀수스 가설에 대한 반론 - 25
12. "독성학에서 Paracelsus 가설에 대한 반론과 증명"에 대한 기타 의견 - 34
13. 급성독성 유발 물질과 Cytochrome P450의 관계 - 36
14. 파라셀수스의 가설에 대한 반론에 대한 결론 - 43
15. MRSD 설정에 있어서 SF 적용의 국내외적 차이 - 44
16. 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma - 47
17. 직접작용화합물(direct-acting chemical)의 특성 - 50
18. 직접작용화합물과 Aptamer-mitomycin C conjugates(ApDC) - 53
19. 직접작용화합물을 이용한 2차 발암 예방을 위한 항암제 개발 - 57
20. 항암제 화학요법의 내성과 암세포 전이를 촉진하는 glutathione(GSH) - 61
21. Glutathione을 활용한 독성대사체 스크린과 신약개발에 활용 - 65
22. 세포노화 지연과 암세포 내성-전이를 촉진하는 glutathione(GSH) - 69
23. 간접작용화합물(indirect-acting chemical)의 특성 - 74
24. 아스트라제네카의 티루캡.파클리탁셀 병용요법 실패에 대한 독성학적 고찰 - 75
25. 아스트라제네카의 티루캡.파클리탁셀 병용요법의 임상 실패에 대한 소견과 방향 - 78
26. Central dogma와 cytochrome P450 cycle - 83
27. ROS 생성의 생체 내 최대 세포소기관 mitochondria에서의 Uncoupling 현상 - 85
28. Cytochrome P450의 Uncoupling 현상 - 88
29. Cytochrome P450의 Uncoupling 현상과 NASH와의 관계 - 91
30. 덴마크 "위험한 맛" 불닭볶음면 리콜에 대한 소견 - 94
31. 3가지 독성대사체와 AI를 이용한 신약 개발의 끝지점 - 99
32. 규제기관의 IND에서 가장 심각한 troubleshooting - 유전독성시험 결과 - 105
33. 규제기관의 Exosome 신약에 대한 독성시험 가이드라인에 대한 고찰 - 109
34. 임상시험에서 약물 대사체 분석 원리에 대한 이해 - 113
35. 약물 대사체 분석에 있어서 기본 원리의 적용 예시 - 119
36. 알코올성 치매에 있어서 exosome의 영향에 대한 고찰 - 126
37. 독성의 중간 차이 및 독성시험 분석을 통한 동물을 이용한 독성시험의 방향성 - 132
38. 독성시험의 276,082건 vs 임상시험의 1,361,367건: IND 및 NDA 통과 추정 - 138
39. 비임상의 intrinsic toxicity와 임상에서의 idiosyncratic toxicity - 140
40. 임상시험에서의 idiosyncratic toxicity의 발생 기전과 위험성 - 143
41. 임상시험에서의 idiosyncratic toxicity - Hepatocellular toxicity와 Oncogenesis - 145
42. 비임상시험 및 임상시험의 연결 즉 IND에서 가장 중요한 Toxicological descriptor 적용의 문제점 - 151
43. 알츠하이머 말병에 있어서 Beta-amyloid plaques 형성과 Tau protein의 신경섬유다발의 선행성 - 치료제 개발의 방향 - 155
44. 유한양행 비소세포암치료제 레라자의 독성학적 성공 요인에 대한 고찰 - 168
45. 항암제 병용요법의 성공을 위한 비교 분석 및 독성학적 check point - 173
46. IADR에 의한 신약 개발의 실패 예방을 위한 투여용량에 대한 이해 - 178
47. 중앙지법 서관 514호 법정 - 182
48. 남성형 탈모 치료제 - 피나스테리드(finasteride)의 안전성과 대책 방안 - 183
49. 약물 유래-나이트로사민류 불순물의 1일 섭취허용량에 대한 자료 - 192
50. ASO(Antisense oligonucleotide), siRNA(small interfering RNA) 등의 독성시험 가이드라인 비교분석 - 201
51. 임상시험 CRO의 글로벌 변화와 국내 비임상 CRO의 엣지 - 206
52. Prodrug을 이용한 New drug modality 소개 - 211
53. 항비만치료제 기전과 polypeptide vs small molecule의 비교분석 - 215
54. Biopharma Trends 2025 - 보스톤컨설팅그룹의 논고 번역 및 요약 - 221
55. 2024년의 New Drug Modality에 대한 분석과 예상 - BCG 보고서 참조 - 232
56. Big data 및 AI-기반 병용요법 항암제 개발과 독성 예측 - 240
57. 다음 보고서의 재평가: <48>의 남성형 탈모 치료제 - 피나스테리드의 안전성과 대책 방안 - 246
58. 신약개발에서 독성의 회피와 응용을 위한 Big-data 및 AI-기반 프로그램 검증 - 254
59. Reactive metabolite 예측을 위한 AI-기반 프로그램 소개 - 266
60. AITOX의 사업 안내 - 312
61. 비임상독성시험과 AI-기반의 독성예측에서의 조화와 완결성 - 314
62. AITOX의 AI-기반 비임상독성시험 결과 및 독성예측의 최초 예시-320
63. IND 및 Riskassessment를 위한AI-based 시뮬레이션-331
64. AI-based polypeptide & protein toxicity Prediction - 350
65. AI-based toxicity prediction 프로그램의 개발 방향성 - Biotransformation 측면 - 353
66. 약물의 유연물질 위해성평가와 인공지능-기반 독성예측 가능한 경우- 363
67. AI-기반 독성예측 프로그램 개발의 우선적 요소에 대한 이해 - 370
68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발 - 374
69. HLB-리보세라닌의 AI-based 약리기전에 대한 예측 - 475
70. Peptide 치료제의 유전독성시험과 국내외적 규제 현황 - 485
71. COVID-19 중증도 환자 치료제인 Paxlovid의 선택적 독성평가에 대한 고찰 - 494
72. 독성시험에서 동물실험 감소를 위한 FDA Roadmap에 대한 고찰 - 498
73. FDA의 Roadmap에서 독성시험 대체할 최초 NAM 적용의 단물론한채 선택의 이유와 향후 약물 모달리티 적용의 순서 예측 - 502
74. 바이오의약품의 비경구적 주사에 의한 독성학적 해석 오류와 대책 - 505
75. 재조합 단백질의 비글주사 독성시험에서 정맥주사 ISR과 NOAEL 결정 방법 - 510
76. 임상시험으로부터의 독성시험을 위한 동물등가용량 추정에 대한 고찰 - 516
77. FDA의 비임상시험 새 기준 제시에 대한 분석과 국내의 방향성 - 520
78. Trump의 주장: 임상부의 타이레놀 복용은 자폐증의 원인? - 524
79. ADC와 Aptamer 개발을 위한 독성학적 응용과 새로운 Payload 플랫폼- 530

80. AI-기반 대사체 분석 프로그램과 약물의 독성학적 Optimization 예시 - 538
81. FDA 2020-2024년 승인된 합성신약의 대사체-90% 예측 AI-프로그램 - 561
82. 2025/12/16 미국 상원을 통과한 FDA Modernization Act 3.0 - 578
83. 알츠하이머병의 치료제 개발에 대한 실패 원인과 NAMs -582
84. 파킨슨병 치료제 개발의 실패 원인과 NAMs - 589
85. 류머티즘성 관절염 치료제의 반응을 임계치와 NAMs - 597
86. 침팬지를 이용한 HIV/AIDS 백신 시험에서 인간으로의 외삽에 대한 현실성 평가 - 606
87. 호흡기 질환인 천식 치료제의 실패 원인과 NAMs - 617
88. Modernization 3.0과 IND를 위한 FDA의 NAM 활용 사례 - 626
89. 의약품 발암성의 동물실험을 대체한 NAM의 예시 - 632
90. 생물학의약품의 IND를 위한 NAM-기반 사례에 대한 고찰 - 640
91. 비임상 연구 도구인 NAM의 핵심 5원칙 - 인간 관련성(Human Relevance) - 646
92. 비임상 NAM의 핵심 5원칙 - (2) 기전적 통찰력(Mechanistic Insight) - 656
93. 비임상 NAM의 핵심 5원칙 - (3) 기전적 통찰력(Mechanistic Insight) - 667
94. 시스템 수준 통합(Systems-Level Integration): 인간 조직-유래 물질을 활용한 NAM과 MABEL로부터 MRSD 산출 예시- 681
95. 현대약품의 임상중절 약물-미프지미소정의 Human relevance-독성학적 고찰 - 694
96. NAM의 출현과 현대독성학의 새로운 정의 - 704
97. FDA의 NAM 적격성 신청과 평가를 위한 IStand 프로그램과 승인된 NAM 현황 - 712
98. NAM(new approach methodologies, 신규 접근 방법)의 FDA 적격성 인증과 실제 제출된 NAM 분석 - 722
99. NAM의 FDA-ISTAND 적격성 접수 현황과 인증 실패에 대한 예시 분석 - 739
100. 컨설팅보고서 100회 특집 - 3가지 독성사건 이해와 첨단 신약개발의 첩경 - 754
101. 미국의 Tissue Chips in Space 2.0과 NAM을 위한 치밀한 사전 준비 - 771
102. NAM 시대와 비임상연구에서 국내 규제기관의 문제점과 향후 방향성 - 776
103. FDA, 신약 승인에 필요한 2건의 임상시험 요건 폐지 - One Pivotal Clinic Trial로 변경 - 791
104. Liver-on-a-chip의 기반 IVIVE(In vitro to in vivo extrapolation)와 독성 예측 - 794
105. Organ-on-a-chip(OoC)의 독성학적 응용과 미래 - OoC Toxicology - 845
106. Organ-on-a chip을 이용한 NOAEL 및 임상시험 안전용량 설정 방법-873
107. FDA의 2026년 핵심 규제 요소와 글로벌 최초의 비임상 NAM(New approach methodologies) 가이드라인 - 887
108. Oncolytic virus의 임상시험에서 안전성을 위한 독성시험에 대한 고찰 - 893
109. 세포치료제의 임상시험에서 최초 용량선택과 고려사항 - 909
110. ADC(항체-약물 결합체) 개발에 적절한 Payload 결정을 위한 기준 - 919
111. Next-Generation Sequencing-기반 유전체 편집 치료제의 안전성 평가에 관한 FDA의 최신 지침 - 928
112. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 - Calicheamicin의 linker - 934
113. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 - MMAE or MMAF used as a peptide payload - 945
114. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 - Maytansine 유도체(DM1과 DM4) ADC - 963
115. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 - Exatecan derivatives(T-DXd and Dato-DXd) - 980
116. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 - Sacituzumab govitecan & Loncastuximab tesirine-lpyl - 999
117. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰-Structural alert와 Bystander effect 측면에서 새로운 개발 방법 - 1014
118. Paracelsus vs Ashby-Tenant rule의 비교를 통한 독성기전의 이해 - 1029
119. 약물 모델리티피별 불순물의 이해와 유해성 및 위해성평가(1) - 1035
120. 약물 모델리티피별 불순물의 이해와 위해성평가(2)- 단일클론항체(mAbs) 및 재조합 단백질의 HCP - 1050
121. 약물 모델리티피별 불순물의 이해와 위해성평가(3)- 유전자 치료제의 불순물 - Host Cell DNA (HCD) - 1077
122. 약물 모델리티피별 불순물의 이해와 위해성평가(4)-핵산치료제(mRNA, siRNA, miRNA, ASO, Aptamer, Mimic & Antagomir)-1092
123. 약물 모델리티피별 불순물의 이해와 위해성평가(5) - 줄기세포 치료제의 Toxicological TPP - 1133
124. 약물 모델리티피별 불순물의 이해와 위해성평가(6): Antibody-drug conjugates와 Toxicological TPP - 1143
125. Toxicological Target Product Profile - 기반 비임상 연구와 마케팅 전략 - 1153
126. mRNA-based NK cell engager for autoimmune or cancer에 대한 tTPP(Toxicological target product profile) - 1174
127. 399종의 합성제제 및 바이오로직스 - 신약 승인 후 부작용에 대한 분석 - 1180
128. FDA-승인 ADC 15종의 비임상독성시험 및 임상시험에서의 독성 및 부작용 비교 분석 - 1198
129. 비만치료제 Mounjaro 복용에 의한 체장염과 독성학적 이해 - 1232
130. 유한양행의 Lazertinib vs HLB의 Rivoceranib의 병용요법에서 저분자 합성물질의 선택에 있어서 우선 고려할 사항 - 1244
131. 오가노이드 평가 결과와 실제 임상 결과의 사이 일치율 - 1255
132. Gap Filling을 위한 맞춤 비임상 전략과 Country K의 비임상 정책 현실- 1277
133. 기사 - 토종 동물시험업체 '수주 가뭄' 심화에 대한 의견 - 1282

1. 성공적인 IND와 Gap analysis에 대한 이해

- 성공적인 IND를 위한 가장 중요한 요소는 다음과 같은 Gap analysis에 대한 이해임

- ① 국내외 규제기관의 차이
- ② 약물 모달리티에 대한 차이

- 두 가지의 차이를 반영하여 국내외적 gap analysis를 위해 다음과 같이 예시를 들 수 있음

	국내	US FDA 및 EMA
3R에 대한 입장	비임상 가이드라인 중시	적절한 동물의 사용을 중시하며 예시와 같이 3R을 중요시함

(3R: 동물실험의 윤리적 측면을 고려한 제도로 동물의 수를 줄이는 Reduction, 동물실험을 대체하는 Replacement, 실험동물의 복지를 위한 세심한 배려인 Refinement 등을 의미함)

<예시> 미국 FDA의 예시

- 비인간 영장류(non-human primate, NHP)에 대한 독성시험 병합:** 비인간-영장류의 반복 투여독성시험과의 병합하여 바이오의약품의 CNS에 대한 안전성약리시험 수행이 가능하도록 함. 이는 3R의 Reduction 측면을 고려하기 위함.
- 바이오의약품의 동물종 선택:** 일반적으로 바이오의약품인 경우에 NHP를 사용하여야 한다고 알고 있지만 그러하지 않음. 바이오의약품에 대한 수용체가 있어야 함. 이는 바이오의약품 경우에는 인체의 표적 수용체가 이미 결정된 후 개발되기 때문임. 그리고 독성시험을 위해 수용체가 존재한다는 적절성에 대한 자료를 요구함.
- 비임상시험에서 동물종 및 독성시험의 선택에 있어서 가장 중요한 것은 바이오의약품의 표적 수용체 확인을 비롯하여 이를 가진 동물종의 선택이다. 이는 바이오의약품 경우에는 인체의 표적 수용체가 이미 결정된 후 개발되기 때문이다. 또한, 바이오의약품이라도 비인간-영장류(Nonhuman primates) 사용은 3R 및 아래와 같이 2022년 발표된 USFDA의 현대화법(modernization act)에 따라 정당한 근거가 제시되어야 한다.
 - ▶ The FDA modernisation Act 2.0 marks a game-changing legislation enabling drug registration without the absolute requirement for the use of animals in safety toxicology assessment(Stewart 등, 2023).
 - ▶ Nonhuman primates should only be used when other models are not

appropriate(Brown 등, 2023)

<참고문헌>

Brown PC, Wange RL. Considerations regarding the use of nonhuman primates in assessing safety endpoints for pharmaceuticals. Regul Toxicol Pharmacol. 2023 Sep;143:105449

Stewart A, Denoyer D, Gao X, Toh YC. The FDA modernisation act 2.0: Bringing non-animal technologies to the regulatory table. Drug Discov Today. 2023 Apr;28(4):103496.

2. 다양한 약물 모달리티와 비임상시험에서 고려할 사항

- 오늘날 약물 개발에서 2가지 특징

- ① 다양한 약물 모달리티(drug modality)
- ② Platform-기반 신약 개발

2-1 다양한 약물 모달리티(drug modality)

1) 2021-2022 FDA 승인 약물 모달리티

- 지난 20 여년 동안 17종의 new drug modality 출현(Boston consulting group, 2023)

그림 1. 지난 20년간 개발된 신약 모달리티 분류



*2022년 10월 현재 비활성 상태이거나 시장에서 철수된 제품은 포함하지 않음

출처 : Boston consulting Group, New Drug Modalities Offer Promise and Peril, 2023. 3 / 국가생명공학정책연구센터 재구성

- 2021-2022년의 약물 모달리티별 미국 FDA에 의해 승인된 약물(Blanco 등, 2022)

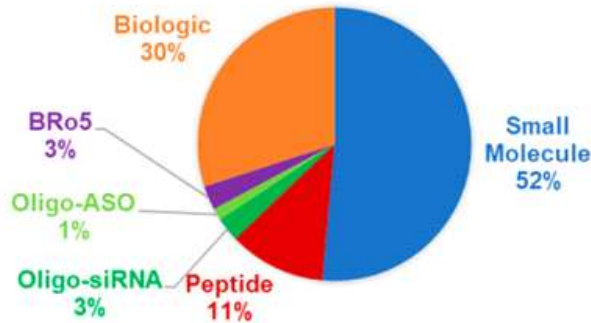


Figure 1. Pie chart showing the percentage by modality of FDA-approved drugs in 2021-22.

The emphasis on new modalities includes non-traditional SMs (e.g., protein-targeted chimerics) and new generation peptides(e.g.,cyclopeptides and macrocycles), also referred to as “beyond rule of 5”(bRo5) chemical space, large peptides, nucleic acid-based therapeutics (oligonucleotides), and biologics (e.g., monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates).

- **비임상설계에서 대단히 중요한 Biogics와 small molecule의 구별:** 생물체에서 분리 또는 생물공학 기술에 의하여 개발된 약물을 바이오의약품이라고함. 그러나 합성된 저분자 화합물이나 펩타이드를 동일하게 합성의약품으로 분류하는 것은 잘못됨. 바이오의약품과 합성의약품의 구분은 생물체에서 분리와 합성에 의한 분류되는 것이 아니고 체내에서 분해·배출이 cytochrome P450(CYP)에 의한 biotransfomration(생화학적 전환)인가 아니면 소화(digestion)의해서 인가에 의해 구별됨. 이점은 비임상시험에서 대단히 중요함. 이를 구별하지 못하여 불필한 독성시험이 수행되고 개발시간이 길어지는 원인이 됨. 소화에 의해 배출되는 모든 약물은 biologics임

<예시> 아래의 Table 2에서 붉은 표시는 small molecule 그리고 노란색은 합성 펩타이드 그리고 생명공학 기술에 의해 개발된 항체 모달리티는 biologics로 구분함. 여기서 문제가 되는 것은 합성 펩타이드가 소화됨에도 불구하고 biologics로 구분하지 않은 것임. 이럴 경우 biologics가 1종의 동물종으로 독성시험이 시험과는 다르게 합성 펩타이드는 저분자 합성의약품처럼 2종의 동물종을 이용하여 독성시험이 수행됨. 따라서 모달리티의 정확한 구분은 성공적인 IND에 있어서 대단히 중요함.

Table 2. Pharmacokinetic and Safety Profile Comparison across Different Chemical Modalities

chemical modality	route of administration	dosing frequency	%F (bioavailability)	T _{1/2} (SC or IM)	V _d (volume of distribution)	metabolism
small molecule (SM)	primarily oral	often once a day	generally good	variable	generally high; broad distribution to organs and tissues including CNS	primarily by CYP and phase II enzymes
bRoS SM	emerging examples of orally bioavailable	daily to weekly	few examples of orally bioavailable	variable	mostly peripheral distribution	variable depending on functional groups
bRoS cyclopeptides/macrocyces	emerging examples of orally bioavailable	daily to weekly	few examples of orally bioavailable	variable	mostly peripheral distribution	mainly proteolytic enzymes
large peptides	not orally bioavailable; mainly IV, SC	weekly to monthly	good for SC	variable	peripheral distribution	proteolytic enzymes
oligonucleotide ASO	not orally bioavailable; IV, SC, IT, and IVT	weekly to monthly	good for SC	0.25–5 h after SC	high; broad distribution to kidneys and liver	by nucleases
oligonucleotide siRNA	not orally bioavailable; IV, SC, IT, and IVT	weekly to once every 3–6 months	not reported	not reported	broad distribution to kidneys and liver	by nucleases
biologics (antibodies)	not orally bioavailable; mainly IV, SC, and IM	weekly to monthly	good for SC and IM	1–8 days after SC or IM	low; often limited to plasma and extracellular fluids	catabolized by proteolytic enzymes

<참고문헌>

Blanco MJ, Gardinier KM, Namchuk MN. Advancing New Chemical Modalities into Clinical Studies. ACS Med Chem Lett. 2022 Oct 27;13(11):1691–1698.

Boston consulting group, 2023

www.bcg.com/publications/2023/benefits-and-risks-of-new-drug-modalities

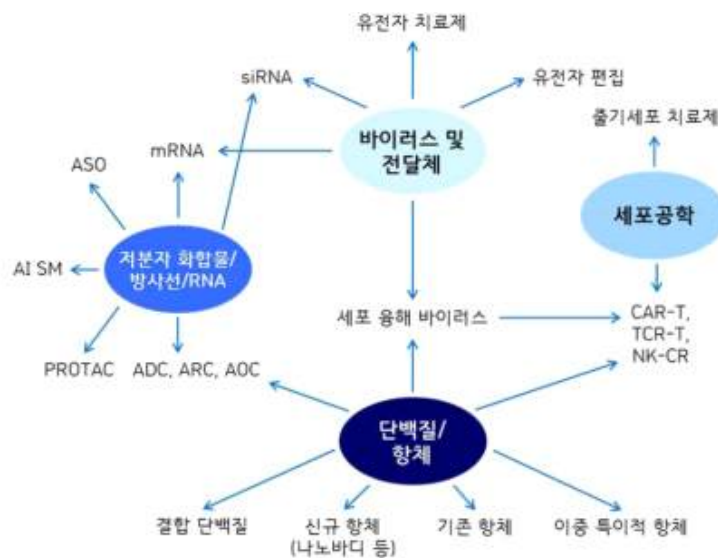
2) 약물 모달리티의 미래

- 약물의 개발은 궁극적으로 표적-특이성(target specificity)을 높이는 방향
- 저분자 합성의약품(small molecule, SM)의 druggable target에 대한 기술적 및 독성학적 한계
 - 대부분의 SM의 target은 protein. 현재까지 생물체에서 밝혀진 단백질은 3억개 정도
 - 3억개 중 약 150,000 개의 정도의 protein에 대한 구조 규명
 - 인체는 현재 22,000 여개 확인된 단백질 중 3500 여개 정도의 protein에 대한 구조 규명
 - SM의 약리기전의 단백질 또는 효소의 active site에 결합을 통해 이루어짐. 단백질 구조 규명이 결국 SM의 신약 개발 핵심. 이와 같은 구조 해결의 문제로 SM으로 질병 치료의 한계와 더불어 전신독성의 우려
- SM의 undruggable target에 대한 도전 – Biologics
 - 유전자 재조합 단백질, 폴리펩타이드, 유전자치료제, 세포치료제, RNA치료제, 세포/유전자치료제, 항체-약물 복합체(antibody-drug conjugates). Microme
- 바이오횰적스의 undruggable target에 대한 도전
 - 장기 대체 치료법(organ replacement therapy): Organoid
 - 시스템 대체 치료법: Assembloid
- 인간복제 vs 인간의 뇌를 가진 휴머노이드

- 기술-규제-윤리의 3가지 측면에서 undruggable target에 대한 다양한 도전이 예상됨

2-2 신약 modality 개발을 위한 Platform 기술

- 신약 개발 플랫폼은 특정 indication에 대한 모달리티를 개발 후 다른 indication에 적용이 장점
- 신약 개발 플랫폼에는 <그림>과 같이 4가지인 ① 저분자화합물/방사선/RNA, ② 단백질 및 항체, ③ 세포공학, ④ 바이러스 및 전달체 등으로 분류되며 결국 다양한 모달리티 개발을 위해서 플랫폼 상호 간 접목의 필요성(Boston consulting group, 2023)



출처 : Boston consulting Group, New Drug Modalities Offer Promise and Peril, 2023. 3 / 국가생명공학정책연구센터 재구성

<참고문헌>

Boston consulting group, 2023

www.bcg.com/publications/2023/benefits-and-risks-of-new-drug-modalities

3. 바이오헬스케어의 출현에 따른 비임상시험에서 고려할 사항

- 바이오헬스케어 제품은 비임상시험을 위해 시험물질 제작에 상당한 노력과 투자가 요구됨
- 바이오헬스케어 제품은 주사(injection)를 통해 투여가 이루어짐. 주사 기술이 데이터에서 outlier 생성에 큰 영향을 줌. 특히 뇌와 관련한 주사는 가장 선진화된 투여 장비가 필요함.

<바이오헬스케어의 비경구적 주사투여에 특별한 관심을 가져야 이유는?>

- ✔ 우리나라 대부분의 GLP-기반 독성시험 기업은 독성시험에서 주사에 의해 나타난 증상을 표적독성(target toxicity)으로 판단함. 이러한 경우 독성시험 최종보고서에 표적독성이라고 서술하면 그 용량 범위에서는 투여할 수 없게 되지 않을까?
- ✔ 일반적으로 주사에 의해 주사부위에 나타나는 것을 Injection site reaction(ISR, 주사부위반응)이라고 함. 임상시험에서도 바이오헬스케어 제품의 주사에 의해 0.5~40% 정도로 발생함.
- ✔ 아래의 참고논문(Thomaidou 등, 2019)에는 ISR은 알러지 또는 면역반응이 아니기 때문에 투여를 중단할 필요가 없고 특히 바이오헬스케어 제품의 주사기술에 의해 예방이 가능함. 따라서 ISR에 의한 병리적 현상을 GLP-기반 독성시험 기관은 이에 대해 'Misunderstanding'을 하지 말라는 논문.
- ✔ 바이오헬스케어 및 주사제 저분자 합성의약품을 개발하시는 기업은 반드시 이 부분을 잘 점검이 필요함. GLP-독성시험 기업의 대부분 병리책임자는 주사 등의 고려사항 없이 표적독성이라고 판단하는데 한치의 양보도 없는 것이 특징임.

<참고논문> Thomaidou E, Ramot Y. Injection site reactions with the use of biological agents. Dermatol Ther. 2019 Mar;32(2):e12817.

- 내용: Misunderstanding of the pathophysiology of the ISRs, most of them not being allergic or immunogenic reactions, might result in unnecessary discontinuation of the treatment. Almost all local reactions to subcutaneously administered biological agents can be prevented by changing the injection techniques.....
- 동물 1종으로 사용가능하며 시험기간에 2~3회 주사 투여가 이루어지므로 안전성약리시

험 및 분포 등에 satellite group 또는 본 시험 동물 사용이 가능하다는 점을 고려해야 함.

- 약리 및 독성의 비임상시험 전에 SM과 Biologics의 약리 기전 및 독성기전에서 차이가 있다는 점을 인식 후 동물종 선택 및 결과에 대한 해석이 필요함(다음의 내용으로 설명 됨)

4. 바이오로직스의 출현으로 독성학의 혼란스러운 미래

1) 독성학의 개념과 혼란

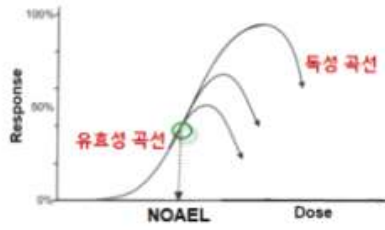
- **전통적인 독성학(traditional toxicology)**은 정의: 외인성물질(xenobiotics)의 유해성을 인체를 제외한 동물의 in vivo 및 in vitro 시험을 통해 확인하고, 결과를 기반으로 인체 유해성을 예측하는 학문.
- **Xenobiotics의 명확한 뜻:** 'Xeno'은 외인 또는 외부라는 의미이며 biotics는 생물물질이라는 뜻. 따라서 xenobiotics는 생체이물질이라는 의미이며 생체물질인 영양물질 외의 모든 물질을 의미함.
- **독성학의 대상 물질:** 생물체에 존재하지 않은 모든 물질. 그러나 오늘날 결국 분자량이 1000 이하의 저분자 합성물질.
- **Biologics인 바이오의약품의 개념:** 바이오의약품은 생물체에서 유래 또는 생명공학 기술로 생산된 의약품이며 외인성물질이 아니라 영양물질.
- **전통적인 독성학과 오늘날 독성학:** 독성학 연구에서 의도적인 노출인 약물 대상이 80% 정도로 높으며 약물은 xenobiotics는 저분자 합성의약품임. 그러나 약물이 바이오의약품도 포함하기 때문에 오늘날 독성학에서는 외인성물질이 아니라 모든 생물체에 공통으로 존재하는 영양물질을 대상으로 연구가 이루어짐.
- **독성학의 혼란한 미래:** 전통적인 독성학에서 다루는 독성기전과 오늘날 독성기전은 완전히 다름. 이에 따라 독성학 교육은 어떻게 이루어져야 하며 미래 독성학의 방향은 어떻게 설정할 것인가에 대해 상당히 혼란스러움이 존재.

2) 저분자 합성의약품과 바이오의약품의 독성기전에 대한 Gap analysis

- 다음의 독성기전의 차이는 신약 개발에서 약물 모달리티에 따라 약리와 독성의 차이가 무엇이며 개발에 앞서 반드시 인식하여야 하는 중요한 사항
- 이는 결과적으로 성공적인 IND를 위한 가장 우선적이면서도 가장 기초적인 출발점
- 독성이든 유효성이든 시험물질 및 연구물질의 특성은 용량-반응 곡선(dose-response curve)로 설명됨
- A)는 저분자 합성의약품에 대한 용량-반응곡선으로 유효성 곡선과 독성 곡선이 완전히 분리되어 존재. 반면에 B)는 바이오의약품에 용량-반응 곡선으로 유효성과 독성이 동일한 용량-반응 곡선에 존재함. 이는 독성기전의 차이로 발생함으로 이에 대한 이해가 약물 개발의 출발점이며 비임상 연구를 어떻게 수행할 것인가에 대한 중요한 사항이 됨.



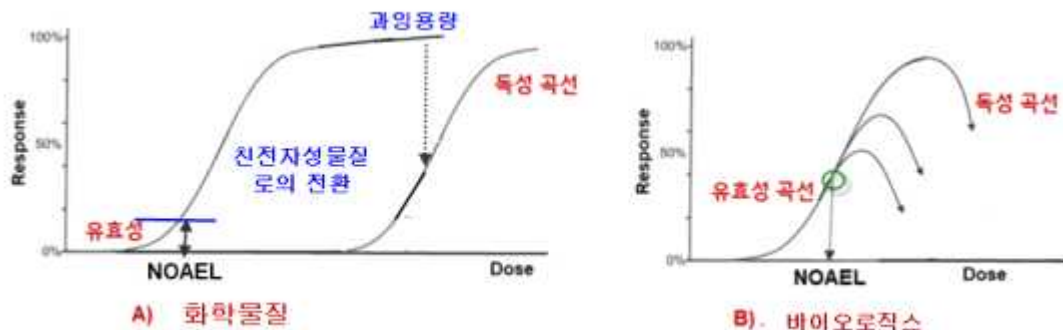
A) 전통적인 독성학의 용량-반응 곡선



B) 오늘날 독성학의 용량-반응 곡선

5. 독성학의 2가지 가설과 독성학의 추구 방향

- 인체 영양물질과 동일한 물질로 구성된 바이오로직스(세포 및 유전자 치료제 포함) 출현은 중금속을 비롯하여 유기화학물질의 유해성을 규명하는 전통적인 독성학의 개념 및 정의에 부합하지 않음.
- 독성기전 측면에서 화학물질은 ① 원물질(parent compound)의 친전자성물질로의 전환, ② 과잉용량(over dose), 그러나 바이오로직스는 오로지 ① 과잉용량에 의한 독성기전으로 설명됨. 이와 같은 기전의 차이로 유효성 및 독성의 용량-반응곡선 분리 또는 동일 선상으로 나타남



- 새로운 약물 모달리티(new drug modality)의 지속적인 출현으로 적어도 신약 개발에서 독성학의 대상은 화학물질이 아니라 약물의 모달리티가 대상이 됨. 즉, 전통적인 독성학은 환경물질 및 산업물질 분야에만 해당되며 신약 개발에서의 독성학은 화학물질과는 전혀 다른 **약물 모달리티에 따른 독성학**으로 접근이 요구됨.
- 현대독성학(modern toxicology)은 구성은 기전독성학(mechanistic toxicology, mode of action을 위한 독성학), 기술독성학(descriptive toxicology, 가이드라인-기반 독성시험), 규제독성학(regulatory toxicology, 신약 개발을 위한 비임상에 대한 규제안) 등의 3가지 독성학으로 구성됨.
- 합성의약품과 바이오로직스의 전혀 다른 약물 모달리티에 대해 기전, 기술 그리고 규제 독성학의 올바른 적용을 위해서는 다음의 2가지 가설에 대한 절대적 이해가 필요하고 이를 기반으로 신약개발을 위한 현대독성학의 기반을 마련하여야 함.

① 독성학의 아버지(father of toxicology)라고 불리는 Paracelsus의 paradox인 "What is there that is not poison? All things are poison and nothing is without poison. **Solely the dose determines that a thing is not a poison.**(모든 것은 독이며 독이 없는 것은 존재하지 않는다. 용량만이 독이 없는 것을 정한다)에 대한 **반론!**

② "If no LOAEL is found, then the NOAEL cannot be determined" 가설에 대한 철저한 이해

6. 파라셀수스 가설에 대한 반론과 증명

<가설-1> Paracelsus의 “Solely the dose determines that a thing is not a poison”에 대한 반론

- 현대독성학(modern toxicology)은 기전독성학(mechanistic toxicology, mode of action 을 위한 독성학), 기술독성학(descriptive toxicology, 가이드라인-기반 독성시험), 규제 독성학(regulatory toxicology 등 3가지로 구성됨.
- 파라셀수스의 가설을 3가지 독성학으로 구성된 현대독성학 측면에서 반론 제기

7. 기전독성학(mechanistic toxicology) 측면에서 파라셀수스 가설에 대한 반론

- 파라셀수스의 생존기간인 1493 – 1541년 고려한다면 그 당시에는 획기적 발상
- 본 가설은 화학물질의 정량만을 의미하며 정성적 의미가 없음.
- 오늘날 정성적인 측면에서 저분자 합성의약품과 바이오의약품의 가장 잘 표현한 것은 다음의 참고자료<Weir 등, 2012>. 이 자료를 ‘전환기 독성시험 컨설팅’의 119 페이지에 소개됨(박영철, 2023). 저분자 합성의약품은 reactive metabolites를 생성하지만 바이오의약품은 이를 생성하지 않음.

<표 8-11> 점안제의 소분자 합성의약품과 바이오의약품의 차이

Small molecules	Biologics
<ul style="list-style-type: none"> • Chemically synthesized organic molecule • Greater potential for off-target effects due to the potential for chemical impurities, active/reactive metabolites, extensive distribution in the body, and activity at multiple receptors or enzymes • Generally active and, therefore, potentially toxic in many species • Generally no or negligible potential for immunogenicity • Pharmacokinetic and pharmacologic considerations when selecting species for nonclinical studies 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteins obtained from living cells • Highly targeted, due to lack of chemical impurities and active/reactive metabolites and decreased potential for extensive distribution as a result of large molecular weight • Activity and toxicity generally limited to animals possessing the intended receptor or epitope (i.e., pharmacologically relevant animal model/species) • Primarily pharmacologic considerations when selecting relevant species for nonclinical studies • Animals can frequently mount an immune response (immunogenicity) to biologics

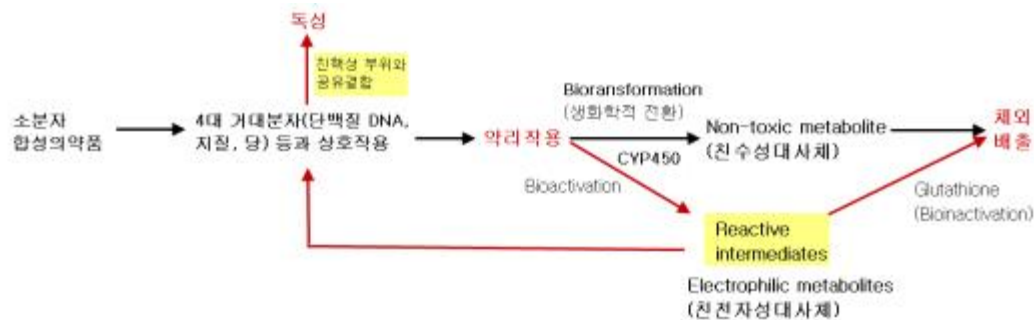
<참고문헌>

- ▶ Weir, AB, Wilson, SD. Nonclinical Regulatory Aspects for Ophthalmic Drugs. In: Weir, A., Collins, M. (eds) Assessing Ocular Toxicology in Laboratory Animals. Molecular and Integrative Toxicology. Humana Press, Totowa, NJ. 2012.
- ▶ 2023년: 박영철 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7

- 가설에 대한 반론의 가장 중요한 근거는 <표 8-11> 점안제의 소분자 합성의약품과 바이오의약품의 차이에서 “active/reactive metabolites” 용어임
- ‘전환기 독성시험 컨설팅’의 24 페이지에 아래 모식도는 저분자-합성의약품이 세포내 수용체와 결합하여 약리작용 후 cytochrome P450(CYP450) 효소에 의한 생화학적 전환(biotransformation)으로 배출되는 과정임.
- 그러나 CYP450은 양날의 칼. CYP450에 의해 친수성대사체로 전환되면 무독성으로 체외 배출. 반면에 reactive intermediates(활성중간대사체 = reactive metabolites)로 전환

되면 DNA와 결합을 통해 유전독성, 단백질에 결합하면 효소활성 저해 등을 통해 독성을 유도함(reactive metabolite는 친전자성, DNA 및 단백질의 전자가 풍부한 친핵성 부위와 공유결합)

- 저분자 합성의약품이 친수성대사체로만 전환되어 배출되면 Paracelsus의 가설이 맞음. 그러나 reactive metabolite로 전환되면 zero-threshold(제로-역치) 측면에서 Paracelsus의 가설과 배치됨.



<그림 4-2> 소분자 합성의약품의 약리기전과 CYP450-의존성 독성기전

- 소분자 합성의약품 개발을 위해 초기 스크린을 통해 먼저 reactive metabolite 생성 유무를 확인 후 약물 초기 개발의 진행 필요성이 있음. 다소 안타까운 것은 cytochrome P450에 대한 정보와 관련하여 DDI(drug-drug interaction) 수준에서 그치는 것임.

1) 카페인과 흡연의 발암성 차이

- 이 둘의 독성 차이는 친수성대사체와 친전자성대사체 생성 유무의 차이에 기인함

① 친수성대사체의 예시: 카페인

- <그림 2-44>은 카페인(caffeine)에서 체내에서 cytochrome P450의 아종인 CYP1A2에 의해 대사되어 NAT2(N-acetyltransferase type 2)에 의해 친수성대사체로 전환을 유도하는 Biotransformation 과정(Higdon 등, 2006; 박영철, 2010)
- 카페인이 독성 또는 발암성이 없는 이유는 이와 같이 활성중간대사체로 전환되지 않기 때문임

<참고문헌>

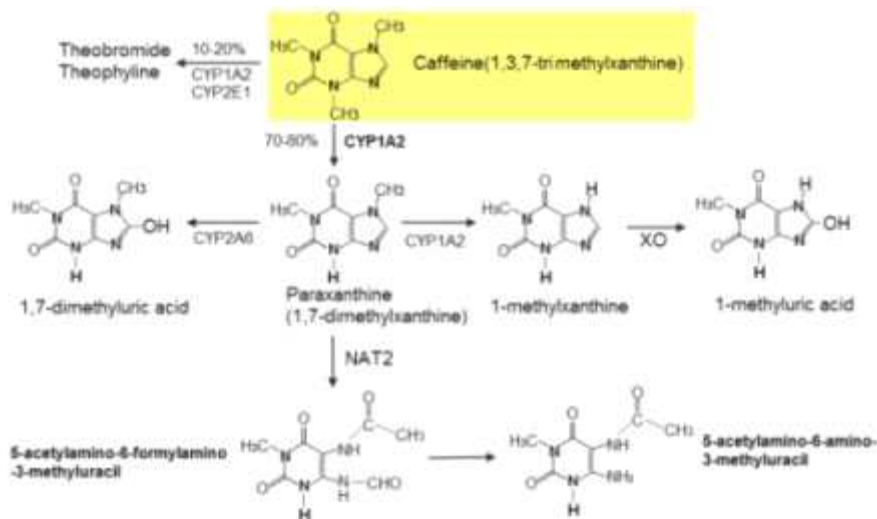
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN

978-89-268-1259-4.

- Higdon, JANE V., and BALZ FREI, Coffee and Health: A Review of Recent Human Research, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46:101 – 123.

② 친전자성대사체의 예시: 담배 – 특이적 nitrosamine인 NNN

- <그림 5-10>은 담배 – 특이적 nitrosamine인 NNKN-nitrosonorcinoine(NNN)의 CYP2A6에 의한 친전자성대사체로의 전환 과정(박영철, 2010; Jeffrey 등, 2006).
- 생체 내에서 reactive metabolites(활성중간대사체) 생성과정을 Bioactivation(생체 활성화)이라고 함



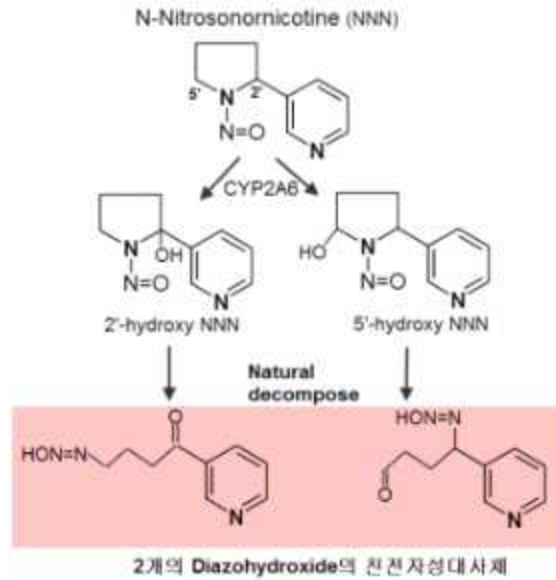
(그림 2-44) CYP1A2에 의한 caffeine 대사 경로: 카페인은 CYP1A2에 의한 대사 이후 다양한 P450과 효소에 의해 대사되는 경로를 거친다. 우선적으로 카페인은 CYP1A2에 의해 paraxanthine(1,7-dimethylxanthine)으로 72-84% 정도 대사되며 나머지 CYP1A2나 일부 CYP2E1에 의해 탈메틸화(demethylation)가 이루어진다. NAT2: N-acetyltransferase type 2; XO=xanthine oxidase(참고: Higdon).

<참고문헌>

- Jeffrey, ALAN M., MICHAEL J. IATROPOULOS, AND GARY M. WILLIAMS., Nasal Cytotoxic and Carcinogenic Activities of Systemically Distributed Organic Chemicals, Toxicologic Pathology, 2006, 34:827 – 852
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

③ 흡연가와 비흡연가의 cytochrome P450 발현 비교

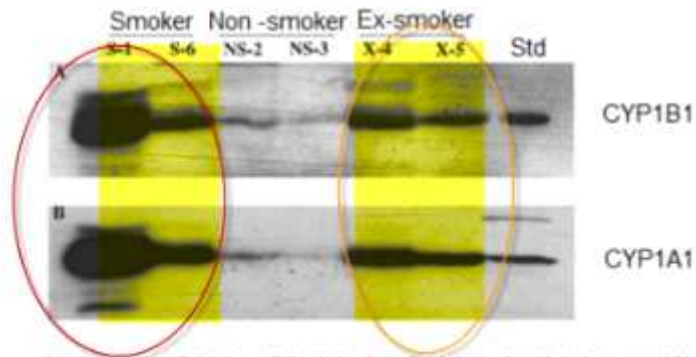
- 담배연기에는 담배 – 특이적 nitrosamine 외에도 polyaromatic carbon(PAH) 등 수많은



〈그림 5-10〉 N-Nitrosomonicotine의 친전자성대사체의 생성
과정 N-Nitrosomonicotine(NNN)은 CYP2A6에 의해
2개의 hydroxy NNN으로 전환되어 고리가 끊어지면서 친
전자성대사체가 형성된다.

발암물질이 존재하며 이들은 인체의 약 16종-20종의 cytochrome P450에 의해 친전자성대사체로 전환됨.

- <그림 3-12> 흡연자(smoker), 비흡연자(Non-smoker) 그리고 과거 흡연자(Ex-smoker)의 Cytochrome P450(CYP1B1 & CYP1A1)에 대한 폐조직에서 발현 정도의 비교(Kim 등, 1998; 박영철, 2019).
- Smoker에서는 엄청난 양의 cytochrome P450 발현이 이루어져 있지만 비흡연가에는 거의 발현되어 있지 않음.
- 비록 금연을 하였지만 과거 흡연자에서도 여전히 cytochrome P450 발현이 어느 정도 있다는 것을 알 수 있음.
- 과거 흡연자의 cytochrome P450이 정상적인 비흡연자와 같은 수준으로 되기 위해서는 약 10 여년이 걸림. 이 기간 동안은 여전히 발암 잠재성이 높음.



〈그림 3-12〉 흡연가, 비흡연가와 과거-흡연가의 폐조직에서 CYP 발현:

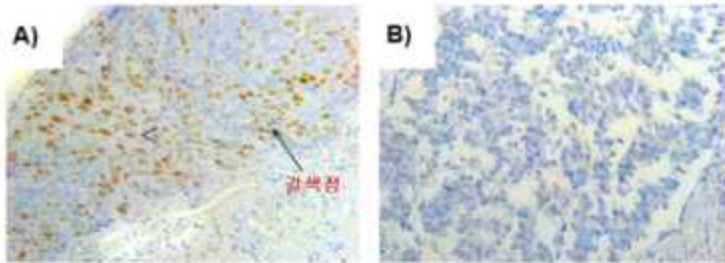
A)는 0.05 pmol CYP1B1, B)는 2.0 pmol CYP1A1의 발현을 나타내며 비흡연가 (Non-smoker)보다 흡연가(smoker)와 과거-흡연가(Ex-smoker)에서 CYP 발현이 증가하는 것이 확인할 수 있다. Std: standard(Kim, 1998)

<참고문헌>

- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7
- Kim, James H., Kevin H.Stansbury, Nigel, Niger J.Walker, Michael A. Trush, Paul T. strickland., Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1, Carcinogenesis, 1998, 19(10):1847-1853.

④ 암조직에서 cytochrome P450 발현

- <그림 3-13>의 A)에서 흡입성 물질에 노출이 많은 사람의 식도암 조직에서 cytochrome P450인 CYP2C9의 발현이 정상조직에서 발현보다 훨씬 증가되는 것이 확인됨.



〈그림 3-13〉 식도암의 환자에서 CYP2C9 발현:

A)는 식도암 부위에서 CYP2C9에 대한 면역조직화학적 분석 결과이며 B)는 암이 발생하지 않은 식도 조직에서 CYP2C9의 면역조직화학적 분석을 나타낸 것이다. A)에서 갈색점은 CYP2C9 효소의 면역된 부분이다(Schmelzle, 2011).

<참고문헌>

- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7
- Schmelzle, M. (2011), Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). Prostaglandins & other Lipid Mediators. 94:25-33.

2) 비알코올성지방간의 원인 - Cytochrome P450

① 비알코올성 지방간(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 최초 치료제 출시

- 비알코올성 지방간은 술을 거의 마시지 않음에도 간에 지방이 쌓이는 현상으로 섬유화, 간경화, 간암으로 발전
- 2023년 미국 식품의약청(FDA)이 레즈디프라(Rezdiffra)를 최초의 비알코올성 지방간 치료제로 승인, 2024년 3월 최초로 출시됨.
- 임상시험에서 레즈디프라 100mg이 투여된 실험군은 24~36%가 지방간이 용해되고 간의 상처가 더 이상 악화하지 않았다. 대조군에서는 9~13%만이 이러한 효과가 나타났다.

② 비알코올성 지방간(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 원인

- <Fig.1>에서처럼 수많은 연구를 통해 NAFLD의 원인으로 cytochrome P450 중 CYP2E1

의 과잉 발현에 의한 산화적 스트레스가 핵심 원인으로 추정되고 있음(Wang 등, 2021; Aubert 등, 2011; Aljomah 등, 2015; Jiang 등, 2024; Wei 등 2023; Harjumäki 등, 2021)

- 구체적으로 CYP2E1-mediated ROS(reactive oxygen species, 유해활성산소종)의 overproduction, 이에 의한 인슐린 내성 및 지방산의 증가로 설명되고 있음
- 최근에는 CYP2E1에 의한 Reactive Intermediates 생성에 의해서도 설명되고 있음
- 왜 대사증후군 질환(dysmetabolic disease)에서 CYP2E1이 증가되는 것은 확인되지 않음.
- 만약 지방간에서 CYP2E1이 증가되는 원인에 대한 이해는 비알코성 지방간 예방약물 개발이 가능할 것을 사료됨.

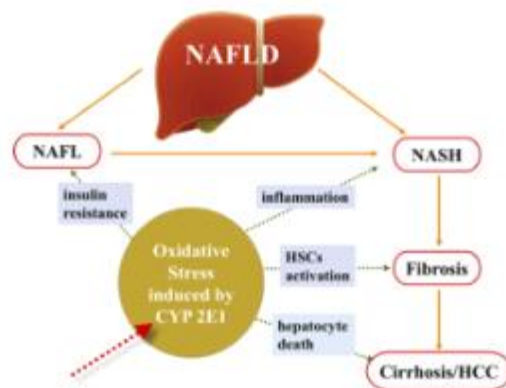


Fig. 1. Spectrum of disease and major hits of NAFLD. NAFLD includes NAFL, NASH, fibrosis, and cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Among them, insulin resistance is the first hit, and inflammation is the second hit. HSCs activation contributes to fibrosis, which can promote the development of cirrhosis or liver cancer, in which hepatocyte death also plays an important role. In addition, oxidative stress induced by CYP2E1 is thought to be involved in the development of the entire disease. The solid lines represent different stages of NAFLD, while the broken lines are the main mechanisms, but not the whole mechanisms, leading to the onset of the stage.

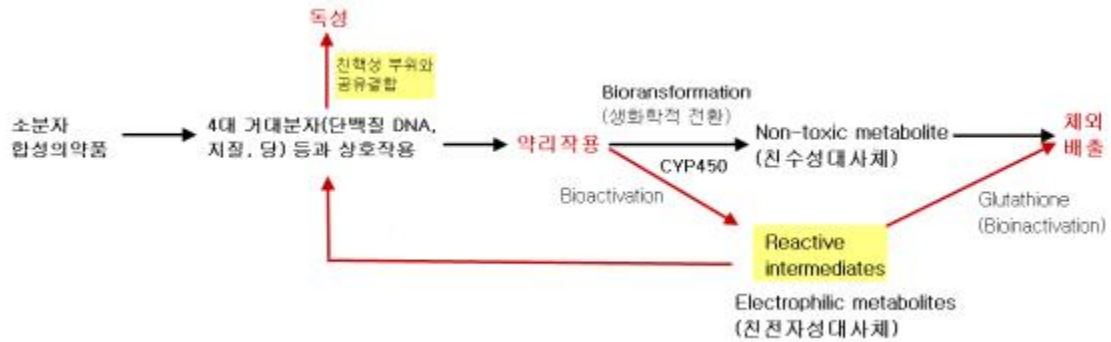
<참고문헌>

- Wang K, Tan W, Liu X, Deng L, Huang L, Wang X, Gao X. New insight and potential therapy for NAFLD: CYP2E1 and flavonoids. Biomed Pharmacother. 2021 May;137:111326.
- Wei, D., Tian, X., Zhu, L. et al. USP14 governs CYP2E1 to promote nonalcoholic fatty liver disease through deubiquitination and stabilization of HSP90AA1. Cell Death Dis 14, 566 (2023)
- Jiang YJ, Cao YM, Cao YB, Yan TH, Jia CL, He P. A Review: Cytochrome P450 in Alcoholic and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Diabetes Metab Syndr Obes. 2024 Apr 1;17:1511-1521.
- Aubert J, Begriche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2011 Oct;35(10):630-7.

- Aljomah G, Baker SS, Liu W, Kozielski R, Oluwole J, Lupu B, Baker RD, Zhu L. Induction of CYP2E1 in non-alcoholic fatty liver diseases. Exp Mol Pathol. 2015 Dec;99(3):677-81.
- Harjumäki R, Pridgeon CS, Ingelman-Sundberg M. CYP2E1 in Alcoholic and Non-Alcoholic Liver Injury. Roles of ROS, Reactive Intermediates and Lipid Overload.

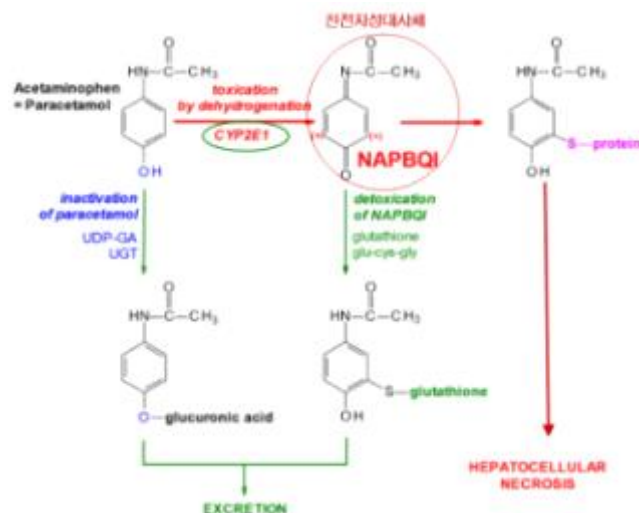
8. 친전자성대사체로 전환되는 모든 물질은 신약으로의 개발이 불가능할까?

- 저분자 유기물질은 아래의 <모식도>에서처럼 생체에서 양날의 칼인 cytochrome P450에 의해 친수성대사체 전환으로 체외배출, 친전자성대사체로의 전환으로 DNA 및 단백질과의 결합으로 독성을 유발로 설명



① 친전자성대사체로 전환되어도 신약으로 개발된 사례 - Tyrenol

- Acetaminophen을 주성분으로 하는 Tyrenol이 있으며 다음과 같이 2가지 경로를 통해 체내에서 biotransformation 됨.
- 대부분(약 90%) Acetaminophen은 Phase 2 반응을 통해 glucuronic acid의 결합에 의하여 체외로 배출됨. 그러나 Phase 2 반응이 저하되고 CYP2E1 활성이 높다면 NAPBQI(N-acetylimidoquinone)의 친전자성대사체로 전환 및 단백질과 결합하여 간독성(liver toxicity)을 유발함.



- 미국의 사망자 수: <참고문헌>에 따르면(Agrawal 등, 2023), 미국에서 간이식의 두 번째 원인으로 아세트아미노펜 독성에 기인함. 또한 아세트아미노펜으로 인하여 56000명이 응급으로 치료로 받았고 이중 2600명이 입원 그리고 매년 500명이 사망함.

<참고문헌>

Agrawal S, Khazaeni B. Acetaminophen Toxicity. [Updated 2023 Jun 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441917/>

Acetaminophen toxicity is the second most common cause of liver transplantation worldwide and the most common cause of liver transplantation in the US. It is responsible for 56,000 emergency department visits, 2,600 hospitalizations, and 500 deaths per year in the United States. Fifty percent of these are unintentional overdoses. More than 60 million Americans consume acetaminophen on a weekly basis, and many are unaware that it is contained in combined products. This activity reviews the etiology, evaluation, and treatment of acetaminophen overdose and highlights the importance of the interprofessional team in both managing and preventing this problem.

- **유럽의 대책;** 유럽에서 아세트아미노펜 서방형 제제에 대해 시판허가 중지를 결정. 서방제인 경우 약효의 지연에 의한 느린 항통제에 대항하여 빠른 약효를 위해 1회에 과용량 복용으로 발생하는 독성 문제

② 아세트아미노펜 복용을 위한 안전성의 대책

- 복용량의 측면: “The recommended dose of acetaminophen for adults is 650 mg to 1000 mg every 4 to 6 hours, not to exceed 4 grams/day”.
- CYP2E1에 의한 친전자성대사체 생성을 막기 위해 간에서 CYP2E1을 유도하는 알코올, 음주 전후를 피할 것.
- Cytochrome P450의 반감기는 48시간이므로 음주 후 약물은 3-4일 지난 후 복용(박영철, 2010)

③ 아세트아미노펜이 유전독성을 유발하지 않는 이유

- 친전자성 강도에 따라 단백질 및 DNA에 공유결합. 친전자성이 강하면 DNA에 결합하여 유전독성을 유발, 반면에 약하면 단백질에 결합하여 효소 활성 저해. 아세트아미노펜은 약 친전자성대사체를 생성 (LoPachin 등, 2005; 박영철, 2010)

<참고문헌>

LoPachin, RM. (2005). Anthony P. DeCaprio., Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity. Toxicological science. 86(2):214-225.

박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

9. 파라셀수스 가설에 대한 기전독성학(mechanistic toxicology) 측면의 결론

<가설-1> Paracelsus의 “Solely the dose determines that a thing is not a poison”에 대한 반론

- 학회나 논문을 보면 파라셀수스의 ‘용량이 약과 독을 결정한다’는 도그마는 지금도 학계와 산업계를 지배하고 있음.
- 하나의 돌연변이가 발암으로 연결된다는 점을 고려한다면 DNA에 공유결합하는 친전자성대사체로 전환되는 물질은 위해성 측면에서 zero-threshold
- 따라서 파라셀수스의 가설은 용량이 아니라 친전자성대사체로의 전환 유무가 약과 독을 결정하는 측면에서 부합하지 않음

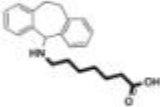
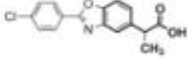
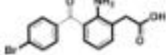
10. 규제독성학 측면에서의 파라셀수스 가설에 대한 반론

1) Reactive intermediate(=metabolites)로의 전환 약물에 대한 시장에서의 퇴출

- <Table -1>은 IADR(idiosyncratic adverse drug reactions, 개체특이적 이상약물반응)을 나타낸 약물과 reactive metabolites(RM) 생성과의 관계를 나타내 것임(첨부논문; Stepan 등, 2011)
- 후향적 조사를 통해 이들 약물 대부분은 시장에서 퇴출됨.

Chemical Research in Toxicology REVIEW

Table 1. Structural Alert and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADRs

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA (Å ²)	Reason for Withdrawal	Daily Dose ^a (mg)	Alerts	Reactive Metabolite Formation ^b
Amitriptyline (1)	Antidepressant	Acid	337	2.51	48.30	Hepatotoxicity Continuous ADRs	200	Short to medium chain fatty acid	Yes ^{W-W}
									
Bismoxifen (2)	NSAID	Acid	301	3.82	58.90	Hepatotoxicity	300-600	Arylcarboxylic acid	Yes ^{W-W}
									
Bismoxifen (3)	NSAID	Acid	334	3.28	66.40	Hepatotoxicity	25-50	Aniline, Arylcarboxylic acid, Bromobenzene	Yes ^W
									

2) 규제독성학 측면에서 반론

- 만약 파라셀수스의 가설처럼 용량이 약과 독을 결정한다면 친전자성대사체를 생성하는 약물이라도 퇴출할 수 없고 타이레놀처럼 용량 감소로 여전히 시장에 존재할 것임
- 따라서 파라셀수스의 가설은 규제독성학적 측면에서도 부합하지 않음

3) Stepan 등 (2011) 등의 논문에서 중요한 문장에 대한 해석

- 친전자성대사체(RM, reactive metabolites) 생성에 의한 독성으로 퇴출되는 약물은 전체의 62-69%임.
- (원문) Collectively, our analysis revealed that a significant proportion (~78-86%) of drugs associated with toxicity contained structural alerts and evidence indicating that RM formation as a causative factor for toxicity has been presented in 62-69% of these molecules.
- <의견> Small molecule의 독성은 ① 친전자성대사체 생성 ② 과잉 약리작용에 기인함. 따라서 나머지는 약물 30% 정도는 과잉약리작용 또는 다른 표적 수용체가 아닌 다른 수용체에 작용하여 부작용을 유발 가능성이 높음. 따라서 이들 30% 약물은 threshold가

존재하고 용량 조절을 통해 가능하다고 사료됨.

11. 기술독성학(descriptive toxicology) 측면에서의 파라셀수스 가설에 대한 반론

1) Idiosyncratic toxicity와 intrinsic toxicity의 의미와 중요성

- Stepan 등 (2011) 등의 논문에서 'Can a low dose drug candidate truly mitigate metabolism-dependent and -independent idiosyncratic toxicity risks?'에서 idiosyncratic toxicity 의미는 대단히 중요하며 개체특이적 독성이라는 의미임
- 임상시험 또는 환자에서 나타나는 'idiosyncratic toxicity'는 동물을 이용한 전임상 독성 시험에서 확인할 수 없음. 이유는 독성시험에서는 'intrinsic toxicity'이라는 본질적 독성을 확인하기 때문임.
- 'Intrinsic toxicity'은 화합물질 자체가 가지고 있는 독성으로 동물 개체가 대사 가능한 범위 내의 용량에 의해 나타나는 독성을 의미함(박영철, 2019)
- 즉, 독성시험에서는 동종교배(in breeding)를 통해 생산된 동물이 사용됨. 이들 동물들은 동일한 유전자적 특성으로 약물에 대해 동일한 반응이 나타남.
- 반면에 환자들은 다양한 유전자적 특징을 가지고 있어 약물에 대해 개체-특이적 독성인 idiosyncratic toxicity이 나타남. 이는 전임상 독성시험이 IND 통과하여 임상시험에 응용 되는 비율이 10%에 불과한 이유 중의 하나임.
- 이와 같이 동물을 이용한 비임상시험과 임상시험에서의 유전자적 차이는 intrinsic response와 idiosyncratic response를 유도할 수 있음. 따라서 비임상시험에서의 독성과 효능이 임상시험에서 독성과 효능에서 차이가 있을 수 있을 때 intrinsic response와 idiosyncratic response 측면에서 재고할 필요성이 있음

<참고문헌>

- Antonia F. Stepan, et al., Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. Chem. Res. Toxicol.2011, 24, 9, 1345-1410
- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7

2) 기술독성학(descriptive toxicology) - 왜 화합물질에 대한 독성시험은 2종의 동물종으로

수행되는가?

- 기술독성학(descriptive toxicology)이란 GLP-기반 가이드라인 독성시험을 의미함.
- 아래의 <표>는 “ICH M3(R2)—Guideline on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals”
- 임상시험을 위해 IND(investigational new drug)를 통과하여야 함. 그런데 합성의약품인 small molecule은 2종의 동물(설치류 1종과 비설치류 1종)이지만 바이오로직스는 비설치류 1종만으로도 독성시험으로도 통과가 가능함.

Repeated dose toxicity (ICH M3(R2))	Small molecule	Biologics
Rodent multidose	O	Optional
Nonrodent multidose	O	O

- 이와 같이 small molecule과 biologics에서 동물종의 수에서 차이가 나는 이유는 무엇일 까에 대한 궁금증을 오랫동안 가졌음
- 화학물질은 ① 원물질(parent compound)의 친전자성대사체로의 전환, ② 과잉용량(over dose), 그러나 바이오로직스는 오로지 ① 과잉용량에 의한 독성기전으로 궁금증에 대한 이유가 설명됨.
- 만약, small molecule과 biologics가 동일하게 단지 과잉용량에 의해서만 독성이 유발된 다면 굳이 2종의 동물종을 사용할 필요가 없음.
- 그러나 화학물질에 의한 친전자성대사체 생성 유무가 종간 차이에 의해 영향이 있기 때 문에 여러 종을 통해 Cross-check가 필요하고 결과적으로 2종을 사용하여 독성시험이 수행됨. 반면에 바이오로직스의 경우에는 오로지 과잉용량에 의해서 독성이 발생하기 때 문에 종간 차이가 없어 1종의 동물종으로 수행된 반복투여독성시험 결과를 IND를 위해 제출하게 됨.
- 따라서 Paracelsus 가설 “Solely the dose determines that a thing is not a poison” 즉 용량이 독성을 결정한다면 모든 독성시험에서 1종의 동물만 사용하면 됨.
- 그러나, 화학물질에 의한 독성은 용량만이 독성을 결정하지 않기 때문에 2종의 동물종을 사용하는 것으로 기전독성학 측면에서 Paracelsus 가설의 반론에 대한 근거가 됨.

3) 기술독성학(descriptive toxicology) - 왜 바이오의약품에 대한 독성시험은 1종의 동물종으로 가능한가?

- 오늘날 약물 모달리티(drug modality)의 다양성으로 Biologics(바이오의약품)의 분류 기준이 다양하며 다소 혼란스러움.
- 그러나 아래와 같이 small molecule과 biologics의 분류를 <표 8-11>과 같이 reactive metabolites 생성 유무와 더불어 대부분 약물의 2가지 독성기전 즉, ① 원물질(parent compound)의 친전자성대사체로의 전환, ② 과잉용량(over dose) 등의 측면에서 분류하는 것이 바람직할 것으로 사료됨(Weir 등, 2012; 박영철, 2023).

<표 8-11> 점안제의 소분자 합성의약품과 바이오의약품의 차이

Small molecules	Biologics
<ul style="list-style-type: none"> • Chemically synthesized organic molecule • Greater potential for off-target effects due to the potential for chemical impurities, active/reactive metabolites, extensive distribution in the body, and activity at multiple receptors or enzymes • Generally active and, therefore, potentially toxic in many species • Generally no or negligible potential for immunogenicity • Pharmacokinetic and pharmacologic considerations when selecting species for nonclinical studies 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteins obtained from living cells • Highly targeted, due to lack of chemical impurities and active/reactive metabolites and decreased potential for extensive distribution as a result of large molecular weight • Activity and toxicity generally limited to animals possessing the intended receptor or epitope (i.e., pharmacologically relevant animal model/species) • Primarily pharmacologic considerations when selecting relevant species for nonclinical studies • Animals can frequently mount an immune response (immunogenicity) to biologics

- 반면에 biologis의 경우에 아래의 <표-1>에서처럼 생체를 구성하는 거대분자인 당, 단백질, 지질 그리고 핵산 등의 개별 category, 생명체의 기본단위인 세포 category, 항체 및 유전자 등과 같이 목적성과 방법이 명확하게 인식할 수 있는 category 등으로 분류하는 것이 타당할 것으로 사료됨.

<표-1> 바이오로직스의 category

Category	Description	Modalities
Antibodies	<ul style="list-style-type: none"> Mass production of antibodies that recognize specific targets 	mAb (monoclonal antibody) ADC(Antibody-drug conjugate) BsAb(Bi-specific antibody) Recombinant proteins and peptides
Proteins and peptides	<ul style="list-style-type: none"> Natural or engineered proteins intended to replace absent or abnormal proteins or to affect another function 	
Cell therapies	<ul style="list-style-type: none"> Manipulation of immune cell function and regenerative medicine to combat disease 	Cell therapies CAR-T (Chimeric antigen receptor-T cell) Stem cells TCRT (T-cell receptor therapy) CAR-NK (Chimeric antigen receptor-Natural Killer cell) TILS (Tumor-infiltrating lymphocytes)
Gene therapies	<ul style="list-style-type: none"> Introduction or modification of DNA in targeted tissues 	Gene augmentation Gene editing
Nucleic acids	<ul style="list-style-type: none"> Injection of genetically engineered DNA or RNA 	DNA and RNA therapies RNAi mRNA
Other new modalities	<ul style="list-style-type: none"> Viruses that target and lyse cancer cells Treatment by restoring healthy gut microbiota Targeted protein degradation via ubiquitylation 	Oncolytic viruses Microbiomes PROTAC (Proteolysis-targeting chimera)

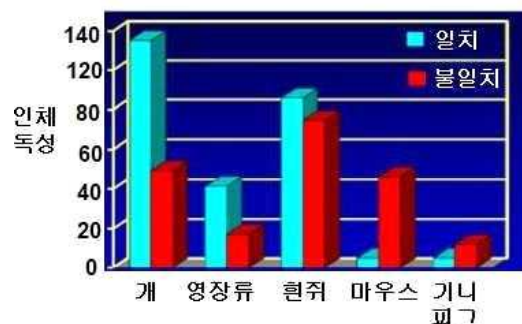
- 바이오로직스의 독성기전은 단순히 과잉약리 기전이며 종간 차이가 없기 때문에 1종으로 한다고 사료됨(ICH M3(R2)—Guideline),

<표-2> (ICH M3(R2)—Guideline에 따른 반복투여독성시험에서 시험물질별 종의 선택

Repeated dose toxicity (ICH M3(R2))	Small molecule	Biologics
Rodent multidose	O	Optional
Nonrodent multidose	O	O

① 그럼 왜 하필이면 Biologics의 반복투여독성시험에서 비설치류가 우선이고 설치류는 선택적이라는 가이드라인에 대한 논리는 무엇일까?

- 후보약물 114종에 대한 임상시험을 통해 확인된 인체 독성의 221종과 5종의 동물인 개, 영장류, 흰쥐, 마우스, 기니피그 등을 이용한 114종에 대한 비임상 독성시험에서 나타난 비교를 통해 일치율 및 불일치율이 확인(Olson, 2000).
- 랫드의 일치율 3%를 제외한 마우스, 기니피그의 일치율은 상당히 낮음. 반면에 비인간 영장류와 개의 경우는 60-70% 정도 높음.
- 독성의 종류 중 가장 높은 일치율로 나타난 것은 혈액학, 위장계, 심혈관계 독성이었으며 가장 낮은 일치율은 피부 독성이었음.
- 이와 같이 임상시험에서 독성에 대한 높은 예측율에 기인하여 바이오로직스의 반복 투여독성시험에서 비글견 및 비인간-영장류(non-human primate)를 사용하는 것으로 추정됨



<그림 4-1> 동물종에 따른 임상시험 및 독성시험의 독성 일치율

<참고문헌>

- ▶ Weir, AB, Wilson, SD. Nonclinical Regulatory Aspects for Ophthalmic Drugs. In: Weir, A., Collins, M. (eds) Assessing Ocular Toxicology in Laboratory Animals. Molecular and Integrative Toxicology. Humana Press, Totowa, NJ. 2012.
- ▶ 2023년: 박영철 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7
- ▶ Boston consulting group, 2023
www.bcg.com/publications/2023/benefits-and-risks-of-new-drug-modalities
- ▶ ICH M3(R2)—Guideline on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals”
- ▶ Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. Regul Toxicol Pharmacol. 2000;32(1):56-67.

② 그럼 왜 설치류에 대한 바이오로직스의 반복투여독성시험에서 선택(optional)
사항이 존재하는가?

- 이에 대한 이해를 위해서는 ㉠ 바이오로직스의 target-specificity가 확실하다는 점, ㉡ 과잉용량에 의한 adverse effect, ㉢ USFDA의 가이드라인 등의 측면을 고려할 필요성

㉠ 바이오로직스의 target-specificity가 확실하다는 점

- 예시로 항암제로 mAB를 개발한다면 인체의 암세포 표면 항원이 명확한 표적이 확실하게 확인되거나 인체에 정상적으로 존재하는 확실한 표적이 존재하는 것을 확인한 후 개발을 시작함

㉡ 과잉용량에 의한 adverse effect

- 2006년 영국에서 백혈병 치료제인 TGN1412의 임상시험에 의한 비극을 예시를 들 수 있음
- TGN1412은 단일클론항체(Anti-CD28 monoclonal antibody)로 백혈구 표면의 면역계 단백질인 CD28에만 특이적 결합.
- 그러나 CD28은 사람에게만 존재하는 면역계 단백질임. 따라서 동물을 이용한 독성시험에서 TGN1412의 adverse effect를 확인하기는 어려움.
- 결과적으로 임상시험에서 TGN1412 결합에 의한 CD28 활성화는 사이토카인(cytokine)의 과도한 분비 즉, 사이토카인 폭풍(cytokine storm)로 염증성 혈관손상과 다발성장기부전을 유도하여 혼수상태, 그리고 후에 사망이나 암도 유발됨
- 이후 MRSD(maximum recommended starting dose, 최초임상권장최대용량) 추정을 위 small molecule과 biologics 등의 모든 modality에 적용되었던 NOAEL(no observed adverse effect level)을 대신하여 MABEL(minimum anticipated biological effect level, 최소생물학적기대효능용량)으로 개발됨(Muller 등, 2009).
- 여기서 2가지 생각이 듦: ① 백신을 제외하고 표적이 너무나 명확한 바이오로직스의 임상시험에 있어서 건강한 사람을 대상으로 안전성 확인에 대한 불필요성. ② 백신을 제외하고 국소 주입으로 전신으로 이동으로 가능성이 낮음

㉢ USFDA의 가이드라인 등의 측면을 고려

- <참고문헌> USFDA.(2022) 및 현대화법(modernization act)에 대한 내용을 확인할 필요성이 있음 (Han 등, 2023)

- COVID-19로 NHP(non-human primate, 비인간 영장류)의 공급이 부족하고 현대화법에 따라 NHP 사용을 엄격히 제한하고 있으면 다음과 같이 모달리티에 따라 동물종 선택을 권장함
- <General Tox – Small Molecules: Small molecule에 대한 반복투여독성시험>
 - “We discourage the use of NHPs for the general toxicology assessment of small molecule drugs, unless the sponsor can provide a scientifically compelling reason why NHPs must be used”: Small molecule의 반복투여독성시험에서 NHP 사용을 권장하지 않고 만약 사용하였다면 왜 사용하였는지에 대한 과학적 설명이 요구됨
- <General Tox – Biologics: Biologics에 대한 반복투여독성시험>
 - If the biological product is active in other nonrodent species(e.g.; dog, minipig), the sponsor should conduct any warranted general toxicity studies in a nonrodent species other than the NHP, whenever scientifically justified.: 바이오로직스가 비설치류(dog & minipig 추천)에서 약리학적 증명이 확인되었다면 NHP 대신에 유효성 시험에 응용된 비설치류를 이용하여 반복투여독성시험을 수행하며 이에 대한 과학적 증명.
 - On a case-by-case basis, if the biological product is active in a rodent and acts on a well-characterized target (e.g., vascular endothelial growth factor, or its receptor), it may be scientifically appropriate for sponsors to conduct warranted general toxicity studies only in the rodent: 바이오의약품이 설치류에서 약리적 효능이 있을 경우에 설치류를 이용하여 반복투여독성시험이 가능

㉔ 결론:

- Small molecule과 biologics에 대한 독성 및 약리 기전의 차이에 대한 명확한 인식의 필요성
- Biologics는 target-specificity를 명확하게 하고 개발되고 과잉약리작용에 의해 adverse effect가 유발됨으로 target이 없는 동물종을 이용한 독성시험은 의미가 없음을 인식할 필요성.
- 아래의 <표-2>에서처럼 biologics 경우에는 반복투여독성시험 1종을 하고 선택적(optional) 1종을 더 수행하는 것이 아니라 비설치류보다 설치류가 더 적절한 경우에는 설치류 1종으로 반복투여독성시험이 가능하다는 것임. 또한 DART(developmental and reproductive toxicity)에도 유사하게 적용되거나 in vitro 시험대체 가능함
- 이와 같은 사실을 기초로 판단되는 것은 biologics에 대한 미래의 독성시험에서 설치

류 또는 비설치류와 상관없이 표적을 가진 동물종 또는 질환동물모델을 이용하여 약리와 독성시험이 동시에 이루어질 가능성이 높으며 이것이 임상시험에서 안전성 확보의 방법으로 사료됨.

<표-2> (ICH M3(R2)—Guideline에 따른 반복투여독성시험에서 시험물질별 종의 선택

Repeated dose toxicity (ICH M3(R2))	Small molecule	Biologics
Rodent multidose	O	Optional
Nonrodent multidose	O	O

<참고문헌>

USFDA. 2022. Nonclinical Considerations for Mitigating Nonhuman Primate Supply Constraints Arising from the COVID-19 Pandemic Guidance for Industry

Muller PY, Milton M, Lloyd P, Sims J, Brennan FR. The minimum anticipated biological effect level (MABEL) for selection of first human dose in clinical trials with monoclonal antibodies. Curr Opin Biotechnol. 2009;20(6):722-9.

Han JJ. FDA Modernization Act 2.0 allows for alternatives to animal testing. Artif Organs. 2023 Mar;47(3):449-450.

12. “독성학에서 Paracelsus 가설에 대한 반론과 증명”에 대한 기타 의견

- 독성학의 아버지라고 불리는 Paracelsus는 1493-1541년 생애로 1538년 즉, 운명 3 년 전에 가설을 제시하였음.
- “All things are poison, and nothing is without poison; the dosage alone makes it so a thing is not a poison.”(용량이 독과 약물을 구분한다)
- 당시에는 중세가 무너지고 근대로 들어서는 르네상스 시대, 즉 과학의 발달이 시작하는 무렵일지라도 대단한 주장이었고 오늘날 인체노출안전용량을 결정하는데 있어서 근거가 되었다고 할 수 있음.
- 본 보고서에서는 유기물질의 cytochrome P450 대사를 발생하는 Reactive metabolites(intermediates, 활성중간대사체) 또는 친전자성대사체(electrophilic metabolites)를 기반으로 3대 현대독성학인 기전독성학, 기술독성학, 규제독성학 측면에서 설명하였음.
- 이와 같은 본 보고서 외에서 주장된 **Paracelsus 가설에 대한 반론**은 Trautmann 등 (2005) 및 Grandjean (2016) 논문이 대표적임. **중요한 부분을 요약하면 다음과 같으며 이 모두가 Cytochrome P450와의 관련 유무로 설명됨.**

① Trautmann 등(2005): <참고자료-1>의 <내용>에서처럼 **급성독성을 유발하는 화학물질**에 대해서는 Paracelsus 가설이 적용될 수 있지만 저용량 장기노출에 의한 만성독성을 유발하는 물질에는 적용되기 어렵다는 점

② Grandjean (2016): <참고자료-2>의 Table 2에서 주목할 부분은 “Standard animal models may not be sensitive to critical effects in human beings임. **종간 차이의 독성이** 존재하기 때문에 가설에 부합하지 않음.

<참고자료-1> Trautmann, Nancy (September 2005). "The Dose Makes the Poison—Or Does It?". BioScience. **55**(9). American Institute of Biological Sciences: 809–810. Archived from the original on 2005-11-17.

<내용> However, there is no linear relationship and chemical toxicity is more complex than merely the acute effects caused by short-term exposure. Relatively low doses of contaminants in water, food, and environment can already have significant chronic effects if there is long-term exposure.

<참고자료-2> Grandjean P. Paracelsus Revisited: The Dose Concept in a Complex World. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2016 Aug;119(2):126–32.

Table 2

Modern challenges in toxicology where Paracelsus' candor and obstinacy might be helpful.

•	Most industrial chemicals have not been tested for toxicity
•	Due to diffuse dissemination, exposures and their sources are complex
•	Standard animal models may not be sensitive to critical effects in human beings
•	Cross-sectional human data underestimate toxicity
•	Prospective studies of exposed population are costly and time-consuming

13. 급성독성 유발 물질과 Cytochrome P450의 관계

- Trautmann 등(2005) 논문에서 **급성독성을 유발하는 화학물질**에 대해서는 Paracelsus 가설이 적용될 수 있지만 저용량 장기노출에 의한 만성독성을 유발하는 물질에는 적용되기 어렵다는 점도 Cytochrome P450의 관계로 설명이 가능함.
- 가슴기 살균제 사건을 유발한 원인물질 중 CMIT와 MIT도 포함되어 있음. 이에 대한 사건은 아직 재판 중에 있는 것으로 알고 있음.
- 이 사건의 결과가 어떻게 결론으로 유도될지는 모르지만, 환경역학(environmental epidemiology) 및 독성학(toxicology)을 전공한 저는 다음과 같은 2가지 측면 즉, ① **동물을 이용한 독성시험의 결과가 인간 집단을 대상으로 역학조사 결과를 우선할 수 없는 측면**, ② **독성기전에 대한 이해 부족 등의 측면**에서 대응에 실패한 것으로 사료되었음. 그리고 이와 같은 내용을 역사적 기록을 위해 저서 '위해성평가를 위한 독성학(2019)의 10장 법독성학과 역학 사고의 예시'에 상세히 서술하였으며 요약하면 다음과 같음.

① **동물을 이용한 독성시험의 결과가 인간 집단을 대상으로 역학조사 결과를 우선할 수 없는 측면**: 보건 및 독성 전문가들은 역학조사의 결과로 가슴기살균제와의 폐 독성 등의 인과관계가 있음에도 불구하고 독성시험을 주장하였음. 다음의 <표 8-16>은 IARC(국제암연구원의 발암성에 대한 물질의 정성평가를 분류한 것임(IARC, 2018). 인체 노출에 의한 역사조사에 의한 발암이 가장 확실한 발암물질 분류인 Group 1이며 동물시험을 통한 발암물질은 인체에 불확실성 때문에 Group 2A로 분류됨. 따라서 역학조사 결과에서 인과성이 증명되었으면 더 이상 동물을 이용한 독성시험을 할 필요성이 없으며 또한 독성시험의 결과가 역학조사의 결과를 우선할 수 없음.

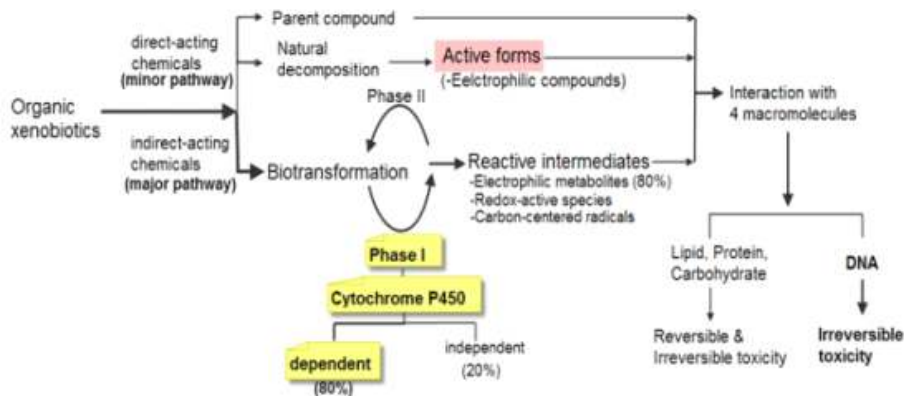
<표 8-16> IARC의 발암성에 대한 물질의 정성평가

분류	발암성	개념	물질 수 및 종류
Group 1	인체 발암물질 (carcinogenic to human)	노출과 암과의 원인관계에 대한 충분한 인체 및 역학 증거가 있음 -역학연구	120(예: 석면, 흡연, 벤젠, 콜타르)
Group 2A	인체 발암 우려물질 (probably carcinogenic to humans)	인간에 대해서 제한적인 증거가 있음 - 인간에 있어서 발암 작용의 기전을 구체적 연구를 통한 설명	82(예:디젤엔진매연, 자외선, 무기 납화합물)
Group 2B	인체 발암 가능물질 (possibly carcinogenic to humans)	동물에서는 충분한 증거가 있으나 인간에 대해서는 증거가 불충분함	311(예: 절인 채소, 가솔린 엔진의 가스, 극저주파자기장)
Group 3	인체 발암 미분류물질 (unclassifiable as to its carcinogenicity in humans)	동물에 있어서 제한적으로 증거가 있음	499(카페인, 콜레스테롤, 잉크, 커피)
Group 4	인체 비발암성 물질(probably not carcinogenic to humans)	동물에서 증거가 불충분함	1(카프로락탐<니이론 원료>)

IARC. (2018). IARC Monographs on the identification of carcinogenic hazards to human, Volumes 1-123

② 독성기전에 대한 이해 부족 측면

- 유기합성물질(Small molecule)의 독성기전은 1. 친전자성대사체 생성, 2. 과잉용량 등의 2가지로 설명
- 친전자성대사체의 생성은 Cytochrome P450 효소 시스템에 의한 대사에 기인으로 설명
- 체내에서 생성되는 유기화합물의 친전자성물질은 90%가 Cytochrome P450에 의해 발생하지만 나머지 5-10%는 생체 내에서 자연분해(natural decomposition)에 기인함
- 자연분해(natural decomposition)이란 체내에서 cytochrome P450에 의한 대사를 통하지 않고 H₂O 등의 가수분해 또는 체내 단백질 등과 비특이적 반응으로 친전자성물질(active form: 대사체가 아니기 때문에 물질)을 생성하는 과정을 의미함
- 저는 이와 같은 과정을 단순화하여 아래의 <그림>에서처럼 유기화합물 독성기전의 “Central dogma”이라고 명명하여 저서와 논문으로 발표하였음(박영철. 2010; Park 등, 2014).



<그림> 유기화합물 독성기전의 “Central dogma”(The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms?)

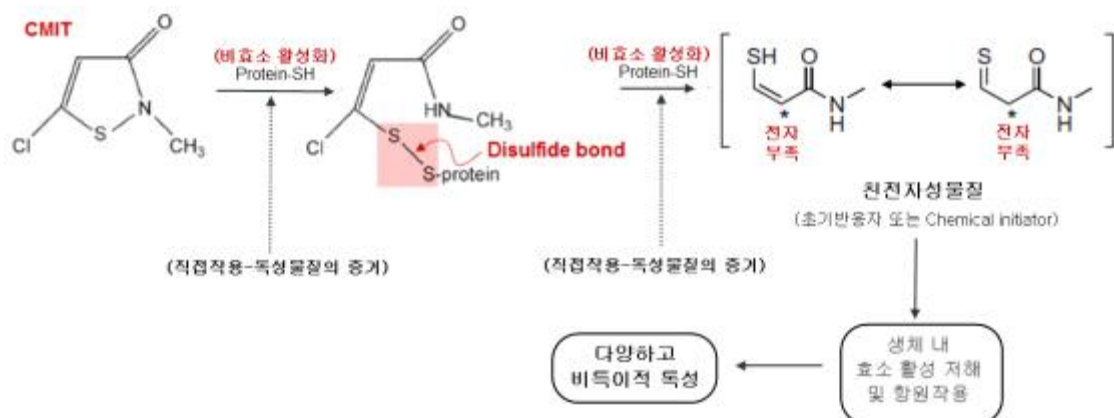
- 결과적으로 유기화합물의 독성기전의 하나인 유해활성물질 생성은 1. 자연분해에 의해 생성되는 친전자성물질(active form), 그리고 2. cytochrome P450에 의한 친전자성대사체(electrophilic metabolites) 전환 경로를 통해 이루어짐

- 두 경로의 생체 내에서 발생하는 결정적인 차이는 중간 차이임. 즉, 자연분해에 의한 친전자성물질 생성은 어느 종에서도 발생하는 독성기전이지만 cytochrome P450에 의한 친전자성대사체 발생은 아래의 <표 3-5>의 **중간 차이 및 이유**에서처럼 cytochrome P450 동종효소가 중간 차이가 있기 때문에 종마다 독성기전에서 차이가 있음(박영철, 2019)

<표 3-5> 반응자 분석을 통한 원물질의 독성학적 특성

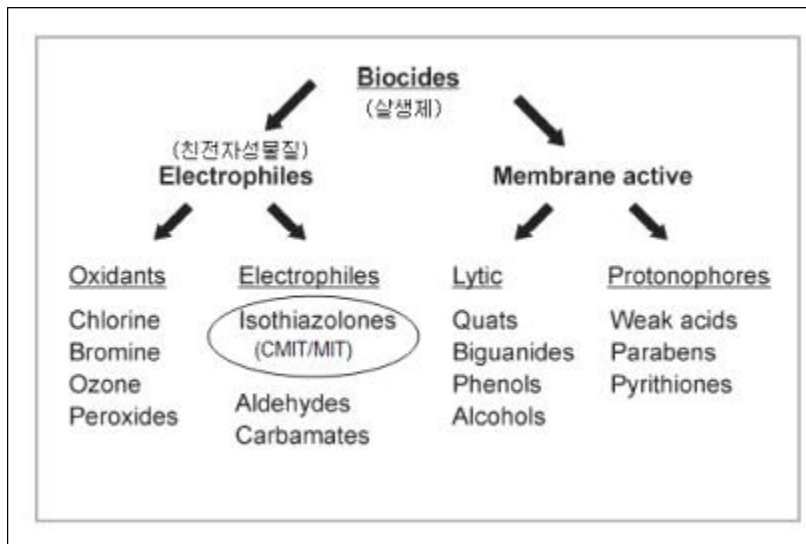
항목	직접작용-독성물질	간접작용-독성물질
초기반응자로의 전환 방법	- 단백질 친핵성 부위와 상호작용 등과 같은 자연분해	- 효소적 대사에 의한 생화학적 전환 ① Cytochrome P450 ② CYP 외의 기타 효소
초기반응자의 이름	- 친전자성전환체(electrophilics)	- 활성중간대사체 3종류: 친전자성대사체, 유기라디칼대사체, 산화-환원 순환대사체 등.
독성의 특성	- 급성 독성 - 물질에 따라 차이가 있지만, 반응성이 큰 물질은 첫 노출 부위부터 독성을 유발할 가능성 - 표적에 분포가 다른 CYP 활성화에 의존하지 않아 표적기관이 없는 비특이적 독성유발의 가능성 있음. - 효소 또는 단백질과 공유결합으로 자가 항원(autoantigen) 전환하여 면역독성 유발	- 만성 독성 - 다양한 조직에서 다양한 cytochrome P450이 존재하는데 활성화를 유도하는 CYP가 어느 조직에 존재하느냐에 따라 표적독성을 유발할 가능성이 있음. - 활성중간대사체 3종류는 독성의 유발에 있어서 공통성 그리고 차이점도 있어 다양한 독성유발 - DNA 손상, 단백질과 상호작용, 산화 스트레스 등.
생체 구성의 거대 분자와의 상호작용 방법	- DNA 염기의 친핵성 부분과 분리되지 않는 공유결합 - 단백질의 친핵성 부위인 -SH기와 공유결합	- DNA 및 단백질의 친핵성 부분과 분리되지 않는 공유결합 - 체내 무기질 등과 상호작용하여 산화 스트레스를 유발
중간 차이 및 이유	- 없음: 독성물질의 활성화 단백질 친핵성 부위 및 pH 등에 의해 이루어지는데 모든 생물체가 이러한 조건은 다 가지고 있어 중간 차이가 없이 활성화	- 있음: 활성화를 유도하는 cytochrome P450이 생물종마다 차이가 있으며 생물종에서 동일 효소의 존재에 대한 유무에 따라 중간 차이 유무가 결정됨
원리가 응용된 독성시험	- In vitro 유전독성시험 직접법: cytochrome P450을 포함한 랫드 간의 S9 분획이 없이 시험방법	- In vitro 유전독성시험의 대사활성법: cytochrome P450이 포함된 S9 분획이 있는 시험방법
약물로의 가능성	- 급성독성을 유발하며 노출되는 부위부터 독성유발 가능성이 있어 약물로의 개발은 불가능 - 초기반응자의 생성이 효소에 의한 것이 아니고 비효소적 빠른 전환에 의한 것. 이러한 빠른 전환의 특성으로 미생물의 살생제로 개발	- 타이레놀과 같이 cytochrome P450에 독성대사체를 유발하지만, 용량 조절을 통해 약물개발의 가능성. 대부분 약물의 독성이 이에 해당됨.
화학물질의 종류	- Gilvocarcin V, cisplatin, mitomycin C, formaldehyde, tetrodotoxin, TCDD, methylisocyanate, HCN 등	- Polycyclic aromatic hydrocarbons, - cyclophosphamide, - dibrochloropropane 등 대부분의 유기성 외인성물질

- 여기서 다시 이와 같은 이론을 제시한 이유는 Paracelsus의 가설이 **급성독성을 유발하는 화학물질**에 대해서는 Paracelsus 가설이 적용될 수 있지만 저용량 장기노출에 의한 만성독성을 유발하는 물질에는 적용되기 어렵다는 점도 Cytochrome P450의 관계로 설명이 가능하다는 것임
- 그리고 급성독성의 예시로 가슴기살균제 사건의 원인물질의 하나인 CMIT/MIT 물질을 제시하기로 하였음.
- <참고문헌> Mutschler 등(2019)에 따르면 CMIT는 아래의 <그림 10-9>에서처럼 cytochrome P450에 의해 친전자성으로 전환되는 것이 아니라 생체 내 단백질 등과 비특이적 반응으로 친전자성물질로 전환되어 생체내 거대분자와 결합하여 독성을 유발하는 기전.



<그림 10-9> CMIT의 비효소적 활성화를 통해 독성을 유발하는 기전(박영철, 2019)

- 또한 Williams 등(2007)은 <그림 10-10>에서처럼 미생물의 살생하는 독성기전에 따라 살생물제(biocide)의 종류를 분류하였다. CMIT/MIT는 <그림 10-9>에서처럼 3개의 탄소 원자, 한 개의 질소 원자 그리고 하나의 황 원자를 구성된 헤테로고리(heterocyclic)를 가진 isothiazlone(또는 isothiazolinone) 계열 물질임. 분류에 따르면 CMIT/MIT를 포함하고 있는 isothiazlone(또는 isothiazolinone)는 초기반응자가 친전자성전환체 또는 친전자성물질(electrophiles)이라는 것이 확인되었음



<그림 10-10> Isothiazolone(CMIT/MIT)의 친전자성물질의 분류

<결론>

- CMIT/MIT는 물이나 단백질이 존재하는 어떤 생체 내에서 자연분해통해 친전자성물질로 전환될 수 있는 독성기전을 가진 물질이기 때문에 **미생물, 동물 그리고 인체 등의 어떤 생물체에서도 독성을 유발할 수 있음**. 이는 가습기살균제에 의한 인체 유해성을 확인하기 위해 동물 독성시험 수행의 필요성이 없다는 것임.
- 만약 CMIT/MIT가 cytochrome P450에 의해 친전자성대사체로 전환된다면 미생물도 cytochrome P450를 가지고 있기때문에 모든 미생물에 대한 살생물질의 역할을 하지 못할 것임.
- 또한 cytochrome P450에 의한 친전자성대사체에 의한 독성은 효소의 유도되는 시간 등으로 급성독성을 유발하지 못함. 살생물질이 급성독성을 유발하지 못하면 미생물 제거 측면에서 당연히 문제가 발생함.
- 따라서, 가습기살균제 CMIT/MIT에 의한 인체 유해성에 대한 긴 재판과 논란은 독성기전 측면에서 이해 부족에 기인한 사회적 및 국가적 불필요한 비용의 소비로 귀결된 사건으

로 사료됨,

<참고문헌>

- 박영철. 2010. 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Yeong-Chul Park, Sundong Lee, Myung-Haing Cho. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? Toxicol Res. 2014 Sep;30(3):179-84.
- 박영철, 2019. 박영철 위해성평가를 위한 독성학. ISBN: 978-89-268-9827-7
- Julien Mutschler, Elena Gimenez-Arnau, Leslie Foertsch, G. Frank Gerberick, Jean-Pierre Lepoittevin. Mechanistic assessment of peptide reactivity assay to predict skin allergens with KathonCG isothiazolinones. Toxicology in Vitro 23 (2009) 943-446

14. 파라셀수스의 가설에 대한 반론에 대한 결론

- 지금까지 Paracelsus의 paradox인 "What is there that is not poison? All things are poison and nothing is without poison. **Solely the dose determines that a thing is not a poison.**(모든 것은 독이며 독이 없는 것은 존재하지 않는다. 용량만이 약과 독을 결정한다)에 대한 반론을 현대독성학(modern toxicology)은 기전독성학(mechanistic toxicology, mode of action을 위한 독성학), 기술독성학(descriptive toxicology, 가이드라인-기반 독성시험), 규제독성학(regulatory toxicology: 인허가를 위한 독성학) 등 3가지 측면에서 제시
- 결과적으로 "과잉용량에 의한 독성은 독성물질의 본질이 아니며 생체 내에서 친전자성대사체 또는 친전자성물질로의 전환 유무가 독성물질을 결정한다" 개념이 필요함.
- 앞서 언급했지만 미국 FDA에서 승인받아 시장에 출시된 약물 중 80%가 친전자성대사체를 가진 약물이 시장에서 퇴출 또는 경고레벨을 표시한 것임
- 따라서 합성의약품인 small molecule의 lead molecule이 확보되면 친전자성으로의 전환 유무를 먼저 확인하고 향후 개발 방향성을 결정하는 것이 중요함
- 친전자성으로 전환된다고 하여도 반드시 약물이 되지 않는다고는 할 수 없음. 1세대 항암제 대 부분이 친전자성으로 전환되는 약물이며 이들은 ADC(antigen-drug conjugate)로 재개발이 가능하거나 다른 바이오사이드(biocide) 등으로 개발이 가능할 것으로 사료됨,

15. MRSD 설정에 있어서 SF 적용의 국내외적 차이

- 반복투여독성시험을 통해 NOAEL를 산출하고 이를 이용하여 임상시험에서의 최대안전용량인 MRSD를 추정함
- 아래의 <표>는 우리나라와 USFDA의 SF 적용에 대한 차이를 나타낸 것임. 즉, 미국에서는 탄력 적으로 SF를 적용하지만 우리나라에서는 적용하지 않음.
- 문제점: 만약 시험물질에 의한 독성이 다소 있는 상태에서 NOAEL을 설정하는 경우 우리나라에 서는 재시험, 반대로 미국 USFDA에서는 <참고자료>에서처럼 SF를 높여 MRSD를 설정. 즉, 반 복투여독성시험 결과를 가지고 SF를 높이거나 낮추어 MRSD 결정
- 개발자 입장에서는 시간과 비용의 낭비 그리고 아주 미미한 건으로 신약개발 의지를 약화 또는 신약개발 분야의 활성화에 부정적인 영향을 줌
- 신약 규제에 대한 교육을 담당하는 약학대학에서 이러한 점에 대한 교육을 통해 글로벌 스탠다드의 규제안이 마련되도록 대책을 강구할 필요성이 있음.

<표> SF 적용에 있어서 우리나라와 USFDA의 차이

항목 및 가이드라인	우리나라	USFDA
MRSD(maximum recommended starting dose, 임상시험최대권장최초용량) 산출방법	<ul style="list-style-type: none"> MRSD= HED /SF(10) HED(Human equivalent dose: 동물-인체 등가용량) = NOAEL x (Animal Km/Human Km) 종내차이: SF(Safety Factor, 안전계수) 	
Safety factor에 대한 적용 유무	허가 측면에서 적용한 건이 없는 것으로 추정됨	미국 FDA의 <참고문헌>에는 safety factor를 증가시키거나 감소를 시킬 수 있음

<자료-1> FDA의 safety factor 적용과 증가 또는 감소 상황

Application of a Safety Factor



- Determine the HED of a NOAEL in the most appropriate species, then apply a safety factor to provide a margin of safety for human volunteers
- Allows for:
 - Enhanced sensitivity in humans to the toxicity associated with a drug
 - Varied bioavailability across species
 - Difficulties detecting certain toxicities in animals e.g. headaches/myalgias
 - Differences in receptor densities or affinities
 - Interspecies differences in ADME
 - Unexpected toxicities
- $\text{HED/Safety factor (at least 10) = MRSD (mg/kg)}$

23

Is a Safety Factor of 10 Always Appropriate?



Consider increasing the safety factor if:

- Steep dose-response curve
- Severe toxicities
- Nonmonitorable toxicity e.g. histopathologic changes
- Variable bioavailability
- Irreversible toxicity
- Unexplained mortality
- Large variability in doses or drug levels that elicit an effect
- Nonlinear PK
- Novel therapeutic targets
- Animal models with limited utility

Is a Safety Factor of 10 Always Appropriate?



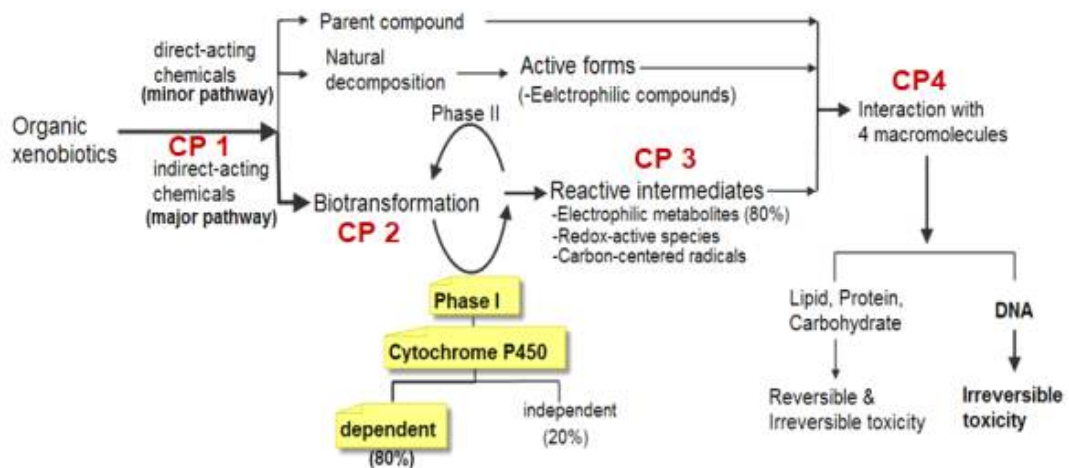
Consider decreasing the safety factor if the drug:

- Is a member of a well-characterized class – and administered by the same route, schedule and duration of administration
- Has similar metabolic profile and bioavailability
- Has similar toxicity profiles across all species tested including humans
- Toxicities are easily monitored, reversible, predictable with a relatively shallow dose-response relationship and toxicities that are consistent across species

<참고문헌>USFDA. (2005). Guidance for Industry **Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.** Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacology and Toxicology.

16. 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma

- 유기화합물의 독성기전은 중금속을 비롯하여 바이오톡스 등의 독성기전을 이해하는데 있어서 기본이 됨
- 아래의 <그림>과 같이 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma는 1957년 크릭 (F.H.C.Crick)이 유전정보가 DNA에서 RNA로 전사된 다음 단백질로 번역된다는 분자생물학의 중심개념(Central Dogma)에서 따옴.
- 분자생물학의 central dogma가 분자생물학의 새로운 지평을 열은 계기가 되었다면 유기물질(small molecule)의 central dogma는 독성학을 누구나 쉽게 이해하기 위하여 제시한 것임
- 대부분의 독성학 저서는 1인이 쓰지 않고 여러 명이 저술하기 때문에 상호 연결성이 부족하여 이해의 어려움이 있을 것이라는 생각이 들었고 이를 해결하고자 독성학에서도 central dogma 필요성이 있었음(박영철, 2010)



<그림> 유기화합물 or small molecule의 central dogma

1) Central dogma의 Check point

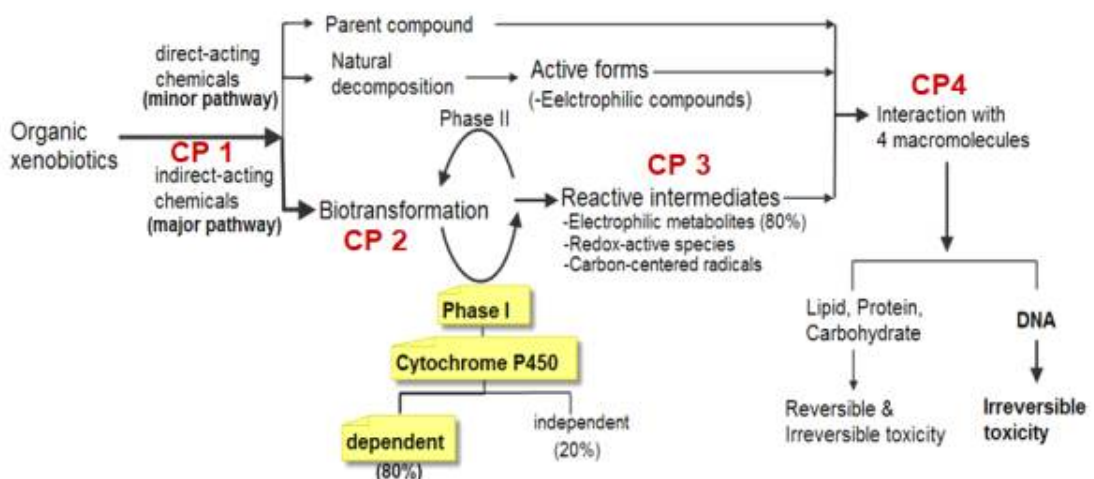
- 유기화합물(small molecule)의 역학조사에서 인과성(causal association)이 있거나 약물 스크린을 통해 약리학적으로 후보물질이 선택하면 다음과 같이 4가지 check point의 점검을 통해 인과성 또는 잠정적 약물로의 개발 가능성을 확인할 수 있음

① Check Point 1

- 유기화합물의 독성기전은 2가지 경로로 구분되며 minor pathway인 직접작용물질(direct-acting chemical)과 major pathway인 간접작용물질(indirect-acting chemical)로 구분.

② Check Point 2

- Minor pathway의 원물질(parent compound)에 의한 독성은 ① 과잉용량에 의한 과잉약리작용 또는 체내 다른 수용체에 대한 교차활성에 기인하는 독성기전과 ② 가수분해 및 단백질과 비특이적 반응으로 발생하는 자연분해(natural decomposition)에 의해 원물질의 친전자성 활성형(active form)으로의 전환에 기인함
- Major pathway는 간접작용물질의 경로이며 이는 cytochrome P450 등의 효소체계에 의한 생화학적 전환(biotransformation) 과정임. 일반적으로 대사(metabolism), 특히 catabolism(분해대사)이라함은 영양물질이 CO_2 로 분해되는 과정이지만 Biotransformation이라함은 분해가 아니라 원물질의 **친지질성이 극성 또는 친전자성**으로의 화학적 특성이 전환되는 과정임.



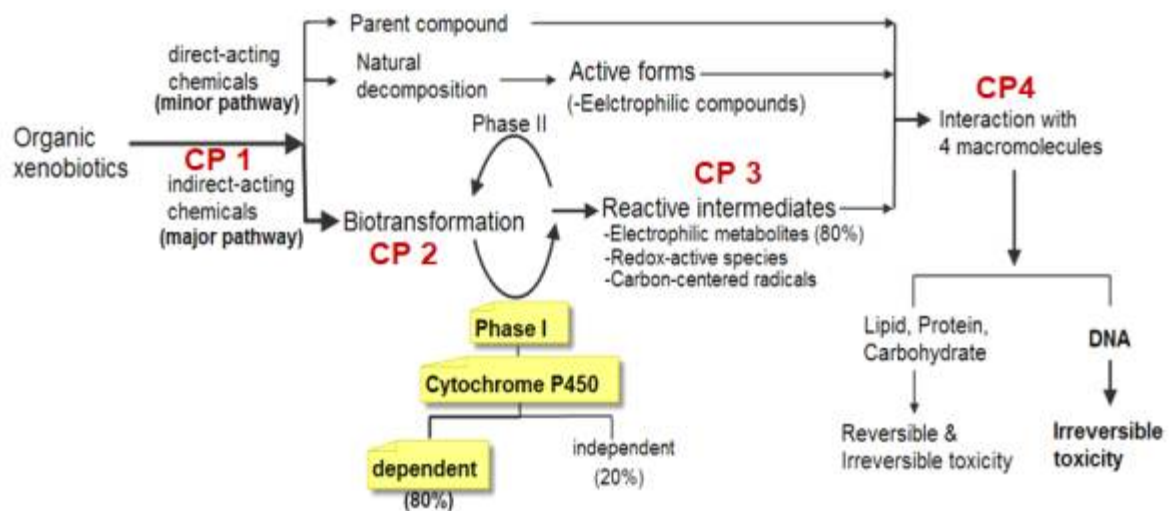
<그림> 유기화합물 or small molecule의 central dogma

③ Check Point 3

- 원물질(parent compound)이 cytochrome P450에 의해 reactive intermediate(활성중간체)로 전환되는 과정임. 저서 또는 논문에 따라 **reactive metabolite(활성 대사체)** 또는 **reactive intermediate(활성중간체)**로 표시되며 대부분 이들 물질은 biotransformation 과정의 도식에서 []로 표현됨. 즉, 공유결합의 반응성이 대단히 빠르기 때문에 그 자체로 존속하기는 쉽지 않아 일시적 또는 이행적이라는 개념으로 []로 표현됨.
- 유기물질 즉, small molecule의 Reactive metabolite(활성 대사체, RM) 또는 reactive intermediate(활성중간체, RI)는 3가지, **electrophilic metabolite(친전자성대사체)**, **carbon-centered radical(유기 및 탄소부위-라디칼)**과 **redox-active species(산화-환원순환 대사체)** 등이 있음. 모든 small molecule에 의한 독성기전은 과잉용량을 제외하고 이들에 의해 독성작용을 유발하는 기전임.

③ Check Point 4

- 생체를 구성하는 물질은 당, 단백질, 지질과 핵산 등의 4대거대분자와 미량원소이며 electrophilic metabolite, carbon-centered radical과 redox-active species 등은 이들에 영향을 통해 **가역적 또는 비가역적 adverse effect 또는 toxicity**를 유발함.



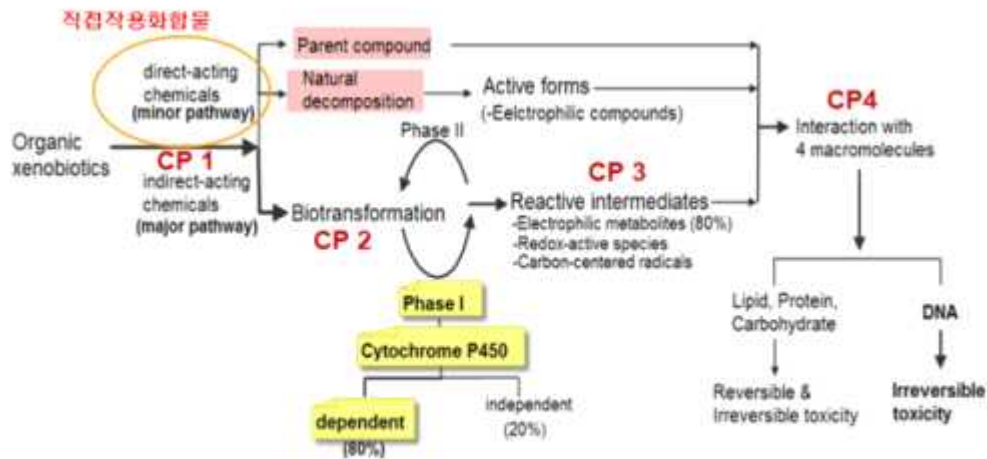
<그림> 유기화합물 or small molecule의 central dogma

<참고문헌>

- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

17. 직접작용화합물(direct-acting chemical)의 특성

- 아래의 그림에서처럼 direct-acting chemical은 원물질의 과잉용량에 의한 유기화합물과 단백질과 상호작용 및 가수분해 등의 비특이적 반응인 자연분해로 발생하는 active form(활성형 물질)으로 불리는 친전자성물질(electrophilic compound)가 있음

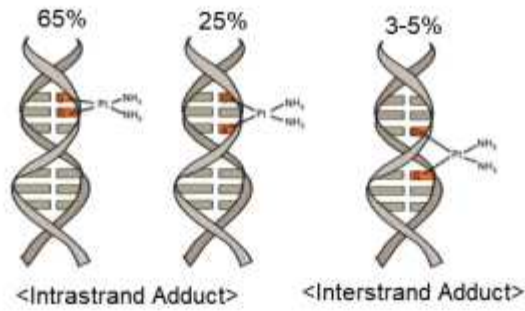


<그림> 유기화합물 or small molecule의 central dogma

- 직접작용화합물의 친전자성물질로의 전환되는 대표적인 약물 및 유기화합물은 cisplatin, Gilvocarcin V, mitomycin C, formaldehyde, tetrodotoxin, TCDD, methylisocyanate 등이 있음
- <그림>은 직접작용독성물질의 예시로 가수분해 등의 비특이적 반응을 통해 친전자성 중간체로 전환하는 cisplatin(그림-A)과 친전자성으로 수화된 cisplatin이 암세포 DNA와 공유결합을 통해 사멸하는 과정(그림-B)을 나타낸 것임(Roch 등, 2018). 그러나 제1세대 항암제인 cisplatin은 정상적인 세포의 DNA와의 공유결합을 통해 부작용을 유발하는 1세대 항암제임



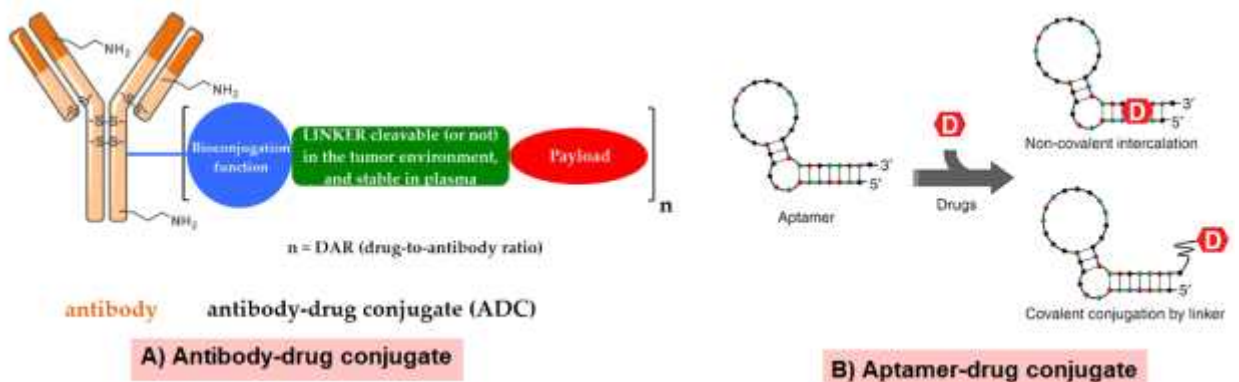
A) Cisplatin의 친전자성 과정



B) Cisplatin의 암세포 DNA 공격

<그림> 가수분해에 의해 DNA의 친핵성 부위와 반응하여 암세포를 사멸하는 cisplatin

- 이와 같이 cisplatin의 전신혈관계 통한 이동 저해를 통해 항암제의 부작용 억제 및 항암 효율을 증대하기 위해 Antibody-drug conjugate (ADC) 및 Aptamer-drug conjugates 약물 모달리티로 cisplatin이 응용되고 있음. Aptamer는 oligonucleotide임.
- <그림>의 A)와 B)와 같이 이들의 형태는 **Antibody or Aptamer + Linker + Payload(drug)**의 형태로 구성되어 직접 암부위에 주사(injection)를 통해 주입됨. 약물의 전신혈관계로 이동을 최소화하면서 빠르게 활성을 유도하는 약물의 조건이 중요함.(Falvo 등, 2013; Sun 등, 2014, Fu 등, 2022).



<그림> Antibody-drug conjugate (ADC) 및 Aptamer-drug conjugates

- 만약 cisplatin이 cytochrome P450에 의해 친전자성으로 전환되어 DNA와 공유결합을 통한 항암제 기전이면 Antibody or Aptamer + Linker + Payload(drug)에서 payload로 응용될 수 없음. 이유는 암세포가 cisplatin을 친전자성대사체로 전환이 가능한 cytochrome P450을 갖고 있지 못하면 DNA 손상을 통한 암세포 사멸을 유도할 수 없기 때문임.
- 따라서 ADC 개발을 위한 payload는 cisplatin과 같이 가수분해 등과 같은 자연분해가 가능한 직접작용화합물이 적합함.
- Payload 특성 외에 ADC 개발을 위해서는 아래의 Table 1과 같이 antibody와 aptamer의 분자의 크기와 안정성 등이 중요한 요소임(He 등, 2023)

Table 1 Comparison of aptamer and antibody.

Character	Aptamer	Antibody
Molecular weight	6–30 kDa	150–180 kDa
Size	~ 2 nm	~ 15 nm
Affinity	High	High
Specificity	High	High
Stability	Very stable	Sensitive to temperature
Targets	Wide range of targets	Immunogenic molecules
Generation discovery time	Few hours to months	Several months
<i>In vivo</i> half-life	Short (~ 20 min)	Long (~ one months)
Cost	Lower	Higher
Nuclease degradation	Sensitive	Resistant
Chemical modifications	Various modifications	Limited modifications
Secondary structure	Hairpin, stem, loop, G-quadruplex	A-helix and β -fold

<참고문헌>

Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CFM. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. Clinics (Sao Paulo). 2018 Sep 6;73(suppl 1):e478s.

Falvo E, Tremante E, Fraioli R, Leonetti C, Zamparelli C, Boffi A, Morea V, Ceci P, Giacomini P. Antibody–drug conjugates: targeting melanoma with cisplatin encapsulated in protein–cage nanoparticles based on human ferritin. Nanoscale. 2013 Dec 21;5(24):12278–85.

Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy. Signal Transduct Target Ther. 2022 Mar 22;7(1):93.

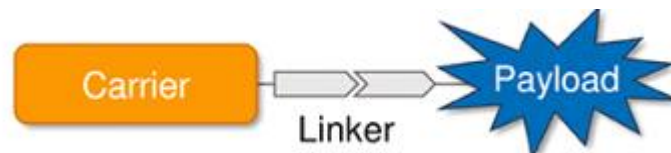
Hongguang Sun, Xun Zhu, Patrick Y Lu, Roberto R Rosato, Wen Tan, Youli Zu,

Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy, Molecular Therapy
– Nucleic Acids, Volume 3, 2014, e182, ISSN 2162-2531,

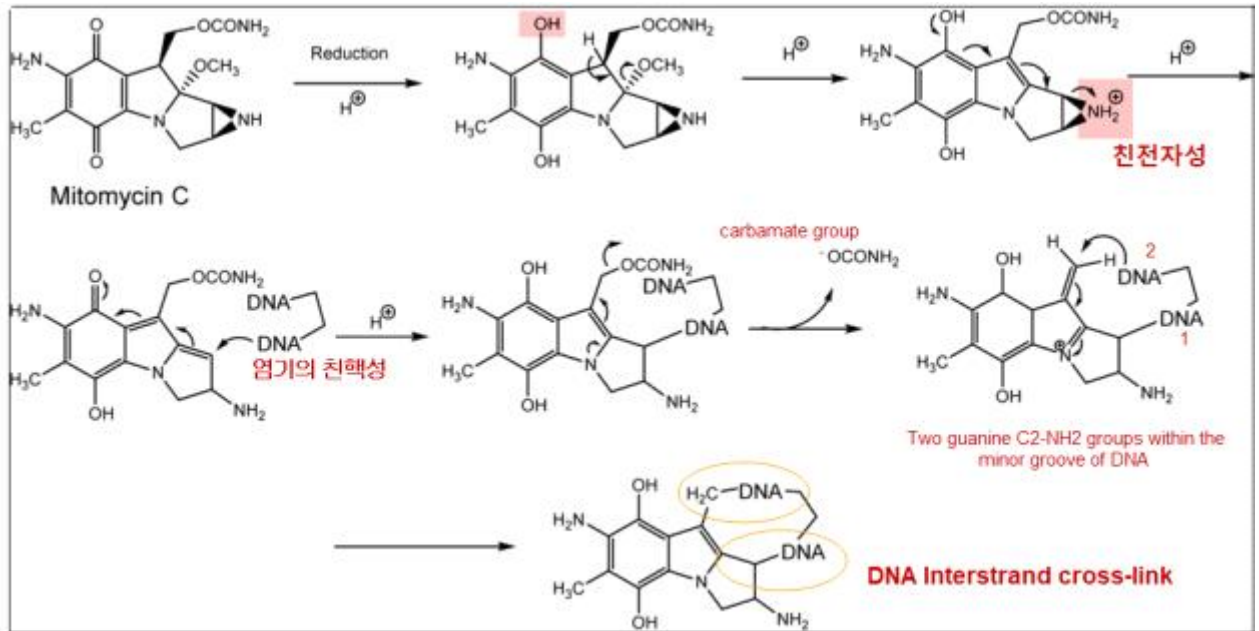
Jiaxuan He, Duan Q, Ran C, Fu T, Liu Y, Tan W. Recent progress of aptamer-drug
conjugates in cancer therapy. Acta Pharm Sin B. 2023

18. 직접작용화합물(direct-acting chemical)과 Aptamer-mitomycin C conjugates(ApDC)

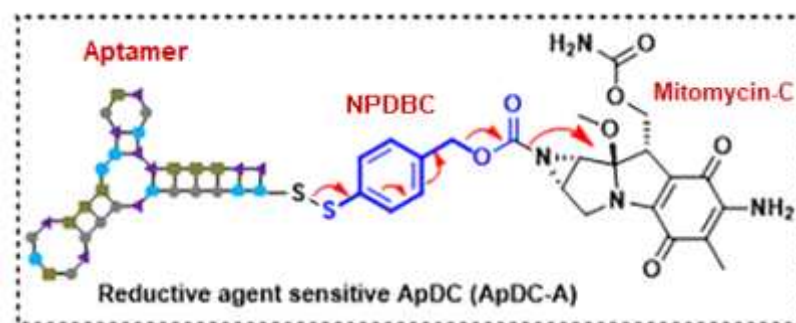
- Antibody-drug conjugate를 약어로 ADC, 그리고 Aptamer-drug conjugate를 ApDC라고 함
- ADC와 ApDC의 중요성은 target recognition 측면에서 유사하지만 무엇보다도 독성기전 측면에서는 small molecule의 cellular internalization, 즉 약물이 세포 내로의 유입에 대한 영향이 고려 대상.
- 앞서 언급한 것처럼 첫 번째 항암제는 cytochrome P450에 의한 친전자성이 아닌 자연 분해에 의한 친전자성으로 전환되는 특징을 가져야 하며 두 번째는 암조직의 미세환경에서 target receptor에 결합하는 Carrier 즉 antibody 또는 aptamer의 안전성, 세 번째는 linker의 특성임.



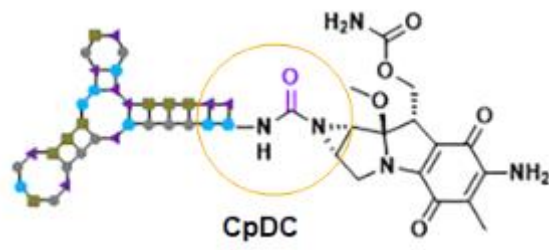
- 암조직 미세환경에서 antibody보다 aptamer가 더 안정성 높다는 것은 52페이지 Table 1에 제시되었음.
- <그림>은 carrier로 aptamer, 그리고 자연분해 약물로 1세대 항암제 mitomycin C를 연결한 Linker의 역할을 통한 항암제의 internalization 증가를 독성기전 측면에서 설명이 가능.
- Small molecule의 독성기전은 1. 과잉용량, 2. 친전자성 활성대사체로 전환에 기인함. 특히 ADC나 ApDC의 경우에는 cytochrome P450에 의한 전환이 아니라 자연분해에 의한 전환 특성을 가져야 암세포 사멸을 유도할 수 있음. Cytochrome P450의 유도 발현 시간도 문제지만 이질성이 특성인 암세포에 있어서 유도발현 및 독성 및 무독성 대사체의 확인도 어려움.
- <그림>은 직접작용 항암제인 mitomycin C가 환원(reduction)에 의해 자연분해에 의한 친전자성에 기인하여 DNA 염기의 친핵성 부분과 공유결합을 통해 interstrand cross-link 형성하여 암세포 사멸을 유도하는 기전(David 등, 2021).



- 이와 같이 mitomycin C를 이용한 ApDC 개발을 위해서는 암조직에서 mitomycin C를 암조직에서 얼마나 신속하게 환원 유도과 세포 내로의 내재화(internalization)가 중요하며 이를 위하여 Linker의 화학적 특성이 고려됨
- Linker로 NPDBC(4-nitrophenyl 4-(2-pyridyldithio) benzyl carbonate)를 응용하여 mitomycin C의 환원력을 유도하는 ApDC, 즉 환원성 물질에 민감하고 분리되는 disulfide bond를 가진 ApDc(Yang 등, 2020)의 <그림-A>와 환원력에 민감하지 않은 nonresponsive aptamer-MMC conjugate의 CpDC(control sequence drug conjugates, 대조군 ApDC)(그림-B)

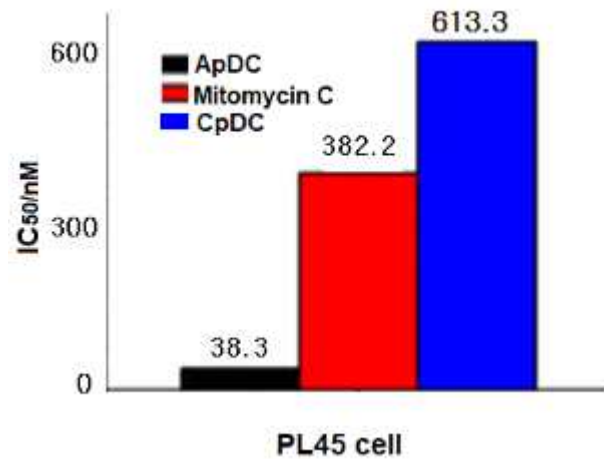


<그림-A> NPDBC Linker를 이용하여 mitomycin C의 환원을 유도하는 과정



<그림-B>환원력에 민감하지 않은 nonresponsive aptamer-MMC conjugate

- 이와 같이 Linker에 기능을 부여한 ApDC와 CpDC 그리고 mitomycin C의 pancreatic cancer의 PL45 cell에 대한 IC_{50}/nM 을 <그림>에 확인됨(Yang 등, 2020). ApDC에 의한 PL45 cell의 사멸비가 mitomycin C보다 약 10배 그리고 대조군인 CpDC보다 약 20배 높은 것으로 확인됨



<그림> ApPC, mitomycin C 그리고 대조군 CpDC에 의한 암세포(PL45 cell)에 대한 IC_{50}

- Linker의 환원력이 표적인식 증가와 암세포 내부로의 이동(internalization)으로 사멸을 증가시키는 것으로 추가적인 실험으로 확인됨
- 암세포의 일반적인 미세환경은 pH가 낮은 산성이며 암세포 내부는 알칼리성이라는 점을 감안하면 산성 환경에서 Linker의 환원력에 의한 mitomycin C의 친전자성 증가에 기인하여 염기의 높은 친핵성에 의한 attractive force로 핵 내부로 이동하는 것으로 추정됨 (순전히 개인적 의견임)
- 제약 및 바이오 업계의 국내외 시장 기반은 small molecule의 특허 해제된 generic(copy drug) 시장과 아래 <그림>처럼 USFDA 승인된 수는 미국 다음의 세계 2위 정도로 막강한 기술력에 의해 개발된 바이오의약품의 generic인 biosimilar(바이오시밀러)임



<그림> 2022년까지 USFDA에 의한 바이오시밀러 허가상황 (자료: 한국바이오협회)

- 외인성 화학물질(xenobiotics)에 대한 독성기전을 규명하는 전통적인 독성학은 바이오의약품의 출현으로 위기 상황임.
- 이는 너무나 빠르게 변화하고 있는 약물 모달리티를 고려하여 새로운 의미 부여를 통해 독성학의 새로운 역할을 찾을 필요성이 있음.
- Small molecule의 generic과 바이오의약품의 바이오시밀러의 결합체 즉, 바이오제너릭(biogeneric)의 개발에 있어 그 어느 때보다 신약의 안전성에 대한 기여뿐만 아니라 신약의 유효성 기전을 개발하는 독성학의 역할로 새로운 영역을 개척하는 기회가 될 수 있음.

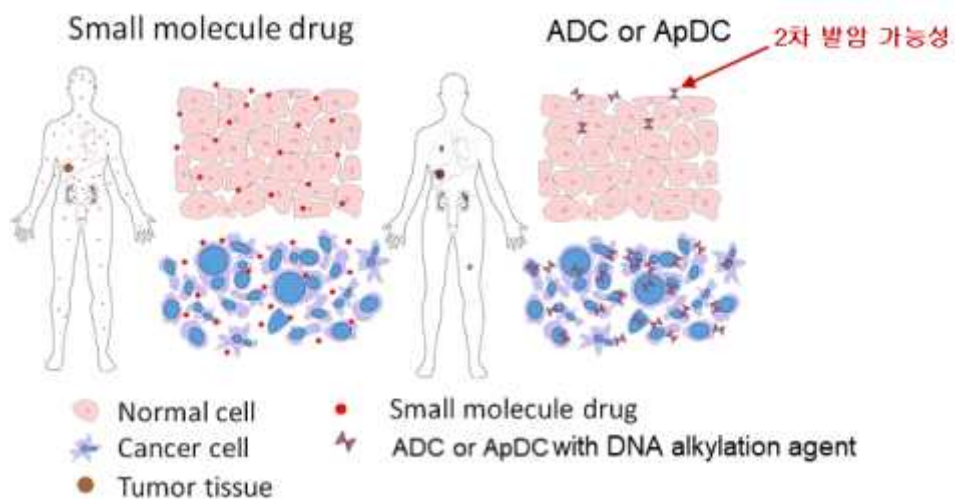
<참고문헌>

David E. Thurston, Ilona Pysz, Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs. 2nd Edition
CRC Press (2021).

Yang QX, Deng ZY, Wang D, He JX, Zhang DL, Tan Y, et al. Conjugating aptamer and mitomycin c with reductant-responsive linker leading to synergistically enhanced anticancer effect. JAm Chem Soc. 2020;142:2532e40.

19. 직접작용화합물(direct-acting chemical)을 이용한 2차 발암 예방을 위한 항암제 개발

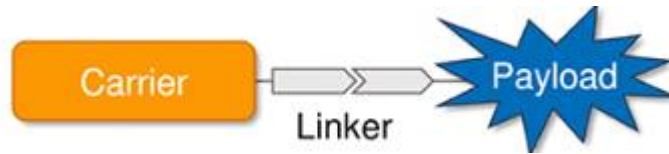
- 오늘날 바이오테크놀로지의 발전으로 신약 개발의 3가지 방법 - ① Targeted therapy, ② Precision and personalized therapy, ③ Platform technology로 개인적으로 사료됨
- 여기에 가장 적절한 신약은 2017년 FDA 승인을 얻은 CAR-T cell (Chimeric antigen receptor- T-cell, 키메라 항원 수용체 T세포) 사례를 들 수 있음. CAR-T cell 치료제는 환자의 T-cell을 환자로부터 수거하여 암세포 항원에 결합하는 유전자 삽입 및 환자에 재주입을 하여 말기 혈액암 환자에 투여되는 항암제.
- 2024년 1월 현재 FDA에 따르면, 2차 T세포 악성 종양에 대한 22건의 보고 후 Warning level 부착 조치됨. 2차 T세포 악성 종양은 T-세포에 암세포 항원 수용체에 대한 표적 유전자를 삽입(insertion)에 의한 종양원성에 기인하는 것으로 추정됨. 이는 바이러스를 이용한 유전자조작 세포치료제에 대한 잠재적 위험성이 항존하기 때문임.
- 모든 항암제의 가장 큰 허들은 정상세포의 손상 및 제2차 발암화(secondary carcinogenesis)임. 1세대 항암제인 cisplatin이나 mitomycin C를 탑재한 Antibody-drug conjugate (ADC) 및 Aptamer-drug conjugates(ApDC) 항암제에 payload인 cisplatin이나 mitomycin C도 DNA alkylation를 통해 사멸을 유도하기 때문에 국소주입을 하더라도 <그림>에서처럼 인근 정상세포의 암화에 대한 잠재성은 존재함(Dragojevic 등, 2015),



<그림> ADC 및 ApDC의 주사로 payload에 의한 정상세포의 2차 발암화

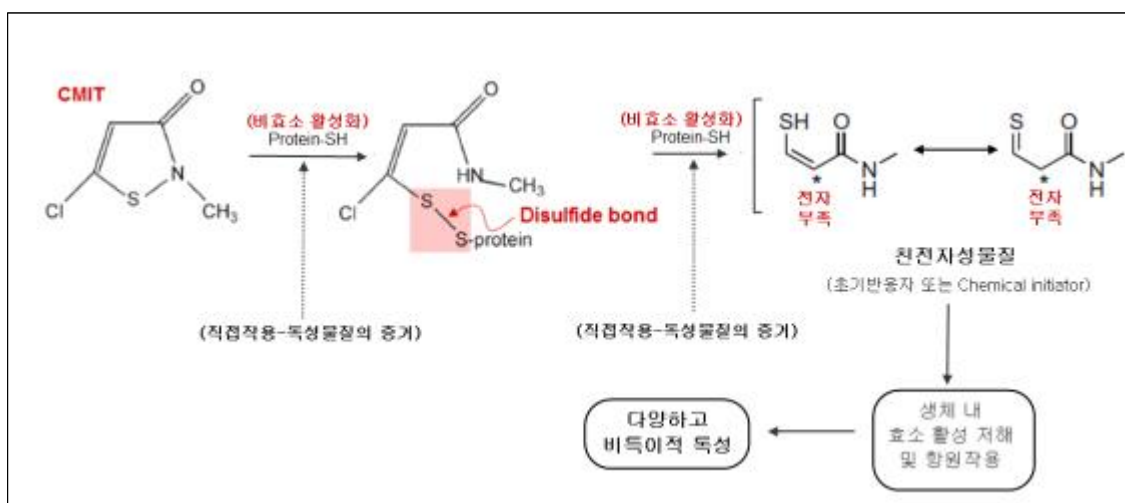
- 이와 같은 경우, ADC이나 ApDC의 Payload에 DNA alkylation 기전이 아닌 다른 기전을

가진 payload의 필요성



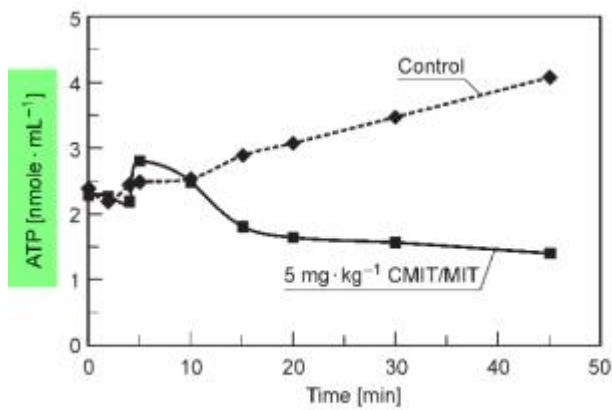
- 암세포에 신생혈관 생성 및 저해를 통해 암세포의 영양공급 차단에 의한 starving strategy로 무anti-angiogenesis(항혈관신생) 항암제도 개발됨.
- 이러한 점을 착안하여 암세포의 에너지원인 ATP 생성을 저해하는 payload로 ADC나 ApDC를 개발하면 일부 정상세포의 사멸을 유도하지만 2차 발암으로 연결되지는 않을 것으로 추정됨
- 이와 같은 조건을 만족시키는 payload는 ① 직접작용의 친전자성 전환 가능 특성과 ② ATP 고갈을 유도하는 특성, ③ 환원성 linker에 반응성을 가진 약물이 필요함.
- 독성을 유발하는 다양한 요인이 있지만 경로도 중요함. 가슴기살균제인 chloromethylisothiazolinone/methylisothiazolinone (CMIT/MIT) 중 CMIT 호흡기 노출에 의해 독성을 유도하지만 유전독성은 없는 것으로 파악되어 TDI(tolerable daily dose, 1일 노출허용량)이 존재

① 직접작용의 친전자성 전환 가능 특성: CMIT는 <그림 10-9>와 같이 cytochrome P450에 의한 전환이 아니라 비효소적으로 친전자성으로 전환((Mutschler 등, 2009; 박영철, 2019)

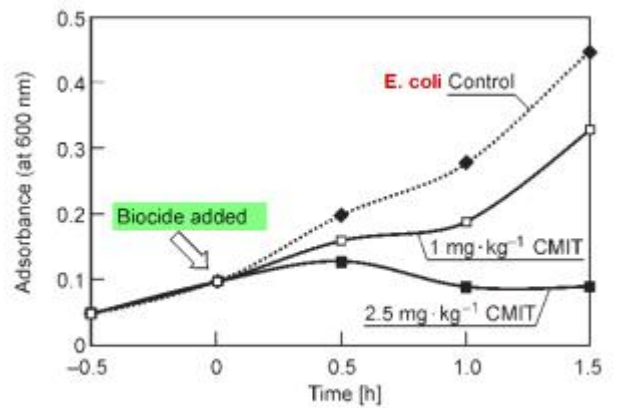


<그림 10-9> CMIT의 비효소적 활성화를 통해 독성을 유발하는 기전: CMIT는 단백질 (proetin)의 -SH와 반응하여 전자가 부족한 친전자성전환체의 초기반응자로의 전환됨. CMIT의 초기반응자는 효소와 공유결합하여 효소 활성 저해 및 자가항원에 의한 면역독성을 유발할 가능성이 있음(Mutschler, 2009).

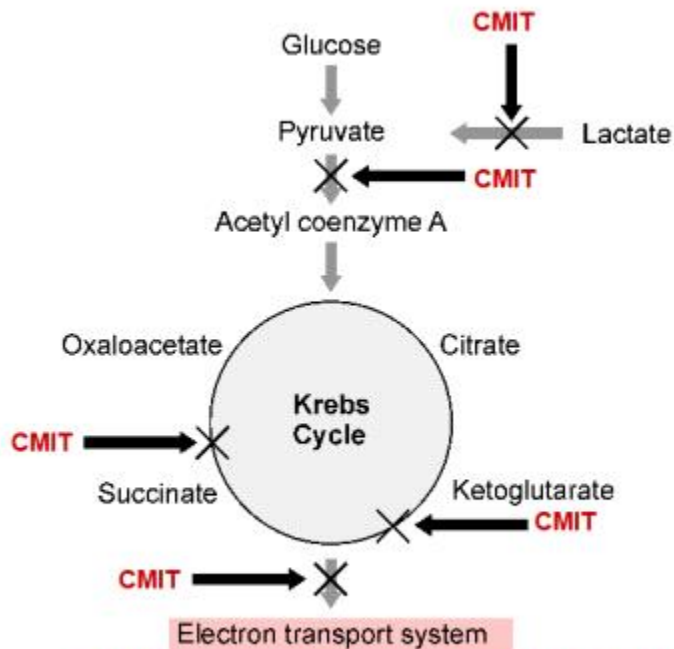
② ATP 고갈을 유도하는 특성: <그림>의 A)는 CMIT에 의해 E. coli에서 ATP 생성 억제를 나타내는 것이며 <그림>의 B)는 ATP 생성 억제와 비례적으로 CMIT에 의한 E. coli 성장을 억제하는 것을 나타냄(Williams 등, 2007). <그림>의 C)는 CMIT에 의해 ATP 생성과 연관된 Krebs cycle의 효소에 대한 저해 기전을 나타낸 것임(Williams 등, 2007).



A) E. coli에서 CMIT에 의한 ATP 생성 저하

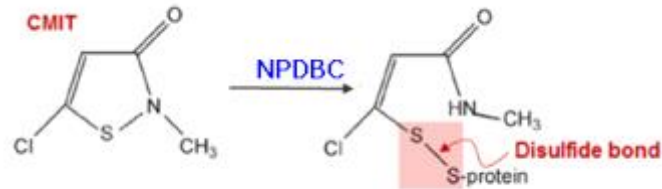


B) CMIT에 의한 ATP 생성 저하와 비례 관계의 E. coli 성장억제



C) CMIT에 의한 ATP 생성과 관련된 효소 저해 기전

③ 환원성 linker에 반응성을 가진 약물: Linker로 NPDBC(4-nitrophenyl 4-(2-pyridyldithio) benzyl carbonate를 사용하면 될 것으로 추정되며 간단히 NPDBC와 CMIT를 혼합하여 CMIT의 ring이 오픈되는지에 대한 확인



<결론>

- 혈액암이든 고형암이든 초기 암을 제외하고 암세포의 이질성에 기인하여 단 하나의 항암제로 암을 치료할 수 있는 방법은 없음
- CMIT를 이용한 ADC 및 ApDC는 최소한 2차 발암성은 없을 것으로 예상되며 주사를 통해 고형암의 margin 존재하는 암세포 사멸에 보조 항암제로 사용 가능성

<참고문헌>

Dragojevic S, Ryu JS, Raucher D. Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules*. 2015 Dec 4;20(12):21750-69.

Mutschler, J. (2009). Mechanistic assessment of peptide reactivity assay to predict skin allergens with KathonCG isothiazolinones *Toxicology in Vitro*. 23:439-446.

박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7

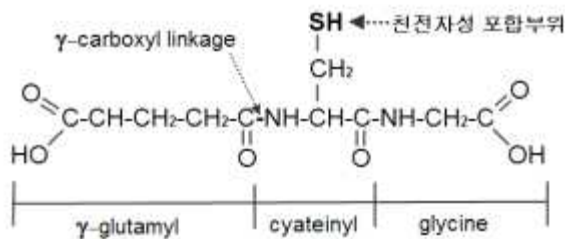
Williams TM. The mechanism of action of isothiazolone biocides. *Power Plant Chemistry*. 2007; 9(1):14-22

20. 항암제 화학요법의 내성과 암세포 전이를 촉진하는 glutathione(GSH)

- 암세포의 일반적인 미세환경은 pH가 낮은 산성이며 암세포 내부는 알칼리성이라는 점은 화학요법의 항암제 내성(resistance)과 암전이와 어떤 관계가 있을까?

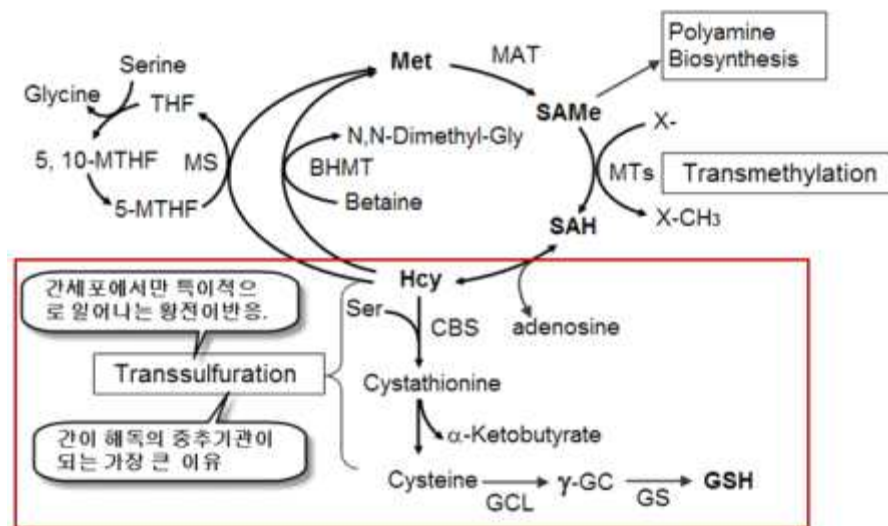
5-1) Glutathione에 대한 일반적 이해

- 글루타치온(glutathione: GSH)은 <그림-20>에서처럼 3개의 아미노산인 γ -glutamic acid, cysteine과 glycine 구성된 tripeptide임.
- Cysteine의 -SH가 친핵성이며 친전자성물질 및 대사체를 포함(conjugation)하여 제거하는 **인체의 유일한 물질**



<그림-20> GSH의 구조: GSH(glutathione 또는 γ -glutamylcysteinyl glycine)은 3개 아미노산인 glutamate, cysteine과 glycine으로 구성되어 있으며 cysteine의 SH가 포함반응에서 있어서 중요한 전자공여체이다. (박영철, 2010)

- Glutathione은 간에서만 생성되어 전신으로 이동하기 때문에 간이 해독(detoxification)의 중심기관이 되는 이유임.
- GSH가 간에서만 합성되는 이유는 간세포(hepatocyte)에만 비필수아미노산인 cysteine을 합성하는 **황전이반응(transsulfuration 또는 cysthathione pathway)** 경로(**그림의 붉은 네 모**)가 존재하기 때문.



- <그림-26> 황전이반응을 통한 간세포에서의 methionine 대사와 GSH합성 기전: 식이를 통해 흡수된 methionine의 50% 이상은 methionine adenosyltransferase(MAT)에 의해 S-adenosylmethionine(SAMe)으로 전환된다. 생성된 SAMe은 3가지 주요 대사경로인 polyamine synthesis(폴리아민 합성), transmethylation(메틸전이화)와 transsulfuration(황전이반응) 과정을 거친다. 그러나 간세포에서만 특이적으로 일어나는 황전이반응 기전에 의해 GSH의 주요 구성아미노산인 cysteine 조달이 높아진다. 이러한 간에서의 황전이반응을 통해 GSH 합성의 증가를 유도하는 cysteine bioavalibility 때문에 간이 대표적인 해독기관이 되는 이유이다. MTs; Methyltransferases, SAH; S-adenosylhomocysteine, Hcy; Homocysteine, MS; Methionine synthase, BHMT; Btadine homocysteine methyltransferase 5-MTHF; 5-methyltetrahydrofolate, 5,10-MTHF; 5,10-methylenetetrahydrofolate, THF; tetrahydrofolate, Cys; cysteine, Hcy; Homocysteine, Ser; serine, CBS; cystathionine b-synthase, GCL; glutamate cysteine ligase, γ-GC, γ-glutamyl-L-cysteine, GS; GSH synthase. (참고문헌: Lu)

- 따라서 GSH는 황전이반응 경로를 통해 합성되기 때문에 GSH 섭취하여도 소화계에서 모두 분해되어 혈중 농도 증가 영향을 주지 못할 것으로 추정되나 더 조사가 필요함

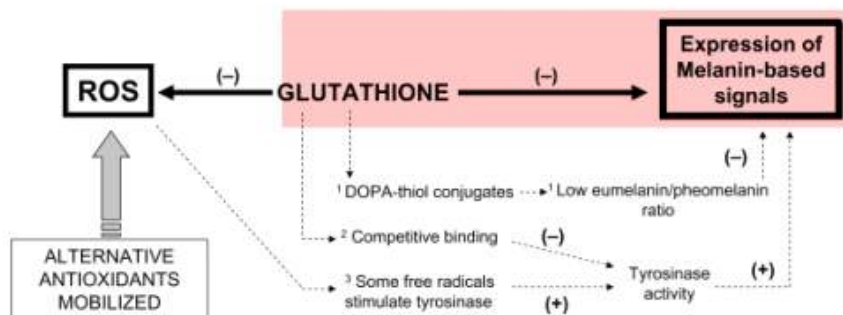
- GSH의 합성 증가는 <그림-26>에서처럼 methionine 증가에 의해 황전이반응 활성 및 cysteine 합성에 의한 GSH 합성에 기인함. 황(-SH)내용이 나는 마늘 성분 중 30-40%가 메치오닌임.
- 아래<표>는 타이레놀의 성분인 acetaminophen(APAP)으로 마우스 간독성을 유도 후 마늘(garlic)과 엉겅퀴 뿌리(대계)의 성분인 silymarin 구강 투여에 의해 glutathione 합성을 증가시키는 것으로 확인됨(Ezeala 등, 2008). 이들에 의한 증가 이유는 glutathione을 구성하는 3개의 아미노산 중 cycteine을 합성하는 -SH(황화기)를 많이 함유하고 있는 필수아미노산 메치오닌(methionine) 증가에 기인함.

Glutathione 합성을 유도하는 마늘과 엉겅퀴 뿌리의 효능

GROUP	TREATMENT	TBARS (mM/Kg)	GSH (ug/mg protein)	SOD (U/g liver)	CAT (U/g liver)
I. NEG CONTROL	0.5 mls Normal saline i.p.	11.5 ± 2.5	48 ± 4.6	85 ± 6.8	85 ± 4.4
II. POS CONTROL	250 mg/Kg APAP i.p.	26.2 ± 1.8 P<0.005	12 ± 2.4 P<0.001	14 ± 3.6 P<0.001	50 ± 3.9 P<0.05
V	250 mg/kg APAP + 750 mg/Kg garlic extract	12.2 ± 0.6 P>0.1 cf. group I; P<0.001 cf. group II	38 ± 2.8 P<0.05 cf. group I; P<0.001 cf. group II	62 ± 2.5 P<0.05 cf. group I; P<0.001 cf. group II	82 ± 2.4 P>0.1 cf. group I; P<0.01 cf. group II
VI	250 mg/Kg APAP + 25 mg/Kg silymarin	10.8 ± 0.8 P>0.1 cf. group I; P<0.005 cf. group II	45 ± 2.9 P>0.1 cf. group I; P<0.0001 cf. group II	76 ± 4.8 P>0.1 cf. group I; P<0.005 cf. group II	78 ± 2.5 P>0.1 cf. group I; P<0.000 cf. group II

APAP: Acetaminophen (Ezeala et al., 2010)

- Glutathione의 정맥 투여를 백옥주사라고함. 이는 아래의 <그림>에서처럼 GSH가 melanin 합성을 저해하는 것으로 설명되고 있음 (Weschawalit 등, 2017; Galván 등, 2008). 이와 같은 이유로 GSH 정맥주사는 피부 whitening을 위해 활용됨.



<그림> Glutathione에 의한 melanin 합성의 저해 기전

<참고문헌>

Lu, Shelly C., Regulation of glutathione synthesis, Mol Aspects Med. 2009, 30(1-2):42-59.

박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

C Ezeala, I Nweke, P Uneke, I El-Safty, E Nwaegerue. Fresh Garlic Extract Protects The Liver Against Acetaminophen Induced Toxicity. The Internet Journal of Nutrition and Wellness. 2008 Volume 7 Number 1.

Weschawalit S, Thongthip S, Phutrakool P, Asawanonda P. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2017 Apr 27;10:147-153

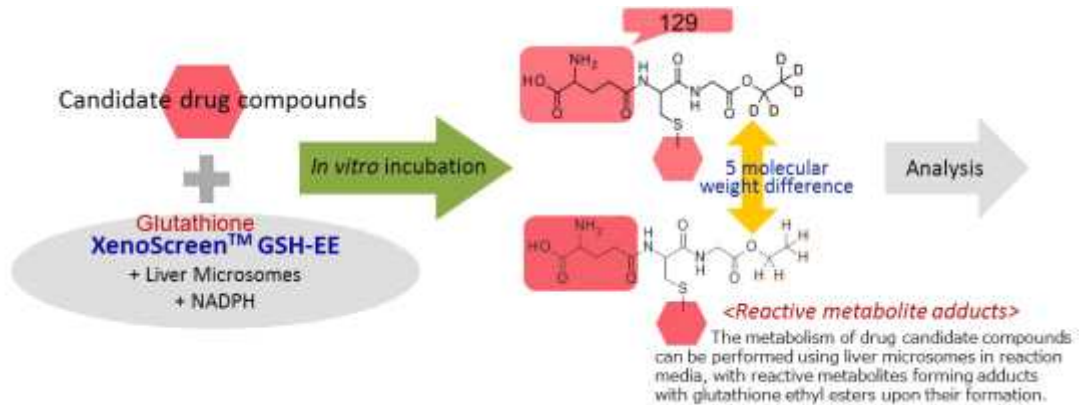
Galván I, Alonso-Alvarez C. An intracellular antioxidant determines the expression of a melanin-based signal in a bird. PLoS One. 2008 Oct 3;3(10):e3335.

21. Glutathione을 활용한 독성대사체 스크린과 신약개발에 활용

- 자연분해 및 Cytochrome P450에 의해 전환되는 친전자성 대사체를 제거하는 체내 유일한 물질이 Glutathione(GSH)이며 동시에 체내 최대 항산화물질임
- 이와 같은 중요성 때문에 다음과 같은 영역에 응용되고 있음

(1) Glutathione을 이용한 drug screening test 방법인 GSH trapping(glutathione 포함)

- Glutathione의 cysteine-SH(친핵성 부위)를 활용하여 친전자성 대사체 또는 친전자성 전환체 확인을 통한 약물 초기스크린 방법(As part of early drug screening strategy to support small molecule structure-activity relationship analysis, **glutathione trapping** is commonly used for the detection of reactive metabolites, Wang 등. 2018)
- 다음은 **GSH trapping 분석을 위한** XenoScreen™ GSH-EE (Tube type) 시약을 파는 회사의 친전자성 대사체를 포획하는 GSH trapping 기법의 원리. <그림-1>과 같이 자연분해 및 cytochrome P450와 더불어 glutathione 함께 시험관에 혼합 후 발생하는 친전자성 독성대사체 또는 친전자성 전환체인 Glutathione conjugate(포합체)를 <그림-2>에 서처럼 LC-MS(액체 크로마토그래프 질량 분석기)로 분석(Fujifilm Waco Chemicals USA, 2024).



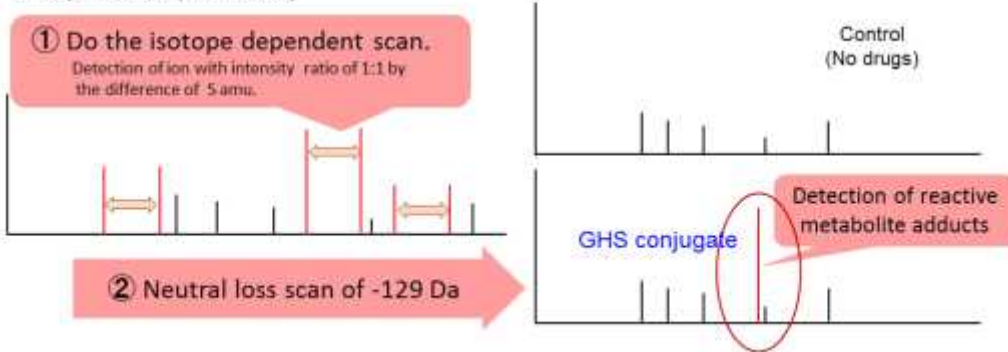
<그림-1> 약물 후보물질과 Glutathione의 혼합

Analytical Data

Data analysis is performed using LC-MS.

For analysis, please use any mass spectrometer instrument with equal to or greater performance than the following instruments.

- LC System: AQUITY UPLC System (Waters)
- MS System: LTQ XL (Thermo Fisher)



<그림-2> LC-MS를 통해 Glutathione conjugate 확인

- 이와 같이 독성대사체로 전환할 가능성이 있는 후보약물을 Glutathione 포함체 확인을 통해 확인하는 반면에 친전자성을 가진 물질을 확인하여 다음과 같이 신약 개발에 응용 되기도 함

(2) Glutathione을 활용한 약 친전자성 대사체로 전환되는 small molecule 스크린 및 신약 개발

- 단백질 분해 효소(protease)인 탈유비퀴틴화효소(deubiquitinase)은 유전성 암부터 신경 변성에 이르기까지 다양한 질병의 유발과 관련이 있음. 특히 virus-triggered type I IFN induction의 저해, NF- κ B signaling의 저해하는 것으로 알려졌다(Resnick 등, 2019). 또한, 탈유비퀴틴화효소 활성은 루게릭 질환(amyotrophic lateral sclerosis)의 원인으로 지목되어 저해제는 치료제로 개발되고 있음(Kudo 등, 2010)
- 특히 탈유비퀴틴화효소 억제제는 탈유비퀴틴화 효소 활성을 저해하여 소포체 스트레스 단백질의 분해를 증가시킴으로써 당뇨병 및 MASH(Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, 대사이상 관련 지방간염) 등의 간 질환의 예방 및 치료 효과에 있음 (Lange 등, 2022).
- 이에 deubiquitinase(OTUB2) 저해제로 약한 친전자성으로 전환되는 small molecule를 스크린 필 요성. 즉, 친전자성이 강한 물질은 DNA와 공유결합하여 돌연변이를 유발하지만, 약한 친전자성은 단백질 또는 효소와 공유결합하여 활성을 저해함 (박영철, 2010; LoPachin, McAulay 등, 2022).

<표-2> Hard 및 Soft Electrophiles과 Hard 및 Soft Nucleophiles의 종류

Electrophiles

Hard:

Alkyl carbonium ions, Benzylic carbonium ions

Soft:

Acrylamide, Acrolein, Acrylonitrile, Quinone

Nucleophiles

Hard:

Oxygen atoms of purine/pyrimidine bases in DNA

Endocyclic nitrogens of purine bases in DNA

Oxygen atoms of protein serine and threonine residues

Soft:

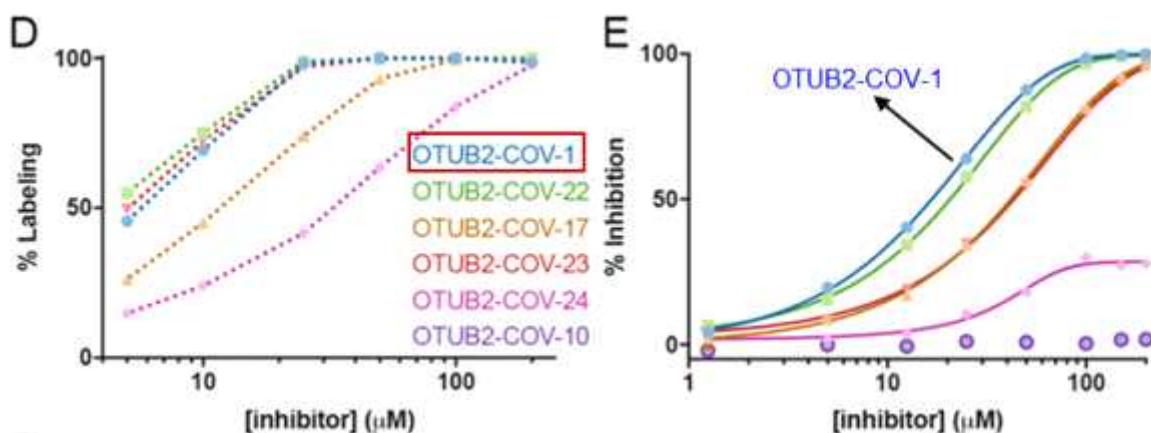
Protein thiol groups

Sulfhydryl groups of glutathione

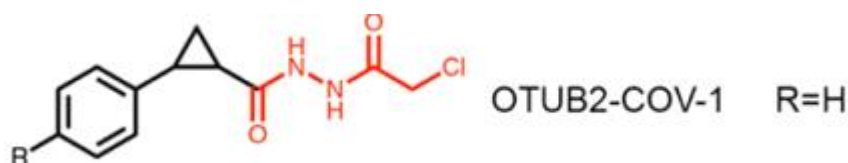
Primary/secondary amino groups of protein lysine and histidine residues

(참고: LoPachin)

- Resnick 등(2019)은 deubiquitinase(OTUB2) 효소에 대한 저해제가 현재까지 확인되지 않은 점을 고려하여 high-throughput thiol-reactivity(GSH Reactivity Assay & Thiol Reactivity Assay) Assay 방법을 사용하여 “938 mildly electrophilic fragments” 즉 938개의 약한 친전자성 물질을 Enamine(<https://www.enamine.net/>) Library를 통해 확인. 다음으로 high-throughput crystallography를 이용하여deubiquitinase(OTUB2) 효소에 대한 아래의 <표>에서처럼 47개 hit compound를 확인함.
- 그리고 최종적으로 아래의 <그림-D와 E>처럼 OTUB2-COV-1 후보물질이 OTUB2에 대한 선택적 공유결합이 가장 높은 것으로 확인되었고 구조는 <그림-F>와 같은 것으로 확인됨.



<그림> OTUB2와 저해 후보물질의 결합 강도(D)와 효소 저해율(E)



<그림-F>

<결론>

- 국내에서 이와 같이 small molecule의 친전자성을 확인하고 독성물질 확인 및 신약 개발에 응용하는 사례는 없는 것으로 추정됨. 그러나 외국에는 glutathione을 활용한 신약 개발 초기 스크린이 활발히 이루어지고 있음. 심지어 지난 2022년에는 NATURE review에서 “Advances in covalent drug discovery(Boike 등, 2022) 논문이 발표될 정도로 활용되고 있음.
- 이와 같은 사례는 독성학이 어떻게 신약 개발에 활용되는가에 대한 좋은 예시가 됨

<참고문헌>

LoPachin, Richard M., Anthony P. DeCaprio., Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity, TOXICOLOGICAL SCIENCES, 2005, 86(2):214-225.

Fujifilm Waco Chemicals USA,
<https://labchem-wako.fujifilm.com/us/category/00591.html>

Kudo, L. C.; Parfenova, L.; Vi, N.; Lau, K.; Pomakian, J.; Valdmanis, P.; Rouleau, G. A.; Vinters, H. V.; Wiedau-Pazos, M.; Karsten, S. L. Integrative Gene-tissue Microarray-Based Approach for Identification of Human Disease Biomarkers: Application to Amyotrophic Lateral Sclerosis. Hum. Mol. Genet. 2010, 19 (16), 3233-3253.

Lange SM, Armstrong LA, Kulathu Y. Deubiquitinases: From mechanisms to their inhibition by small molecules. Mol Cell. 2022 Jan 6;82(1):15-29.

Olivier C, Oliver L, Lalier L, Vallette FM. Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. Front Mol Biosci. 2021 Jan 27;7:620677.

Resnick E, Bradley A, Gan J, Douangamath A, Krojer T, Sethi R, Geurink PP, Aimon A, Amitai G, Bellini D, Bennett J, Fairhead M, Fedorov O, Gabizon R, Gan J, Guo J, Plotnikov A, Reznik N, Ruda GF, Díaz-Sáez L, Straub VM, Szommer T, Velupillai S, Zaidman D, Zhang Y, Coker AR, Dowson CG, Barr HM, Wang C, Huber KVM, Brennan PE, Ovaa H, von Delft F, London N. Rapid Covalent-Probe Discovery by Electrophile-Fragment Screening. J Am Chem Soc. 2019 Jun 5;141(22):8951-8968.

박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

McAulay K, Bilsland A, Bon M. Reactivity of Covalent Fragments and Their Role in Fragment Based Drug Discovery. Pharmaceuticals (Basel). 2022 Nov 8;15(11):1366.

Wang, Z., Fang, Y., Rock, D. et al. Rapid screening and characterization of glutathione-trapped reactive metabolites using a polarity switch-based approach on a high-resolution quadrupole orbitrap mass spectrometer. Anal Bioanal Chem 410, 1595-1606 (2018).

Boike L, Henning NJ, Nomura DK. Advances in covalent drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2022 Dec;21(12):881-898.

22. 세포노화 지연과 암세포 내성-전이를 촉진하는 glutathione(GSH)

- 아래의 Figure-2에서처럼 모든 질환의 90%가 직간접 원인으로 지목되는 oxidative stress와 small molecule의 친전자성 독성대사체를 제거하는 생체 내 **유일한 물질이 Glutathione**이라는 점을 고려할 때 정상인의 life-span의 연장에 가장 큰 영향을 주는 물질이라고 고려됨.

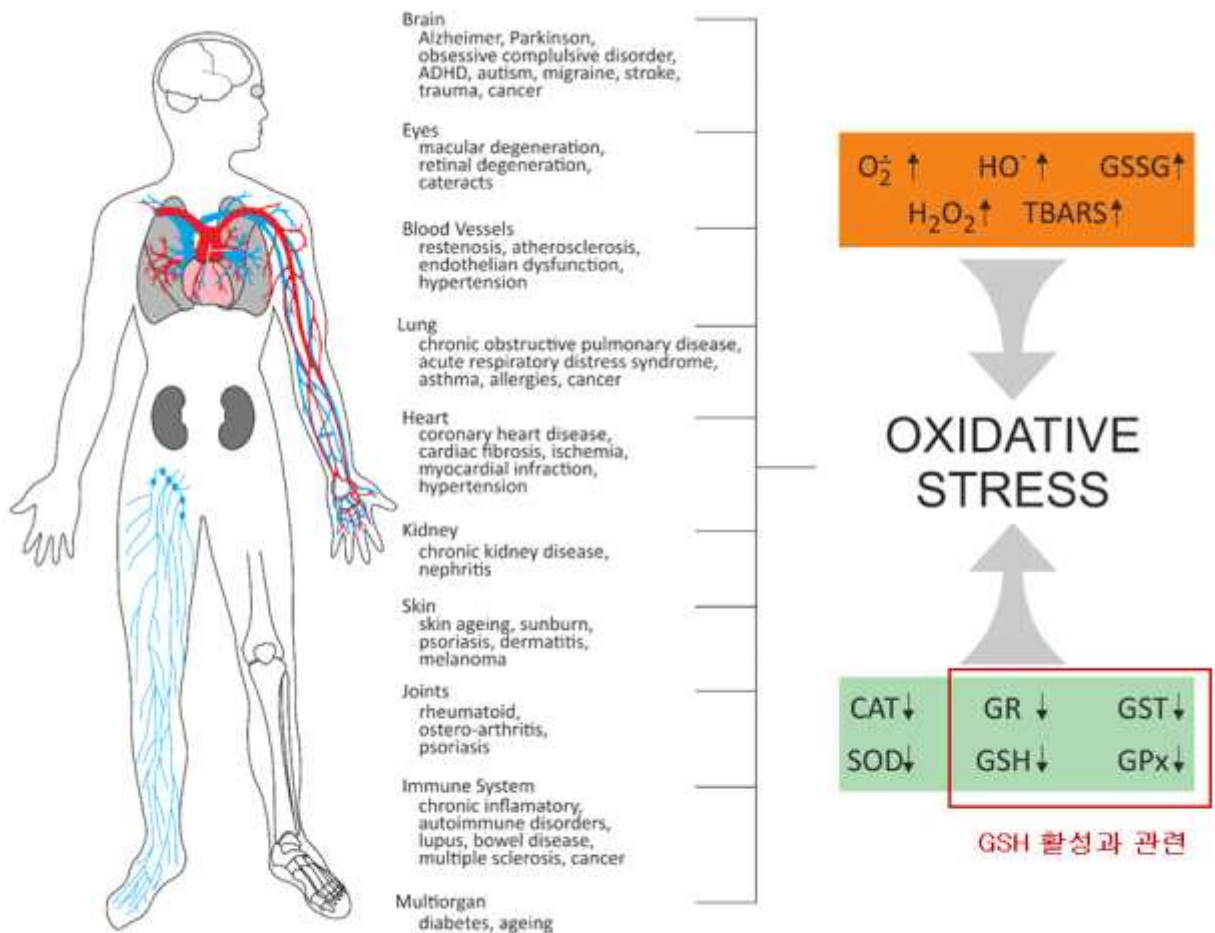


Figure 2. Oxidative stress-related diseases [18–20]. CAT–catalase; GPX–glutathione peroxidase; GR–glutathione reductase; GSH–reduced glutathione; GSSG–disulfide glutathione; GST–glutathione transferase; SOD–superoxide dismutase; TBARS–thiobarbituric acid reactive substances.

(Bukowska 등, 2022)

- 세포노화 지연:** Werner syndrome은 30-40 연령대에서 발생하는 조로증. 원인은 helicase과 exonuclease 활성을 가지고 있는 WRN(Werner syndrome protein)의 돌연변이에 기인함. Figure -1은 lentivirus를 이용, Hela cell에 sh(short hairpin)RNA를 주입하여 WRN 발현을 억제한 세포군과 glutathione과 함께 주입한 세포군과의 cellular senescence 현상을 비교한 것임. 세포 세네센스(cellular senescence) 현상이란 세포의 복제(replication) 능력을 상실한 것으로 세포 노화의 최종적인 현상임. 이는 텔로미어 길이 단축에 의한 crisis point에 도달에 기인한 것으로 biomarker가 β -galactosidase 활성임. Figure-1에서처럼 GSH 투여에 의해 세포 세네센스가 지연된 것을 확인할 수 있음. 세포노화가 곧 개체노화이라면 GHS는 노화 지연을 유도하는 물질이라는 것을 확인할 수 있음(Li 등, 2014; Wiley 등, 2021).

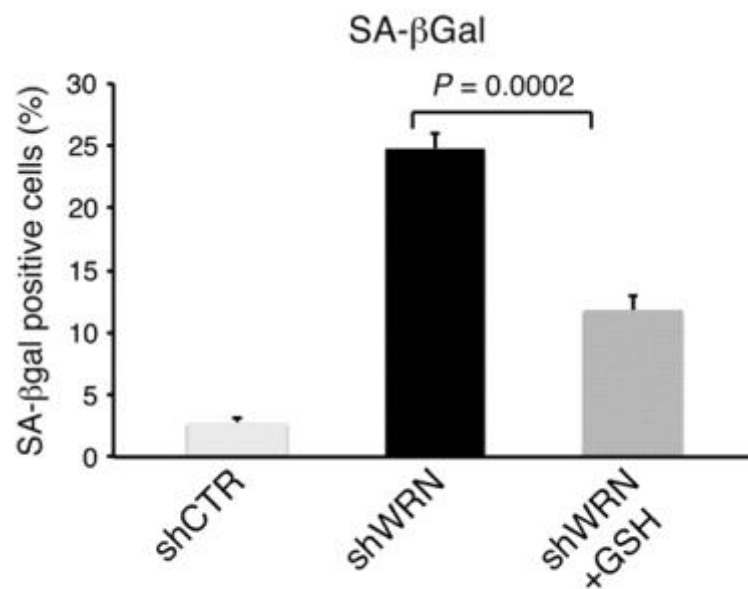


Figure-1 Detection of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity.

- **암의 진행과 내성을 유도하는 glutathione:** Although in healthy cells it is crucial for the removal and detoxification of carcinogens, elevated GSH levels in tumor cells are associated with tumor progression and increased resistance to chemotherapeutic drugs(Kennedy 등, 2020).
- 아래의 Figure 7과 같이 고형암은 암세포뿐만 아니라 non-tumor cell인 stromal fibroblasts, cancer-associated fibroblasts(CAF), tumor vasculature(endothelial cells and pericytes), 그리고 유입하는 면역세포(lymphocytes, neutrophils, macrophages, and mast cells) 등 다양한 세포군으로 구성됨.
- 이들 세포들은 exosome과 같은 외세포액포(extracellular vesicles, EV)를 통해 Producer cells Producer cells(cancer-associated fibroblasts 및 glioma cells)이 “Recipient tumor cells”에게 tricarboxylic acid (TCA) cycle metabolites, amino acids 와 lipids 등을 제공함으로 암세포의 성장과 전이를 도움. 이를 암세포의 대사 **재프로그래밍(metabolic reprogramming)**이라고 함. 이와 같은 환경은 암세포 주변의 저산소증과 산증(acidosis)을 유도함,

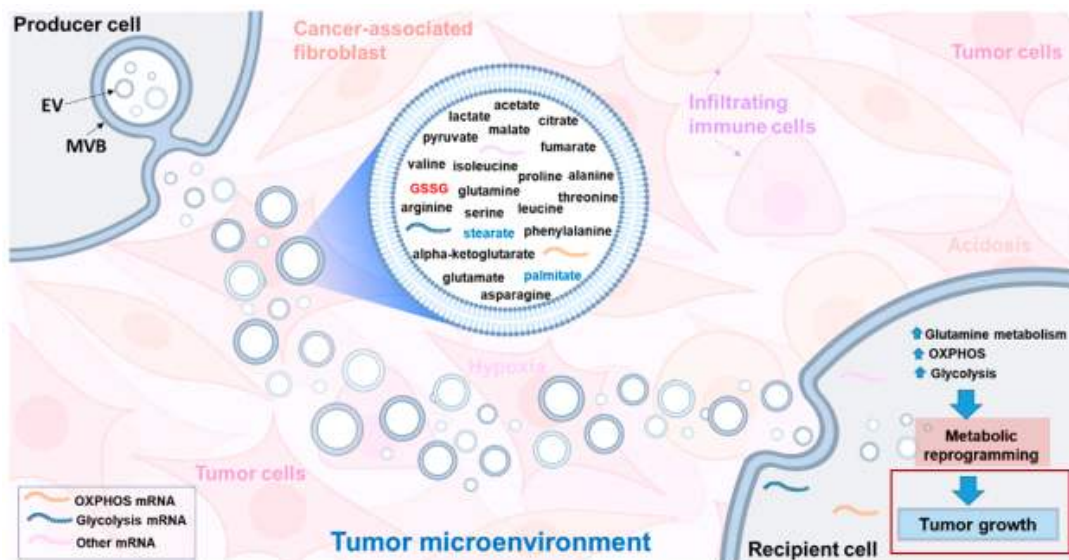


Figure 7. Induction of metabolic reprogramming in recipient cells by internalization of producer

cell-derived exosomes. <Extracellular vesicles, such as exosomes; MVB, multivesicular body; OXPHOS, oxidative phosphorylation>

- 암세포 주변의 저산소증과 산증(acidosis)은 암 미세환경(tumor microenvironment, TME)에서 glutathione의 증가 등 산화-환원 환경(redox status)에 영향을 줌. 실제로 저산소 미세환경에서의 암세포는 당분해 촉진을 통해 젖산 및 산증이 증가함, 이와 같은 환경에서 FIG. 3에서처럼 암세포는 생존을 위해 GSH 농도뿐만 아니라 관련 효소인 glutathione peroxidases 및 glutathione reductase 등의 발현을 증가시킴(Khramtsov, 등, 2014). 이는 결과적으로 암세포 내성을 증가시키고(Li 등, 2019). 또한 암세포에서의

glutathione의 증가는 암세포의 전이에 사용되는 단백질분해효소(protease)의 핵심 아미노산인 cysteine의 공급으로 전이에 도움을 주는 것으로 추정됨(Bansal 등, 2018; Gout 등, 1997)

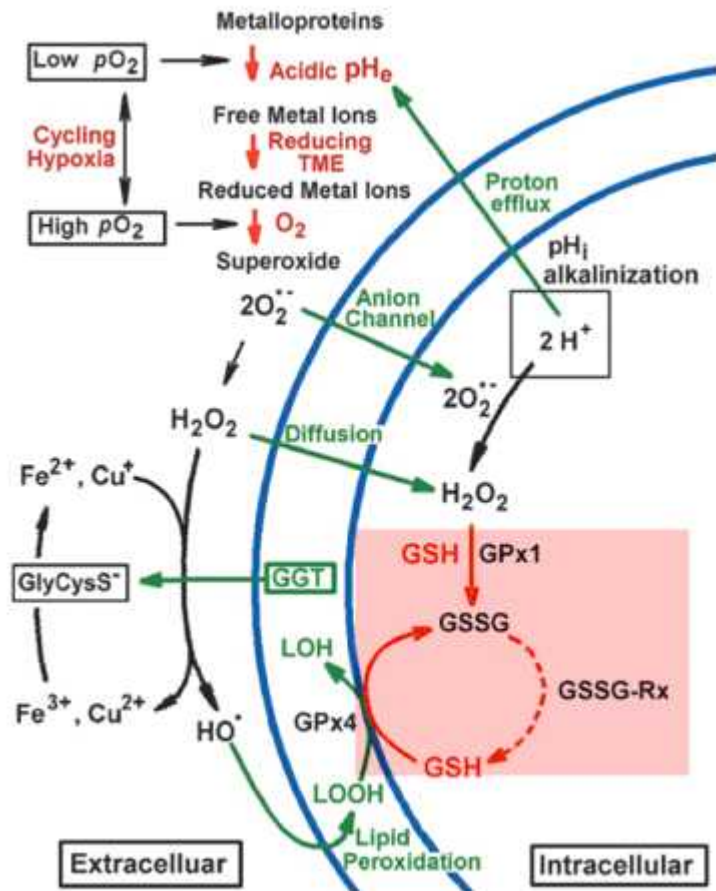


FIG. 3. Janus-faced tumor redox microenvironment.

<참고문헌>

Bukowska B, Duchnowicz P. Molecular Mechanisms of Action of Selected Substances Involved in the Reduction of Benzo[a]pyrene-Induced Oxidative Stress. *Molecules*. 2022 Feb 18;27(4):1379.

Li B, Iglesias-Pedraz JM, Chen LY, Yin F, Cadenas E, Reddy S, Comai L. Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells. *Aging Cell*. 2014 Apr;13(2):367–78.

Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab*. 2021 Oct;3(10):1290–1301.

Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*. 2020 Oct 9;10(10):1429.

Khramtsov, V.V.; Gillies, R.J. Janus-faced tumor microenvironment and redox. *Antioxid. Redox Signal* 2014, 21, 723–729.

Li, I.; Nabet, B.Y. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Mol. Cancer* 2019, 18, 32.

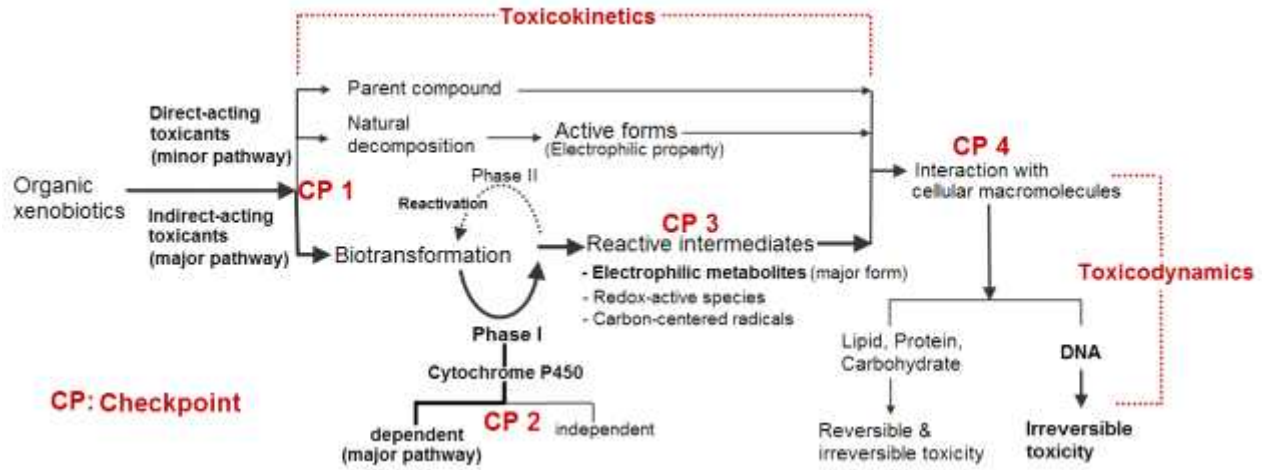
Gout, P.W., Y.J. Kang, D.J. Buckley, N. Bruchovsky, and A.R. Buckley. 1997. Increased cystine uptake capability associated with malignant progression of Nb2 lymphoma cells. *Leukemia*. 11:1329–1337.

Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2291–2298.

23. 간접작용화학물질(indirect-acting chemical)의 특성

- Page 45부터 지금까지 6. 유기화합물의 독성기전에 대한 Centra dogma에서 direct-acting chemical(직접작용-화학물질)에 대한 개념과 예시를 들었음.
- 요약하면 가수분해 및 단백질의 -SH(친핵성) 기능기와 상호작용을 자연분해에 의해 친전자성으로 전환되어 독성을 유발
- Cysplatin 그리고 mitomycin C 등 제1세대 항암제 등이 대표적 direct-acting chemical 임.
- 이들 물질들은 종간 및 종내 차이가 없어 모든 생명체에서 독성을 유발할 수 있음
- 오늘날 바이오의약품 특히 항체 및 뉴클레오타이드와의 결합과 국소주사로 단백질투여에 의한 전신독성을 예방할 수 있고 효능을 높이는 drug repurposing(신약 재창출) 분야에서 가치가 높음.
- 약물의 약한 친전자성과 효소의 친핵성의 공유결합은 효소 활성 저해제로 개발됨이 확인됨. 이는 역으로 독성시험에 의한 독성 확인을 위한 독성학이 아니라 기존의 바이오의약품과의 결합을 통한 독성기전의 활용의 독성학으로 신약 개발에 크게 기여할 수 있다는 측면임.
- 독성학에서는 타 학문을 앞서는 첨단이라는 말이 없음. 이유는 약리학, 조직 및 임상 병리학, 생화학, 생리학 등에서 생명현상에 대한 정의가 내려진 후 화학물질에 의한 독성을 설명이 가능하기 때문임. 따라서 상당히 후진 학문임.
- 그러나 바이오의약품의 출현과 IT의 발전은 small molecule을 이용한 신약 개발을 새롭게 바라보는 관점이 필요. 독성시험의 독성학이 아니라 신약개발을 위한 mechanism of action을 제공하는 독성학으로 패러다임의 전환이 필요할 때임. 특히 독성학에 대한 올바른 이해는 비임상시험의 약리와 독성에 대한 예측에 크게 도움이 됨.
- 독성학 입문을 위해 초기에 Curtis D. Klaassen와 John B. Watkins을 산적이 있음. 그 어디에도 유기화학물질의 독성은 ① 과잉용량과 ② 활성독성대사체에 기인한다고 간략히 설명하는 것이 없음. 이를 이해하지 못하면 그들의 저서는 여러 논문을 묶은 놓은 수준에 지나지 않음.

- 저는 아래의 central dogma과 더불어 **간접작용화학물질(indirect-acting chemical)**에 대한 독성학적 측면을 관련 전문가님과 논하게 되는 것에 큰 기쁨이며 독성학을 공부한 보람입니다. 읽어주셔서 너무 감사하며 신약개발에 도움이 되는 논문과 더불어 좋은 정보를 올리겠습니다.

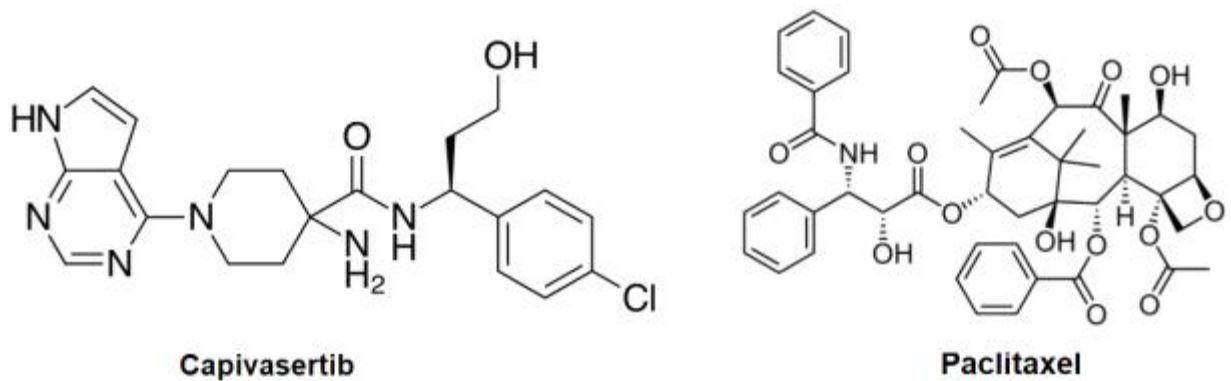


<그림> 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma

24. 아스트라제네카의 티루캡·파클리탁셀 병용요법 실패에 대한 독성학적 고찰

<간접작용화학물질(indirect-acting chemical)의 중요성을 생각하면서 추정해 보았습니다>

- 아스트라제네카, 유방암 치료제 ‘티루캡’ 항암화학요법의 티루캡·파클리탁셀 병용요법 임상 실패(헬스조선 입력 2024.06.20.)
- 티루캡의 원물질 ‘capiwasertib’ 파클리탁셀(paclitaxel) – Taxol



① <1995년의 논문> Sonnichsen DS, Liu Q, Schuetz EG, Schuetz JD, Pappo A, Relling MV. Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. J Pharmacol Exp Ther. **1995** Nov;275(2):566–75. (원문:(Inhibitor experiments suggest that typical CYP3A substrates/inhibitors (e.g., cyclosporin, epipodophyllotoxins) may significantly interact with paclitaxel in vivo. CYP3A4 catalytic activity is important to overall paclitaxel metabolism in humans))

- 따라서 Paclitaxel은 CYP3A 특히 인체에서 CYP3A4의 기질임

② <2024년의 논문> Miller C, Somnavilla R, O'Bryant CL, Barve M, Dowlati A, Luke JJ, Khatun M, Morris T, Cullberg M. Pharmacokinetic study of capivasertib and the CYP3A4 substrate midazolam in patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol. 2024 Apr 20. doi: 10.1007/s00280-024-04667-3. (원문: This study evaluated the drug-drug interaction risk of capivasertib with the cytochrome P450 3A substrate midazolam in previously treated adults with advanced solid tumors. The up to 1.75-fold increase in midazolam exposure indicates capivasertib is a weak CYP3A inhibitor at 400 mg BID on an intermittent schedule)

- 인체 말기 고형암에서 진정제이면서 CYP3A4의 기질인 midazolam와 capivasertib의 병용 투여에 의해 midazolam이 혈중농도가 1.75배 증가. 따라서 capivasertib은 CYP3A inhibitor(저해제)

③ <2020년의 논문> Schmid P, Abraham J, Chan S, Wheatley D, Brunt AM, Nemsadze G, Baird RD, Park YH, Hall PS, Perren T, Stein RC, Mangel L, Ferrero JM, Phillips M, Conibear J, Cortes J, Foxley A, de Bruin EC, McEwen R, Stetson D, Dougherty B, Sarker SJ, Prendergast A, McLaughlin-Callan M, Burgess M, Lawrence C, Cartwright H, Mousa K, Turner NC. Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. J Clin Oncol. 2020 Feb 10;38(5):423-433.

- Table 3은 Capivasertib+Paclitaxel 병용투여의 제2상임상시험에서 여러 adverse effect 빈도 및 유의성 검증을 나타낸 것임. 가장 높은 빈도로 나타나는 Diarrhea와 Rash에서 유의한 증가는 국소적으로는 장내 그리고 전신적으로는 심혈관계에서 Paclitaxel 농도가 병용투여에 의해 더 높은 농도에 기인하는 것으로 추정됨.
- 이와 같은 결론은 CYP3A 또는 CYP3A4의 기질인 Paclitaxel이 CYP3A 또는 CYP3A4의 활성 저해제인 Capivasertib의 약물상호작용에 의해 대사가 되지 않아 농도 증가에 기인하는 추정됨

TABLE 3. AEs Occurring in $\geq 8\%$ of Patients in ≥ 1 Treatment Group

AE	No. (%) ^a					
	Paclitaxel + Capivasertib (n = 68)		Paclitaxel + Placebo (n = 70)		P†	
	All Grades	Grade 3/4	All Grades	Grade 3/4	All Grades	Grade 3/4
Patients with ≥ 1 AE	66 (97.1)	37 (54.4)	64 (91.4)	18 (25.7)	0.27	< 0.01
Diarrhea	49 (72.1)	9 (13.2)	19 (27.1)	1 (1.4)	< 0.01	< 0.01
Fatigue	30 (44.1)	3 (4.4%)	18 (25.7)	0	0.03	0.12
Nausea	24 (35.3)	1 (1.5)	23 (32.9)	0	0.86	0.49
Rash	28 (41.2)	3 (4.4)	11 (15.7)	0	< 0.01	0.12
Neuropathy	17 (25.0)	1 (1.5)	13 (18.6)	0	0.41	0.49
Stomatitis	18 (26.5)	1 (1.5)	10 (14.3)	0	0.09	0.49
Infection	15 (22.1)	3 (4.4)	10 (14.3)	1 (1.4)	0.27	0.36
Decreased appetite	14 (20.6)	0	8 (11.4)	0	0.17	1.00
Alopecia	11 (16.2)	0	9 (12.9)	0	0.63	1.00
Vomiting	13 (19.1)	1 (1.5)	6 (8.6)	1 (1.4)	0.09	1.00
Constipation	5 (7.4)	0	10 (14.3)	0	0.27	1.00
Abdominal pain	7 (10.3)	0	7 (10.0)	0	1.00	1.00
Dry skin	10 (14.7)	0	2 (2.9)	0	0.02	1.00
Dyspnoea	6 (8.8)	0	5 (7.1)	0	0.76	1.00
Headache	8 (11.8)	0	3 (4.3)	0	0.13	1.00
Edema	6 (8.8)	0	4 (5.7)	0	0.53	1.00
Dysgeusia	7 (10.3)	0	3 (4.3)	0	0.20	1.00
Joint pain	2 (2.9)	0	6 (8.6)	0	0.27	1.00
Neutropenia	6 (8.8)	2 (2.9)	2 (2.9)	2 (2.9)	0.16	1.00
Cough	1 (1.5)	0	6 (8.6)	0	0.12	1.00
Hyperglycemia	6 (8.8)	1 (1.5)	1 (1.4)	0	0.06	0.49

NOTE: Worst toxicity for each patient during the entire treatment is reported. AE instances with missing grade are not included in table.

Abbreviation: AE, adverse event.

^aAll percentages are based on the total No. of patients in that arm who received ≥ 1 dose of the study drug, with patients analyzed according to the treatment they actually received (safety population).

†P values are 2-sided.

25. 아스트라제네카의 티루캡·파클리탁셀 병용요법의 임상 실패에 대한 소견과 방향

- 아스트라제네카, 유방암 치료제 ‘티루캡’ 항암화학요법의 티루캡·파클리탁셀 병용요법 임상 실패(헬스조선 입력 2024.06.20.)

1) 티루캡·파클리탁셀 병용요법의 독성학적 고찰 요약: 티루캡(Capivasertib)에 Paclitaxel의 추가에 의한 약물 상호작용은 다음과 같은 기전이며 결과는 Table 3과 같음. Toxicity-benefit analysis 측면에서 Diarrhea와 Rash 유의한 증가는 그렇게 의미있는 부정적 영향은 아니며 임상 실패의 원인도 아님.

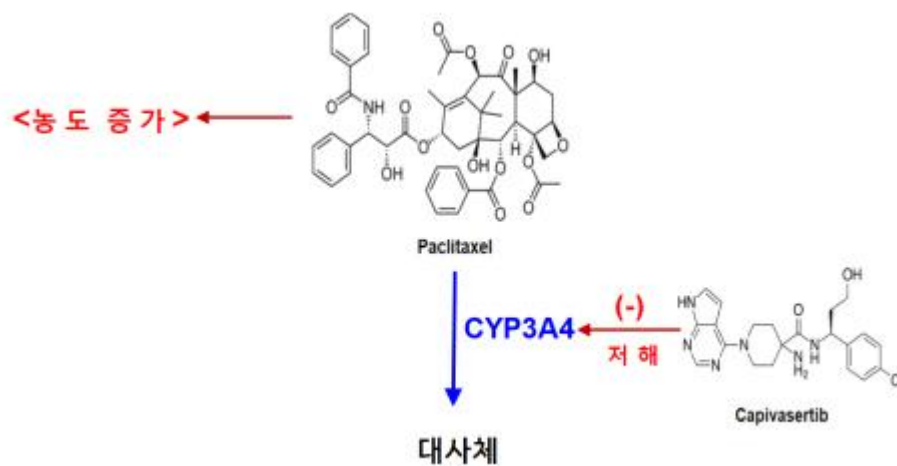
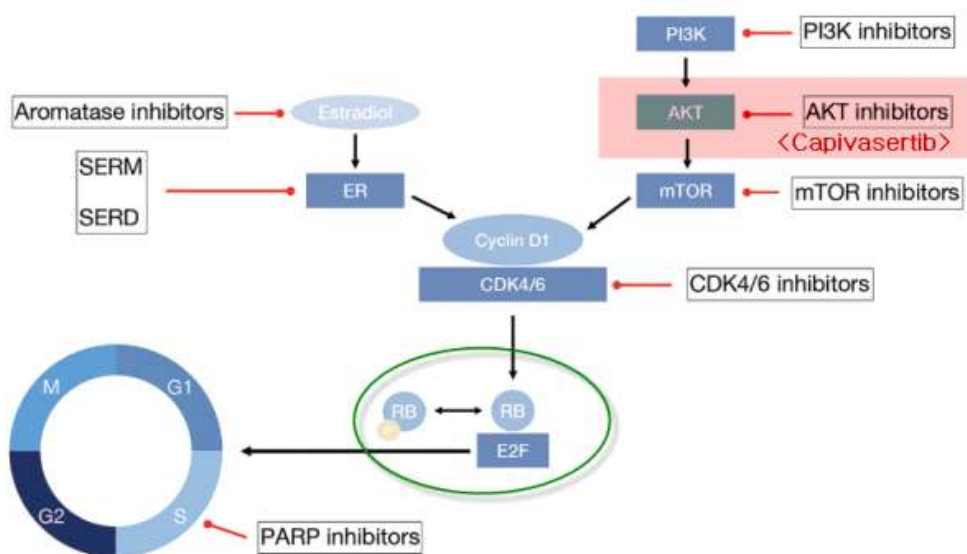


TABLE 3. AEs Occurring in $\geq 8\%$ of Patients in ≥ 1 Treatment Group
No. (%)^a

AE	Paclitaxel + Capivasertib (n = 68)		Paclitaxel + Placebo (n = 70)		P†	
	All Grades	Grade 3/4	All Grades	Grade 3/4	All Grades	Grade 3/4
Patients with ≥ 1 AE	66 (97.1)	37 (54.4)	64 (91.4)	18 (25.7)	0.27	< 0.01
Diarrhea	49 (72.1)	9 (13.2)	19 (27.1)	1 (1.4)	< 0.01	< 0.01
Fatigue	30 (44.1)	3 (4.4%)	18 (25.7)	0	0.03	0.12
Nausea	24 (35.3)	1 (1.5)	23 (32.9)	0	0.86	0.49
Rash	28 (41.2)	3 (4.4)	11 (15.7)	0	< 0.01	0.12

2) 티루캡(Capivasertib)의 항암 약리기전

- 아스트라제네카 유방암 신약 티루캡정(Capivasertib, 카피바설팁)’은 단독처방으로 식약처에 의해 2024년 4월에 허가됨(중앙일보헬스미디어, 2024.04.30.)
- 유방암은 호르몬 수용체(에스트로겐 수용체<ER>+프로게스테론 수용체<PR>)와 HER2(human epidermal growth factor receptor 2, 사람상피세포성장인자수용체 2)의 발현 정도에 따라 ①호르몬 양성 유방암’, ②‘HER2 양성 유방암’, ③호르몬(ER+PR)과 HER2 모두 갖고 있지 않은 ‘삼중 음성 유방암 등으로 분류. 예를 들어 호르몬 양성 유방암은 여성호르몬 중 하나인 에스트로겐과 프로게스테론이 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체에 결합하여 암세포 증식의 증식하는 유발암임. 따라서 호르몬과 수용체의 결합 및 결합에 의한 세포주기 신호전달체계의 차단이 곧 치료제.
- Capivasertib은 HR(estrogen+Progesteron) 양성, HER2(human epidermal growth factor receptor 2, 사람상피세포성장인자수용체 2) 음성이고, ‘PIK3CA·AKT1·PTEN’ 유전자 중 한 가지 이상 변이가 있는 국소 진행성 또는 전이성 유방암 성인 환자가 적용대상임.
- PIK3CA·AKT1·PTEN 또는 PI3K/AKT/mTOR signaling cascade이라고도 불리며 최종적으로 mTOR (mammalian target of the rapamycin)에 의해 세포 증식을 유도.
- Capivasertib은 아래의 <그림>은 HR-양성, HER2-음성 환자에서 있어서 PI3K/AKT/mTOR signaling cascade에서 AKT 저해 및 암세포의 증식 저해의 항암 약리기전(Derouane 등, 2021)



<그림-1> Capivasertib에 의한 AKT 저해를 통한 암세포 분열중지 기전

<참고문헌> Derouane F MD, K. Punie MD, F.P. Duhoux MD, PhD. SYSTEMIC TREATMENT LANDSCAPE AND ALGORITHM FOR HORMONE-RECEPTOR POSITIVE, HER2 NEGATIVE ADVANCED BREAST CANCER. BELG J MED ONCOL 2021;15(1):20-33

3) Paclitaxel(파클리탁셀)의 항암 약리기전

- <Figure 2>에서처럼 Paclitaxel은 세포골격을 이루어 microtubule(미세소관)의 분해 저해(stabilization)를 통해 암세포의 분열 중지를 유도하는 항암 기전(Tókéş 등, 2022)

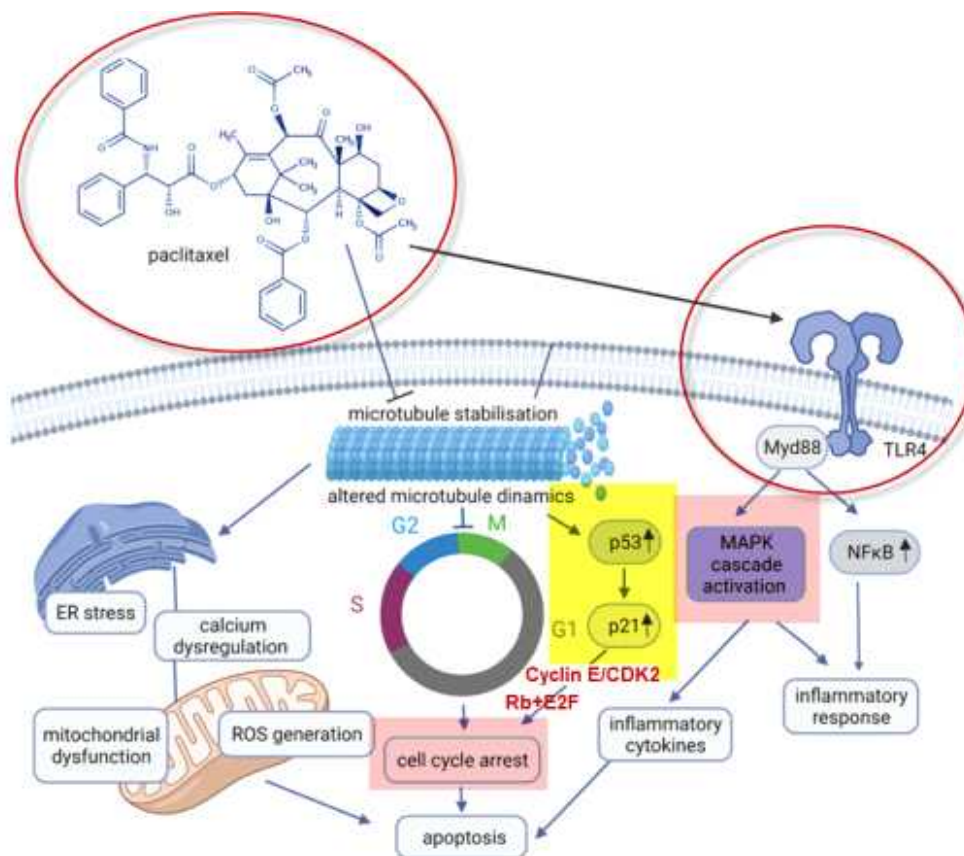
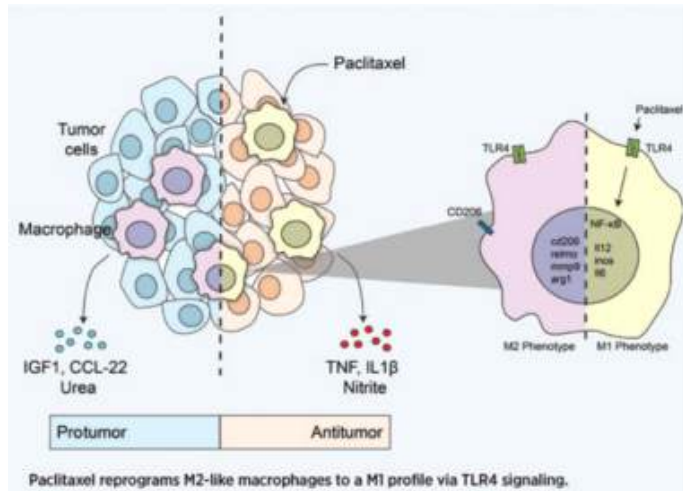


Figure 2. Chemical structures of paclitaxel and its mechanism of action

<참고문헌> Tókéş AM, Vári-Kakas S, Kulka J, Törőcsik B. Tumor Glucose and Fatty Acid Metabolism in the Context of Anthracycline and Taxane-Based (Neo)Adjuvant Chemotherapy in Breast Carcinomas. Front Oncol. 2022 Mar 31;12:850401.

- 또한 Paclitaxel에 의한 암세포의 아포토시스는 <그림-3>에서처럼 **TLR4-Dependent Manner** 활성을 Tumor-Associated Macrophages의 재프로그래밍을 통한 M2 phenotype를 M1 type의 전환을 통한 기전으로 처음으로 제시됨(Wanderley 등, 2019).



<그림-3> Paclitaxel에 의한 대식세포의 M2 phenotype에서 M1 phenotype으로의 전환

- 문제점: 여기서 Paclitaxel에 의한 대식세포의 M2 phenotype에서 M1 phenotype으로의 전환이 <Figure-2>에서처럼 MAPK pathway 활성을 통해 이루어진다는 것임
- MAPK pathway은 암세포에서 활성화되어 증식을 촉진하는 것으로 알려졌으며 아래의 Figure 1에서처럼 신호전달체계가 구성 단백질의 저해를 통해 항암제로 개발되고 있음 (Smalley 등, 2018). 이는 결국 Paclitaxel의 병용 투여로 Capivasertib의 항암효능을 저해하는 결과를 초래할 것으로 추정됨.

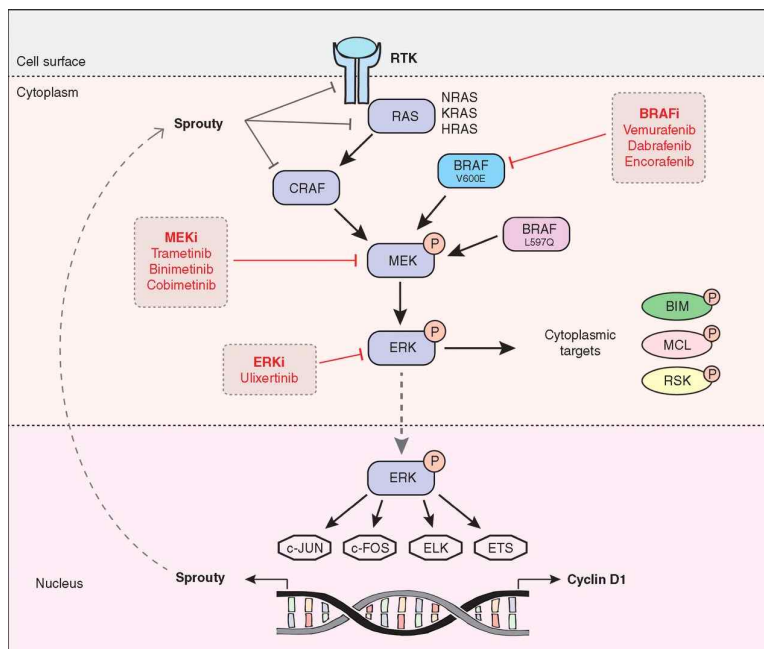


Figure 1. An overview of the MAPK signaling pathway with points of therapeutic

intervention indicated.

<참고문헌> Smalley I, Smalley KSM. ERK Inhibition: A New Front in the War against MAPK Pathway-Driven Cancers? Cancer Discov. 2018 Feb;8(2):140-142.

4) 티루캡(Capivasertib)+파클리탁셀(Paclitaxel) 병용요법 임상 실패에 대한 결론과 향후 방향

- <표>에서처럼 결과적으로 Capivasertib과 Paclitaxel의 병용투여는 전사인자 E2F의 활성 억제를 더욱 강화하여 유방암 세포 증식을 더욱 억제시키며 특히 Paclitaxel의 추가 투입은 MAPK patjtway를 통한 M2에서 M1 phenotype으로 전환으로 유방암세포 증식을 더욱 억제시킬 것으로 추정됨,

<표> Capivasertib의 유방암 치료제에 Paclitaxel 추가 투여에 의한 항암기전

	Capivasertib	Paclitaxel
암세포 증식 억제 기전	전사인자 E2F의 활성 억제	전사인자 E2F의 활성 억제
대식세포 활성화에 의한 항암 효능	-	MAPK patjtway를 통한 M2에서 M1 phenotype으로 전환

- 결과적으로 Capivasertib에 대한 Paclitaxe의 추가 투약은 MAPK pathway 활성화에 의한 대식세포의 활성화에 의한 암세포 사멸도 유도하였지만 동시에 유방암세포에서 세포주기를 촉진하여 병용투여의 임상3상시험이 실패되었을 것으로 추정됨. 특히 Drug-drug interaction에 의해 Paclitaxe의 농도가 기대치보다 높아 MAPK pathway는 더욱 촉진되었을 것으로 추정됨.
- <해결책> 대부분의 암조직에서는 MAPK pathwdy가 활성화됨으로 이 경로에 있는 MEK 또는 ERK의 inhibitor와 병용투여의 필요성

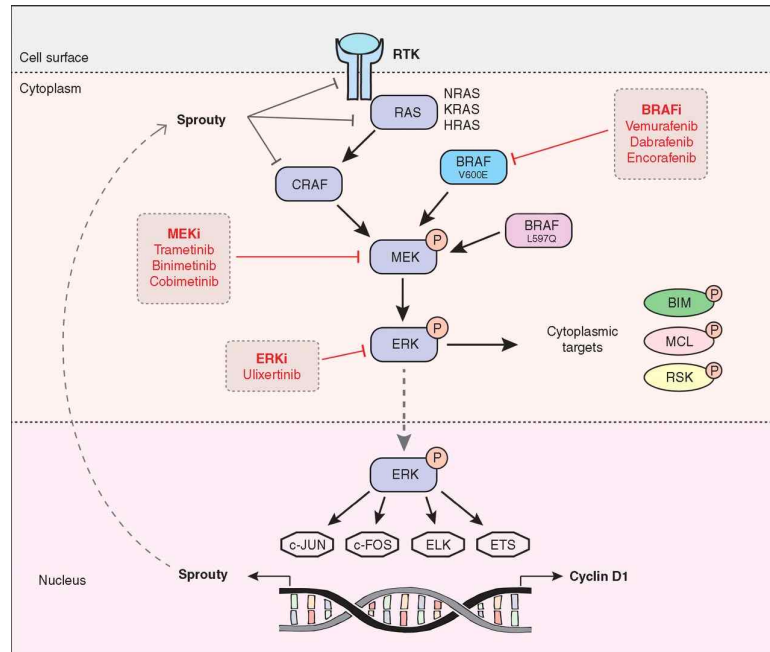
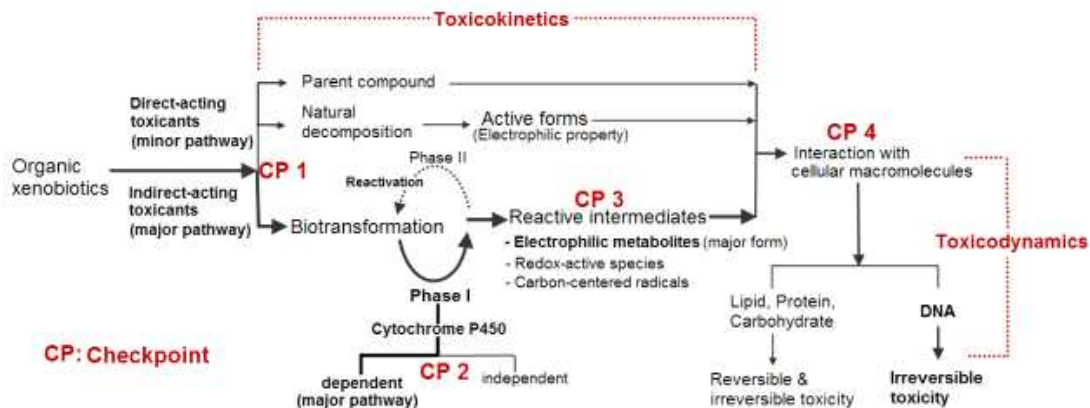


Figure 1. An overview of the MAPK signaling pathway with points of therapeutic intervention indicated.

26. Central dogma와 cytochrome P450 cycle

- Direct-acting chemical vs indirect-acting chemical의 비율 - 10% : 90%
- Indirect-acting chemical의 90%가 cytochrome P450에 의해 Biotransformation(생화학적 전환)
- Biotransformation(생화학적 전환)의 구성: 제1상반응(Phase I reaction) + 제2상반응(Phase II reaction)
- 친지질성 물질은 cytochrome P450에 의한 극성대사체로 전환되는 제1상반응, 극성 부분에 당, 아미노산, 황, 메틸기, 아세틸기가 포함(conjugation)하는 제2상반응을 통해 친수성대사체로 전환 후 배출
- 그러나 독성을 유발하는 기전은 아래의<그림>에서처럼 cytochrome P450에 의한 reactive intermediate(활성중간대사체)로 전환되어 그 자체 또는 부산물에 의한 효소 및 DNA에 결합함



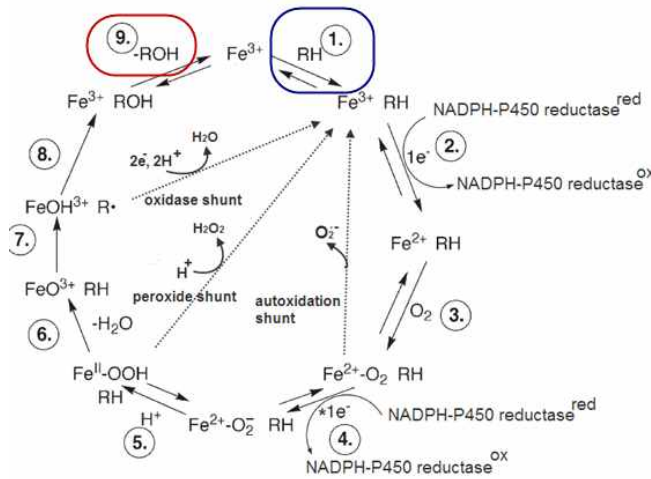
<그림> 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma

- 결과적으로 cytochrome P450의 양면성에 의해 극성대사체 또는 독성대사체가 발생
- 인체 cytochrome P450은 약 57종 있으며 CYP1, CYP2와 CYP3군이며 “독물-약물 대사효소군(toxin-drug metabolism enzyme families)”이라고 하며 약 20 여종의 동종효소가 있음

군(Families)	하위군(Subfamilies)	CYP 동질효소 (isozymes)
CYP1	3 subfamilies, 3 genes, 1 pseudogene	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP2	13 subfamilies, 16 genes, 16 pseudogenes	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1
CYP3	1 subfamily, 4 genes, 2 pseudogenes	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43

- 일반적으로 P450은 세포내에서 두 세포소기관인 소포체를 포함하는 미크로솜과 미토콘드리아 내막에 분포하는데 대부분 독물-약물 대사효소군의 P450은 간의 소포체에 집중되어 존재

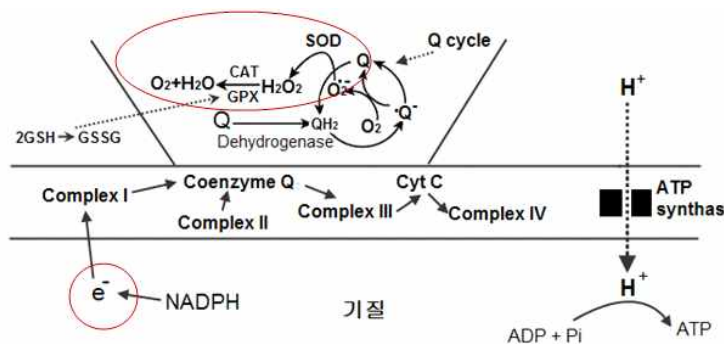
- <그림>과 같이 Cytochrome P450은 $RH \rightarrow ROH$ 즉 기질에 1 산소를 추가하여 hydroxylation의 monooxygenation(일산화과정) 과정



<그림-14> 일반적인 P450의 촉매반응 사이클: R: 유기화합물 또는 유기원자단, H: 기질의 수소, ROH: RH에 산소가 결합하여 수산화된 기질, R^* 은 유기라디칼성 기질을 나타낸다. *: ④에서는 때론 $NADPH-P450$ reductase로부터 나온 전자가 또 다른 전자전달계 효소인 cytochrome b_5 를 통해 $Fe^{2+}-O_2$ 복합체로 전달되기도 한다. (박영철 2010)

27. ROS 생성의 생체 내 최대 세포소기관 mitochondria에서의 Uncoupling 현상

- 미토콘드리아(MT)의 Uncoupling(부조화) 현상: TCA cycle에서 생성된 전자(NADH)는 전자전달계(MT)를 통해 ATP 합성에 이용됨.
- NADH에서 산소로 전달되는 총 전자의 약 1% 정도가 산소에 전달되어 superoxide anion radical을 생성에 이용되며 체내 산소의 3-5%가 superoxide anion radical로 전환되는 것으로 추정됨(박영철, 2010)됨. Superoxide dismutase 등의 항산화효소 및 glutathione이 가장 많이 밀집된 곳이 미토콘드리아이기 때문에 충분히 유해활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 제거함.
- 그러나 과식에 의한 과잉열량 공급으로 생성된 과잉전자(NADH)와 산소와의 전자전달계에서 uncoupling reaction(부조화 반응)은 ROS의 생성을 증가시키며 체내 산소의 약 7%가 superoxide anion radical로 전환됨.



<그림-30> ROS의 주요 생성 장소인 mitochondria의 complex III.

- 미토콘드리아에서 ROS는 증가하는 종국에는 노화(aging) 촉진과 연결됨(Lagouge 등, 2013)

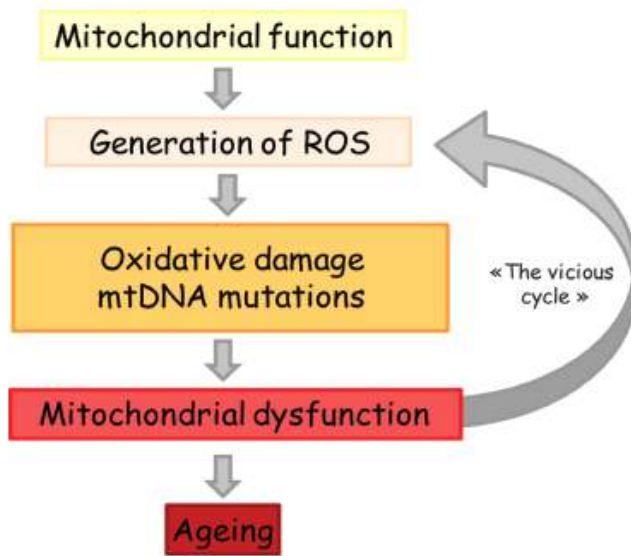


Fig. 1 Schematic representation of the mitochondrial free radical theory of ageing. Reactive oxygen species (ROS) are normal by-products of mitochondrial function that progressively damage the constituents of mitochondria, inducing mitochondrial dysfunction and increased ROS production through a vicious cycle, leading ultimately to cellular dysfunction and ageing.

- 아래의 <그림>에서처럼 다양한 종에서 식이제한(calorie restriction) 즉 NADH 공급을 줄임으로써 평균수명과 최대수명이 증가되는 것이 확인되었음. 인간도 일본의 사례처럼 소식과 수명이 상관관계가 있는 것이 증명되었음(Guarente 등, 2008).

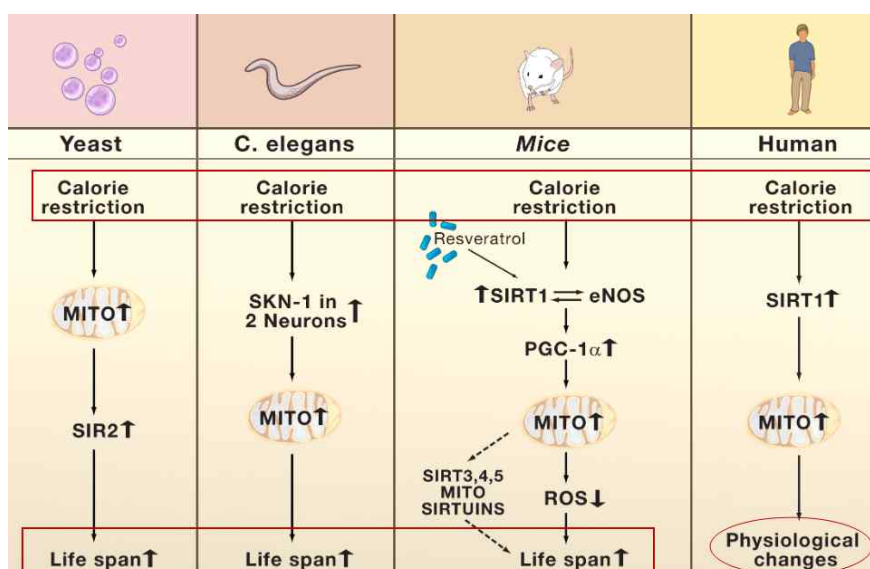


Figure 1. Calorie Restriction Pathways in Different Species

- 아래의 <그림>은 어떤 생물이 주어진 시간 동안 이용한 에너지량의 척도를 나타내는 대사율(metabolic rate)에 따라 평균수명을 나타낸 것임(Grabski, 2020). 대사율이 빠르면 빠를수록 평균수명이 짧고 느리면 느릴수록 평균수명이 김. 이는 빠른 대사율에 의해 ATP의 빠른 생산을 유도하여 전자전달계에서 NADH와 산소 공급의 부조화반응이 그만큼 높다는 것을 의미함.

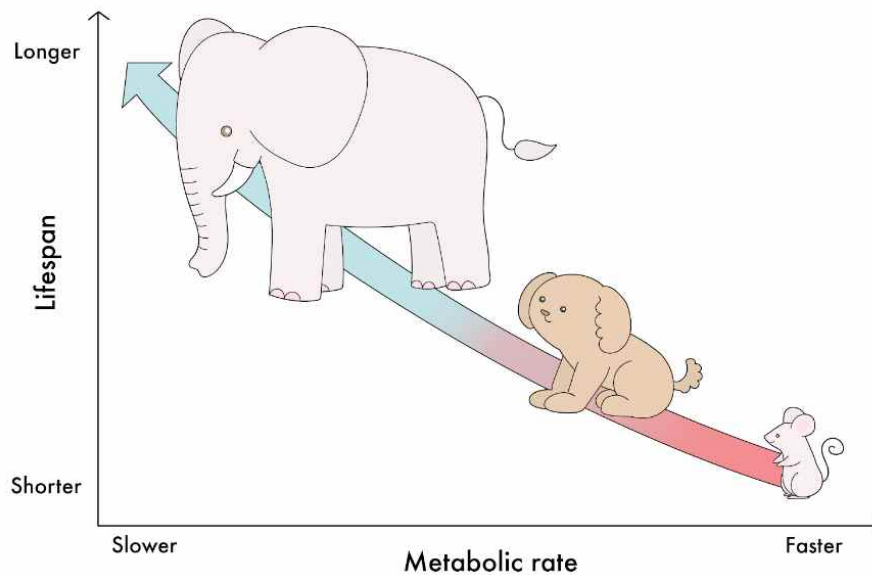
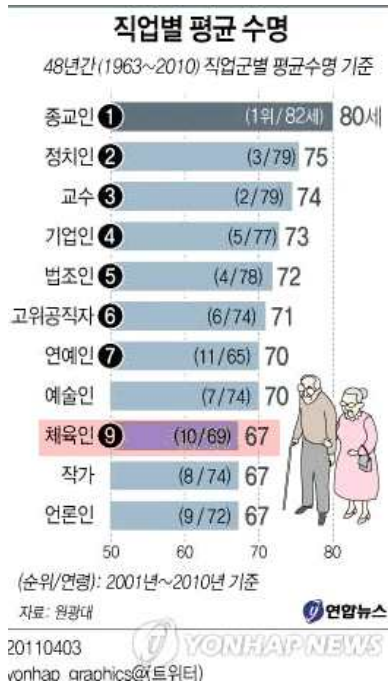


Figure 1: The so-called rate of living theory posits that larger animals live longer than smaller animals due to their slower metabolic rates.

- 아래 <그림>은 1963-2010년 동안 신문의 부고란을 조사하여 직업별 평균수명을 조사한 그래프임. 체육인인 가장 짧은 수명으로 확인되었음(연합뉴스, 20220403). 이와 같은 운동선수의 짧은 수명은 ATP의 빠른 생산을 위해 전자전달계에서 NADH와 산소 공급의 부조화반응을 유도하는 faster metabolic rate에 기인할 것으로 추정됨.



<참고문헌>

Lagouge M, Larsson NG: The Role of Mitochondrial DNA Mutations and Free Radicals in Disease and Ageing. J. Intern. Med. 2013;273(6):529-543.

Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? Cell. 2008 Jan 25;132(2):171-6

Isabella Grabski. Can Calorie Restriction Extend Your Lifespan? a 3rd-year PhD student in Biostatistics at Harvard University. (2020)

박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

28. Cytochrome P450의 Uncoupling 현상

1) 미토콘드리아에서 ROS 생성은 퇴행성질환의 원인임

- 앞서 언급없이 미토콘드리아에서 유해활성산소(reactive oxygen speicies, ROS)와 평균 수명을 언급한 것은 cytochrome P450의 Uncoupling 현상과 연결하기 위해서임.
- 유전적 질환이 없는 인간의 수명은 미토콘드리아의 수명이라고 생각하고 있음. 즉, ATP 합성을 위해 우리가 마시는 산소와 식이를 통해 공급되는 전자(NADH)가 미토콘드리아 전자전달계에서 얼마나 coupling vs uncoupling 반응의 비(ratio)에 영향을 주는 정도가 결국 인간 개개인의 수명을 결정한다는 것.
- 특히 노화와 더불어 발생하는 퇴행성질환 중 수많은 질환이 ROS 생성과 연관이 있을 것으로 추정됨. 물론 (β -amyloid와 Tau 단백질의 이상)과 (TCA cycle 장애와 미토콘드리아에서의 ATP 생성) 사이 선행성에는 논란이 있지만 microglia(미세교세포, 뇌의 대식세포)에서의 ROS는 알츠하이머 치매 발생은 대표적인 사례로 들 수 있음(Fairley 등, 2021).

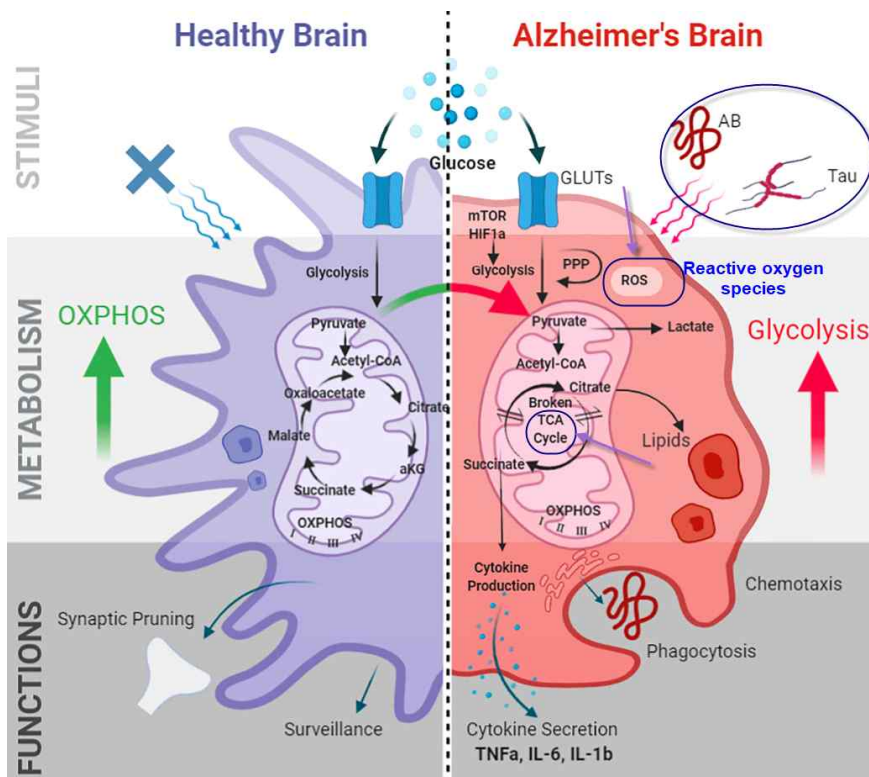


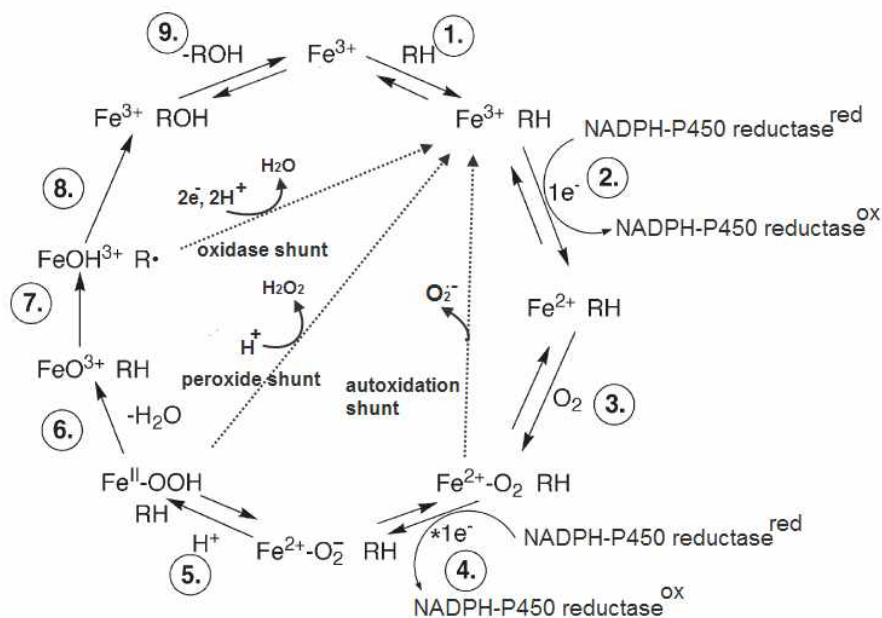
Figure 1 Microglial metabolic programming and immune functions in AD. Alzheimer's pathogenic stimuli A β and tau induce microglial metabolic alterations(보라색 화살표)

<참고문헌>

- Fairley LH, Wong JH, Barron AM. Mitochondrial Regulation of Microglial Immunometabolism in Alzheimer's Disease. Front Immunol. 2021 Feb 25;12:624538.

2) Cytochrome P450의 촉매반응 사이클의 uncoupling reaction

- 일산화(monoxygenation)을 통해 RH 기질을 ROH 기질로 전환하는 cytochrome P450의 촉매반응 사이클도 uncoupling 반응을 통해 ROS를 유발함.
- 생체 내 미토콘드리아 다음으로 ROS 최대 생산시스템.
- 일반적인 P450의 촉매반응 사이클이며 uncoupling에 의한 ROS 생성은 <그림-14>에서 처럼 Shunt pathway를 통해서 발생함(2010, 박영철; Veith 등, 2018)

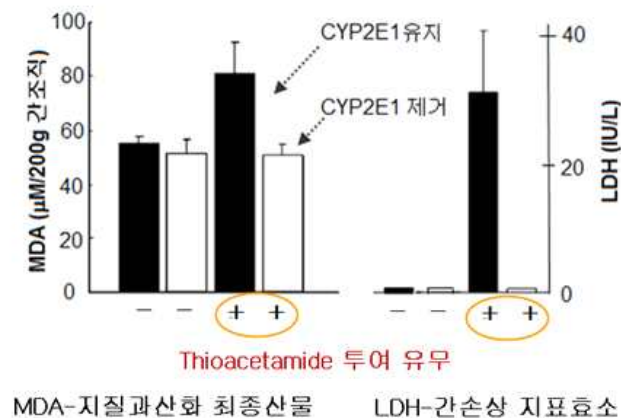


<그림-14> 일반적인 P450의 촉매반응 사이클

3) Cytochrome P450의 촉매반응 자체가 ROS 발생의 중요한 Source

- 만약 기질은 있지만 cytochrome P450의 활성이 없다면 ROS가 생성되지 않아야 함. 아래의 <그림>은 이는 다음 thioacetamide 기질을 생화학적 전환을 유도하는 CYP2E1를 제거 전과 제거 후의 마우스로부터 간의 손상 정도를 ROS 생성 유무 및 지질과산화 즉, ROS 생성 지표인 MDA 그리고 간손상 지표인 LDH 등을 측정한 것임(Kang 등, 2007; Veith 등, 2018).

- Thioacetamide를 투여한 후(+) CYP2E1를 제거한 마우스에서 MDA 생성이 낮았고 특히 간손상의 지표인 LDH는 비교가 안될 정도로 낮은 것을 확인할 수 있음. 따라서 cytochrome P450의 촉매작용 자체가 ROS 생성에 상당한 기원이라고 할 수 있음. **이는 약물 대사 자체가 ROS 생성에 기여를 한다는 것을 의미함.**



<그림> Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity.

<참고문헌>

- Hrycay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. Adv Pharmacol. 2015;74:35-84.
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai R, Chusiri Y, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2008 May 1;228(3):295-300.
- Veith A, Moorthy B. ROLE OF CYTOCHROME P450S IN THE GENERATION AND METABOLISM OF REACTIVE OXYGEN SPECIES. Curr Opin Toxicol. 2018 Feb;7:44-51

29. Cytochrome P450의 Uncoupling 현상과 NASH와의 관계

1) 미토콘드리아 ROS에 의한 NASH 유도

- Figure 1은 2023년 미국 FDA가 레즈디프라(Rezdiffra)를 최초 치료제로 승인한 비알코올성 지방간질환(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)이 상호 가역적인 비알콜성 지방성간염(non alcohol steatohepatitis, NASH) 이후 비가역적인 간경변(cirrhosis)으로 발달하는 과정을 나타낸 것임(Chen 등, 2018).
- NAFLD은 유전과 환경적인 요인, 간에서의 지방축적, 인슐린 저항성, 지방산과 지방독성(lipotoxicity), 산화 스트레스와 미토콘드리아 기능장애 및 다양한 싸이토카인/아디포카인(cytokines/adipokines)의 상호작용 등에 대한 기전 등이 원인으로 설명되고 있음.
- NAFLD은 트리글리세리드(triglyceride)와 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)가 소포체(ER)의 이중층 사이에 축적되어 발생하는 지방방울(lipid droplet)이 간세포 사이에 5% 이상 상황을 의미하며 지방간(fatty acid)의 전단계로 상호 가역적임. 지방방울에는 주로 지방이 저장됨.
- <Figure 1>에서 중요 사항은 미토콘드리아의 장애로 발생하는 ROS가 염증 등의 반응을 통해 NAFLD 상황에 직접적으로 NASH를 유발하는 것임(초록색 부분). 이는 약물 복용 시 Cytochrome P450 촉매반응도 ROS 생성으로 NASH를 유도할 수 있다는 것을 의미함

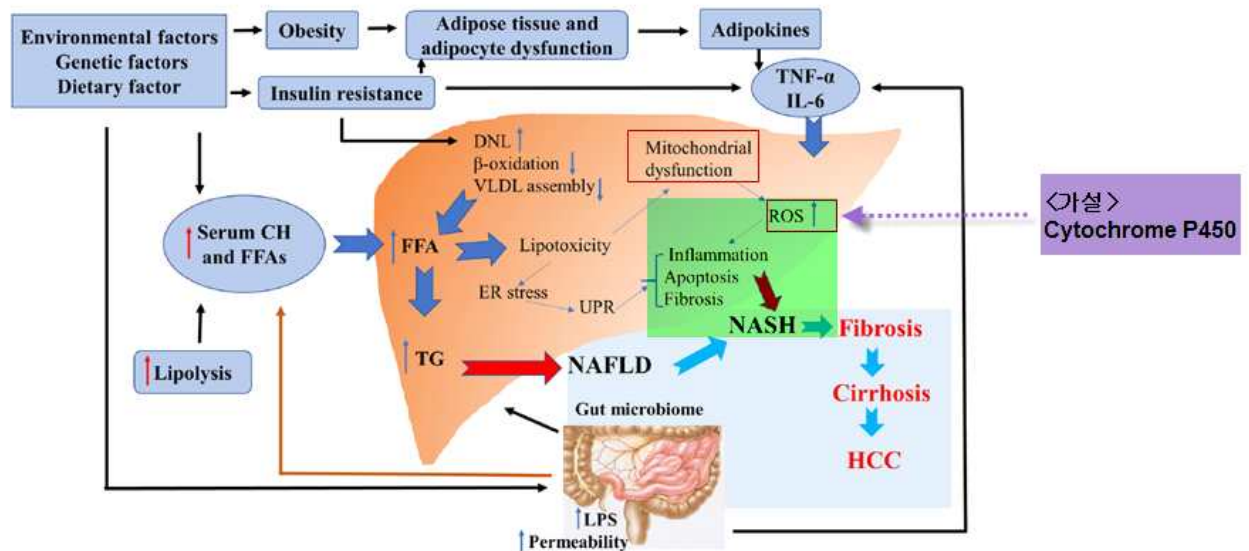


Figure 1. The 'multiple hit' hypothesis for the progression of NAFLD and natural history of NAFLD (가설은 원그림에 추가적으로 작성한 것임)

<참고문헌>

- Chen W, Zhang J, Fan HN, Zhu JS. Function and therapeutic advances of chemokine and its receptor in nonalcoholic fatty liver disease. Therap Adv Gastroenterol. 2018 Dec 6;11:1756284818815184.

2) Cytochrome P450에 의한 ROS와 염증 반응 유도

- <Figure 1>은 Cytochrome P450을 비롯하여 mitochondria, xanthine oxidase, NADPH oxidase 그리고 neutrophils 등에 의한 ROS source에 의한 심장에서 염증반응 유발하는 기전을 나타낸 것임(David 등, 2012).

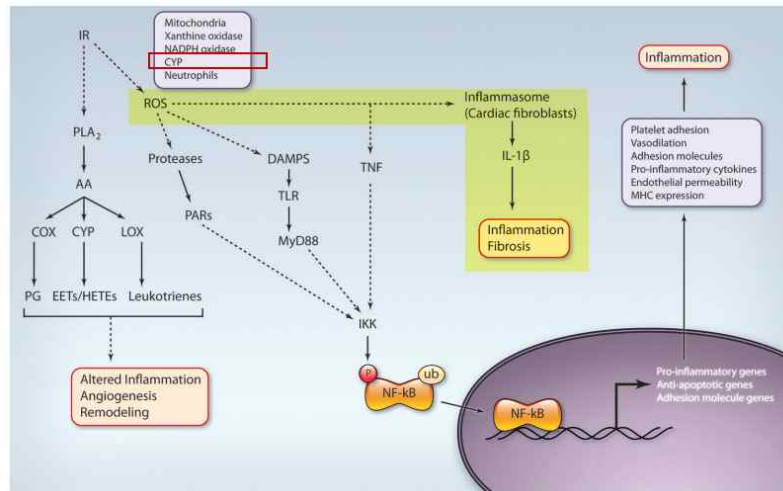


Figure 1. Mechanisms by which ischemia and reperfusion (IR) induces inflammation.

- <Figure 5>은 Cytochrome P450과 mitochondria에서 발생하는 ROS는 비알콜성지방간염(NASH, nonalcoholic steatohepatitis) 유발에 있어서 가장 중요한 원인으로 추정됨. 이는 가능한 과식을 줄이면서 어느 정도 소화가 된 상태에서 약물 복용이 중요하며 이는 2 장소에서 동시 다발적으로 과도한 ROS 생성에 의한 NASH를 예방이 가능하기 때문임. 특히 현대 사회에 있어서 누구나 저용량-장기간 노출의 약물 복용이 일상적이기 때문에 가능한 과식을 줄이면서 어느 정도 소화가 된 상태에서 약물 복용이 중요할 것으로 추정됨,

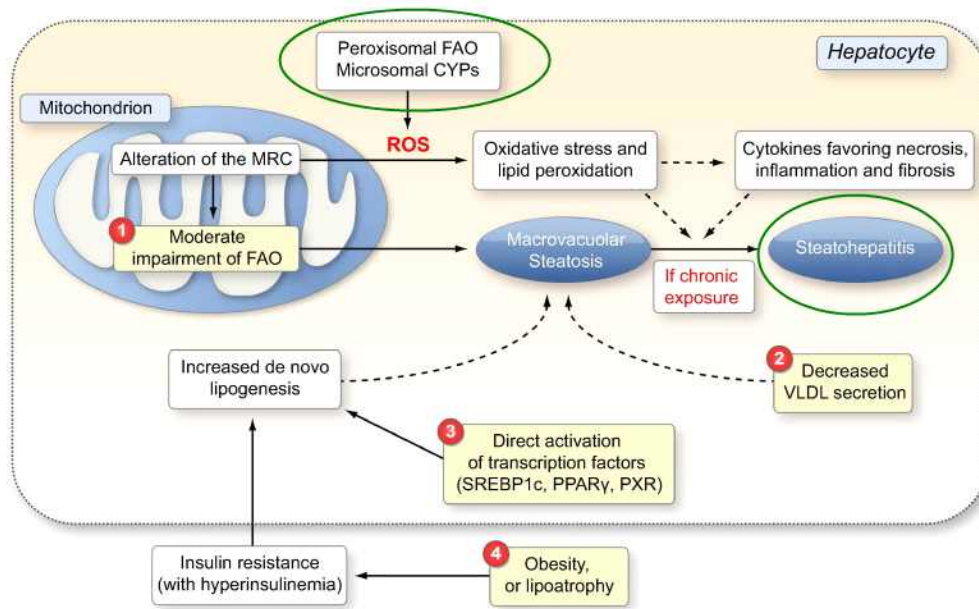


Fig. 5. Mechanisms of drug-induced macrovacuolar steatosis and steatohepatitis.

<참고문헌>

- Begriche K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. J Hepatol. 2011 Apr;54(4):773-94
- David J. Marchant, John H. Boyd, David C. Lin, David J. Granville, Farshid S. Garmaroudi, and Bruce M. McManus. Inflammation in Myocardial Diseases. Circulation Research Volume 110, Issue 1, 6 January 2012; Pages 126-144

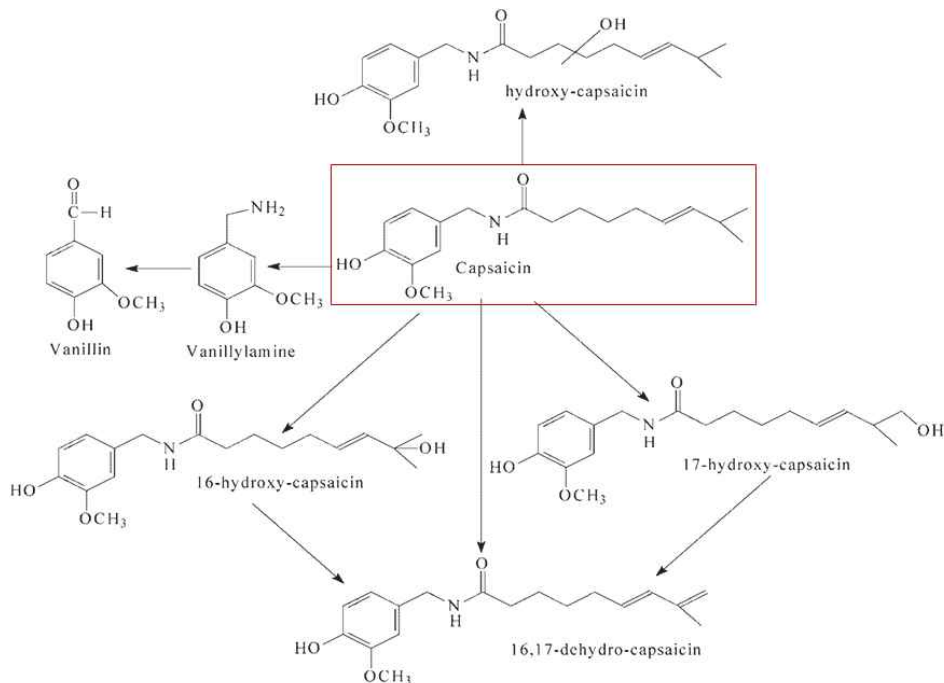
30. 덴마크 "위험한맛" 불닭볶음면 리콜에 대한 소견

- 덴마크 정부는 캡사이신(Capsaicin)을 다량 섭취하면 작열감(타는 듯한 느낌), 불편함, 메스꺼움, 구토 및 고혈압 등 급성 중독 현상을 일으킬 수 있는 것으로 설명하고 있다 (조선일보, [Weekly Biz 5Q] 매운 맛이 촉발한 ‘핫한 논쟁’ 2024. 06. 29).

1. 캡사이신(Capsaicin)의 약리와 독성

1) 간에서 capsacin의 biotransformation과 약물상호작용

- 무독성대사체: ‘Three major metabolites were detected and identified as 16-hydroxycapsaicin, 17-hydroxycapsaicin, and 16,17-dehydrocapsaicin. vanillylamine and vanillin(Chanda 등, 2008)’ 결과적으로 친전자성대사체는 생성되지 않는 것으로 고려됨,
- 단지 고용량에서는 CYP1A2 발현 증가를 유도하는 외에는 Capsaicin의 약물 대사 및 CYP450 유도 및 저해에 대한 영향은 아주 미미함(Babbar 등, 2010)



<그림> 간에서 Capsaicin의 대사 과정

<참고문헌>

- Chanda S, Bashir M, Babbar S, Koganti A, Bley K. In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. Drug Metab Dispos. 2008 Apr;36(4):670–5.
- Babbar S, Chanda S, Bley K. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes in vitro by capsaicin. Xenobiotica. 2010 Dec;40(12):807–16.

2) Capsaicin과 고혈압

- **관련이 없음:** Meta-analysis showed no significant effect of red pepper/capsaicin on SBP (0.43 mmHg, 95% CI: -1.15 to 2.01), DBP (-0.45 mmHg, 95% CI: -2.14 to 1.24), and HR (-0.60 bpm, 95% CI: -1.97 to 0.78). <Shirani 등, 2021>

<참고문헌>

- Shirani F, Foshati S, Tavassoly M, Clark CCT, Rouhani MH. The effect of red pepper/capsaicin on blood pressure and heart rate: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. Phytother Res. 2021 Nov;35(11):6080–6088.

3) Capsaicin의 약리 효과

- 수 많은 논문에 의해 Table 6에서처럼 <capsaicin exerts antioxidative(항산화), antitumor(항암), antiulcer(항궤양) and analgesic(진통), antiinflammatory(항염증) effects and it has demonstrated potential as a treatment for cardiovascular, gastrointestinal, oncological and dermatological conditions. unique among natural irritants(자극), capsaicin initially excites neurons but then ‘calms’ them into long-lasting non-responsiveness(흥분 후 진정). capsaicin can also promote weight loss(항비만), making it potentially useful for treating obesity. Several mechanisms have been proposed to explain the therapeutic effects of capsaicin, including antioxidation(항산화작용), analgesia(진통) and promotion of apoptosis(세포자멸). (Batiha 등, 2020; Zhang 등, 2024)

Table 6. The biological activities of *Capsicum*.

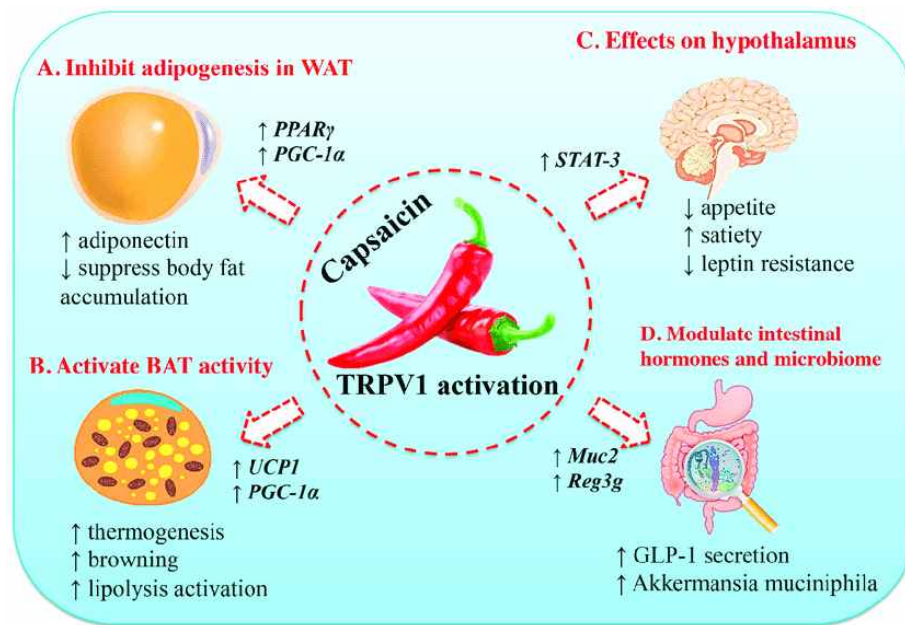
Activities	Models	Extract	Bioactive Compound Mechanism of Action	References
Antimicrobial effects	<i>Micrococcus</i> sp (20 mm), <i>Bacillus</i> (10 mm), <i>E. Coli</i> (17 mm), <i>Pseudomonas</i> sp (16mm) and <i>Citrobacter</i> sp (15 mm)	The butanol extract of <i>Capsicum annuum</i> fruit	Capsaicin.	[88]
	<i>Salmonella typhimurium</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	The ethanol extract (100 mg/mL) of <i>Capsicum annuum</i> .	Capsaicin.	[89]
	(<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA02, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC6057, <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 86), and Gram negative (<i>Escherichia coli</i> ATCC25922, <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC29665, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA416) bacteria and one yeast strain (<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007)	<i>C. frutescens</i> extract.	CAY-1, a novel saponin obtained from <i>C. frutescens</i> , rupturing the membrane integrity of fungal cells.	[88,91]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> and <i>Candida guilliermondii</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>	<i>Capsicum frutescens</i> extracts.	Peptides obtained from chili pepper seeds.	[94] [93]
Antiviral	Guinea pigs against cutaneous herpes simplex virus	<i>Capsicum</i> extract.	Capsaicin, disrupting standard virus-neuron connections.	[192]
Insecticidal, anthelmintic and Larvicidal effects	<i>A. aegypti</i> mosquitoes	<i>Capsicum frutescens</i> extracts.	Extremely repellent extracts.	[115]
	Cercaria of <i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Capsicum annuum</i> leaves extracts.	Water-soluble unsaturated compounds from the oils or their hydrolysis products.	[100]
Antioxidant properties	Adult men and women	<i>Capsicum annuum</i> .	Antioxidant properties of capsaicinoids gave additional advantage in the management of cardiovascular diseases.	[108]
Anti-inflammatory properties	Rat hind paw inflammation induced by subplantar injections of fresh egg albumin (0.5 mL/kg)	Ethyl acetate <i>C. frutescens</i> extract	Carotenoids.	[117]
Cardiovascular effects	Anesthetized dogs iv injections	Capsaicin (10-300 µg/kg).	Temporary increase in the mean systemic blood pressure trailed by a continued fall.	[193]
Antithrombotic and Vasodilatory Properties	Gerbil males	Pepper oleoresin.	Decreasing intestinal absorption of exogenous cholesterol as a result of the increased biliary excretion of endogenous cholesterol.	[121]
	Feed rabbits for 12 weeks with a diet rich in cholesterol (1%) and chili pepper (1%).	Chili pepper (1%).	Discovered the anti-atherosclerotic effects of pepper. At the end of 12 weeks, a reduced activity of cholesterol ester transfer protein (CETP) was witnessed, in contrast to the control group (rabbits feeding without pepper).	[194]

<참고문헌>

- Batiha GE, Alqahtani A, Ojo OA, Shaheen HM, Wasef L, Elzeiny M, Ismail M, Shalaby M, Murata T, Zaragoza-Bastida A, Rivero-Perez N, Magdy Beshbishy A, Kasozi KI, Jeandet P, Hetta HF. Biological Properties, Bioactive Constituents, and Pharmacokinetics of Some *Capsicum* spp. and Capsaicinoids. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 22;21(15):5179.
- Zhang W, Zhang Y, Fan J, Feng Z, Song X. Pharmacological activity of capsaicin: Mechanisms and controversies (Review). *Mol Med Rep.* 2024 Mar;29(3):38

4) Capsaicin의 약리 기전

- 대부분 capsaicine 약리효능은 캡사이신 수용체이라고 불리는 TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1)을 통해 이루어지는 것으로 확인됨(Shuba 등, 2021; www.freshinechem.com/capsaicin-2)



<참고문헌>

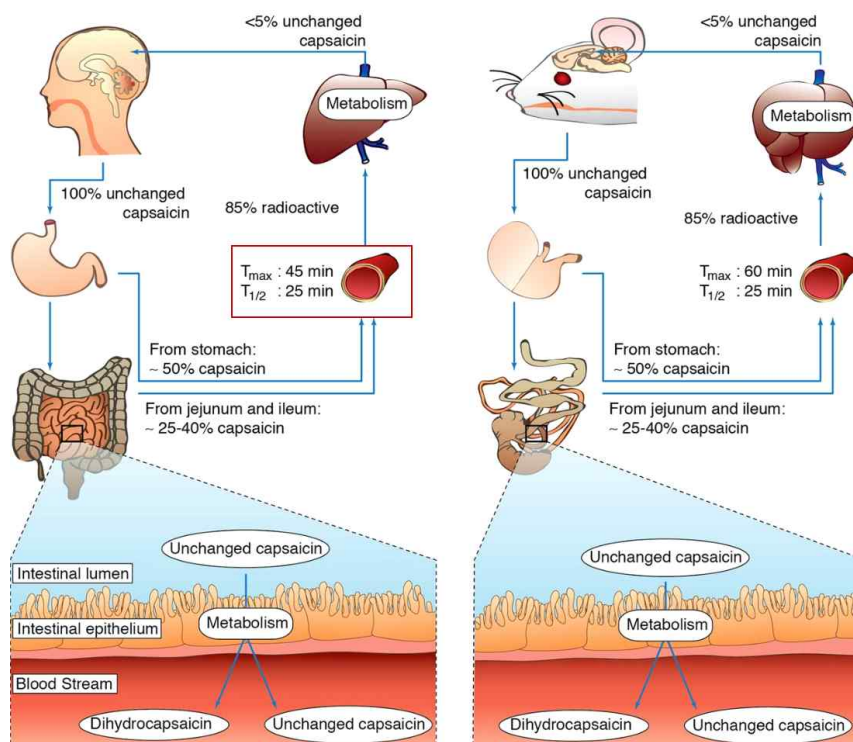
- Shuba YM. Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. Front Cell Neurosci. 2021 Feb 5;14:612480.

2. Capsaicin 섭취의 안전성

① 모든 식이와 섭취는 negative-feedback control로 어느 정도 섭취가 되었으면 더 이상 섭취에 대한 거부반응

② 캡사이신의 반감기: Capsaicin은 다양한 효능을 가지고 있지만 약 25분이라는 짧은 반감기로 치료제 개발로의 한계가 있음(The clinical usefulness of capsaicin is limited by its short half-life; Zhang 등, 2024; Rollyson 등, 2014). 이는 다량으로 섭취하여도 과잉약리 작용에 의한 독성이 아주 약하다는 것을 의미하며 오히려 capsaicin의 효능을 얻기 위해서는 짧은 시간 내 다량 섭취가 요구됨.

<Rollyson 등, 2014: The half-life of capsaicin in the blood was found to be about 25 minutes. The peak plasma concentration of capsaicin (T_{peak}) was 2.5 ng/mL (~ 8.2 nM) at 45 minutes. After 105 minutes, no capsaicin was detected in the blood of the volunteers.(Rollyson 등, 2014)



<참고문헌>

- Zhang W, Zhang Y, Fan J, Feng Z, Song X. Pharmacological activity of capsaicin: Mechanisms and controversies (Review). Mol Med Rep. 2024 Mar;29(3):38
- Rollyson WD, Stover CA, Brown KC, Perry HE, Stevenson CD, McNees CA, Ball JG, Valentovic MA, Dasgupta P. Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery. J Control Release. 2014 Dec 28;196:96–105.

3. 덴마크와 우리나라의 흡연을 및 평균수명 비교

- 아마 흡연이 평균수명에 부정적인 영향을 주는 주요 원인 중의 하나임. <표>에서처럼 두 나라 비교에서 덴마크 16.2%, 우리나라 20%로 더 높음

<표> 국가별 남녀 및 평균 흡연율

Country	Total Smokers 2022 ~		Male Smokers 2022		Female Smokers 2022	
Search... (164)	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Nauru	48.3%		48.6%		48.1%	
Myanmar	44.4%		69.5%		19.3%	
Kiribati	39.7%		52.5%		26.8%	
South Korea	20%		34.1%		5.8%	
Kuwait	19.9%		37.7%		2.1%	
Singapore	16.4%		27.9%		4.9%	
Brunei	16.4%		30.7%		2.2%	
Denmark	16.2%		16.4%		16.1%	

<참고문헌>worldpopulationreview.com/country-rankings/smoking-rates-by-country

- 아래의 <표>는 각 나라의 기대수명을 나타낸 것으로 덴마크는 평균 81.30년, 우리나라는 82.68년으로 각각 30위 및 18위임. 우리나라가 훨씬 높은 평균수명을 나타냄

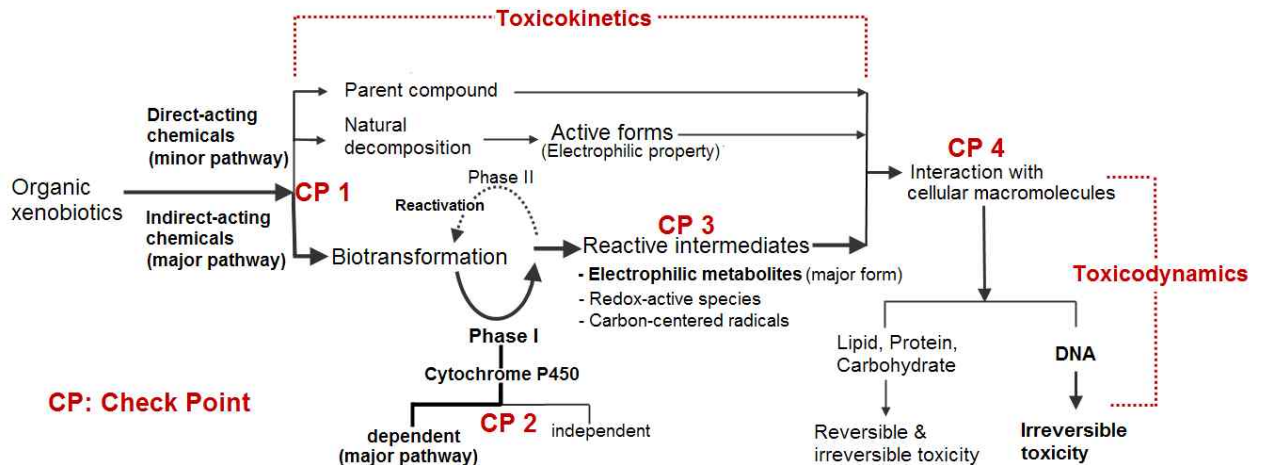
<표> List of countries by life expectancy(참고: wikipedia)

	Countries and territories	2022				Historical data								recovery from COVID-19: 2019→2022		
		All	Male	Female	Sex gap	2014	2014→2019	2019	2019→2020	2020	2020→2021	2021	2021→2022			2022
2	 Macao SAR, China	85.38	82.75	87.98	5.23	83.88	1.09	84.98	0.21	85.18	0.22	85.40	−0.02	85.38	0.40	
3	 Japan	84.00	81.05	87.09	6.04	83.59	0.77	84.36	0.20	84.56	−0.11	84.45	−0.45	84.00	−0.36	
18	 South Korea	82.68	79.90	85.60	5.70	81.72	1.50	83.23	0.20	83.43	0.10	83.53	−0.85	82.68	−0.55	
19	 Norway	82.56	81.00	84.20	3.20	82.10	0.86	82.96	0.25	83.21	−0.05	83.16	−0.60	82.56	−0.40	
20	 France	82.23	79.40	85.20	5.80	82.72	0.11	82.83	−0.65	82.18	0.15	82.32	−0.10	82.23	−0.60	
21	 Iceland	82.17	81.00	83.40	2.40	82.86	0.30	83.16	−0.10	83.06	0.10	83.17	−1.00	82.17	−0.99	
30	 Denmark	81.30	79.50	83.20	3.70	80.70	0.75	81.45	0.15	81.60	−0.20	81.40	−0.10	81.30	−0.15	
31	 Canada	81.30	79.12	83.58	4.46	81.78	0.44	82.22	−0.56	81.66	−0.07	81.59	−0.29	81.30	−0.93	
32	 Slovenia	81.28	78.60	84.10	5.50	81.08	0.45	81.53	−1.00	80.53	0.14	80.68	0.61	81.28	−0.25	
33	 Finland	81.19	78.70	83.80	5.10	81.18	0.80	81.98	−0.05	81.93	−0.05	81.89	−0.70	81.19	−0.80	

31. 3가지 독성대사체와 시를 이용한 신약 개발의 끝지점

1) Cytochrome P450의 양날의 칼

- 아래의 CP2에서처럼 cytochrome P450에 의해 무독성대사체도 전환시키지만 CP2에서처럼 3가지 Reactive intermediates(활성중간대사체)인 Electrophilic metabolites(친전자성대사체), Carbon-centered radicals(탄소부위-라디칼), Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체) 등의 독성대사체도 생성함.

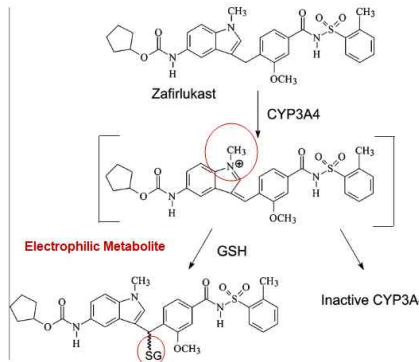


<그림> 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma

2) Cytochrome P450에 의한 Reactive intermediates(활성중간대사체) - 3 종류

- Electrophilic metabolites(친전자성대사체):** 친전자성물질이란 전자가 부족한 원자, 이온을 비롯한, 분자성 물질을 말하며 친핵성물질의 전자쌍과 높은 친화성의 결합력을 가지고 있음. 이러한 결합은 주로 DNA 및 단백질 등과 이루어져 약물 등의 외인성물질(xenobiotics)의 주요 독성 기전임. Cytochrome P450에 의해 가장 많은 대사체를 생성하는

- <예시> 아래 <그림>은 CYP3A4에 의한 기관지 천식 치료제인 zafirlukast(자피르뤼캐스트, accolate)의 electrophilic metabolite 생성 과정이며 친전자성대사체를 제거하는 유일한 물질인 Glutathione이 결합하여 친수성으로 전환되어 배출됨(Kassahun 등, 2005). 이와 같이 electrophilic metabolite 생성으로 복용 시 간독성(hepatotoxicity)이 유도됨. 또한 호산구 증가로 폐침윤 및 혈관염증이 증가하는 Strauss syndrome(척-스트라우스 증후군, 과사성 혈관염)이 발생하며 지속되면 호산구가 많은 육아종을 형성하여 혈관외 육아종이 발생함.



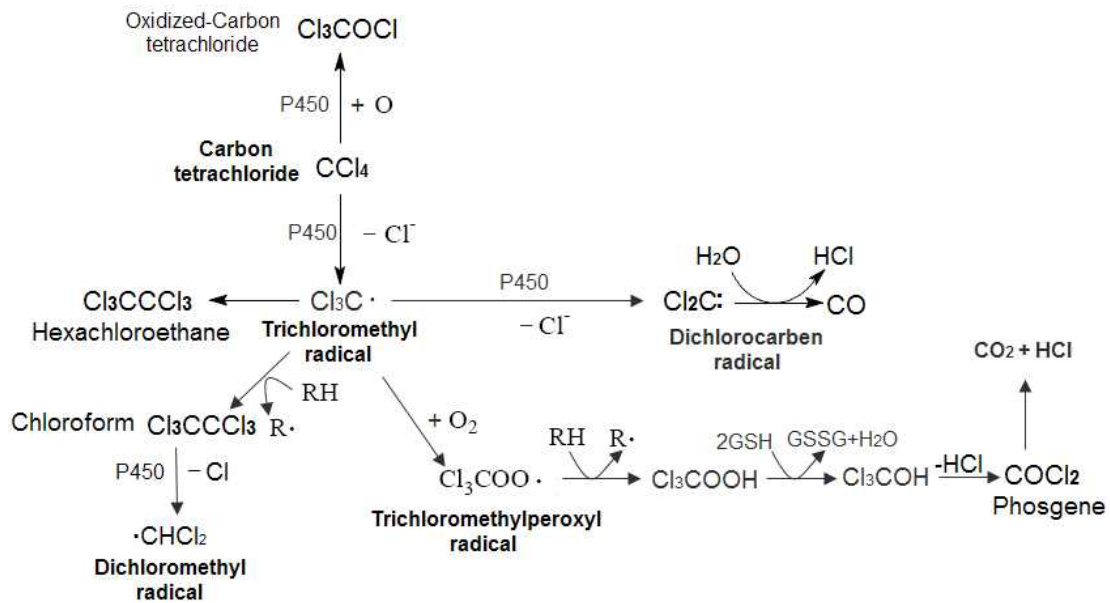
<그림> zafirlukast의 친전자성대사체 생성 과정

<참고문헌>

- Kelem Kassahun, Konstantine Skordos, Ian McIntosh, Donald Slaughter, George A. Doss, Thomas A. Baillie, and Garold S. Yost. firlukast Metabolism by Cytochrome P450 3A4 Produces an Electrophilic α,β -Unsaturated Iminium Species That Results in the Selective Mechanism-Based Inactivation of the Enzyme. *em. Res. Toxicol.* 2005, 18, 9, 1427-1437

② Carbon-centered radicals(탄소 부위-라디칼)

- <그림-21>에서처럼 CCl_4 (사염화탄소)는 cytochrome P450에 의해 대표적인 탄소부위-라디칼 생성물질로 이의 생성으로 독성이 강함
- CCl_4 는 CYP2E1, CYP2B1 및 CYP2B2 등 다양한 P450에 의해 대사되며 특정 P450 효소에 의한 특정대사체는 확인되지 않음. CCl_4 생화학적 전환을 통해 trichloromethyl radical과 같은 carbon-centered radical, trichloromethylperoxyl radical의 alkylperoxyl radical 그리고 2개의 비쌍전자성 라디칼인 dichlorocarbene 라디칼 등 다양한 라디칼대사체들이 생성됨. 친전자성물질인 phosgene을 비롯하여 또한 chloroform도 CCl_4 의 대사로부터 생성됨. chloroform으로부터 CYP2E1, CYP2B1 및 CYP2B2 등에 의해 라디칼대사체인 dichloromethyl radical로 전환되기도 함(Knockaert 등, 2012; 박영철, 2010).



<그림-21> Carbon tetrachloride의 라디칼대사체 생성과정(박영철, 2010)

<참고문헌>

- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Knockaert, L., Berson, A., Ribault, C. et al. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. Lab Invest 92, 396-410 (2012)

<참고문헌>

- Nioi, Paul, John D. Hayes., Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basicregion leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors, Mutation Research, 2004, 555:149-171.
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Xuan Ji, Xiaomei Liu, Muzi Li, Songxue Shao, Jing Chang, Jing Du, Xiaofei Ma, Xia Feng, Lina Zhu, Xi Yu, and Wenping Hu. Study of the Redox Potentials of Benzoquinone and Its Derivatives by Combining Electrochemistry and Computational Chemistry Journal of Chemical Education 2021 98 (9), 3019-3025

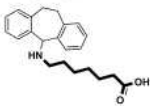
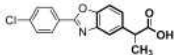
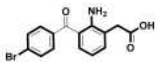
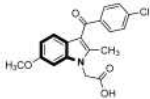
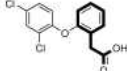
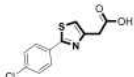
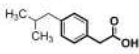
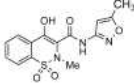
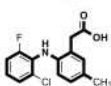
3) AI 및 small molecule을 이용한 신약 개발의 의문과 한계점

① Reactive intermediates(metabolites) 생성에 의한 시장에서 퇴출된 약물: Stepan 등 (2011) 등의 논문의 Table 1. Structural Alert and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADR에서처럼 약물의 개체-특이적 독성(Idiosyncratic Drug Toxicity)에 기인하여 퇴출된 약물의 62-69%가 reactive intermediate로 전환되는 약물임

<참고문헌>

- Stepan AF. , et al., Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. Chem. Res. Toxicol.2011, 24, 9, 1345-1410

Table 1. Structural Alert and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADR<붉은 마크가 reactive intermediate로 전환하여 퇴출된 약물>

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA ^a (Å ²)	Reason for Withdrawal	Daily Dose ^c (mg)	Alerts	Reactive Intermediate Formation ^d
Amineptine (1)	Antidepressant	Acid	337	2.51	49.30	Hepatotoxicity Cutaneous ADRs	200	Short to medium chain fatty acid	Yes ^{9,10}
									
Benoxaprofen (2)	NSAID	Acid	301	3.82	58.90	Hepatotoxicity	300-600	Arylacetic acid	Yes ^{29,30}
									
Bromfenac (3)	NSAID	Acid	334	3.28	80.40	Hepatotoxicity	25-50	Aniline, Arylacetic acid, Bromobenzene	Yes ¹²
									
Chlometacin (4)	NSAID	Acid	357	4.46	66.84	Hepatotoxicity	450	Aniline	N.D. ^c
									
Fenclofenac (5)	NSAID	Acid	297	4.70	46.53	Hepatotoxicity	1200	Arylacetic acid	N.D. ^c
									
Fenclozic acid (6)	NSAID	Acid	253	2.57	49.66	Hepatotoxicity	300	Heteroarylacetic acid, Thiazole	N.D. ^c
									
Ibuprofen (7)	NSAID	Acid	192	3.37	37.30	Hepatotoxicity	2400	Arylacetic acid	Yes ^{29,30}
									
Isoxicam (8)	NSAID	Acid	335	1.61	108.3	Cutaneous ADRs	200	None	N.D. ^c
									
Lumiracoxib (9)	NSAID	Acid	293	4.65	49.30	Hepatotoxicity	400	Arylacetic acid, p-Alkylaniline	Yes ^{29,30}
									

Chemical Research in Toxicology

REVIEW

Drug	Indication	Phys. Chem.	M.W.	Log P	TPSA (Å ²)	Reactive Intermediates	LD ₅₀ (mg/kg)	Reactive Intermediate Formation ^a
Propofol (16)	NSAID	Acid	231	2.66	46.30	Hepatotoxicity	800	Acidic, Aromatic, Quinone
Indomethacin (17)	NSAID	Acid	357	1.79	89.10	Hepatotoxicity	50	2-Aminothiazole
Tamoxifen (18)	Diuretic	Acid	331	3.23	63.40	Hepatotoxicity	250-300	Thiophene
Tolazepam (19)	Anti-Parkinson	Acid	271	3.24	109.34	Hepatotoxicity	500-600	Catechol, Nucleoside
Tolmetamol (20)	Antidiabetic	Acid	357	3.43	48.70	Hepatotoxicity	400	Thioamide
Zonitrol (21)	NSAID	Acid	291	2.94	57.60	Acidic, Aromatic	600	Acidic, Aromatic, Alkylpyridine
Amoxicillin (22)	Antibiotic	Base	231	0.57	26.79	Blood dyscrasia	2000	Aryldiazine
Amoxicillin (23)	Antibiotic	Base	355	5.46	47.86	Hepatotoxicity, Blood dyscrasia	200	p-Hydroxyaniline
Ethanol (24)	H ₂ receptor antagonist	Base	477	2.41	135.2	Hepatotoxicity	800	Benzene, 2-Aminothiazole

1348 doi.org/10.1021/acs.chemtox.1c00000 (Chem. Res. Toxicol. 2011, 24, 1345-1412)

Chemical Research in Toxicology

REVIEW

Drug	Indication	Phys. Chem.	M.W.	Log P	TPSA (Å ²)	Reactive Intermediates	LD ₅₀ (mg/kg)	Reactive Intermediate Formation ^a
Propofol (25)	H ₂ receptor antagonist	Base	434	2.39	106.8	Hepatotoxicity	400	Acidic, 1,3-Benzodioxole
Propofol (26)	Antidepressant	Base	238	2.37	29.30	Hepatotoxicity, Blood dyscrasia	125	Acidic
Propofol (27)	Antidepressant	Base	401	3.91	49.37	Hepatotoxicity	15	Acidic
Propofol (28)	Thrombotic	Base	473	1.37	146.37	Hepatotoxicity	45	None
Propofol (29)	Anticancer	Neutral	464	5.58	33.91	Hepatotoxicity	25-100	None
Propofol (30)	Anticancer	Neutral	318	6.31	46.50	Hepatotoxicity	300	Acidic, 1,3-Benzodioxole
Propofol (31)	Anticancer	Neutral	273	1.57	34.50	Cytotoxicity	600	None
Propofol (32)	Anticancer	Neutral	179	0.23	53.50	Hepatotoxicity	25-100	Alkylpyridine
Propofol (33)	NSAID	Neutral	324	2.71	68.80	Blood dyscrasia	800	Acidic, p-Hydroxyaniline, Hydroxide

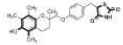
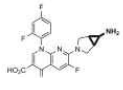
1349 doi.org/10.1021/acs.chemtox.1c00000 (Chem. Res. Toxicol. 2011, 24, 1345-1412)

Chemical Research in Toxicology

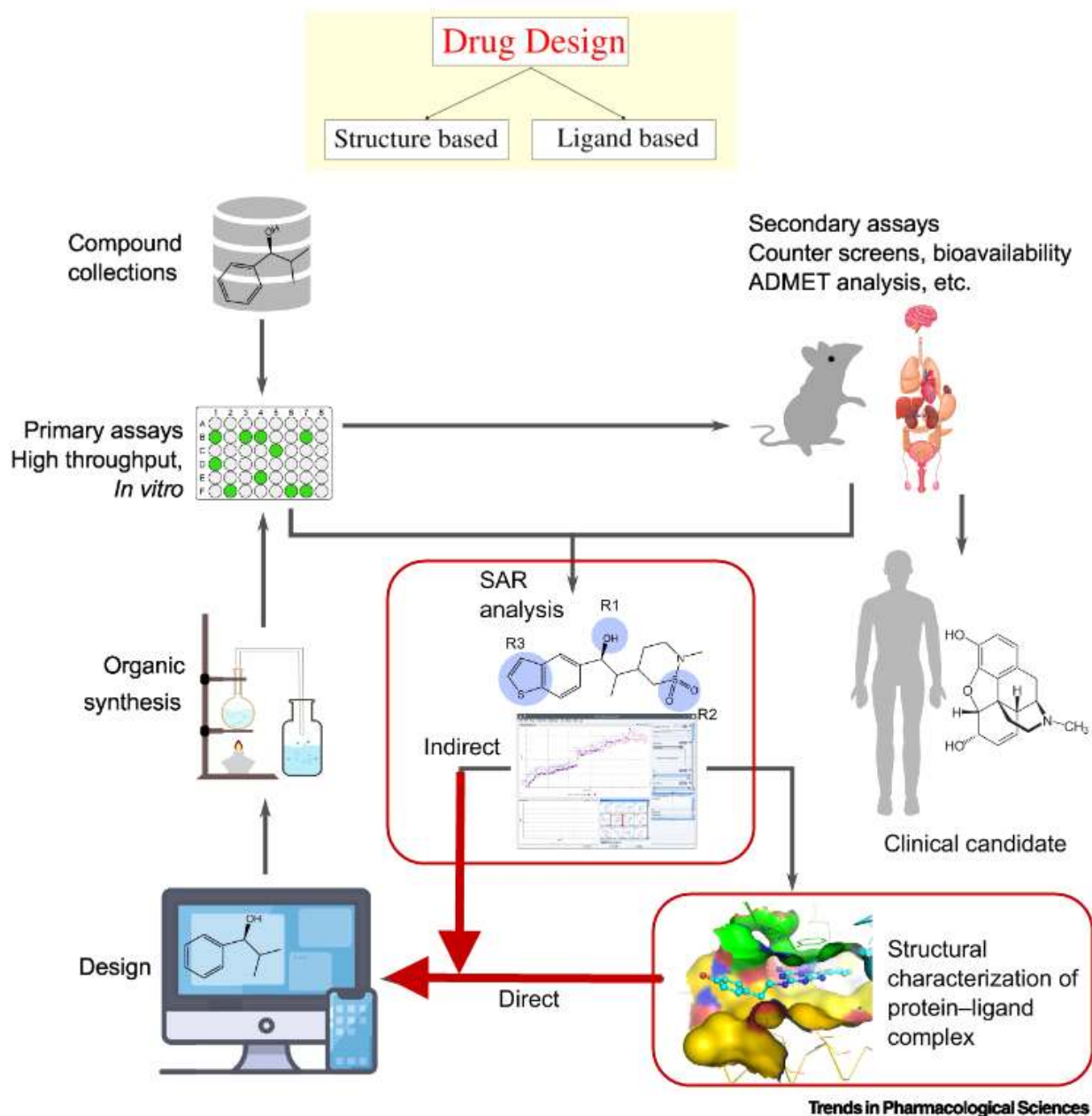
REVIEW

Table 1. Continued

Reactive intermediate Formation

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA (Å ²)	Reason Withdrawal	for Daily Dose ^a (mg)	Reactive Metabolite Formation ^b
Oxyphenisatin (28)	Laxative	Neutral	312	2.49	69.50	Hepatotoxicity	50	Amide, Phenol N.D. ^c
								
Fenofibrate (29)	ADHD ^d	Neutral	176	0.46	66.70	Hepatotoxicity	110	None N.D. ^c
								
Triptolizone (30)	Antidiabetic	Neutral	441	5.58	84.80	Hepatotoxicity	600	Thiazolidinedione, α -alkylphenol Yes ¹⁰
								
Tirofibanacin (31)	Antibacterial	Neutral	418	-1.1	99.20	Hepatotoxicity	100-500	Cyclopropylamine Yes ¹⁰
								

② AI를 이용한 신약 개발의 추구 방향: 신약의 개발을 <그림>에서처럼(Chan 등, 2019) 단순히 ligand-target protein 측면에서 본다면 단백질 구조 규명과 이에 결합하는 small molecule을 구조적 스크리닝. 스크리닝된 small molecule이 구조적으로 표적 단백질과 결합한다고 하더라도 이 후보약물이 Reactive intermediates가 아니라는 것을 현재 AI 기술로 분별가능할 것인가 하는 점이 한계점이라고 추정됨. 결국 생물종에서 1억개가 넘게 확인된 단백질 중 현재까지 겨우 3만여개 단백질 구조가 밝혀짐. 따라서 단백질 구조에 규명과 더불어 Reactive intermediate로 전환되지 않는 ligand 개발이 AI가 추구해야할 방향이며 미래 AI 기술 개발 과정에서 종말점을 위한 고려할 사항이 아닐까?



<참고문헌>

- Chan HCS, Shan H, Dahoun T, Vogel H, Yuan S. Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. Trends Pharmacol Sci. 2019 Aug;40(8):592-604.

32. 규제기관의 IND에서 가장 심각한 troubleshooting - 유전독성시험 결과

1) Small molecule의 유전독성을 확인하기 위한 시험 **three battery test**

- in vitro 복귀돌연변이시험(bacterial mutation assay, AMES Test)
- In vitro 염색체이상시험(in vitro mammalian chromosomal aberration test)
- In vivo 소핵시험(in vivo micronucleus test)

2) 가장 **빈번히** 발생하는 Troubleshooting 사례

- In vitro 복귀돌연변이시험과 in vivo 소핵시험의 음성 결과에도 불구하고 in vitro 염색체 이상시험에서 양성이면 추가적인 comet 시험에서 음성이라도 IND 통과가 쉽지 않은 국내 상황

3) **동일한 상황**에서 ICH S2(R1)의 가이드라인에서 결정

- Weight of evidence(증거비중도)에 근거하여 결정. 즉, 다음의 같은 경우에 in vitro에서 양성이라도 in vivo에서 음성이면 시험물질은 음성 판정
 - i. 포유동물 세포를 이용한 염색체이상시험에서 시험물질에 의한 변화 **즉, pH, 삼투압(osmolarity), 침전물 등의 발생과 더불어 양성**일 경우에 in vivo 소핵시험에 음성이면 시험물질의 유전독성은 음성
 - ii. 포유동물세포의 세포독성을 유발하는 50% 내외의 성장을 억제하는 농도에서 양성이고 in vivo 소핵시험에 음성이면 시험물질의 유전독성은 음성

<참고문헌> CH S2(R1): Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use - Scientific guideline (2012)

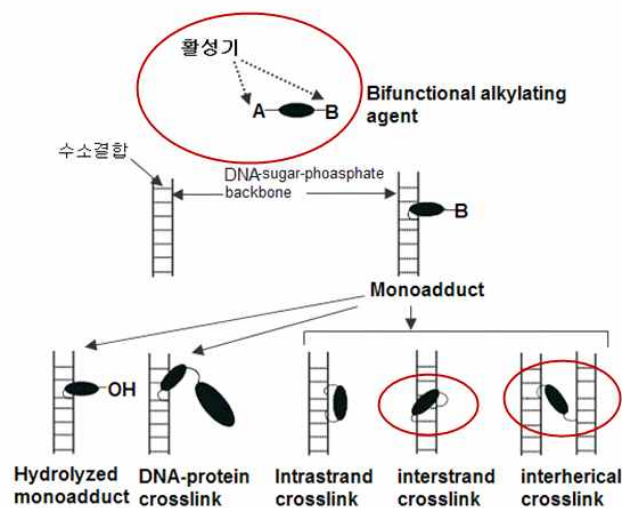
4) **독성학적** 고찰

- Small molecule은 앞서 6-2-4의 페이지 99에서 언급한 3가지 Reactive intermediates (활성중간대사체)인 Electrophilic metabolites(친전자성대사체), Carbon-centered radicals(탄소부위-라디칼), Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체)로 전환을 통해 mutagenicity와 clastogenicity를 유발함
- **Mutagenicity**는 염기 손상 등과 같이 유전자 수준의 DNA 손상으로 돌연변이원성을 의미하며 **clastogenicity**는 DNA 이중나선의 손상을 통해 염색체 절단과 같은 염색체 수준의 DNA 손상인 염색체 나선파괴물질을 의미함
- 다음의 <표>는 Reactive intermediates의 종류에 따라 DNA 손상 기전인 mutagenicity와 clastogenicity

<표> Reactive intermediates의 종류에 따라 DNA 손상 기전

Reactive intermediates (활성중간대사체)의 종류	DNA 손상 기전 및 종류
① Electrophilic metabolites(친전자성대사체)	아래의 <그림>에서처럼 자체의 활성기의 수에 따라 차이가 있음. 활성기가 1개일 경우 mutagenicity, 반면에 활성기가 2개일 경우 80%는 clastogenicity, 나머지 20% 정도는 mutagenicity와 동시에 유발함
② Carbon-centered radicals(탄소부위-라디칼)	연쇄반응을 통해 수많은 라디칼 및 ROS를 생성하여 염기 및 나선을 모두 공격하여 mutagenicity와 clastogenicity 유발
③ Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체)	연쇄반응을 통해 수많은 라디칼 및 ROS를 생성하여 염기 및 나선을 모두 공격하여 mutagenicity와 clastogenicity 유발

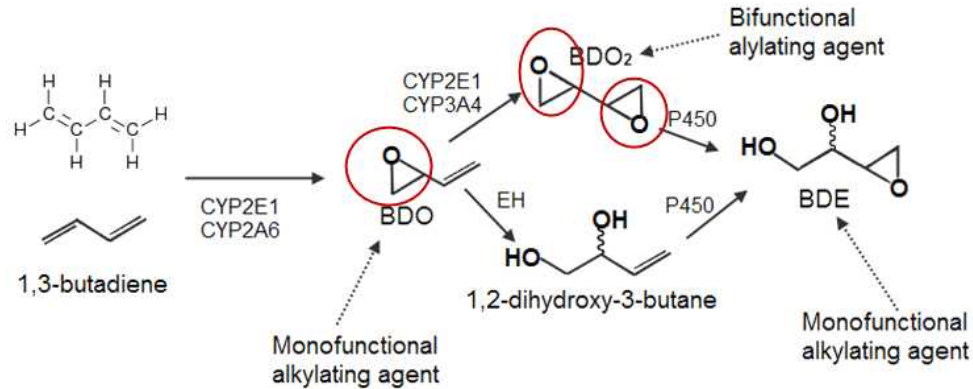
- Electrophilic metabolites(친전자성대사체)의 mutagenicity와 clastogenicity를 유발하는 기전
- 2개의 활성기를 가진 Electrophilic metabolites(친전자성대사체)가 염기 및 염색체 수준의 DNA 손상 유발의 mutagenicity와 clastogenicity 유도하는 기전의 예시(de Abreu 등, 2002)



<그림> 복수작용기성 알킬화-유도물질의 다양한 DNA 손상(de Abreu 등, 2002)

- de Abreu, Fabiane C., Patrícia A. de L. Ferraz, Marília O. F. Goulart., Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties, J. Braz. Chem. Soc., 2002, 13(1):19–35.

- Cytochrome P450에 의한 1개의 활성기와 2개의 활성기를 생성하는 1,3-butadiene은 mutagenicity와 clastogenicity 모두를 유도하는 물질이지만 이와 같이 2개의 활성기를 가지는 small molecule은 흔하지 않음 (Noll 등, 2006; Fu 등, 2012; Tsao 등, 2021)



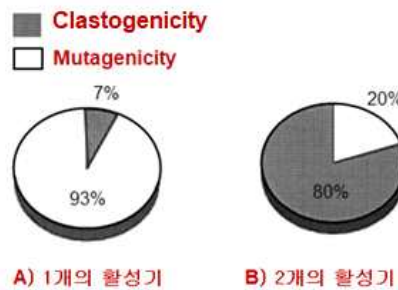
<그림> Cytochrome P450dp 의해 1개 활성기 생성 후 2개 활성기를 생성하는 1,3-butadiene

<참고문헌>

- Noll, David M., Tracey McGregor Mason, and Paul S. Miller, Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA, Chem Rev., 2006, 106:277-301.
- Fu, D., Calvo, J. & Samson, L. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nat Rev Cancer 12, 104-120 (2012).
- Tsao N, Schärer OD, Mosammaparast N. The complexity and regulation of repair of alkylation damage to nucleic acids. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2021 Apr;56(2):125-136.

5) 결론

- 아래의 <그림>은 1개 및 2개의 활성기를 가진 친전자성대사체에 의한 mutagenicity 및 clastogenicity를 유발하는 비율을 나타낸 것임(Wijen, 2001). 복귀돌연변이를 유발하는 small molecule은 mutagenicity를 93% 유발하지만 clastogenicity 유발은 자연발생적인 수준의 7%에 불과함. 반면에 2개의 활성기를 가진 친전자성대사체는 80%는 clastogenicity를 유발하면 동시에 20% mutagenicity를 반드시 유발함. 따라서 in vitro 염색체이상시험에서 양성인 small molecule은 반드시 복귀돌연변이시험에서 양성을 유발하여야 함. 이를 바탕으로 복귀돌연변이시험에서 양성이 없이 in vitro 염색체이상시험에서 양성은 가양성임. 반면에 복귀돌연변이시험에서 양성은 in vitro 염색체이상시험 결과에서 음성이 나타날 수 있음.



<그림> 활성기 차이에 따른 mutagenicity 및 clastogenicity의 발생비율 (Wijen, 2001)

<참고문헌>

- Wijen, John P.H., Madeleine J.M. Nivard, Ekkehart W. Vogel, Genetic damage by bifunctional agents in repair-active pre-meiotic stages of Drosophila males, Mutation Research, 2001, 478:107-117.

6) 규제기관의 재고

- ICH 등 모든 독성시험 가이드라인은 독성학 기전을 기반으로 만들어 지고 있습니다. 우리가 글로벌 스탠다드에 따라가고 심지어 글로벌 스탠다드를 넘는 독성시험 가이드라인을 만들 수 있습니다. 이를 이해한다면 과도하게 개발자에게 스트레스를 주지 않고 안전성이 더 높은 임상시험을 기대할 수 있는 IND 심사를 수행할 수 있습니다. 이는 자연스럽게 글로벌 신약회사는 한국의 비임상시험을 높게 평가하고 GLP 시장뿐만 아니라 임상시험의 시장규모도 커지게 됩니다.
- 저는 때로 조심스럽게 느낍니다. 수의대 약대 그리고 의대에서 개설되어 있는 독성학 프로그램의 내용에 대한 근본적인 재고가 필요하고 이러한 재고를 바탕으로 규제기관에서 비임상에 대한 새로운 인식의 변화를 조심스럽게 소원해 봅니다. 특히 IND 심사와 관련된 약대 교수님들에게 머리숙여 소원을 전해봅니다. 약대 교수님들의 생각이 우리나라 비임상의 질적 수준을 결정하시기 때문입니다.

33. 규제기관의 Exosome 신약에 대한 독성시험 가이드라인에 대한 고찰

1) 독성시험 가이드라인 제작에 있어서 혼란성

- 모든 독성시험의 가이드라인은 small molecule의 독성기전을 바탕으로 제작되었지만 1990년대 후반부터 biologics(바이오의약품) 신약이 개발되면서 아래와 <표 4-3>과 같이 저분자 합성의약품의 small molecule과 biologics의 large, macro 그리고 mega molecule과 분리되어 독성시험 가이드라인이 제작됨(Shen 등, 2019).
- 오늘날 국내 규제기관의 독성시험 가이드라인 제작에 있어서 문제점이 있다면 OECD test guidelines(TG) for testing of chemicals에 대한 집착에 기인함. 말 그대로 OECD TG는 small molecule 특히 산업 및 환경에서 이용되는 비의도적 노출에 대한 독성시험 가이드라인임. 즉, 의도적 노출의 약물에 대한 가이드라인과는 다소 문제가 있음. 이와 같이 비의도적 노출의 small molecule, 그리고 약물과 같이 의도적 노출의 small molecule에 대한 독성시험 가이드라인에 **비구분적 접근**이 신약 인허가를 담당하는 규제 기관에서 새로운 약물 모달리티 출현에 대한 가이드라인 제작에 혼란스러움이 다소 있을 것으로 추정됨

<표 4-3> 약물 모달리티별 첫 임상투여를 위한 ICH의 비임상 독성시험

Study type	Small molecules	Large molecules ^a	GLP compliance Requirement
Pharmacodynamics			No
<i>In vitro</i> (MOA)	X	X	
<i>In vivo</i> (MOA and therapeutic effect)	X	X	
Safety pharmacology (ICH S7A ⁶² and S7B ⁶³)			Yes
<i>In vitro</i> (concentration-effect relationship)	X	X	
<i>In vivo</i> (dose-response for CNS, CV, respiratory effects)	X	X	
Pharmacokinetics (ICH M3(R2) ⁶)			
<i>In vitro</i> metabolism (across species microsomal metabolism)	X	NA	No
<i>In vitro</i> plasma protein binding	X	NA	No
Toxicokinetics from repeat dose GLP toxicity studies (ICH S3A ⁶⁴)	X	X	Yes
Genotoxicity battery (ICH S2(R1) ⁷)			Yes
<i>In vitro</i> Ames test	X	* ^b	
<i>In vitro</i> and/or <i>in vivo</i> mammalian cell chromosomal damage evaluation	X	* ^b	
Single-dose / dose range finding			No and Yes ^c
Rodent single-dose (could be MTD study)	X	NA	
Nonrodent single-dose (could be MTD study)	X ^e	X ^f	
Repeat dose toxicity ^d (ICH M3(R2) ⁶)			Yes
Rodent multidose	X	Optional ^g	
Nonrodent multidose	X ^e	X ^f	
Other studies			No
Immunotoxicity (ICH S8 ⁶⁵)	X	X	
Photosafety (ICH S10 ¹⁰)	X	X	
Abuse liability ^h	X	X	

CNS, central nervous system; CV, cardiovascular; FIH, first-in-human; GLP, good laboratory practice; ICH, International Conference on Harmonization; MOA, mechanism of action; MTD, maximum tolerated dose; NA, not applicable.
^aRefer to ICH S6 (R1).
^bNot typically required.
^cIf single-dose study is pivotal (i.e., used to support a single-dose FIH trial), it should be GLP compliant, which is more typical for large molecules.
^dDuration and dosing route dependent on clinical trial design (Table 1 in ref. 6).
^eSpecies selection dependent on similarity in metabolism to humans.
^fOften nonhuman primate or minipig; dependent on presence of target and relative potency of the drug

candidate against the target.

^aTissue cross-reactivity dictates which species should be studied. If the biologic is cross-reactive in both rodents/nonrodents, then both species should be studied. If the biologic is cross-reactive in only one species (most often nonhuman primate), then only that species is studied. If the biologic is not cross-reactive to any species, then consider a transgenic or surrogate biologic.

^bFor drugs with abuse potential based on MOA/similarity to known drugs of abuse.

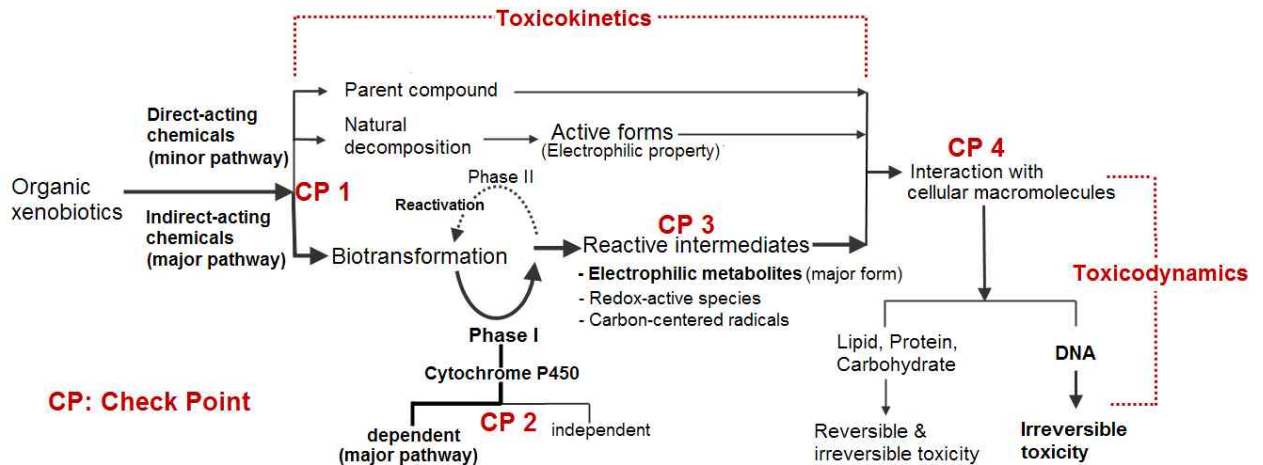
(Shen 등, 2019)

<참고문헌>

- Shen J, Swift B, Mamelok R, Pine S, Sinclair J, Attar M. Design and Conduct Considerations for First-in-Human Trials. Clin Transl Sci. 2019;12(1):6-19.

2) 독성시험 가이드라인 제작에 있어서 혼란성 예시 - Exosome(세포외소포)

- Small molecule의 독성은 ① 원물질의 과잉약리작용 ② 원물질의 reactive intermediates(아래 그림에서 CP 3) 생성 등 2가지 요인에 기인함. 이와 같은 기전을 바탕으로 모든 독성시험 가이드라인 제작에 응용됨



<그림-1> 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma

- 이와 같은 독성기전으로 2023년 12. 21에 발간된 세포외소포(exosome) 치료제 품질, 비임상 및 임상평가 가이드라인 [민원인 안내서]에서 Page 15의 독성에 관한 자료를 고찰할 때 다음과 같은 문제점이 있음

① 단회/반복투여 독성시험

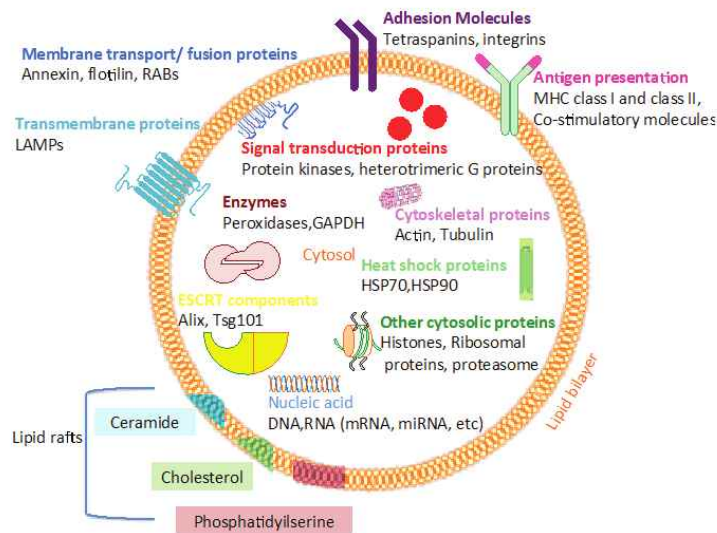
- 단회투여독성시험은 가장 오래된 독성시험 항목으로 small molecule의 독성 강도 및

small molecule 간 독성 강도의 비교를 나타내는 시험. 독성학적 자료는 개략치사량 (approximate lethal dose)와 LD₅₀(lethal dose of 50%) 등으로 나타냄.

- Exosome은 small molecule이 아니며 일종의 biologics임. 따라서 독성 강도의 비교 필요성이 없으며 생산하는 개발자마다 차이가 있어 활용성 정보를 제공하지 못함. 특히 반복투여독성시험의 DRF(dose-range finding, 용량결정시험)을 통해 단회투여독성시험의 역할을 가능함.
- 따라서 실험동물윤리 측면인 3R을 고려할 때 Exosome에 대한 단회투여독성시험의 불필요성으로 판단됨. 실제로 <표 4-3>에서도 biologics에 대한 단회투여독성시험이 불필요함.

② 유전독성시험

- 유전독성시험은 small molecule이 cytochrome P450에 의한 대사과정에서 발생하는 친전자성인 reactive intermediates(활성중간대사체)가 DNA 염기의 친핵성에 결합하여 발생하는 유전자 수준의 mutagenicity 및 염색체 수준의 염색체 이상인 clastogenicity을 확인함.
- In vitro 시험에서는 cytochrome P450에 의한 대사를 위해 상업적 상품인 S9 fraction (랫드의 간분획)의 존재 유무에 구별하여 시험이 수행됨. 아래의 <그림-2>에서처럼 S9 fraction에 의해 대사될 내용물을 exosome 내에는 없음(Garcia-Contreras 등, 2017).
- 특히 복귀돌연변이 시험은 histidine-영양 요구 미생물을 이용하여 시험이 이루어짐. Exosome 단백질 및 아미노산이 포함되어 있어 가양성의 mutagenicity를 유발할 수 있음.
- 따라서 유전독성시험의 목적과 절차에 대한 과정 측면에서 exosome을 유전독성시험은 논리적으로 맞지 않음. 대신에 거대분자와 유전정보가 있으므로 항원성과 더불어 종양원성시험이 수행되어야 함.



<그림-2> Schematic image of the molecular composition of an exosome.

<참고문헌>

- Garcia-Contreras M, Brooks RW, Boccuzzi L, Robbins PD, Ricordi C. Exosomes as biomarkers and therapeutic tools for type 1 diabetes mellitus. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017 Jun;21(12):2940-2956.
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

3) 결 론

- 만약 미국이나 유럽에서 exosome-기반 신약을 우리나라 규제기관에 인허가 신청을 했을 때 이에 대한 유전독성시험을 요구하면 그들의 반응은 무엇일까?
- 현대화법으로 동물실험을 억제하는 정책을 펴는 US FDA에 우리나라 가이드라인으로 맞춰 exosome-기반 신약에 대한 IND를 위해 제출했을 때 그들의 반응은 무엇일까?
- 오늘날 비임상 독성시험은 불필요한 독성시험을 포함한다고 좋은 것이 아니며 글로벌 스탠다드도 그렇게 요구하고 있음.
- 무엇보다도 중요한 것은 비의도적 노출의 산업물질에 초점을 두어 제작되고 있는 OECD 독성시험가이드라인에 벗어나 의도적 노출의 신약이라는 점을 차별적으로 접근의 필요성이 있음. 특히 OECD test guideline에서 다루지 않는 biologics를 고려하면 더욱 ICH이나 미국 등의 독성시험 가이드라인을 추구할 필요성이 있음.
- 모든 독성시험의 가이드라인은 독성학을 기본으로 제작됨으로 <그림-1> 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma와 같은 독성기전에 대한 이해와 이를 바탕으로 small molecule 및 biologics에 대한 신약에 대한 독성시험 가이드라인을 제작의 필요성
- 이제 이러한 비임상 연구에서 발생하는 모든 불일치를 수정하고 글로벌 스탠다드에 접근하기 위한 대책 마련은 GLP-전문가 및 비임상 전문가의 손을 떠났다는 것이 지난 20년간 경험을 통한 인식임. 따라서 IND에 관여하시는 약대 교수님들만이 비임상의 문제점을 개선할 수 있다고 사료되며 적극적인 관심이 필요합니다.

34. 임상시험에서 약물 대사체 분석 원리에 대한 이해

1. Phase I & II reaction의 기초

- Small molecule을 이용한 신약 개발에 있어서 NDA(new drug application, 신약허가신청)를 위해 반드시 대사체에 대한 분석이 이루어져야 할 뿐만 아니라 active component가 무엇인지에도 잘 설명하여야 함.
- 대사체 분석 및 생성 원리는 생화학적 전환(biotransformation)의 2 과정인 cytochrome P450에 의한 Phase I reaction(제1상반응)과 Phase II reaction(제2상반응)에 대한 이해가 필요함.
- 아래의 <Figure 1>은 간 및 소장에서 cytochrome P450 효소의 용량적 분포를 나타낸 것으로 CYP3A4 및 CYP3A5가 가장 많고 CYP2C9/2C19이 다음으로 많은 효소임 (Gundert-Remy 등, 2014). 이들 cytochrome P450에 의해 **R-H가 R-OH(hydroxylation, 수산화)로 전환되는 일산화**가 이루어짐.

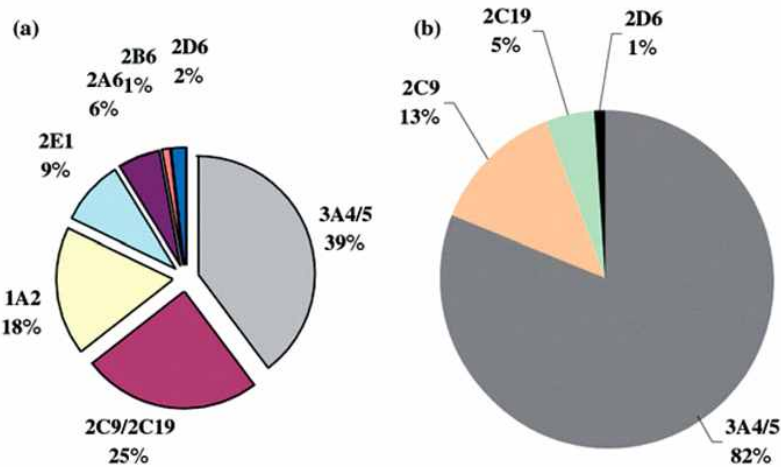


Figure 1. Distribution of the major cytochromes P450 (CYPs) (a) in the human liver and (b) in the small intestine.

<참고문헌>

- Gundert-Remy U, Bernauer U, Blömeke B, Döring B, Fabian E, Goebel C, Hessel S, Jäckh C, Lampen A, Oesch F, Petzinger E, Völkel W, Roos PH. Extrahepatic metabolism at the body's internal-external interfaces. Drug Metab Rev. 2014 Aug;46(3):291-324
- <표-1>은 제1상반응의 포합반응(conjugation reaction) 종류를 나타낸 것임. Cytochrome P450에 의해 형성된 R-OH인 무독성대사체의 극성 부위에 당, 황산기, Acetyl-CoA, 메틸기, 아미노산 등을 결합시켜 친수성으로 배출됨. 그러나 제2상반응에서 극성대사체에 당이 결합하는 **글루쿠론산포합반응(Glucuronidation)**이 가장 많이 이루어짐. 반면에 제1상반응의 cytochrome P450에 의해 형성된 독성대사체의 친전자성 부위에 glutathione(GSH)에 결합하여 친수성으로 배출됨(박영철, 2010).

<표-1> 포합반응 종류와 반응에 관여하는 요소

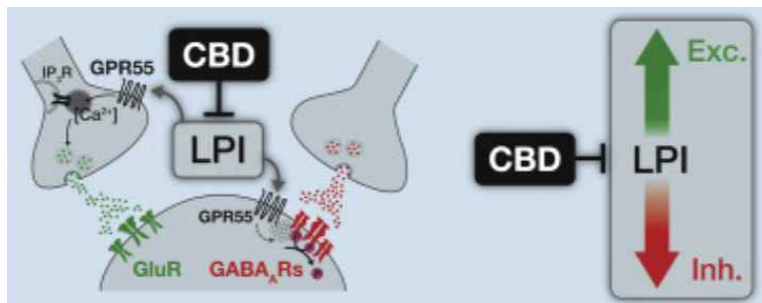
포합반응의 종류		포합물질 또는 내인성반응물질	포합물질의 전이효소(효소위치)	대사체의 반응부위	기질의 분류	기질의 예
극성 대사체 (무독성대사체)	글루쿠론산포합 (Glucuronidation)	UDP-glucuronic acid	UDP-glucuronosyl transferase (microsome)	-OH -COOH -NH ₂ -NH -SH -CH	phenols alcohols carboxylic acids hydroxylamines sulfonamides	morphine acetaminophen diazepam digitoxin digoxin meprobamate
	황산포합 (sulfate conjugation)	Phosphoadenosyl phosphosulfate	Sulfotransferase (cytosol)	aromatic-OH aromatic-NH ₂ alcohols	phenols alcohols aromatic amines	estrone 3-hydroxy coumarin acetaminophen methyldopa
	아세틸화 (acetylation)	Acetyl-CoA	N-Acetyl transferase (cytosol)	aromatic-NH ₂ aliphatic-NH ₂ hydrazine -SO ₂ NH ₂	amines	sulfonamides isoniazid clonazepam procainamide histamine
	메틸화 (methylation)	S-Adenosyl-methionine	transmethylase (cytosol)	aromatic-OH -NH ₂ -NH -SH	catecholamines phenols amines histamine	dopamine epinephrine histamine thiouracil pyridine
	아미노산포합 (amino acid conjugation)	glycine glutamine	Amino acid acyl transferase (microsome)	aromatic-NH ₂ -COOH	aromatic amine carboxylic acids	
전전자성 대사체 (독성대사체)	GSH포합 (glutathione conjugation)	Glutathione	GSH-S-transferase (cytosolic, microsome)	epoxide organic halides	epoxides, nitro groups, hydroxylamines	ethyrcinic acid bromobenzene

(박영철, 2010)

2. 대마의 성분 카나비다이올(Cannabidiol, CBD)의 Metabolite 유형

1) 카나비다이올의 뇌전증 또는 항경련 효능 기전

- 카나비다이올(cannabidiol, CBD): 대마 성분 중 도취감을 유발하지 않으면서 항경련 효과를 나타낸다고 알려진 CBD가 신경 활성화와 경련 조절 기전이 최근에 확인됨 (Rosenberg 등, 2023). 경련 유발 시 흥분성 신경활성을 증진시키는 세포막지질 성분인 lysophosphatidyl inositol(LPI)과 그 작용을 매개한다고 알려진 GPR55 수용체가 증가함. CBD는 아래의 <그림>에서처럼 경련에 의한 LPI와 GPR55의 증가를 억제하여 흥분성/억제성 재정립을 통한 경련 억제 기전으로 설명되고 있음.



A) LPI와 GPR55 증가의 CBD에 의한억제

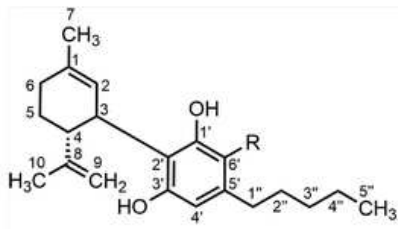
B) CBD에 의한흥분성/억제성 신경활성 재정립

(Rosenberg 등, 2023)

<참고문헌>

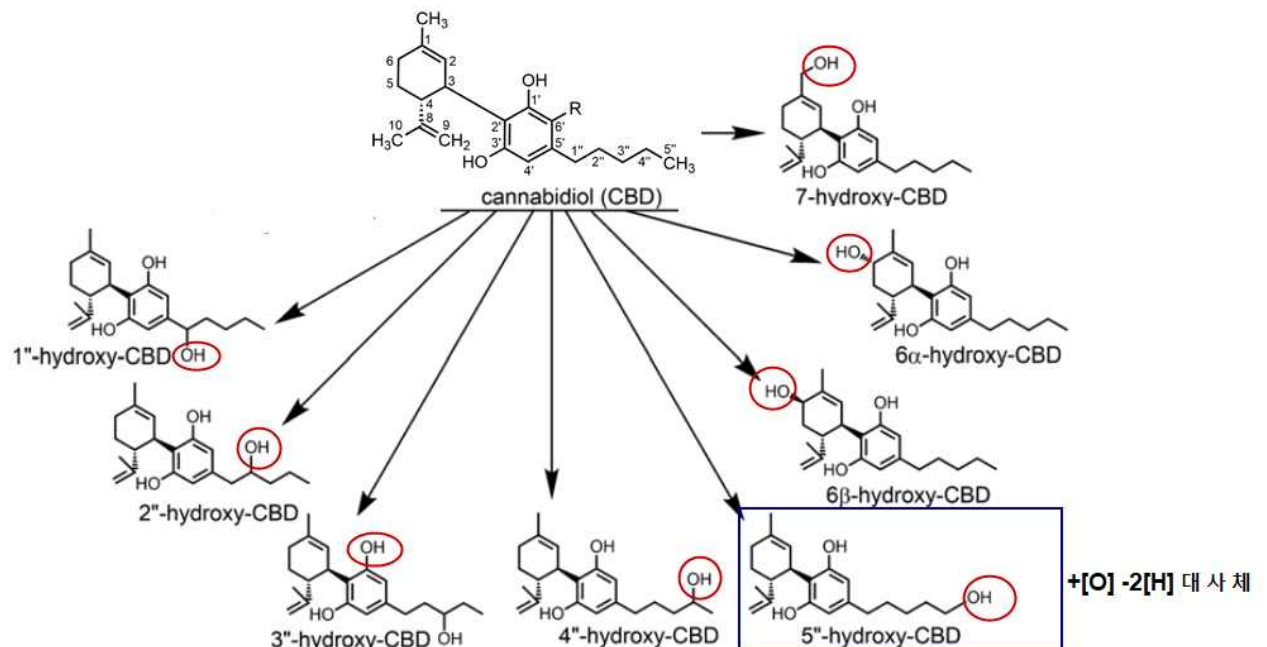
- Rosenberg EC, Chamberland S, Bazet M, Nebet ER, Wang X, McKenzie S, Jain S, Greenhill S, Wilson M, Marley N, Salah A, Bailey S, Patra PH, Rose R, Chenouard N, Sun SED, Jones D, Buzsáki G, Devinsky O, Woodhall G, Scharfman HE, Whalley BJ, Tsien RW. Cannabidiol modulates excitatory-inhibitory ratio to counter hippocampal hyperactivity. Neuron. 2023 Apr 19;111(8):1282-1300.e8.

2) Cannabidiol의 구조와 대사체 분석



① +[O] 대사체

- 아래의 <그림>에서처럼 Cytochrome P450에 의한 수산화(-OH)가 된 대사체
- CBD의 다양한 위치에서 cytochrome P450에 의해 수산화가 이루어지며 동종효소로는 CYP2C19, CYP2C9 그리고 CYP3A4에 의해 이루어지는 것으로 확인됨
- 따라서 +[O] + [H], 그러나 수산화가 되는 부위에 CBD의 5" 위치처럼 2개의 수소가 소실됨으로 CBD의 +[O] -2[H] 대사체<그림에서 네모>가 됨.



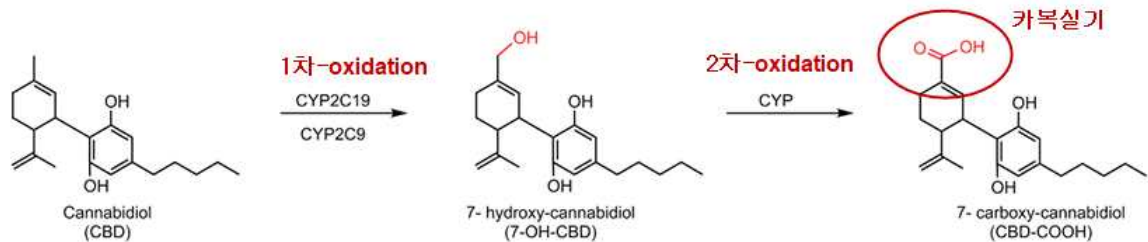
<그림> Cytochrome P450에 의한 다양한 수산화 대사체 형태 (Beers 등, 2021)

<참고문헌>

Beers JL, Fu D, Jackson KD. Cytochrome P450-Catalyzed Metabolism of Cannabidiol to the Active Metabolite 7-Hydroxy-Cannabidiol. Drug Metab Dispos. 2021 Oct;49(10):882-891

② [COOH] 대사체

- Cytochrome P450의 대사에 의한 [COOH] 대사체는 대부분의 경우에 연속적으로 2번에 걸쳐 수산화이 이루어지는 경우에 발생함
- 아래의 <그림>은 CBD가 1차적으로 CYP2C19 또는 CYP2C9에 의해 -OH가 붙은 후 2차적으로 한번 더 +[O] 일산화 후 COOH가 생성되는 과정을 나타낸 것으로 최종적으로 **CBD의 +2[O] 대사체**가 됨(Bardhi 등, 2022)



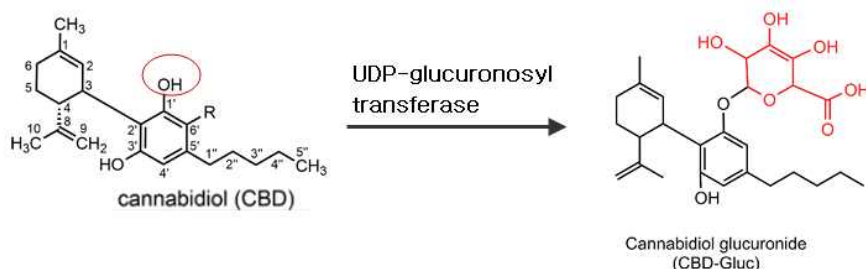
<그림> Cytochrome P450에 의한 2차에 걸친 촉매작용으로 카복실기 형성 과정

<참고문헌>

- Bardhi K, Coates S, Watson CJW, Lazarus P. Cannabinoids and drug metabolizing enzymes: potential for drug-drug interactions and implications for drug safety and efficacy. Expert Rev Clin Pharmacol. 2022 Dec;15(12):1443-1460.

③ Glucuronidation -[H] 대사체

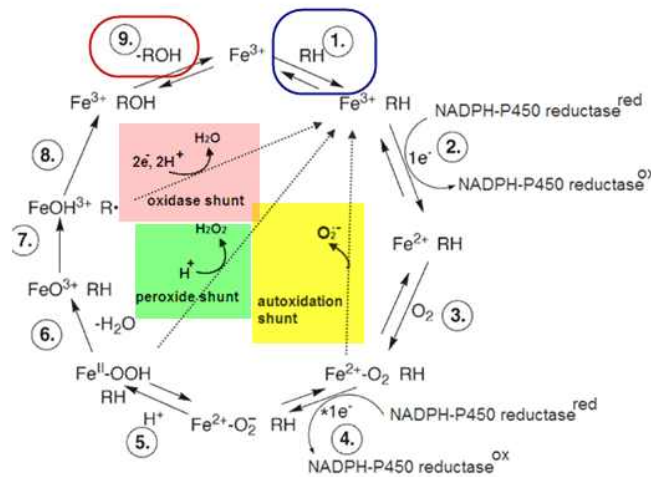
- 제2상반응인 포합반응은 생체내 흔히 존재하는 당에서 유래된 글루쿠로닉산(glucuronic acid), 황산이온(SO₃⁻), 아세틸기(CH₃COO⁻), 메틸기(CH₃), 아미노산(glycine, serine, glutamine의 NH₂) 등이 cytochrome P450에 의해 형성된 -OH 기에 결합하는 반응으로 친수성대사체가 형성 및 배출되는 대사체
- 일반적으로 포합반응은 cytochrome P450 후 -OH 기에서 발생하지만 약물 자체에 -OH가 있다면 cytochrome P450에 의한 촉매반응이 없이도 발생함.
- <그림>은 CBD의 1" 위치에서 cytochrome P450 촉매반응이 없이 글루쿠로닉산(glucuronic acid)이 결합하여 수소가 하나가 소실된 **CBD의 Glucuronidation -[H] 대사체**를 나타낸 것임(Bardhi 등, 2022)



<그림> Cytochrome P450 촉매반응이 없이 기존 -OH 부위에 Glucuronidation

④ 불안전성 및 확인 불가능한 대사체

- Cytochrome P450의 촉매과정인 1단계 RH부터 마지막 9단계 ROH 단계 사이 2-8단계는 대단히 불안한 복합체. 이러한 과정에서 사각형 칼러 내의 “shunt pathway”가 발생하면서 이의 결과로 [H] & [O] 등의 라디칼 형태 ROS 생성에 의해 RH 및 ROH 이외의 비정상적 대사체 생성 또는 확인 불가능 대사체 생성

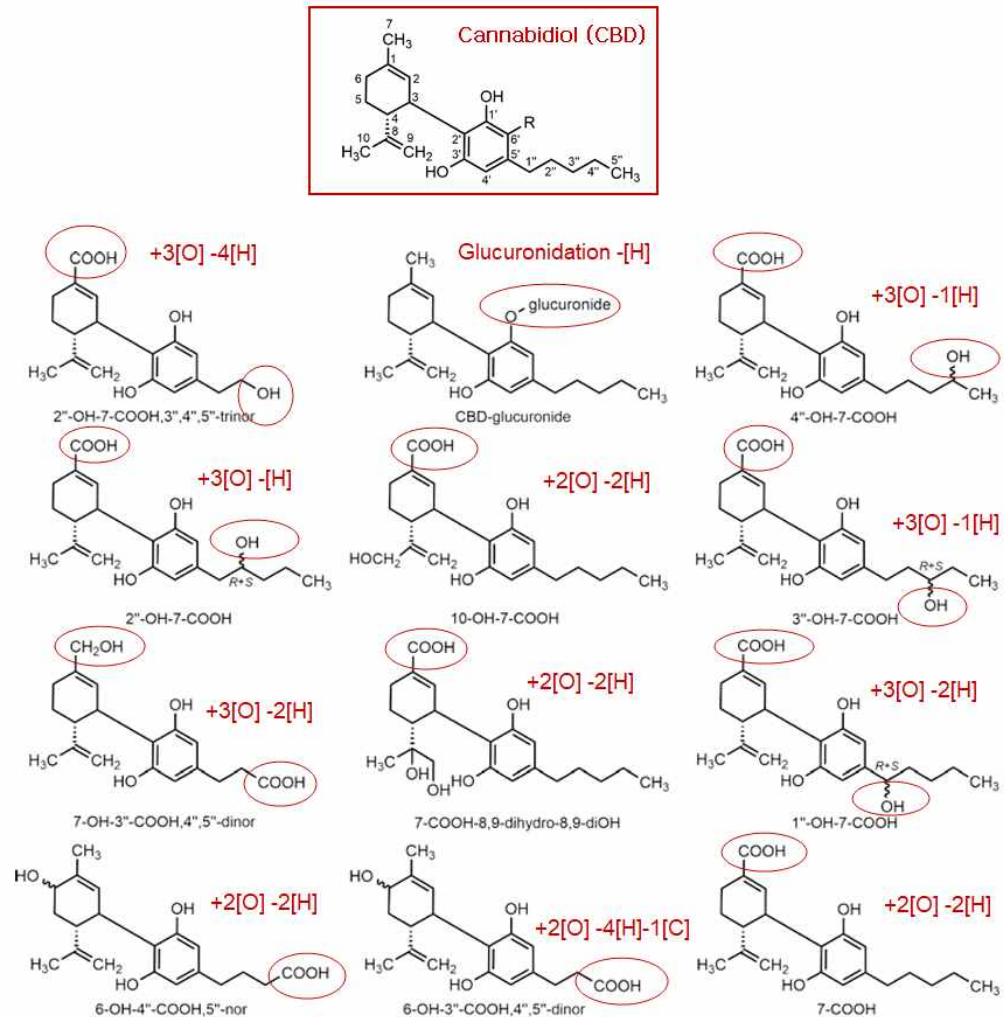


<그림> Cytochrome P450의 촉매과정 중 발생하는 shunt pathway로 확인 불가능 대사체 생성

- ⑤ GSH 포함 대사체: Cannabidiol은 cytochrome P450에 의해 친전자성대사체로 전환이 되지 않기 때문에 glutathione에 의한 대사체는 없음

⑥ 소변에서 Cannabidiol의 다양한 대사체 분석

- 아래 <그림>은 장기간 CBD를 투여한 근긴장이상 환자(dystonic patient) 5명의 소변에서 확인된 대사체임(Ujváry 등, 2016). 대부분 7-COOH-CBD와 더불어 기타 다른 side chain에 산소화가 이루어진 대사체이며 일부 대사체에서 Phase II의 glucuronidation이 확인됨.



<그림> 소변에서 확인된 CBD 대사체

<참고문헌>

- Ujváry I, Hanuš L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. Cannabis Cannabinoid Res. 2016 Mar 1;1(1):90-101.

3. 결론

- 카나비다이올(Cannabidiol, CBD)는 2번 이상의 cytochrome P450에 의해 촉매작용 후

배출되는 특성이 확인됨. 특히 일부 대사체에서 Glucuronidation의 제2상반응이 확인되었지만 주로 제1상반응 후 체외로 배출되는 특성을 확인할 수 있음.

35. 약물 대사체 분석에 있어서 기본 원리의 적용 예시

1. Naringin과 더불어 활성대사체(active metabolite)인 Naringenin의 탁월한 효능

- 자몽 오렌지, 만다린 그리고 포도를 비롯하여 버가못(bergamots), 토마토 등에 존재하며 특히 다소 씹살한 맛을 나는 원인은 나린진(naringin)에 기인함
- 특히 Naringin과 더불어 활성대사체(active metabolite)인 Naringenin도 Table 1에서처럼 다양한 암에 강력한 항암효능이 있는 것으로 확인되어 오늘날 다양한 암종에 항암보조제로 추천되고 있음(Memariani 등, 2022).

Table 1. The main anticancer effects of naringin and naringenin.

Flavanones	Pathway	Main Effect	References
<i>Breast Cancer</i>			
Naringenin	ERK	Inhibition of tumor growth	[38]
Naringin	ERK	Inhibition of cell proliferation and promotion of cell apoptosis	[39]
Naringenin	ROS	Inducement of apoptosis	[30]
<i>Lung Cancer</i>			
Naringenin	AKT/MMP	Inhibition of tumor growth and metastasis	[40]
Naringin	ROS	Inducement of apoptosis	[17,41]
<i>Gastric Cancer</i>			
Naringenin	MMP	Inhibition of chemical-induced cell invasion and metastasis	[42,43]
	ROS	Inhibition of all proliferation and inducement of apoptosis	[42]
Naringin	PI3K/AKT	Blocking of the PI3K/AKT pathway and activation of pro-death autophagy	[44,45]
<i>Colorectal Cancer</i>			
Naringenin	NF-kB/p65	Inducement of apoptosis and cell cycle arrest	[46]
Naringin	PI3K/AKT/mTOR	Inhibition of cell proliferation and promotion of cell apoptosis	[47]
<i>Prostate Cancer</i>			
Naringenin	ERK	Invasion and migration	[48]
Naringin	(PI3K)/AKT	Inducement of apoptosis and cell cycle arrest in G1 phase	[49]

<참고문헌>

- Memariani Z, Abbas SQ, UI Hassan SS, Ahmadi A, Chabra A. Naringin and naringenin as anticancer agents and adjuvants in cancer combination therapy: Efficacy and molecular mechanisms of action, a comprehensive narrative review. Pharmacol Res. 2021 Sep;171:105264.

2, 최근 제시된 naringin와 naringenin의 대사 경로

- Bai 등(2020)에 의하면 이들 naringin와 naringenin 등의 물질이 다음과 같이 cytochrome P450에 의해 대사되는 것으로 제시되었음

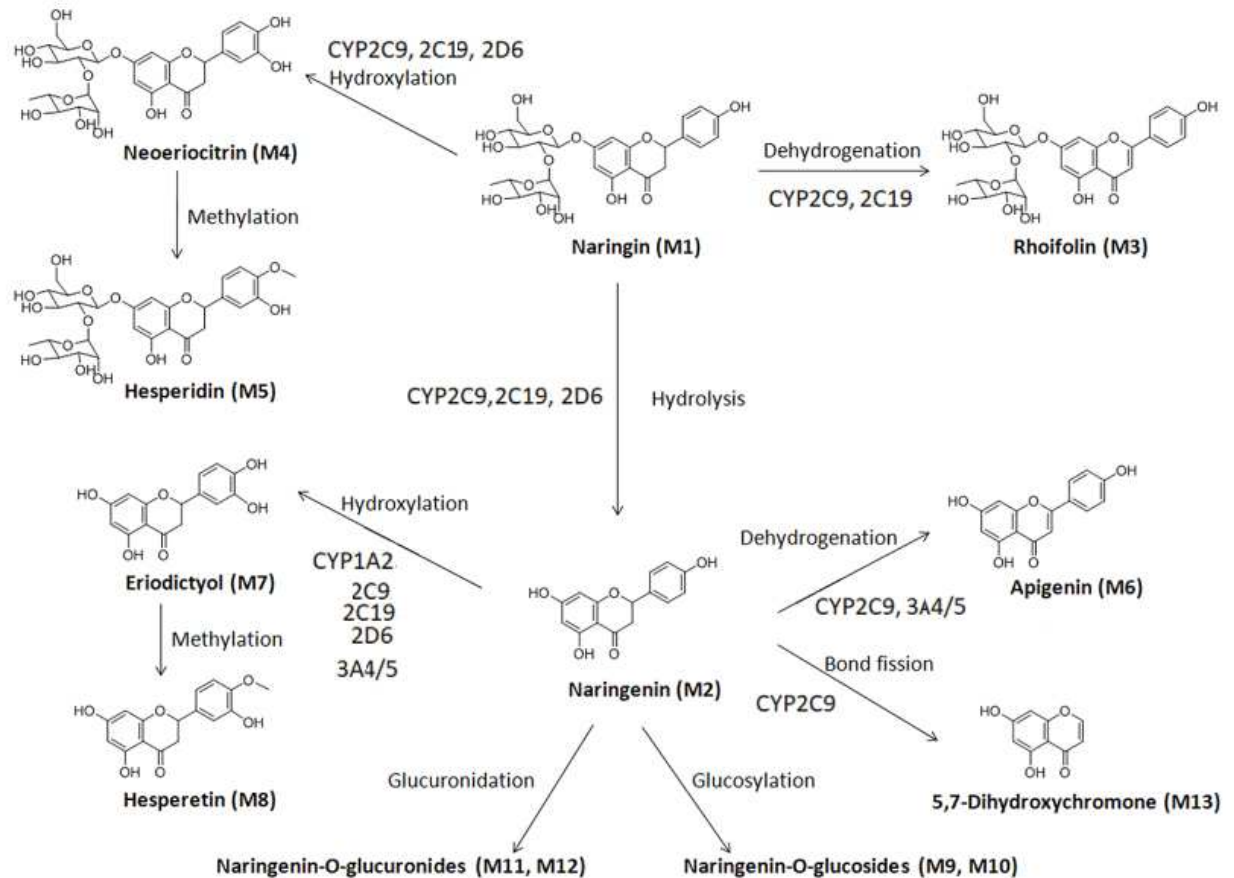


FIGURE 2 | Proposed metabolic pathway of naringin in liver and kidney microsomes of rats and humans.

TABLE 7 | Metabolites of naringin (G) and naringenin (S) in liver and kidney microsomes of rats and humans.

No.	Metabolism	Name	Retention time (min)	[M-H] ⁻ (Error, ppm)	Main fragment ions (<i>m/z</i>)	Identified by standard	Rat micro- somes		Human liver microsomes	
							Liver	Kidney	G	S
M1	[M ₁]	Naringin	19.19	579.1699 (-2.6)	459, 271, 151	√	+	+	+	
M2	[M ₂]	Naringenin	24.52	271.0581 (-9.2)	177, 151, 119	√	+	+	+	+
M3	[M ₁ -2H]	Rhoifolin	21.15	577.1561 (0.7)	475, 273, 167	√	+		+	
M4	[M ₁ +O]	Neohespericitrin	16.62	595.1653 (-1.7)	459, 287, 151	√	+		+	
M5	[M ₁ +O+CH ₃]	Hesperidin	20.50	609.1791 (-4.6)	459, 271, 151	√	+			
M6	[M ₂ -2H]	Apigenin	28.16	269.0468 (6.7)	225, 151, 117	√		+		+
M7	[M ₂ +O]	Eriodictyol	20.87	287.0561 (1.4)	151, 135, 107	√		+		+
M8	[M ₂ +O+CH ₃]	Hesperetin	25.09	301.0736 (8.0)	271, 177, 151, 119	√		+		
M9	[M ₂ +Glc]	Naringenin-O-glucoside	16.72	433.1175 (9.2)	271, 165, 151			+		
M10	[M ₂ +Glc]	Naringenin-O-glucoside	17.67	433.1157 (5.1)	271, 165, 151			+		+
M11	[M ₂ +GlcuA]	Naringenin-O-glucuronide	13.54	447.0897 (-6.7)	271, 151,			+		+
M12	[M ₂ +GlcuA]	Naringenin-O-glucuronide	14.05	447.0891 (-5.8)	271, 151				+	
M13	Bond fission of M ₂	5,7-Dihydroxychromone	12.60	177.0168 (-5.6)	133, 109	√		+		+

<참고문헌>

- Bai Y, Peng W, Yang C, Zou W, Liu M, Wu H, Fan L, Li P, Zeng X, Su W. Pharmacokinetics and Metabolism of Naringin and Active Metabolite Naringenin in Rats, Dogs, Humans, and the Differences Between Species. Front Pharmacol. 2020 Mar 27;11:364.

3. 제시된 naringin와 naringenin의 대사 경로에 대한 분석

1) 대사체 분석에 대한 일반적 원리

- 다음과 같은 대사체 분석의 기본원리를 통해 Bai 등(2020) 등이 제시한 대사 경로를 검토하였음

① 일반적으로 cytochrome P450에 의한 촉매반응식은 다음과 같음

① $\text{NAD(P)H} + \text{O}_2 + \text{R} \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{RO} + \text{H}_2\text{O}$

① 촉매반응은 C-H와 C=C 부위에서 발생하며 결과는 R-OH(hydroxylation), epoxidation (친전자성대사체, R-C-O-C-R), 그리고 ketonization(RCOR) 등의 구조로 나타남

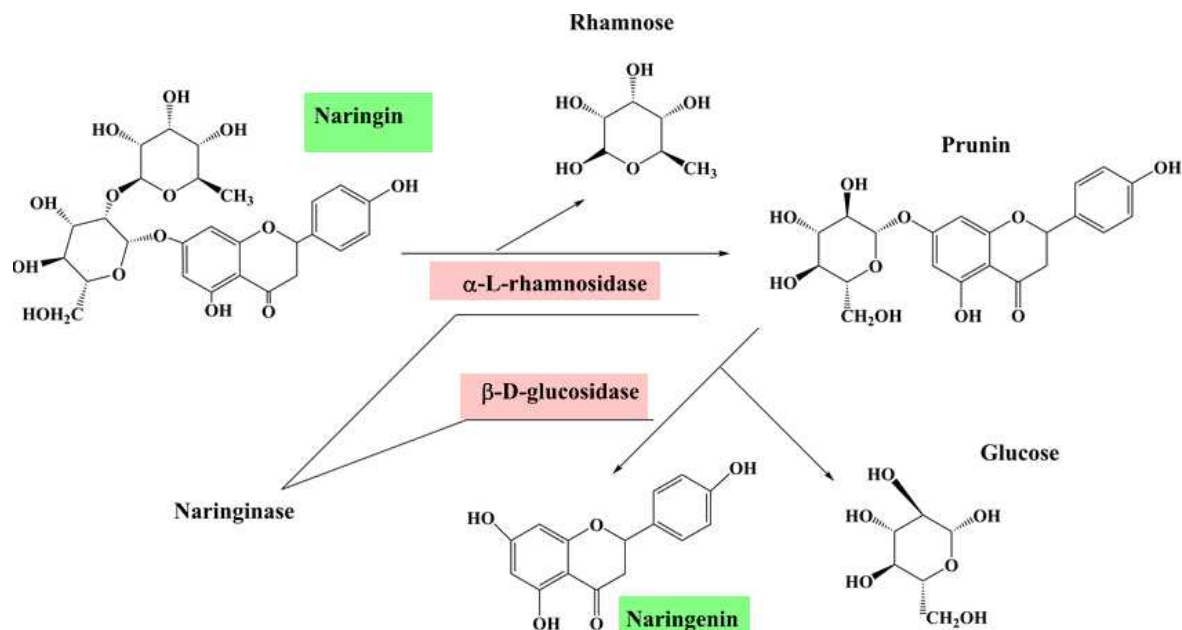
① 제2상반응인 포합반응은 생체내 흔히 존재하는 당에서 유래된 글루쿠로닉산(glucuronic acid), 황산이온(SO_3^-), 아세틸기(CH_3COO^-), 메틸기(CH_3), 아미노산(glycine, serine, glutamine의 NH_2) 등이 cytochrome P450에 의해 형성된 -OH 기에 결합하는 반응으로 친수성대사체가 형성 및 배출을 유도하는 반응

2) Bai 등(2020) 등이 제시한 대사 경로를 검토

1) M1에서 M2로의 전환

- 이와 같은 기본적인 기전을 통해 M1에서 M2의 전환이 가수분해에 의한 전환은 다소 의문스러움

- Naringin에서 Naringenin로의 전환에 대한 자료를 검색한 결과, 인체에서는 α -rhamnosidase와 β -glucosidase에 의해 전환되는 것으로 확인되었음(Muñoz 등, 2022). 이와 같은 오류는 여러 가지 cytochrome P450에 대한 저해제를 투여 후 대조군과의 전환체 차이로 확인하는데서의 오류에 기인함.



Scheme 1. Hydrolysis of naringin into prunin, rhamnose, naringenin, and glucose by sequential reaction of α -rhamnosidase and β -glucosidase

<참고문헌>

- Muñoz M, Holtheuer J, Wilson L, Urrutia P. Grapefruit Debittering by Simultaneous Naringin Hydrolysis and Limonin Adsorption Using Naringinase Immobilized in Agarose Supports. *Molecules*. 2022 Apr 30;27(9):2867.

2) M1에서 M3로의 전환

- Naringin(M1)의 직접적으로 Rhoifolin(M3)의 전환은 CYP2C9과 2C19에 의한 탈수소화(dehydrogenation)에 의한 것으로 추정하였음. Cytochrome P450에 의한 hydroxylation, epoxidation, 그리고 ketonization이 이루어지는 것을 설명하였음. Cytochrome P450에 의한 dehydrogenation에 대한 조사결과 아래와 같이 hydroxylation과 더불어 종종 발생하는 것으로 확인됨(Wong 등, 2017). 그러나 M3 대사체에서 일산화소가 발생하지 않았으며, 따라서 아래의 Figure 2에서처럼 소장에서 미생물에 의해 Naringin(M1)이 Rhoifolin(M3)로 흡수된 것으로 추정됨(Zeng 등, 2022)

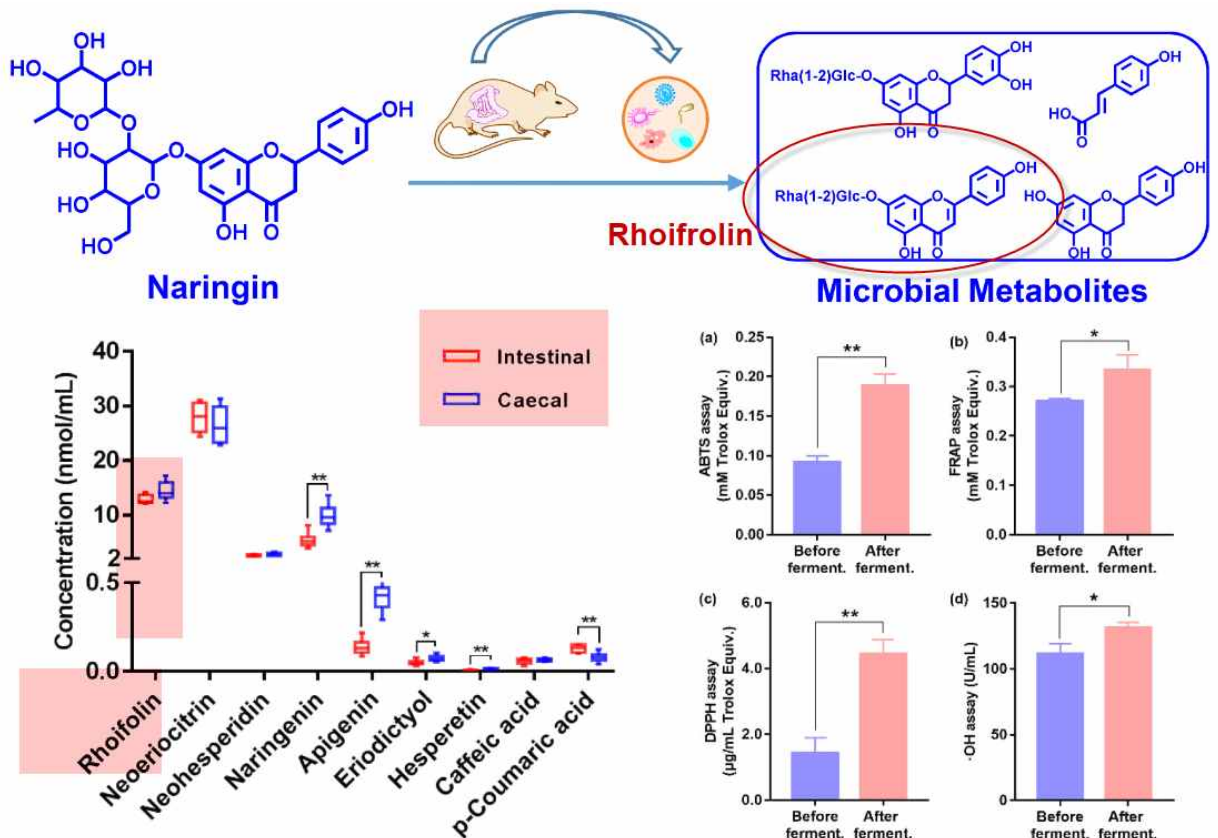


Figure 2. Measured concentrations of target analytes in rat fecal fermentation samples (compared with intestinal contents group)

<참고문헌>

- Siew Hoon Wong, Stephen G. Bell and James J. De Voss. P450 catalysed dehydrogenation. Pure Appl. Chem. 2017; 89(6): 841-852(원문: Hydroxylation is one the most thoroughly investigated of all identified P450-catalysed reactions whilst dehydrogenation has been relatively much less explored to date. P450-catalysed dehydrogenation is often found to occur with hydroxylation and thus, it was initially suspected to be a stepwise process consisting of

hydroxylation and subsequent dehydration to yield the final olefin product)

- Zeng X, Zheng Y, He Y, Zhang J, Peng W, Su W. Microbial Metabolism of Naringin and the Impact on Antioxidant Capacity. Nutrients. 2022 Sep 13;14(18):3765.

3) M1에서 M4→M5로의 전환 및 M2에서 M7→M8

- Naringin(M1) → Neohesperidin(M4) → Hesperidin(M5)의 전환은 Phase 1 reaction의 Cytochrome P450에 의한 R-OH, 그리고 아래의 <표-1>에서처럼 Phase II reaction에 의한 methylation의 전형적인 biotransformation 예시임. 이와 같은 기전은 M2에서 M7 → M8의 전환과정인 Naringenin(M2) → Eriodictyol(M7) → Hesperetin(M8)와 동일함

4) M2에서 M9, M10 M11 및 M12

- Naringenin에 의한 -OH에 당 결합은 <표-1>에서처럼 전형적인 Phase II reaction의 일종임

<표-1> 포합반응 종류와 반응에 관여하는 요소

포합반응의 종류		포합물질 또는 내인성반응물질	포합물질의 전이효소(효소위 치)	대사체의 반응부위	기질의 분류	기질의 예
극성 대사체 (무독성대 사체)	글루쿠론산포합 (Glucuronidati on)	UDP-glucuroni c acid	UDP-glucuronos yl transferase (microsome)	-OH -COOH -NH ₂ -NH -SH -CH	phenols alcohols carboxylic acids hydroxylamines sulfonamides	morphine acetaminophen diazepam digitoxin digoxin meprobamate
	황산포합 (s u l f a t e conjugation)	Phosphoadeno syl phosphosulfate	Sulfotransferase (cytosol)	aromatic-OH aromatic-NH ₂ alcohols	phenols alcohols aromatic amines	estrone 3-hydroxy coumarin acetaminophen methyldopa
	아세틸화 (acetylation)	Acetyl-CoA	N-Acetyl transferase (cytosol)	aromatic-NH ₂ aliphatic-NH ₂ hydrazine -SO ₂ NH ₂	amines	sulfonamides isoniazid clonazepam procainamide histamine
	메틸화 (methylation)	S-Adenosyl-m ethionine	transmethylase (cytosol)	aromatic-OH -NH ₂ -NH -SH	catecholamines phenols amines histamine	dopamine epinephrine histamine thiouracil pyridine
	아미노산포합 (amino acid conjugation)	glycine glutamine	Amino acid acyl transferase (microsome)	aromatic-NH ₂ -COOH	aromatic amine carboxylic acids	
전전자성 대사체 (독성대사 체)	GSH포합 (glutathione conjugation)	Glutathione	GSH-S-transfera se (cytosolic, microsome)	epoxide organic halides	epoxides, nitro groups, hydroxylamines	ethyrcinic acid bromobenzene

(박영철, 2010)

4. 결론

- Naringin와 naringenin이 cytochrome P450 효소에 대한 저해제(inhiitor) 역할은 하지만 cytochrome P450의 기질이라는 논문은 그 어디에서도 찾지 못하였음.
- 이와 같은 검토를 바탕으로 다음의 <참고>에서처럼 논문을 재검토한 결과, 사람 및 랫드의 cytochrome P450이 포함된 mcirosome에 아래와 같이 다양한 CYP 효소의 저해제를 넣어 대조군과 비교하여 기질 및 대사체의 용량 변화에 대한 유의성으로 대사 경로를 밝혔음. 5종류의 저해제를 포함한 in vitro 시험에서 제대로 대사체를 확인될까 하는 생각이 듦. 결과적으로 각각의 경로에서 중복된 cytochrome P450이 많고 기질 특이성 부족으로 잘못된 시험한 결과임

<참고>

- Cytochrome P450 저해제와 기질 및 대사체 측정방법: Five single inhibitor working solutions were separately added. Their concentrations were as follows: a-naphthoflavone (0.04 mM) for CYP 1A2, sulfaphenazole (0.8 mM) for CYP 2C9,(+/-)-N-3-benzylinirvanol (0.8 mM) for CYP 2C19, quinidine (0.08 mM)for CYP 2D6, and ketoconazole (0.04 mM) for CYP 3A4/5. All protein concentrations were 0.15 mg ml⁻¹ in the incubation system, except 0.3 mg ml⁻¹ for the sulfaphenazole working solution.

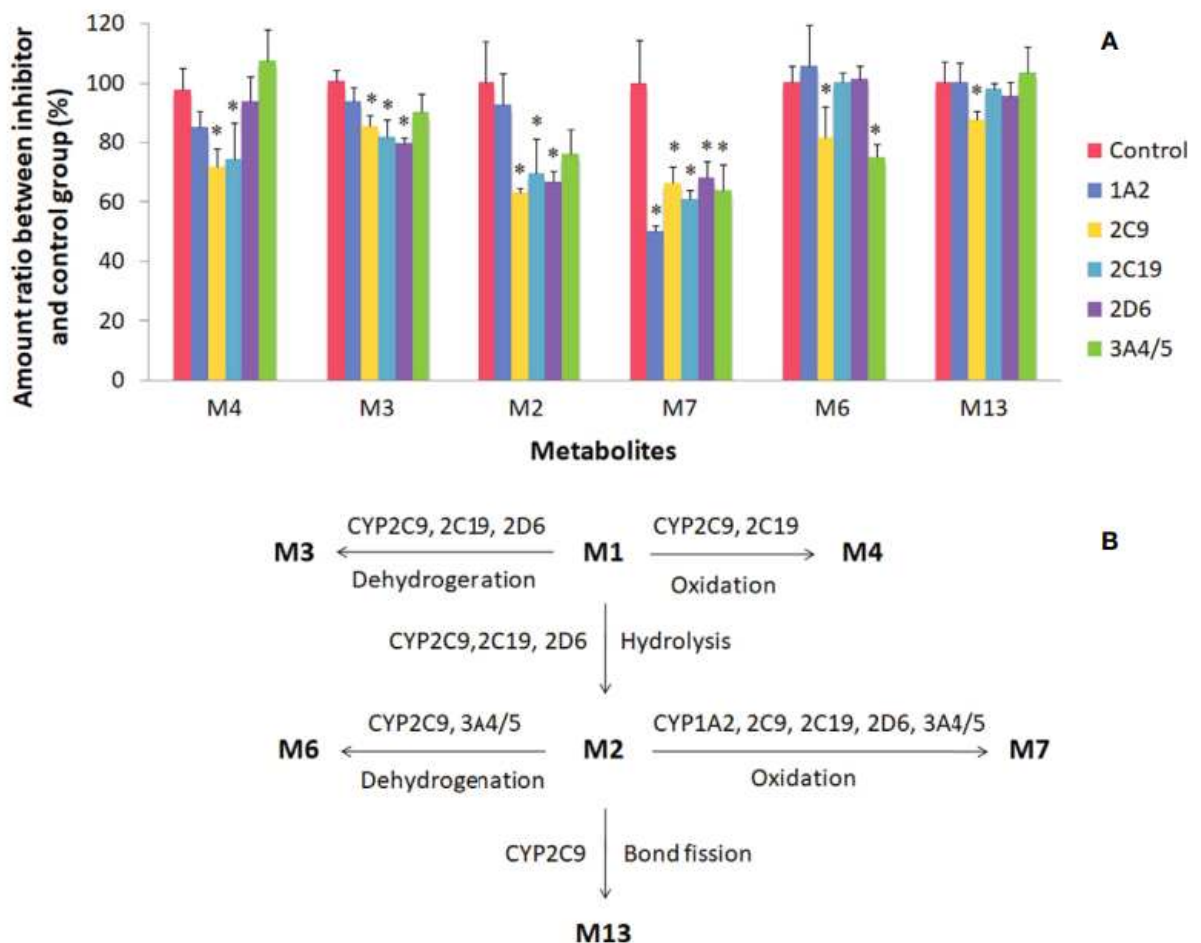


FIGURE 3 | Metabolism of naringin and naringenin in human liver microsomes (incubation system III-human). There were six metabolites on the abscissa, including neoeriocitrin (M4), rhoifolin (M3), naringenin (M2), eriodictyol (M7), apigenin (M6), and 5, 7-dihydroxychromone (M13). For plot (A), the control and inhibitor groups were presented as follows: blank solution, control; a-naphthoflavone groups, 1A2; sulfaphenazole, 2C9; benzylnirvanol, 2C19; quinidine, 2D6; ketoconazole, 3A4/5. *Compared to the control group, the acceptable level of significance was established at $P < 0.05$. For plot (B), CYP enzyme pathways of naringin and naringenin were proposed in human liver microsomes

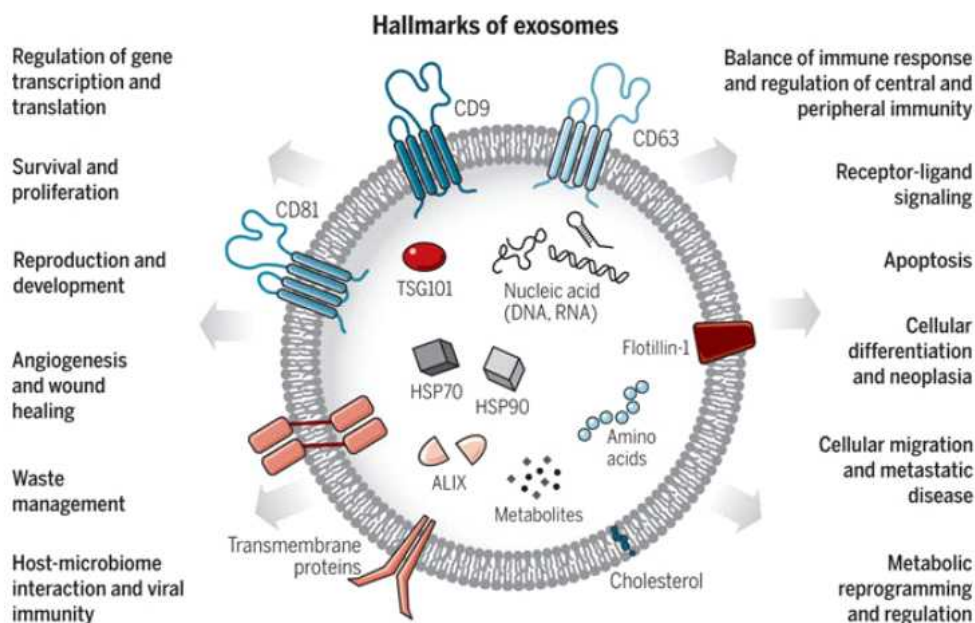
<참고문헌>

- Bai Y, Peng W, Yang C, Zou W, Liu M, Wu H, Fan L, Li P, Zeng X, Su W. Pharmacokinetics and Metabolism of Naringin and Active Metabolite Naringenin in Rats, Dogs, Humans, and the Differences Between Species. *Front Pharmacol*. 2020 Mar 27;11:364.

36. 알코올성 치매에 있어서 exosome의 영향에 대한 고찰

1. Exosome의 역할

- 다양한 생리적 기능(pleiotropic functions): <그림-1>에서처럼 세포가 분비하는 지름 50~200나노미터 크기의 물질로 혈액, 소변, 침, 모유, 뇌척수액 등에 있음. 그리고 단백질, 지방, 리보핵산(RNA) 등 특정 세포의 정보를 다른 세포에 전달하는 역할뿐만 아니라 진단 지표로도 응용됨(Zhang 등, 2020; Kalluri 등, 2020).
- 특히 BBB(brain-blood-barrier)와 상호작용 또는 통과가 이루어진다는 것은 향후 중추신경계와 관련하여 신약 개발에 큰 도움이 될 것을 사료됨(Osaid 등, 2023).



<그림-1> Exosomes: A cell-to-cell transit system in the human body with pleiotropic functions. Exosomes are extracellular vesicles generated by all cells and they carry nucleic acids, proteins, lipids, and metabolites. They are mediators of near and long-distance intercellular communication in health and disease and affect various aspects of cell biology

<참고문헌>

- Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. Int J Nanomedicine. 2020 Sep 22;15:6917–6934.
- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977.
- Osaid Z, Haider M, Hamoudi R, Harati R. Exosomes Interactions with the Blood-Brain Barrier: Implications for Cerebral Disorders and Therapeutics. Int J Mol Sci. 2023 Oct 26;24(21):15635.

2. 인체 혈장에서의 Exosome과 cytochrome P450 확인

- Fig 2는 건강한 2 사람의 혈장에서부터 분리된 엑소좀으로부터 exosomal CYP mRNA 및 protein을 확인할 결과임. 혈장 엑소좀으로부터 CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4 등의 mRNA 및 단백질이 확인되었음(Kumar 등, 2017)
- 특히 Fig 2에서는 확인이 어렵지만 논문에서는 CYP2E1 mRNA가 다른 CYP보다 500 배 이상 농도가 높다는 것이 확인됨(the relative level of CYP2E1 mRNA was >500-fold higher than the other CYPs).

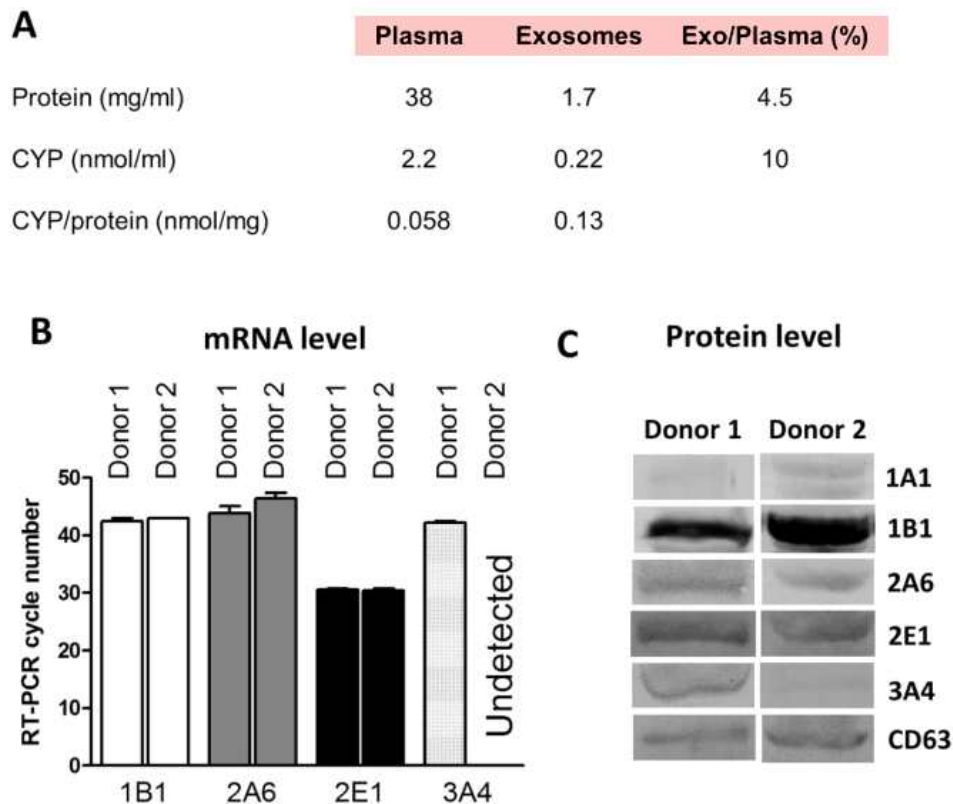


Fig. 2. Analysis of CYP enzymes using absolute spectra, Q-RTPCR, and Western blotting. Absolute spectra was obtained between 350 and 700 nm and absorbance at 417 nm (low spin CYP heme peak) was used to determine the concentration of CYP. The CYP (in nmol/ml) and protein (mg/ml) quantifications presented are representative of at least three different determinations. Q-RTPCR was performed to determine the relative mRNA level of CYP enzymes from two donors. The relative cycle numbers (mean $\pm$ SEM) is presented from three independent determinations. Western blot of CYP enzymes from two donors are presented.

<참고문헌>

- Kumar S, Sinha N, Gerth KA, Rahman MA, Yallapu MM, Midde NM. Specific packaging and circulation of cytochromes P450, especially 2E1 isozyme, in human plasma exosomes and their implications in cellular communications. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Sep 23;491(3):675-680.

3. 에탄올의 대사 경로와 대사체

- 에탄올 대사는 <Figure 6.52>에서처럼 일반적으로 alcohol dehydrogenase(ADH)에 의하여 acetaldehyde 그리고 최종적으로 aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 acetyl CoA로 대사됨. ADH의 활성은 NAD 조효소의 부족 그리고 NADH의 증가를 유도. 이에 대한 조효소의 불균형은 을 초래하며 <그림-1>에서처럼 **CYP2E1** 활성 증가로 산화-환원의 균형 조정(Wikipedia, 2024; Hotcore, 2024).
- 이에 따라서 음주량의 증가는 ADH에 의한 에탄올 대사보다도 CYP2E1에 의한 대사가 증가됨(Kong 등, 2024). Ethanol은 CYP2E1의 inducer이면서 substrate임. 이에 CYP2E1은 알코올 대사를 통해 독성물질인 aldehyde 증가를 유도함

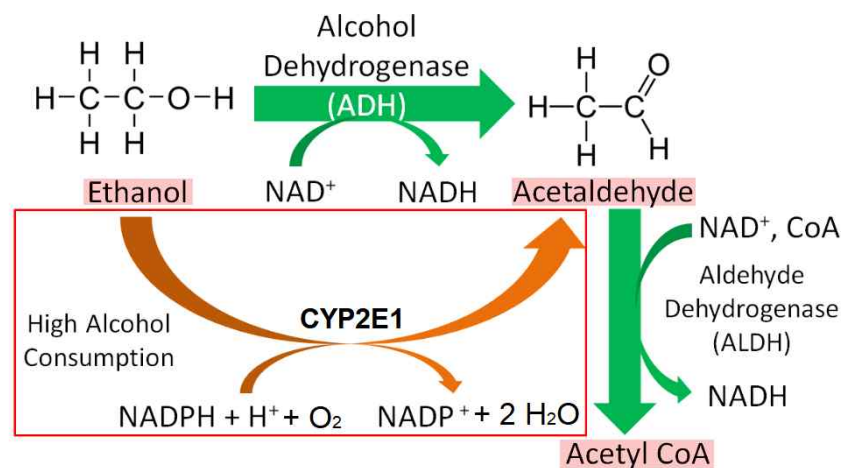
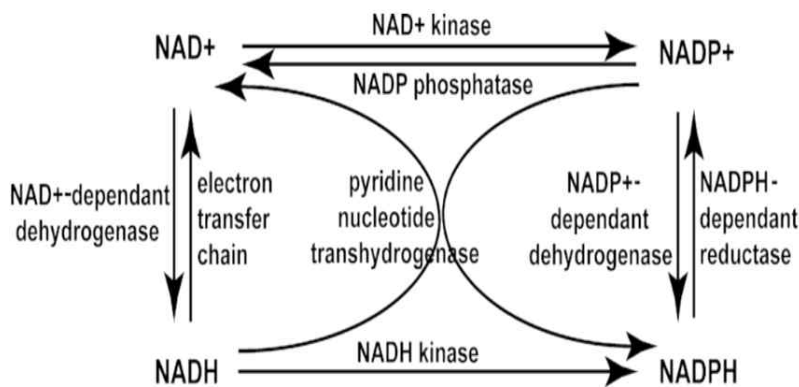


Figure 6.52 Ethanol Metabolism



<그림-1> NADH와 NADPH의 호환성

<참고문헌>

- Wikipedia(2024)<https://en.wikipedia.org/wiki/Acetaldehyde#/media/File:Acetaldehyde-2D-flat.svg>
- Hotcore, 2024, <https://hotcore.info/act/kareff-072024p.html>
- Kong EQZ, Subramanian V, Lubau NSA. Uncovering the impact of alcohol on internal organs and reproductive health: Exploring TLR4/NF-κB and CYP2E1/ROS/Nrf2 pathways. Animal Model Exp Med. 2024 Jun 9.

4. CYP2E1 함유-exosome에 의한 독성 증가

- Figure 5는 알코올을 먹인 마우스의 혈장에서 CD63 발현을 통해 exosome의 존재와 이에 cytochrome P450 발현이 확인됨.
- Figure 5의 a)에서 exosome의 cytochrome P450 발현이 증가됨. b)에서처럼 U1 cells에 알코올 및 cytochrome P450을 함유한 exosome을 투여한 결과, 독성 강도가 유의하게 증가된 것이 확인됨(Rahman 등, 2019)

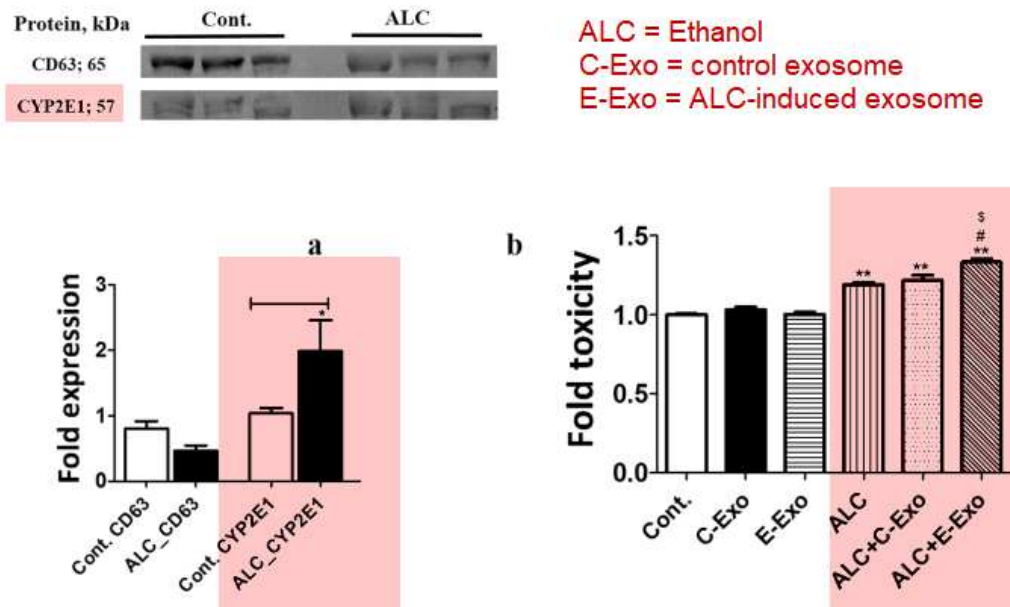


Figure 5. Effect of alcohol on murine plasma exosomal CYP2E1. (a) Expression of CYP2E1 in plasma exosomes in binge-drinking mice. (b) Effect of exosomes derived from ALC fed mice on ALC-induced toxicity in U1 cells after 4 days. One-way ANOVA was used to measure statistical significance. *Represents significance compared to control and control-exosomes (C-Exo), # represents significance compared to ALC induced exosomes (E-Exo), represents significance relative to ALC and ALC+C-Exo. Full-length blots/gels are presented in Supplementary Fig. 1

<참고문헌>

- Rahman, M.A., Kodidela, S., Sinha, N. et al. Plasma exosomes exacerbate alcohol- and acetaminophen-induced toxicity via CYP2E1 pathway. Sci Rep 9, 6571 (2019).

5. 뇌의 CYP2E1 함유량

- 뇌의 cytochrome P450 함유량은 간의 0.5-2%에 불과하며 특히 CYP2E1은 CYP 중에서 10% 정도의 비율로 존재한다는 것을 고려할 때 뇌에는 거의 미량이 존재할 것으로 추정됨(Kuban 등, 2020; Total CYP protein content in the brain is significantly lower compared to the liver and is estimated to be 0.5%-2% of hepatic CYP content (Kuban 등, 2020))
- 이러한 측면을 고려할 뇌에 존재하는 CYP2E1의 역할에 기인하여 알코올에 의한 뇌신경 손상은 다소 부족하다고 사료됨.

<참고문헌>

Kuban, W., & Daniel, W. A. (2020). Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metabolism Reviews*, 53(1), 1-29.

6. 결론 - 1

- 우리나라 치매 환자 중 약 10%가 알콜성 치매(서울아산병원 질환백과, 2024)
- 알코올성 신경질환으로 독성대사체인 acetaldehyde와 CYP2E에 의한 reactive oxygen species의 생성에 기인한 것으로 확인됨(Brocardo 등, 2011)

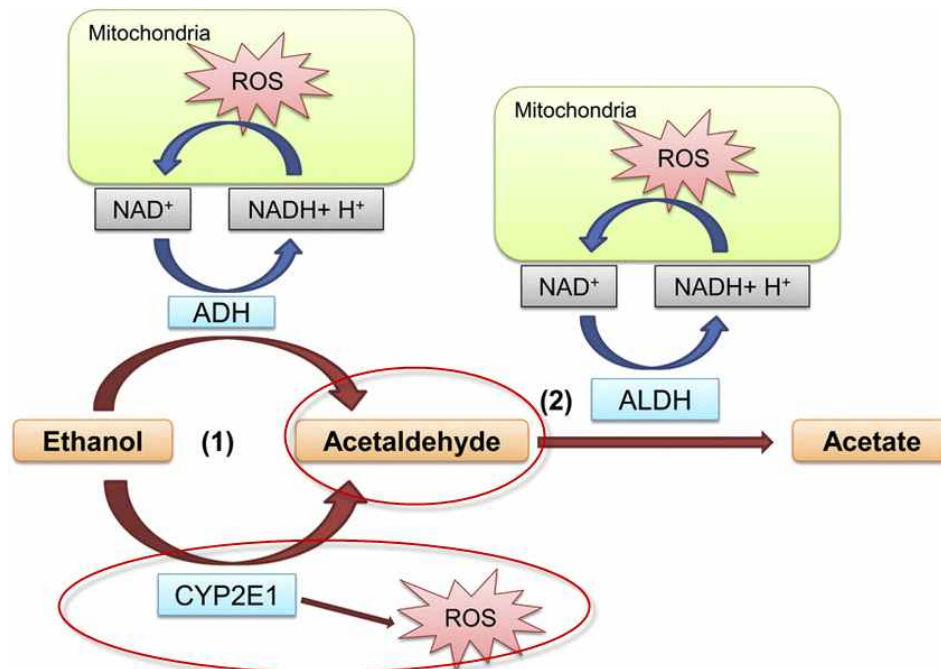


Fig. 1 - How does ethanol cause oxidative stress? Ethanol is metabolized in two steps. (1) First, ethanol is converted into acetaldehyde by the enzymes alcohol dehydrogenase (ADH), cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and, to a much lesser extent, catalase (not shown). (2) Acetaldehyde is then further oxidized to acetate by

the enzyme acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). ADH-mediated ethanol metabolism results in the generation of reducing equivalents in the form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and acetaldehyde, whereas ethanol oxidation by CYP2E1 leads to the production of acetaldehyde, ut also to the generation of reactive oxygen species (ROS). NADH is reoxidized to NAD⁺ in the mitochondria, which may further increase the generation of ROS.

<참고문헌>

- Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Christie BR. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. Brain Res Rev. 2011 Jun 24;67(1-2):209-25.

7. 결론 -2

- 간에서 분비된 혈장 Exosome의 cytochrome P450 함유와 이동이 확인되었음. 뇌에서 CYP2E1이 거의 소량으로 존재하여 알코올 대사가 부족하지만 다음과 같이 CYP2E1의 혈장 exosome이 BBB와 상호작용을 통해 CYP2E1 mRNA 및 효소의 이동으로 뇌에서의 알코올 대사 촉진, 결과적으로 알코올 치매와 같은 뇌신경 손상의 원인으로 추정됨. 특히 혈장 exosome에는 CYP2E1 mRNA가 다른 CYP보다 500 배 이상 농도가 높다는 것은 이러한 추정에 근거가 됨.
- Figure 1은 Cytochrome P450 효소 및 mRNA를 함유한 Exosome(녹색화살표)이 간 및 기타 기관에서 분비되어 혈액을 통해 BBB를 지나 뇌까지 전달되는 기전을 설명한 것임 (Gerth 등, 2019)
- 인체에서 약물대사와 관련된 cytochrome P450 16종 동종효소는 기관 및 조직마다 다름. 화학물질 및 약물의 Cytochrome P450에 의해 발생하는 친전자성대사체 발생은 반감기가 micro ~nano second이기 때문에 발생하는 장소가 곧 약물의 표적기관(target organ toxicity)이 됨.
- 이와 같은 점을 고려할 때 Cytochrome P450의 exosome에 의한 뇌로의 이동은 약물 및 술을 포함한 화학물질에 의한 독성이 뇌질환을 어떻게 유발하는가에 대한 기전을 새롭게 재정립할 필요성이 제시하는 것임.

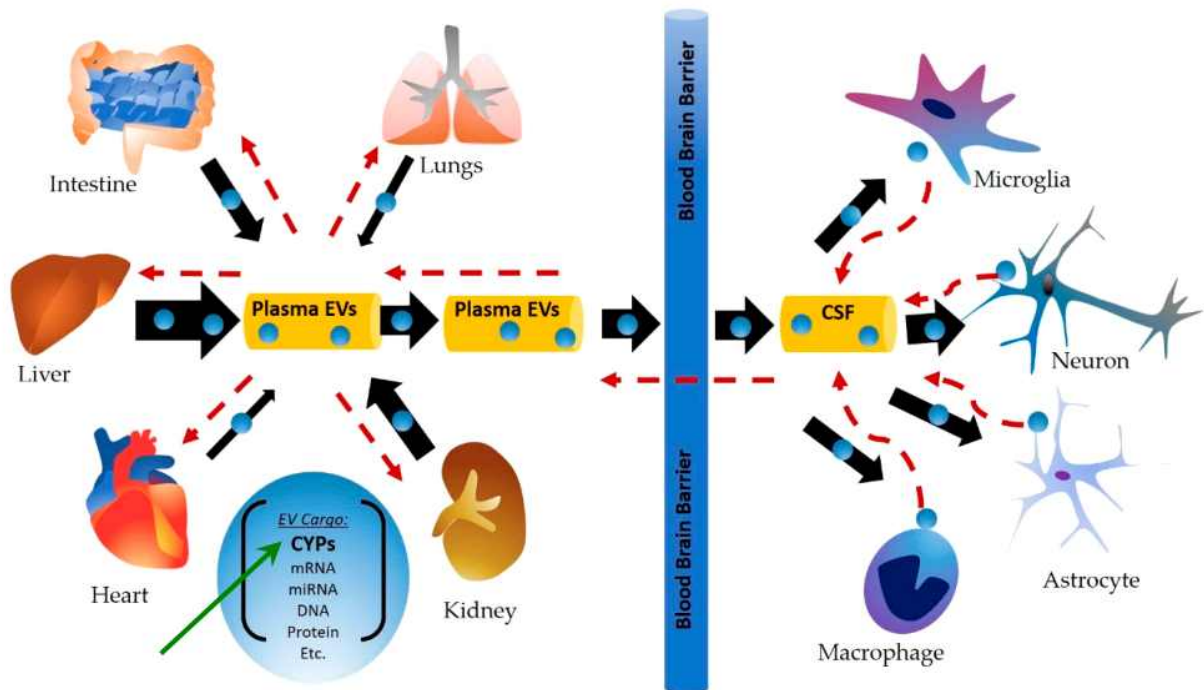


Figure 1. Cytochrome P450 (CYP)-containing plasma extracellular vesicles (EVs)/exosomes are secreted from the liver and other peripheral organs, circulate via plasma, and are delivered to distant sites (e.g., brain cells), where they may aid in extrahepatic drug metabolism, detoxification, and may also influence toxicity at these sites. Similarly, secretion of EVs from extrahepatic cells, including brain cells are also likely to contain CYPs in addition to other biomolecules, which would also be circulated via plasma and delivered to other distant cells.

<참고문헌>

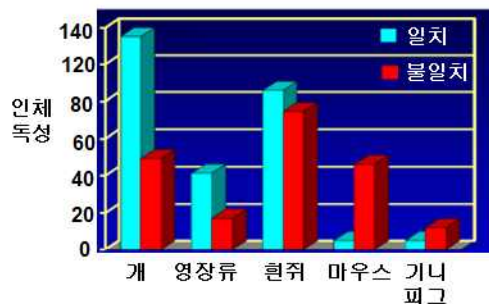
- Gerth K, Kodidela S, Mahon M, Haque S, Verma N, Kumar S. Circulating Extracellular Vesicles Containing Xenobiotic Metabolizing CYP Enzymes and Their Potential Roles in Extrahepatic Cells Via Cell-Cell Interactions. Int J Mol Sci. 2019 Dec 7;20(24):6178.

37. 독성의 종간 차이 및 독성시험 분석을 통한 동물을 이용한 독성시험의 방향성

- 비임상시험(유효성 및 독성)의 목적은 임상시험에서 약물에 의한 변화의 예측(prediction)임. 다음과 같은 사례를 통해 개략적 비임상 독성시험의 임상시험 예측률을 확인할 수 있음.
- 약물의 모달리티는 크게 small molecule과 biologics이며 2 모달리티의 구분 기준은 cytochrome P450의 기질 유무임. 이를 바탕으로 독성의 종간 차이(interspecies differences in toxicity)에 대한 분석은 향후 신약 개발을 위한 비임상연구의 방향성을 확인이 가능할 수 있음.

1) Small molecule의 동물종과 인체 수준에서의 독성 일치율

- 독성의 일치율:** <그림 10-13>은 small molecule 114종의 후보약물을 임상시험에서 투여되어 나타난 인체 독성 221가지를 비임상 독성시험에서 5가지 동물종인 개, 영장류, 흰쥐, 마우스, 기니피그 등에서 나타난 독성 일치율 및 불일치율을 나타낸 것임(Olson 등, 2000).
- 비설치류인 개 및 원숭이 일치율이 평균 63%이며 설치류의 경우에 랫드 53% 일치율을 제외하고 마우스 및 기니피그는 10% 이하의 일치율로 확인됨.
- 인체와 동물의 독성 발현 기간에 대한 일치율은 독성시험에서 투여 기간 1개월이 94%로 가장 높았음.



<그림 10-13> 동물종에 따른 임상시험 및 독성시험의 독성 일치율(박영철, 2019)

- 동물종과 사람의 Cytochrome P450의 공유율:** <표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교를 나타낸 것임. 인체 cytochrome P450의 20 여종과 다른 동물 종과의 공유율은 비인간-영장류 27%, 랫드 14.3%, 그리고 마우스 11.8%로 확인됨 (Konstandi 등, 2014)
- 개인적으로 추정하건대, <그림 10-13>에처럼 동물-인체 독성의 일치율이 높으면 <표 3-6>에서처럼 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 공유율이 높다는 것임

<표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교

CYP family	CYP subfamily	CYP isozyme			
		Human	Monkey	Rat	Mouse
CYP1	CYP1A	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1
		CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2
	CYP1B	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1
CYP2	CYP2A	CYP2A6	CYP2A23	CYP2A1	CYP2A4
		CYP2A7	CYP2A24	CYP2A2	CYP2A5
		CYP2A13		CYP2A3	CYP2A12
	CYP2B				CYP2A22
		CYP2B6	CYP2B17	CYP2B1	CYP2B9
		CYP2B7		CYP2B2	CYP2B10
	CYP2C			CYP2B3	
		CYP2C8	CYP2C20	CYP2C6	CYP2C29
		CYP2C9	CYP2C43	CYP2C7	CYP2C37
		CYP2C18		CYP2C11	CYP2C38
		CYP2C19		CYP2C12	CYP2C39
				CYP2C13	CYP2C40
				CYP2C22	CYP2C44
				CYP2C23	CYP2C50
					CYP2C50
					CYP2C55
	CYP2D	CYP2D6	CYP2D17	CYP2D1	CYP2D9
		CYP2D7	CYP2D19	CYP2D2	CYP2D10
		CYP2D8	CYP2D29	CYP2D3	CYP2D11
			CYP2D30	CYP2D4	CYP2D12
			CYP2D42	CYP2D5	CYP2D13
				CYP2D18	CYP2D22
					CYP2D26
					CYP2D34
					CYP2D40
	CYP2E	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1
CYP3	CYP3A	CYP3A4	CYP3A8	CYP3A1	CYP3A11
		CYP3A5		CYP3A2	CYP3A13
		CYP3A7		CYP3A9	CYP3A16
		CYP3A43		CYP3A18	CYP3A25
				CYP3A62	CYP3A41
인체 CYP에 대한 일치율			4/15 = 27%	4/28 = 14.3%	4/34 = 11.8%

(Konstandi, 2014)

- 동물종과 사람과의 가장 큰 차이의 cytochrome P450: 아래의 Figure 1은 인체에서 cytochrome P450 동종효소별 분포 비율을 나타낸 것으로 CYP3A4/5와 CYP2C9/2C19이 70%를 차지하고 있음(Gundert-Remy 등, 2014). 그러나 동물의 그 어느 종에서도 이들 CYP 동종효소를 포함하고 있지 않음. 종간 독성의 차이에서 수용체 등의 몇 가지 요인이 있지만 이들의 차이가 가장 큰 요인임.

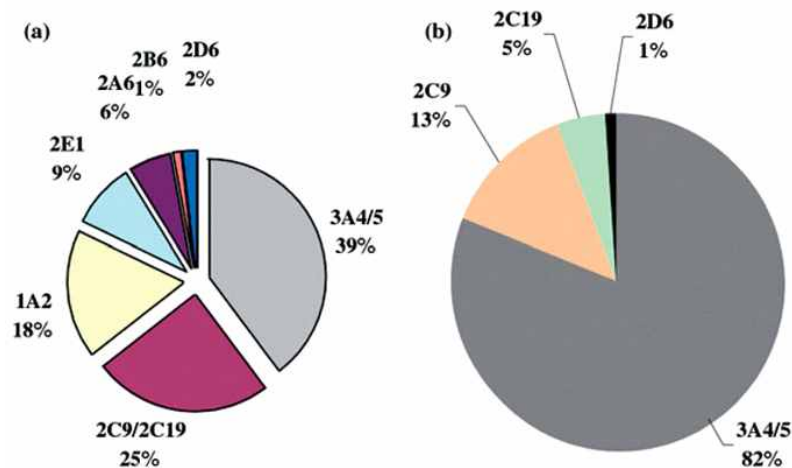


Figure 1. Distribution of the major cytochromes P450 (CYPs) (a) in the human liver and (b) in the small intestine.

- 가장 높은 일치율의 기관계: Small molecule 142 중 약물의 분석 연구에서 독성의 종류 중 가장 높은 일치율로 나타난 것은 혈액학적 adverse effects가 약 70%이었으며 근골격계, 호흡계 그리고 신경계 등은 30% 이하의 일치율이 확인되었음(Tamaki 등, 2013).

<참고문헌>

- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7
- Olson, H. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. Reg Toxicol Pharmacol. 32:56-67.
- Konstandi, M. (2014). Consequences of psychophysiological stress on cytochrome P450-catalyzed drug metabolism. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 45:149-167.
- Gundert-Remy U, Bernauer U, Blömeke B, Döring B, Fabian E, Goebel C, Hessel S, Jäckh C, Lampen A, Oesch F, Petzinger E, Völkel W, Roos PH. Extrahepatic metabolism at the body's internal-external interfaces. Drug Metab Rev. 2014 Aug;46(3):291-324.

- Tamaki, C., Nagayama, T., Hashiba, M., Fujiyoshi, M., Hizue, M., Kodaira, H., Nishida, M., Suzuki, K., Takashima, Y., Ogino, Y., Yasugi, D., Yoneta, Y., Hisada, S., Ohkura, T., Nakamura, K., 2013. Potentials and limitations of nonclinical safety assessment for predicting clinical adverse drug reactions: correlation analysis of 142 approved drugs in Japan. J. Toxicol. Sci. 38, 581–598.

2) (Small molecule + Biologics)와 동물종과의 인체 수준에서 기관계별 독성 일치율

- 오늘날 미국의 FDA 및 유럽의 EMA 등에서 신약의 인허가 비율은 small molecule vs biologics = 7:3 정도임
- Clark 등의 연구(2018): <Table 1>은 Elsevier PharmaPendium database을 이용하여 미국 FDA와 유럽의약청(EMA)에서 허가된 **3920 약물(저분자 화합물 + biologics)의 독성 건수**임. 비임상 독성시험에서 확인된 독성 건수(adverse event) 276,082건, 그리고 임상시험에서 확인된 독성 건수(adverse event) 1,361,367건의 합인 1,637,449가지를 이용하여 종별 및 기관계별 약물의 수와 일치율이 확인되었음.
- 독성에 대한 비임상 독성시험과 임상시험에서의 확인된 adverse event에 대해 종별 및 기관계별 진양성(true positive)을 확인한 것임(Clark 등, 2018). 여기서 진양성이라고 함은 동물에서 나타난 adverse effect가 임상시험에서 나타난 경우를 의미함.

Table 1
Species reported in FDA/EMA regulatory filings.

Species	Count of Observations
Human	1,361,367
Rat	155,807
Dog	51,175
Mouse	49,388
Rabbit	20,836
Cynomolgus monkey	14,662
Monkey (unspecified)	6,760
Rhesus monkey	2,743
Pig	2,059
Guinea pig	1,326

- 임상 독성 결과와 동물종별 및 기관별 진양성: Fig. 2는 동물종별 및 기관계별 진양성을 나타낸 것으로 진양성을 나타낸 약물 **3920(저분자 화합물 + biologics) 중** 수가 높은 동물종은 Dog & Rat > Mouse > Monkey > Rabbit 순으로 확인되었음. 특히 Dog는 소화기 및 심장순환 계통에서 높은 진양성의 약물 수, 그리고 랫드는 일반 증상과 투여 부위 그리고 간에서 높은 진양성의 약물 수가 확인되었음

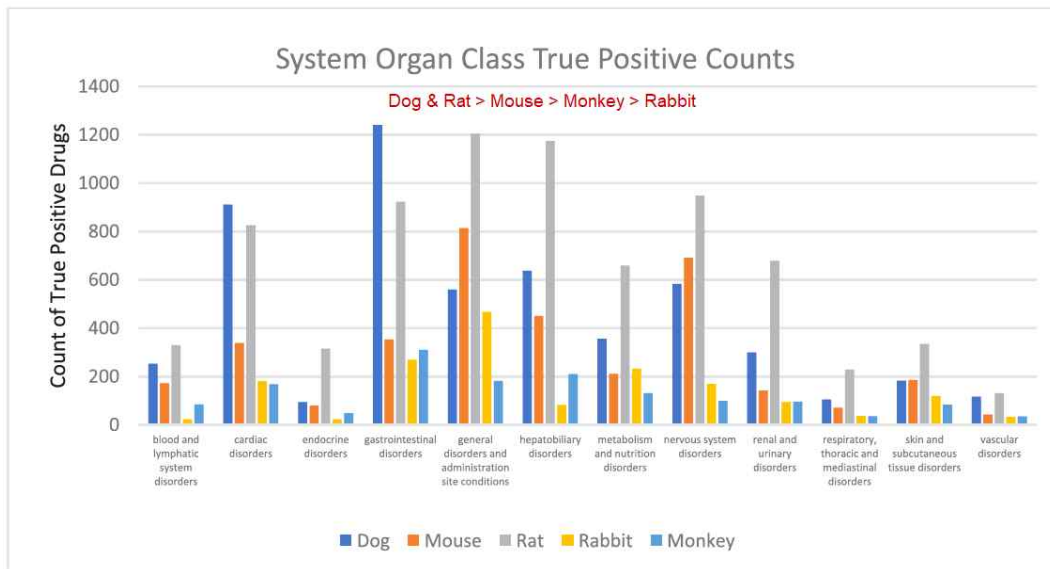


Fig. 2. Count of true positive drugs by system organ class and species.

- 임상 독성 결과와 동물종별 및 기관별 진양성의 백분율: Fig 4는 동물종별 및 기관별 진양성을 백분율로 나타낸 것으로 랫드> Dog. Mouse> Monkey> Rabbit 순으로 높은 비율이 확인되었음. 랫드에서는 대부분 40~50%, Dog에서는 20~40% 정도의 진양성 비율이 각 기관계 별로 확인되었. 마우스는 20~30%, 원숭이와 토끼는 10% 정도이었음.

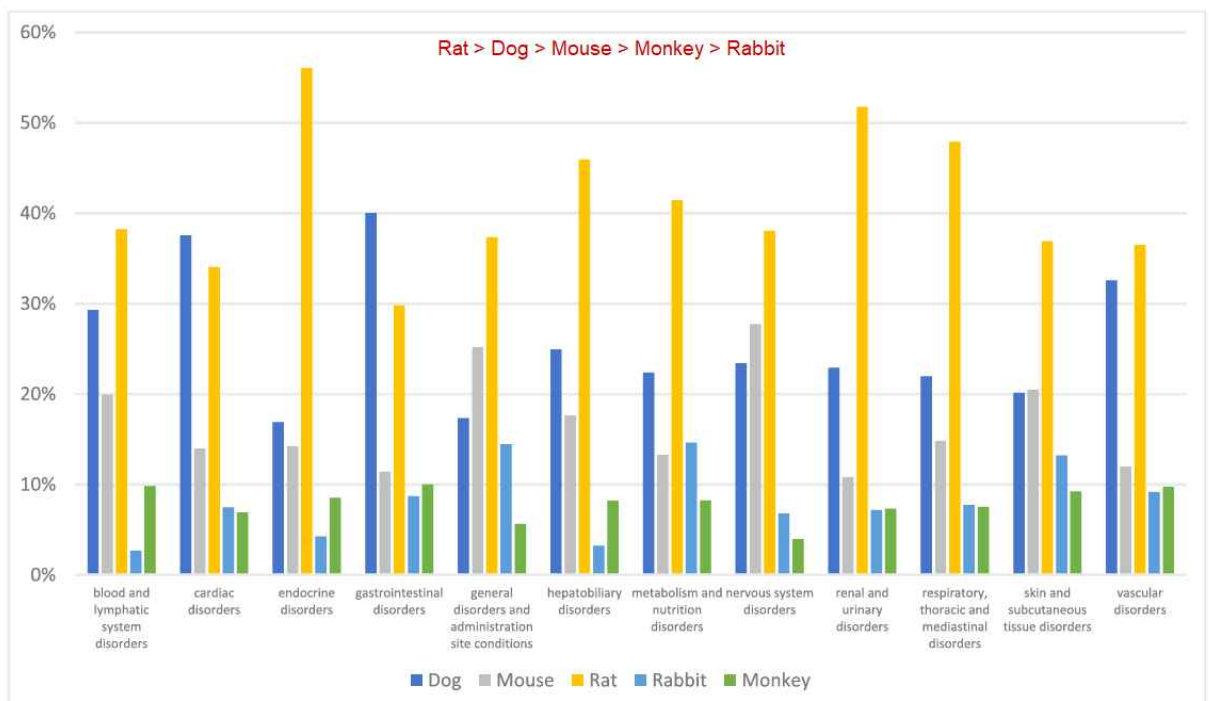


Fig. 4. Distribution of true positives by system organ class and species, normalized by proportion of true positives in each species for each organ class.

<참고문헌>

- Clark M, Steger-Hartmann T. A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. Regul Toxicol Pharmacol. 2018 Jul;96:94-105.

3) 독성의 종간 차이에 대한 결과와 향후 방향성

3-1) 결과 요약

- Small molecule의 인체와 동물종 간 일치율: Small molecule에 대한 종간 일치율은 **Dog, 비인간영장류(65% 이상) > 랫드(50% 정도) > 마우스, 기니피그 (10% 이하) 순**으로 추정되었음. 특히 cytochrome P450의 종간 공유율의 높은 순위와 일치한다는 것을 추정할 수 있음.
- (Small molecule + biologics) 혼합의 일치율: 임상시험에서의 독성 결과와 동물종별 및 기관별 진양성의 백분율은 **랫드> Dog> Mouse> Monkey> Rabbit** 순으로 높은 비율이 확인되었음. 랫드에서는 대부분 40-50%, 그리고 dog는 20-40% 정도의 진양성 비율이 각 기관계 별로 확인되었음. 그리고 마우스는 20-30%, 원숭이와 토끼는 10% 정도이었음. 또한 (Small molecule + biologics)의 혼합 자료는 독성의 종간 차이가 cytochrome P450의 종간 공유율과 일치하지 않았음.

3-2) 본 주제를 통해 살필 필요가 있는 내용

- ① Small molecule의 비임상시험과 임상시험의 예측률이 비교적 **cytochrome P450의 종간 공유율과 일치한다는 점**
- ② Table 1에서처럼 3920 약물(저분자 화합물 + biologics)에 대한 비임상 독성시험과 임상시험을 통해 각각 276,082건과 1,361,367 독성 건수가 확인되었음. 비임상 독성시험을 통해 임상시험에서 확인된 건수의 약 20%만 나타나는 독성시험이 수행되었다는 점을 확인할 수 있음. 약 20% 중에서 가장 높은 인체와 동물종간 기관계별 일치율이 40%이라는 점을 고려할 때 **비임상 독성시험을 통해 임상시험에서 예측률은 약 8%에 불과하다는 것임. 한편으로는 독성시험이 아니라 무독성시험이 수행되었다는 점을 의미하기도 함.**
- ③ 2022년 12월 조 바이든 대통령이 미국 FDA 현대화법(modernization law)을 승인하여 임상시험을 위해 비임상 동물시험이 없이도 IND가 가능하도록 하였음. 신약 개발을 위해 비임상 독성시험이 없이 문서 자체만이라도 IND 신청이 가능하다는 의미이며 그 이유는 8%라는 초라한 예측률에 기인하지 않을까? 이와 같은 상황에서 우리는 어떻게 대책 마련하고 우리의 인식과 현실적 규제는 어느 수준인지를 먼저 살펴볼 필요성이 있다고 사료됨.

Table 1
Species reported in FDA/EMA regulatory filings.

Species	Count of Observations
Human	1,361,367
Rat	155,807
Dog	51,175
Mouse	49,388
Rabbit	20,836
Cynomolgus monkey	14,662
Monkey (unspecified)	6,760
Rhesus monkey	2,743
Pig	2,059
Guinea pig	1,326

38. 비임상 독성시험에서 276,082건 vs 임상시험에서 1,361,367 건 - IND 및 NDA 통과 추정

1. Clark 등(2018)의 Big data에 대한 분석 결과

- Table 1은 미국 FDA 및 EMA(European Medicines Agency, 유럽의약청)에 의해 지난 수 십년 동안 허가를 받은 약물(small molecule + biologics) 3920 종에 대한 비임상 독성시험 및 임상시험에서 확인된 **adverse effect**의 건수를 나타낸 것임
- 비임상 독성시험에서 확인된 건수는 276,082건, 그리고 임상시험에서 확인된 건수는 1,361,367건이며 비임상 독성시험에 확인된 **adverse effect**는 임상시험 건수의 약 20.3%임.
- Rat에서 확인된 건수는 비임상 독성시험에서 확인된 **adverse effect**의 56.4%로 가장 높은 비율이며 이는 랫드가 비임상 독성시험에서 가장 많이 사용되기 때문으로 추정됨.
- Rat 다음으로 높은 비율은 Dog로 18.5%로 확인되었음. 일반적으로 small molecule에 대한 반복투여독성시험은 설치류 1종 및 비설치류 1종 등 2종으로 이루어짐. 이에 2종으로 주로 Rat와 Dog이기 때문에 Dog가 랫드 다음으로 높은 비율의 **adverse effect**가 확인된 동물종으로 추정됨.
- 그 다음의 높은 Mouse의 **adverse effect**에 대한 비율은 17.9%임. 단회투여독성시험뿐만 아니라 유전독성시험 그리고 생식독성시험 등에 사용된 결과로 높은 비율의 **adverse effect**로 확인된 것으로 추정됨.
- 결론적으로 비임상 독성시험에서 확인된 **adverse effect**의 비율은 사용된 동물종의 수에 비례하는 것으로 추정됨

Table 1
Species reported in FDA/EMA regulatory filings.

Species	Count of Observations
Human	1,361,367
Rat	155,807
Dog	51,175
Mouse	49,388
Rabbit	20,836
Cynomolgus monkey	14,662
Monkey (unspecified)	6,760
Rhesus monkey	2,743
Pig	2,059
Guinea pig	1,326

2. Big data 분석 결과에 대한 해석과 허가에 대한 추정

- 비록 임상시험에서 확인된 adverse effect 건수의 불과 20.3% adverse effect가 비임상 독성시험에서 확인되었지만, IND(IND(Investigational new drug, 임상시험허가신청) 및 NDA(New drug application, 신약허가신청)를 통과하였다는 점.
 - 또한 비임상 독성시험에서 확인된 adverse effect의 276,082건의 약 5배 가량인 1,361,367건의 adverse effect가 임상시험에서 확인되었지만, NDA를 통과하였다는 점. 여기서 FDA와 EMA의 비임상 독성시험 및 임상시험에서 확인된 신약허가 기준에 대한 추정이 가능함.
- ① 비임상 독성시험에서 통계적으로 유의성이 있는 시험물질에 의한 변화이지만 “may not raise a safety concern”으로 판정할 수 있는 독성학적 지식의 활용 및 임상시험에서 안전용량으로 포함된다는 점
 - ② 임상시험에서 1,361,367건의 adverse effect 또는 통계적으로 유의한 부작용이 확인되었지만 3920종 약물이 허가되었다는 것은 독성-편익(toxicity-benefit) 분석을 기반한 허가 또는 실제 용량 처방의 감소 조건 하에 허가 가능성이 있음.

3. 결론

- 우리나라 규제기관에서 이와 같은 상황 하에 3920종 약물에 대한 허가가 과연 이루어졌을가에 대한 궁금증이 있음.
- 그 어떤 약도 무영향 및 무독성 약물은 없음. 확인 불가능할 뿐임. 단지 우리는 현재 당면한 질환을 치료하면서 발생하는 약물의 부작용의 최소화 또는 가역성이 있는 약물을 개발할 뿐임.

<참고문헌>

- Clark M, Steger-Hartmann T. A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. Regul Toxicol Pharmacol. 2018 Jul;96:94-105.

39. 비임상의 intrinsic toxicity와 임상에서의 idiosyncratic toxicity

1. Intrinsic toxicity의 개념

- Intrinsic toxicity는 동일한 유전자를 가진 집단에서 확인이 가능하기 때문에 동종교배(in breeding)를 통해 얻어진 종을 이용한 독성시험을 통해 확인이 가능한 독성임.
- 동종교배를 통해 생산된 동물을 이용한 목적은 동일한 유전자적 특성으로 약물에 대해 동일한 반응을 확인하기 위함임.
- Intrinsic toxicity는 화학물질 자체가 가지고 있는 독성으로 동물 개체가 **대사 가능한 범위 내의 용량에 의해 나타나는 독성**을 의미하며 화학물질의 본질적 독성이라고 할 수 있음(박영철, 2019)
- 독성시험 가이드라인의 글로벌 스탠다드는 반복투여독성시험에서 intrinsic toxicity를 확인하기 위한 1000 mg/kg/day이며 이를 한계용량(limit dose)이라고 함.
- 글로벌 스탠다드에서 1000 mg/kg/day로 설정한 이유는 대부분의 척추동물에서 약물 및 화학물질에 대한 대사 한계가 1000 mg/kg/day로 추정하였기 때문임. 이 이상의 용량에서 투여에 의해 나타나는 독성은 약물 및 화학물질의 intrinsic toxicity를 확인할 수 없다고 할 수 있음.
- 따라서 1000 mg/kg/day의 용량 이상으로 투여되는 상용화 약물은 아직 없음. 개발자는 이점을 인식할 필요성이 있음.

2, Idiosyncratic toxicity의 개념

- Stepan 등 (2011) 등의 논문에서 'Can a low dose drug candidate truly mitigate metabolism-dependent and -independent idiosyncratic toxicity risks?에서 idiosyncratic toxicity 의미는 대단히 중요하며 **개체-특이적 독성**이라는 의미임
- 임상시험 또는 환자에서는 약물에 대해 공통적인 독성이 나타날 수도 있기도 하지만 개인마다 다른 반응 또는 독성을 나타낼 수도 있음. 이와 같이 개체마다 다른 반응 또는 독성을 **idiosyncratic toxicity이라고 함.**
- 이와 같이 임상시험 및 환자에서 'idiosyncratic toxicity'가 나타나는 이유는 개인마다 유전자 특성이 모두 다르기 때문임. 따라서 동일한 유전자 특성을 가진 동물을 이용한 비임상 독성시험에서 'idiosyncratic toxicity' 확인할 수 없음.
- 글로벌 제약시장에서 약물 사용의 중지 또는 사용 경고의 이유는 본질적 특성이 아니라 이와 같은 idiosyncratic toxicity에 기인함

이와 같은 이유로 임상시험 및 환자군의 다양한 유전자적 특징에 의한 idiosyncratic toxicity에 기인하여 IND 통과하여 비임상시험의 독성이 임상시험에서 일치율이 10%에 불과한 이유 중의 하나임.

3. 비임상의 intrinsic toxicity와 임상에서의 idiosyncratic toxicity의 예시

- <설명을 위한 자료> 앞서 소개한 Clark 등(2018)의 Big data에 대한 분석이 비임상의 intrinsic toxicity와 임상에서의 idiosyncratic toxicity의 예시가 됨. 이 자료 분석하면서 놀라기도 하면서 동시에 신약 개발에 있어서 뿐만 아니라 약물의 종간 차이에 대한 이해에 있어서 중요한 자료라고 사료됨.
- 요약하면 Table 1은 미국 FDA 및 EMA(European Medicines Agency, 유럽의약청)에 의해 지난 수 십년 동안 허가를 받은 약물(small molecule + biologics) 3920 종에 대한 비임상 독성시험 및 임상시험에서 확인된 **adverse effect**의 건수를 나타낸 것임
- 비임상 독성시험에서 확인된 건수는 276,082건, 그리고 임상시험에서 확인된 건수는 1,361,367건이며 비임상 독성시험에 확인된 **adverse effect**는 임상시험 건수의 약 20.3%임.
- 이와 같이 임상시험의 독성 건수가 비임상시험에서의 독성 건수가 5배가 높은데 이러한 이유는 여러 가지 제시할 수 있지만 가장 중요한 이유는 동일한 유전자 특성을 가진 동물 집단과 다양한 유전자 특성을 환자 집단의 반응 차이에 기인하는 것으로 추정됨.

Table 1
Species reported in FDA/EMA regulatory filings.

Species	Count of Observations
Human	1,361,367
Rat	155,807
Dog	51,175
Mouse	49,388
Rabbit	20,836
Cynomolgus monkey	14,662
Monkey (unspecified)	6,760
Rhesus monkey	2,743
Pig	2,059
Guinea pig	1,326

4. 결론

- 비임상의 독성시험에서는 intrinsic toxicity가 발생하며 임상시험에서는 intrinsic toxicity 및 idiosyncratic toxicity가 모두 발생한다는 것을 항상 염두하여 신약 개발에 임하는 것이 성공에 필수적 요소이며 약물-반응의 차이에 대한 핵심 원리라고 사료됨.

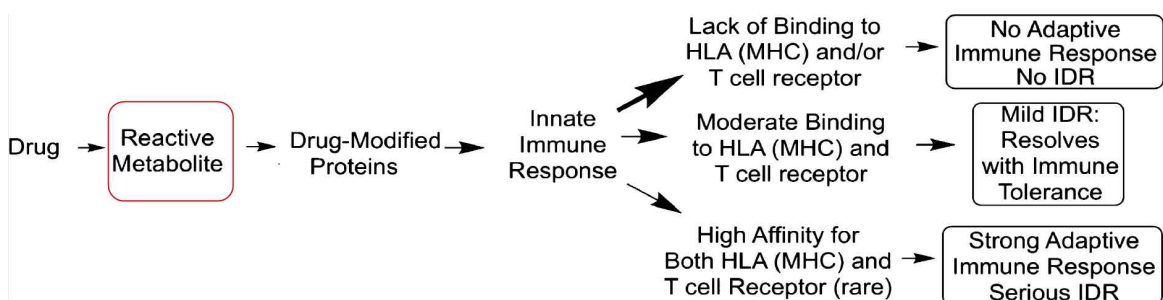
40. 임상시험에서의 idiosyncratic toxicity의 발생 기전과 위험성

1. Idiosyncratic adverse drug reactions (IADR, 개체-특이적 약물이상반응)의 개념

- FDA 및 EMA에 의해 승인된 3920(small molecule + biologics) 중에서 독성학적 변화의 확인된 건수는 276,082건, 그리고 임상시험에서 확인된 건수는 1,361,367건이며 비임상 독성시험에 확인된 **adverse effect**는 임상시험 건수의 약 20.3%임(Clark 등, 2018)
- 이와 같이 임상시험에서의 독성 건수가 비임상시험의 건수보다 약 5배가 넘는 이유는 유전자의 동질성에 기인함. 즉, 약물을 접하는 환자 또는 사람의 유전자는 거의 이질성이며 동종교배를 통해 생산된 동물은 동질성임
- 이에 따라 동물시험에서는 모든 개체가 약물에 대한 intrinsic toxicity가 나타나고 임상시험에는 intrinsic toxicity와 더불어 사람 개체의 문제로 idiosyncratic toxicity가 나타남, 이와 같은 임상에서의 idiosyncratic toxicity 현상을 Idiosyncratic adverse drug reactions (IADR, 개체-특이적 약물이상반응)이라고 함.
- IADR의 문제점은 예측이 거의 불가능하고 사망 또는 치명적이라는 것임. 이와 같은 이유로 약물시장에서 철수된 약물의 약 80%가 IADR에 기인함(Stepan 등, 2011)

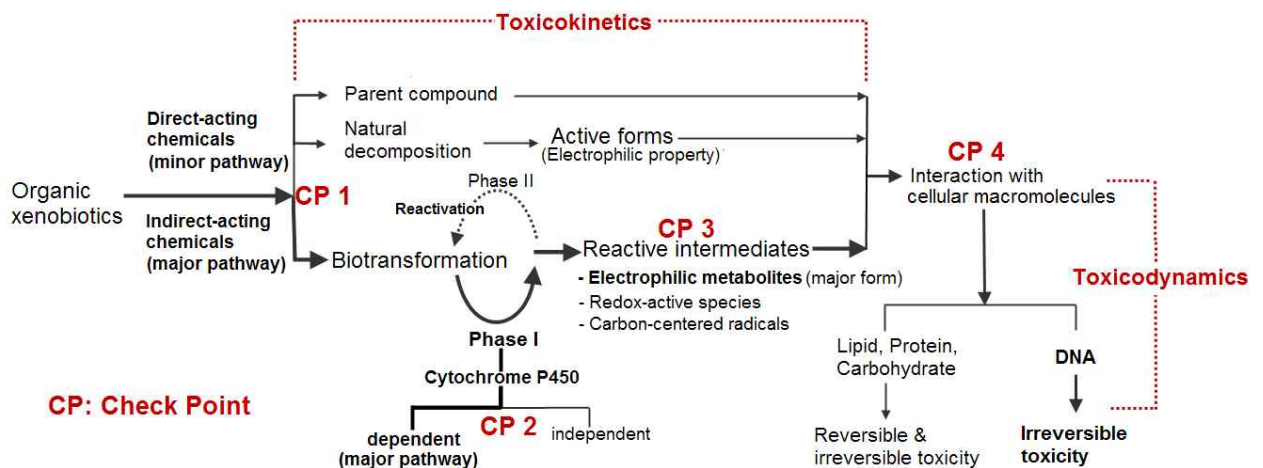
2. Small molecule에 의한 IADR의 원인

- Small molecule:** 지난 35년간 IADR을 분석한 결과, cytochrome P450에 의해 생성된 Reactive metabolites에 기인하는 것으로 추정됨(Utrecht 등 2022). 특히 자체적으로 항원 능력이 없는 reactive intermediates가 아래의 <그림>에서처럼 생체내 비특이적 단백질과 결합하여 항원으로 작용하여 면역 반응에 기인하는 것으로 추정되었음.



<그림> Small molecule에 의한 IADR 발생 기전

- 독성기전의 **central dogma**를 통한 IADR 이해: 아래 <그림>의 CP2에서처럼 cytochrome P450에 의해 3가지 Reactive intermediates 또는 Reactive metabolite(활성 중간대사체)인 Electrophilic metabolites(친전자성대사체), Carbon-centered radicals(탄소부위-라디칼), Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체) 중 **Electrophilic metabolites(친전자성대사체)**가 단백질과 비특이적 공유결합을 통해 항원으로 작용할 것으로 추정됨(박영철, 2010).
- 만약 직접작용화학물질(Direct-acting chemical)은 natural decomposition에 의해 발생한 친전자성물질도 단백질과 결합하여 항원으로 작용하여 IADR을 유발함. 그러나 종간 및 개체간가 차이가 없기 때문에 IADR이 아니라 intrinsic toxicity가 됨.



<그림> 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma

<참고문헌>

- Uetrecht J. Idiosyncratic Drug Reactions: A 35-Year Chemical Research in Toxicology Perspective. Chem Res Toxicol. 2022 Oct 17;35(10):1649-1654.
- Clark M, Steger-Hartmann T. A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. Regul Toxicol Pharmacol. 2018 Jul;96:94-105.
- Antonia F. Stepan, et al., Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. Chem. Res. Toxicol. 2011, 24, 9, 1345-1410
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

41. 임상시험에서의 idiosyncratic toxicity – Hepatocellular toxicity와 Oncogenesis

1. IADR의 주요 타입

- Table 3은 약물 복용에 의해 발생하는 대표적인 개체-특이적 약물 이상반응 (Idiosyncratic adverse drug reactions, IADR)의 예시임(Dong 등, 2020), 본 고찰에서는 노란 표시로 된 Hepatocellular(간세포)의 IADR과 Oncogenesis(종양형성력)의 IADR에 대해 고찰하였음.

Table 3. Types of Idiosyncratic Drug Reactions.

Type of Reaction	Effect on Cells	Examples of Drugs
Hepatocellular	Direct effect or production by enzyme-drug adduct leads to cell dysfunction, membrane dysfunction, and cytotoxic T-cell response.	Isoniazid, trazodone, diclofenac, nefazodone, venlafaxine, lovastatin
Cholestasis	Injury to canalicular membrane and transporters	Chlorpromazine, estrogen, erythromycin and its derivatives
Immunoallergic	Enzyme-drug adducts on cell surface induce IgE response	Halothane, phenytoin, sulfamethoxazole
Granulomatous	Macrophages, lymphocytes infiltrate hepatic lobule	Diltiazem, sulfa drugs, quinidine
Microvesicular fat	Altered mitochondrial respiration, β -oxidation leads to lactic acidosis and triglyceride accumulation.	Didanosine, tetracycline, acetylsalicylic acid, valproic acid
Steatohepatitis	Multifactorial	Amiodarone, tamoxifen
Autoimmune	Cytotoxic lymphocyte response directed at hepatocyte membrane components	Nitrofurantoin, methyl dopa, lovastatin, minocycline
Fibrosis	Activation of stellate cells	Methotrexate, excess vitamin A
Vascular collapse	Causes ischemic or hypoxic injury	Nicotinic acid, cocaine, methylenedioxymethamphetamine
Oncogenesis	Encourages tumor formation	Oral contraceptives, androgens
Mixed	Cytoplasmic and canalicular injury, direct damage to bile ducts	Amoxicillin-clavulanate, carbamazepine, herbs, cyclosporine, methimazole, troglitazone

IgE, immunoglobulin E.

2. Hepatocellular(간세포)의 IADR: 환자-특이적 약인성 간손상(idiosyncratic drug induced liver injury, iDILI)

- Teschke 등(2020)의 iDILI를 유발한 3312 환자를 분석한 결과, 다음과 같은 환자-특이적 약인성 간손상의 원인으로 **61.1%가 cytochrome P450의 대사와 관련**이 있는 것으로 확인됨. 원인으로서는 다음과 같이 제시되었음.
 - ① Cytochrome P450에 의해 대사되는 약물들의 1일 고용량 복합처방(high daily drug dose combined with drugs metabolized via CYP pathways)
 - ② 간에서 대사되는 약물들의 1일 고용량 복합처방(high daily drug dose combined with high hepatic drug metabolism)
 - ③ 친지질성이 높은 약물들의 1일 복합처방(daily drug dose combined with lipophilicity)

- 환자 3312명이 복용한 약물을 분석 후 관련된 cytochrome P450의 iDILI를 유발한 기여율은 다음과 같으며 49.6%의 CYP 3A4/5, 24.6%의 CYP 2C9, 13.2%의 CYP2E1, 7.3%의 CYP2C19, 3.5%의 CYP1A2 그리고 1.8%의 CYP2D6이었음. Table 3에서처럼 인체내에서 가장 많이 분포된 CYP 3A4/5가 iDILI 유발에 가장 높은 기여를 하는 것으로 추정됨.

Table 3. Ranking of CYP isoforms involved in drug metabolism of patients with RUCAM based iDILI

CYP Isoform.	Drugs Implicated in RUCAM Based iDILI Cases and Metabolized by CYP Isoforms (n)	Drugs Implicated in RUCAM Based iDILI Cases and Metabolized by CYP Isoforms (%)	Contribution of CYP Isoforms in Drug Metabolism in the General Population (%)
CYP 1A2	22	3.5	5
CYP 3A4/5	307	49.6	40-45
CYP 2C9	152	24.6	10
CYP2 C19	45	7.3	5
CYP 2D6	11	1.8	20-30
CYP 2E1	82	13.2	2-4

3. Oral contraceptives(경구피임약)의 IADR - Oncogenesis

1) Carcinogenesis vs Tumorigenesis vs Oncogenesis의 차이점

- 이 3가지 용어를 어떻게 구분하여 학생들에게 강의를 해야할지 상당히 고민을 많이 하였고 아직도 확실하지 않지만 다음과 같이 구분하였음.

1-1) Carcinogenesis (돌연변이에 의한 발암성)

① 돌연변이에 의해 암이 유도되는 유전자의 수와 종류

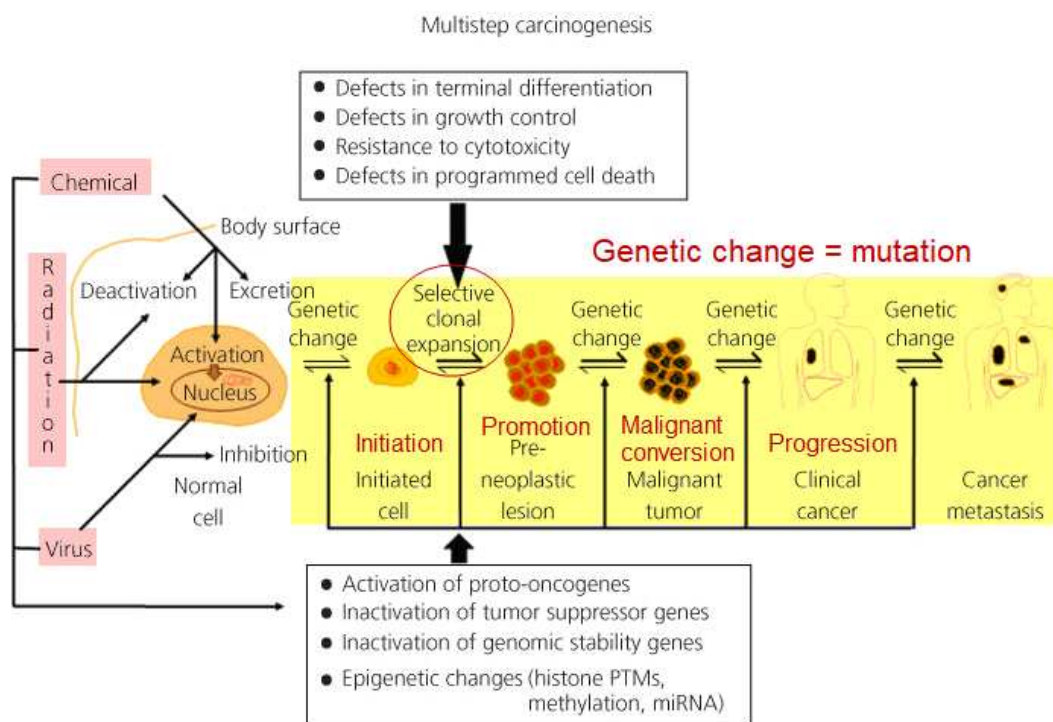
- 사람의 유전체:유전자 20,500개 중 약 2% 유전자의 돌연변이가 발암과 관련이 있으며 생식세포에서는 암과 관련된 유전자는 약 70개, 체세포에서는 약 342개의 유전자가 관련이 있는 것을 추정(박영철, 2010; Porta-Pardo 등, 2020).
- 대부분은 발암의 개시단계를 시작하는 유전자 돌연변이와 관련이 있는 유전자이며 다음과 같은 3종류

- (1) 발암전구유전자(Proto-oncogene)
- (2) 발암억제유전자(Tumor suppressor gene)
- (3) DNA 수선유전자(repair gene)

- 이들 유전자는 생장을 조절하는 유전자로: (I) 성장인자(growth factor), (II) 성장인자수용체(growth factor receptors), (III) 신호전달단백질(signal-transduction proteins), (IV) 전사인자(transcription factors), (V) 아포토시스-유도 또는 -억제 단백질(pro- 또는 anti-apoptotic proteins), (VI) 세포주기주절단백질(cellcycle control proteins) 그리고 (VII) DNA 수선단백질(DNA repair proteins) 등 7 가지 종류로 분류됨.

② Carcinogenesis의 기전

- 다음의 <그림>에서처럼 발암의 다단계 이론(Multi stage theory): Tumor initiation → Promotion → Malignant conversion → Progress
- 생식세포에서는 암과 관련된 유전자는 약 70개, 체세포에서는 약 342개의 유전자임. **발암기전에 대한 규명이 어려운 이유는 이들 유전자 중 단순히 하나의 유전자 돌연변이 또는 여러 개 동일한 유전자 구성에 의해 발암화가 이루어지는 것이 아니고 최소한 4개에서 10개 정도의 유전자 돌연변이가 발생하여야 하며 암종마다 그리고 암세포마다 그 수 및 그 유전자 종류가 다르기 때문임.**
- 약물을 약 2년 정도 투여 후 약물의 발암성을 확인함



<그림> 돌연변이에 의한 다단계 발암화

1-2) Tumorigenicity(종양원성)

- 기전과는 관련이 없이 세포의 무절제한 성장으로 benign tumor 및 malignant tumor로 구분되며 cancer는 malignant tumor이며 따라서 분류 측면에서 Tumor > Cancer가 됨
- Tumorigenicity(종양원성)이란 세포를 세포 배양액이나 동물에 이식하였을 때 세포 성장 또는 분열이 제어되지 않고 무제한 성장하는 특성을 의미함.
- 다음의 Table 1은 hPSC(human pluripotent stem cells, 인간 만능 줄기세포)의 인체에 주입 후 나타날 수 있는 잠재적 outcome을 나타낸 것으로 영향이 없거나 benign 또는 malignant tumor 등이 발생할 수 있음(Sato등, 2019)
- 종양원성을 확인하기 위해 immunosuppressed nude mice를 이용한 In vivo 및 in vitro 종양원성 시험(Tumorigenesis test)이 있으며 양성대조군(positive control cells)을 이용 및 비교로 판단함

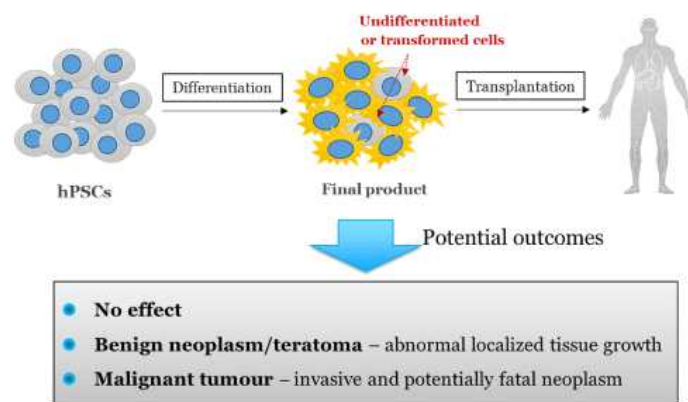


Figure 1 Rationale for tumorigenicity testing of PSC-derived products.

1-3) Oncogenicity(종양형성력)

- Immunosuppressed nude mice를 이용한 **tumorigenicity testing**(종양원성 시험)을 통해 tumor를 형성한 test cell은 **tumorigenicity**을 가진 세포로 판단함
- 만약 종양원성을 가진 세포의 DNA 추출물이나 용해물(lysate) 또한 tumor 형성하는지에 대한 확인이 필요할 경우도 있고 이들 물질을 Immunosuppressed nude mice에 주입하여 tumor 형성력을 확인함.
- 예시) 백신은 세포(cell substrate)를 이용하여 생산되는데 대량생산을 위해 암-표현형 세포가 이용되는 경우가 있음. 이러한 경우 암-표현형 세포는 oncogene 또는 oncogenic viruses를 가질 경우가 있음. 이러한 경우에 세포의 용해물 또는 DNA 추출

물을 Immunosuppressed nude mice에 주입하여 tumor 형성력을 확인함(Virusure.com, 2024)

- 앞서 발암을 유발하는 유전자의 돌연변이는 발암전구유전자(Proto-oncogene), 발암억제유전자(Tumor suppressor gene), DNA 수선유전자(repair gene) 등의 유전자에서의 돌연변이임
- 결국 oncogenecity는 Proto-oncogene의 돌연변이에 의해 oncogene으로 전환되어 이들의 활성화에 의한 세포주기에 대한 영향을 확인하는 것을 oncogenicity(종양형성력)이라고 할 수 있음

2) Oral contraceptives(경구피임약)의 IADR - Oncogenesis

- 다음은 Table 3에서처럼 Oral contraceptives(경구피임약)의 개체-특이적 약물 이상반응(Idiosyncratic adverse drug reactions, IADR)으로 Oncogenesis(종양형성력)가 제시되었음 (Dong 등, 2020).

Table 3. Types of Idiosyncratic Drug Reactions.

Type of Reaction	Effect on Cells	Examples of Drugs
Hepatocellular	Direct effect or production by enzyme-drug adduct leads to cell dysfunction, membrane dysfunction, and cytotoxic T-cell response.	Isoniazid, trazodone, diclofenac, nefazodone, venlafaxine, lovastatin
Cholestasis	Injury to canalicular membrane and transporters	Chlorpromazine, estrogen, erythromycin and its derivatives
Immunoallergic	Enzyme-drug adducts on cell surface induce IgE response	Halothane, phenytoin, sulfamethoxazole
Granulomatous	Macrophages, lymphocytes infiltrate hepatic lobule	Diltiazem, sulfa drugs, quinidine
Microvesicular fat	Altered mitochondrial respiration, β -oxidation leads to lactic acidosis and triglyceride accumulation.	Didanosine, tetracycline, acetylsalicylic acid, valproic acid
Steatohepatitis	Multifactorial	Amiodarone, tamoxifen
Autoimmune	Cytotoxic lymphocyte response directed at hepatocyte membrane components	Nitrofurantoin, methyldopa, lovastatin, minocycline
Fibrosis	Activation of stellate cells	Methotrexate, excess vitamin A
Vascular collapse	Causes ischemic or hypoxic injury	Nicotinic acid, cocaine, methylenedioxymethamphetamine
Oncogenesis	Encourages tumor formation	Oral contraceptives, androgens
Mixed	Cytoplasmic and canalicular injury, direct damage to bile ducts	Amoxicillin-clavulanate, carbamazepine, herbs, cyclosporine, methimazole, troglitazone

IgE, immunoglobulin E.

- 최근 Li 등(2023)의 발표 논문에 따르면 Table 6에서처럼 경구피임약을 복용한 여성군에서 일반 여성군보다 발암율이 더 낮은 것으로 확인되어 앞서 Table 1에서처럼 Oral contraceptives(경구 피임약)의 개체-특이적 약물 이상반응(Idiosyncratic adverse drug reactions, IADR)으로 Oncogenesis(종양형성력) 발생과는 상관이 없는 것으로 추정되었음. **역학(epidemiology)의 중요성을 확인 고찰임**

TABLE 6

Comparison of age-specific incidence rate of all cancer in 2011–2013 in the UK and the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study for women aged 30–75 years

Age, y	United Kingdom 2011–2013 ^a		Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study 1968–2013	
	Average no. per year	Incidence rate per 100,000 women	N	Incidence rate per 100,000 women
30–34	2,239	105.2	106	94.9
35–39	3,239	159.0	174	127.2
40–44	5,833	252.7	301	202.5
45–49	9,617	406.1	544	362.1
50–54	12,188	570.3	706	480.5
55–59	13,552	726.1	985	701.5
60–64	18,577	997.3	1227	937.0
65–69	21,713	1278.6	1149	1159.6
70–74	19,901	1516.1	906	1518.5

^a Source: Cancer Research UK.¹¹
Iversen et al. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 2017.

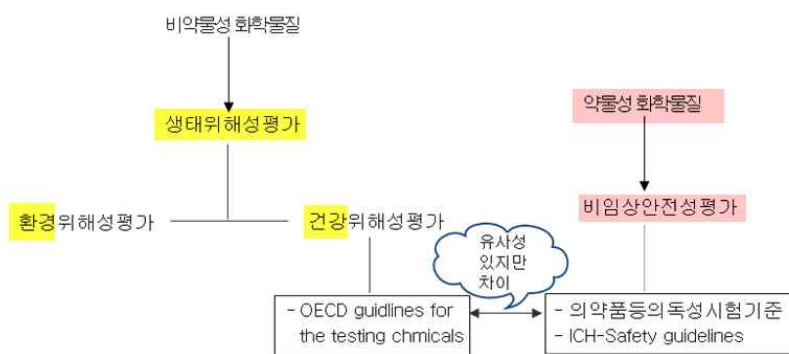
<참고문헌>

- Li L, Yang X, Tran D, Seo SK, Lu Y. Combined Oral Contraceptives As Victims of Drug Interactions. *Drug Metab Dispos*. 2023 Jun;51(6):718–732.
- Sato Y, Bando H, Di Piazza M, Gowing G, Herberts C, Jackman S, Leoni G, Libertini S, MacLachlan T, McBlane JW, Pereira Mouriès L, Sharpe M, Shingleton W, Surmacz-Cordle B, Yamamoto K, van der Laan JW. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider. *Cytotherapy*. 2019 Nov;21(11):1095–1111.
- Porta-Pardo E, Valencia A, Godzik A. Understanding oncogenicity of cancer driver genes and mutations in the cancer genomics era. *FEBS Lett*. 2020 Dec;594(24):4233–4246
- Hepatic, Extrahepatic and Extracellular Vesicle Cytochrome P450 2E1 in Alcohol and Acetaminophen-Mediated Adverse Interactions and Potential Treatment Options
- Teschke R, Danan G. Idiosyncratic Drug Induced Liver Injury, Cytochrome P450, Metabolic Risk Factors and Lipophilicity: Highlights and Controversies. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 26;22(7):3441.
- Oral contraceptives androgen
- Dong V, Nanchal R, Karvellas CJ. Pathophysiology of Acute Liver Failure. *Nutr Clin Pract*. 2020 Feb;35(1):24–29.
- Rattay B, Benndorf RA. Drug-Induced Idiosyncratic Agranulocytosis – Infrequent but Dangerous. *Front Pharmacol*. 2021 Aug 13;12:727717.
- Virusure.com. 2024. In Vivo Tumorigenicity & Oncogenicity Studies For cell lines producing vaccines.
<https://virusure.com/services/tumorigenicity-oncogenicity-studies/>

42. 비임상시험 및 임상시험의 연결 즉 IND에서 가장 중요한 Toxicological descriptor 적용의 문제점

1) 위해성평가(Risk assessment)와 비임상안전성평가(Safety assessment)의 차이

- 독성시험은 다음과 같이 2 분야인 비의도적 노출인 생태위해성평가와 의도적 노출인 비임상안전성평가(박영철, 2019)
- 생태와 환경의 위해성평가 대상에서의 차이는 전자에서 인간집단의 포함이고 후자에서는 인간집단이 제외되는 것임



<그림 1-1> 생태위해성평가와 비임상안전성평가의 차이:

2) 위해성평가와 비임상안전성평가의 목적과 차이

- 독성시험을 이용하여 위해성평가에서는 인체노출안전기준(health based guidance value, HBGV), 비임상안전성평가(nonclinical safety assessment)에서는 MRSD(maximum recommended starting dose, 최대초기임상권장용량)을 추정함이며 예시는 아래와 같음.
- 비의적 노출의 HBGV와 약물과 같은 의도적 노출에 대한 MRSD의 산출에 대한 예시는 랫드에 대한 반복투여독성시험에서 얻은 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대비독성용량)에 safety factor(안전계수: 종간 및 종내 차이에 대한 계수)를 적용한 것임.
- Safety factor에서 적용의 차이가 있는 것을 알 수 있는데 MRSD 추정은 체중이 아니라 체표면적을 기준으로 추정되기 때문임. 즉, 체중보다 체표 면적을 이용하여 약물 대사율이 더 정확하게 반영되기 때문임. 반면에 RfD의 경우에는 비의도적 노출이기 때문에 더 낮게 노출되면 더 안전성을 높여 대사율은 반영이 안되는 것이 더 실질적인 것임.

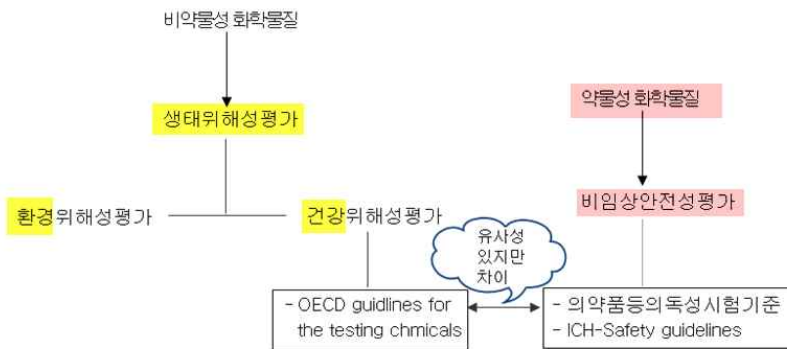
<표-1> 비발암물질 인체노출안전기준의 RfD와 비임상안전성평가의 MRSD에 대한 차이

인체노출안전기준 비임상안전성평가	추정방법	개념	노출 형태
----------------------	------	----	----------

RfD (Reference dose, 1일인체노출허용수준)	NOAEL SF(10 x 10)	일생 동안 유해한 영향에 의한 인체위해성이 없이 경구로 노출될 수 있는 1일 노출추정용량. 흡입의 경우에는 RfD 대신에 RfC(reference concentrations)	비 의 도 적
MRSD	NOAEL SF(10 x 6.2)	임상시험에서 초기에 투여할 수 있는 약물의 최대용량	의 도 적

3) 국내 규제기관의 IND 심사에 있어서 가장 큰 문제점

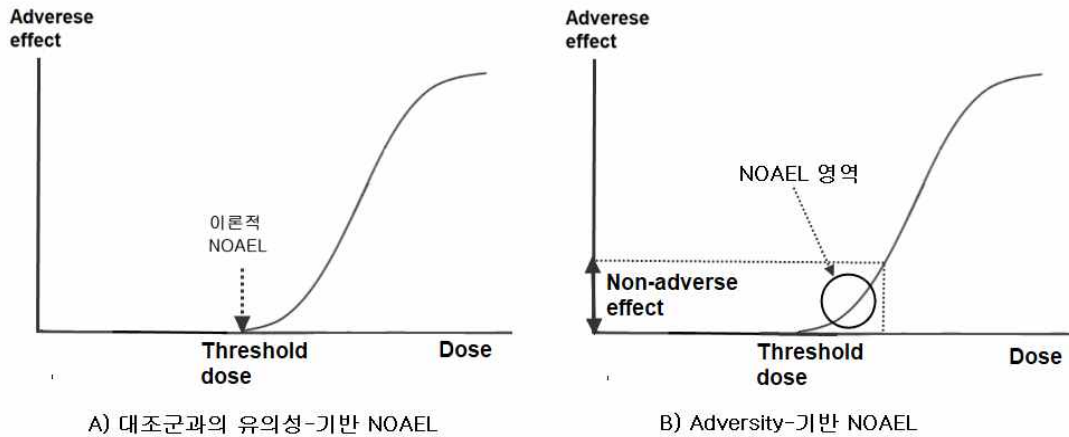
- 아래의 <그림 1-1>에서처럼 비의도적 노출과 관련된 가이드라인을 의도적 노출의 가이드라인을 적용하는 것임



<그림 1-1> 생태위해성평가와 비임상안전성평가의 차이:

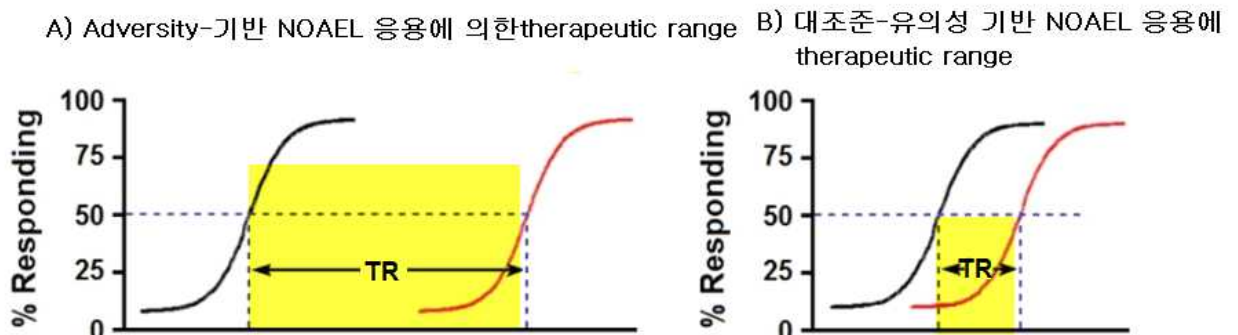
- 이와 같은 잘못된 적용은 아래와 같은 독성시험의 목적을 상실하게 됨. 예를 들어 비의도적 노출의 화학물질에 대한 독성시험은 인체에 미치는 예측(prediction)에는 큰 관심이 없어 NOAEL만 산출하여 노출안전용량만 산출하는 것에 주안점을 둠.
- 반면에 약물과 같은 의도적 노출에 대한 화학물질에 대한 독성시험은 임상시험에서 안전용량뿐만 아니라 예측(prediction)을 아주 중요하게 생각함
- 따라서 MRSD를 산출하기 위한 NOAEL 결정을 위한 반복투여독성시험에서 용량-반응 곡선에서 toxicological descriptor(독성용량기술치)에 대한 국내 규제기관과 글로벌 스탠다드에서 차이가 있음.
- <그림-2>에서처럼 약물의 IND를 담당하는 국내 규제기관은 비의도적 노출의 화학물질에 응용되는 대조군과 유의성 기반 NOAEL, 반면에 미국 FDA 및 ICH는 adversity-기반 NOAEL 결정 방법을 사용함(USFDA, 2005). 대조군과 유의성 기반 NOAEL을 사용하면 용량-반응 곡선을 얻지 못하는 경우가 허다하여 임상시험에서 용량량 변화에 따른 예측

을 하지 못하는 치명적인 문제점을 가지고 있음. 반면에 adversity-기반 NOAEL 방법에서는 약물에 의한 변화가 존재하며 이 변화를 non-adverse effect와 adverse effect를 구분하여 non-adverse effect 영역을 NOAEL을 설정함. 따라서 용량 변화에 의한 임상 시험에서 변화에 대한 예측이 가능함(박영철, 2023)



<그림-2> 유의성-기반 NOAEL vs adversity-기반 NOAEL

- 이와 같이 비임상 독성시험에서 adversity-기반 NOAEL에서처럼 ‘Toxicity’이라는 용어를 사용하는 대신에 adversity 사용하는 이유는 임상시험에서 중간 차이에 의한 확실한 Toxicity이라고 판정하기 어렵고 reversibility의 존재하기 때문임. 특히 약물 자체가 정상적인 신체에서 반응을 유도하는 것은 당연하며 단지 그 반응이 acceptable change 또는 acceptable risk인가 하는 문제이기 때문임.
- 현재 우리나라의 규제기관은 유의성-기반 NOAEL을 응용하여 반복투여독성시험에서 반응과 무반응의 지점에 존재하는 이론적 NOAEL 지점의 용량 설정이 불가능. 이는 당연히 NOAEL 지점이 낮은 용량을 갈 수밖에 없고 MRSD의 축소에 의한 therapeutic range는 A → B로 좁아지게 됨. 이것이 오늘날 국내에서 신약 개발 어렵게 만드는 이유 중의 하나임.



<그림-3> NOAEL 설정 차이에 따른 therapeutic range의 차이

4) 결론

- 저는 독성학과 GLP 독성시험을 전공하면서 이 문제에 대해 심도있게 공부하였으며 비임상 영역에서 이와 같은 문제점을 많이 호소하였습니다. 그러나 IND를 담당하는 약대 교수님께서 심사에서, 그리고 약대 교육에서 반영을 하시지 않는다면 글로벌 스탠다드의 접근은 어렵습니다. 특히 약대 교수님께서 개발한 신약 후보에 대해 IND를 담당하는 약대 교수님들께서 개발에 허들을 제공하는 순환이 반복될 것으로 생각이 듭니다. 이것이 제가 성공적인 IND 보고서를 작성하는 가장 큰 이유이며 약대 교수님들께 호소하는 문제가 바로 이것입니다. 감사합니다.

<참고문헌>

- 박영철 (2023) 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7
- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7
- USFDA. (2005). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacology and Toxicology.

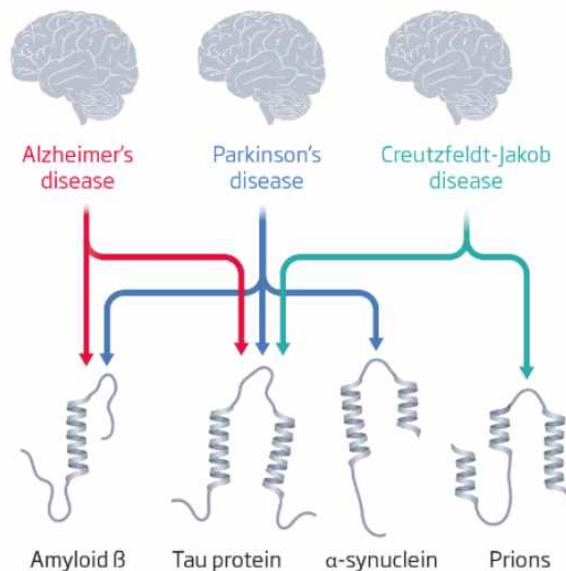
43. 알츠하이머 발병에 있어서 Beta-amyloid plaques 형성과 Tau protein의 신경섬유다발의 선행성 - 치료제 개발의 방향

1. 신경퇴행성질환의 원인별 misfold 단백질

- 신경퇴행성 단백질병증(neurodegenerative proteinopathies)의 가장 중요한 특징은 단백질 항상성(proteostasis)을 붕괴시키는 잘못접힘(misfold)의 응집체 형성이라는 점을 부정하지 않음(Coghlan 등, 2015; Sweeney 등, 2017; Basha 등, 2023).
- 단백질의 misfold에 의한 비정상적 불량단백질이 다양한 신경퇴행성질환을 유발하는 것으로 확인이 됨. <그림-1>과 같이 Alzheimer's disease(알츠하이머질환), Parkinson's disease(파킨슨병)와 Creutzfeldt-Jakob disease(크루츠펠트-야콥 질환) 등의 원인으로 misfold 단백질인 β -amyloid, tau protein, 그리고 α -synuclein(알파 시누클레인) 등이 있음(Coghlanm, 2015)
- 그러나 이들 질환 원인으로 misfold 단백질을 공유하기도 함. 예를 들어 파킨슨질환은 알츠하이머질환의 원인인 β -amyloid, tau protein와 공유하며, 그리고 크루츠펠트-야콥 질환은 파킨슨질환과 알츠하이머질환의 원인인 tau protein과 공유하는 것으로 알려짐.

Proteins gone rogue

Many kinds of misfolded protein plaques are implicated in different diseases, but they all have a structural kink called a canonical amyloid fold



<그림-1> 신경퇴행성질환의 원인별 misfold 단백질

2. 신경퇴행성질환에서의 단백질 misfold 원인과 Key issue.

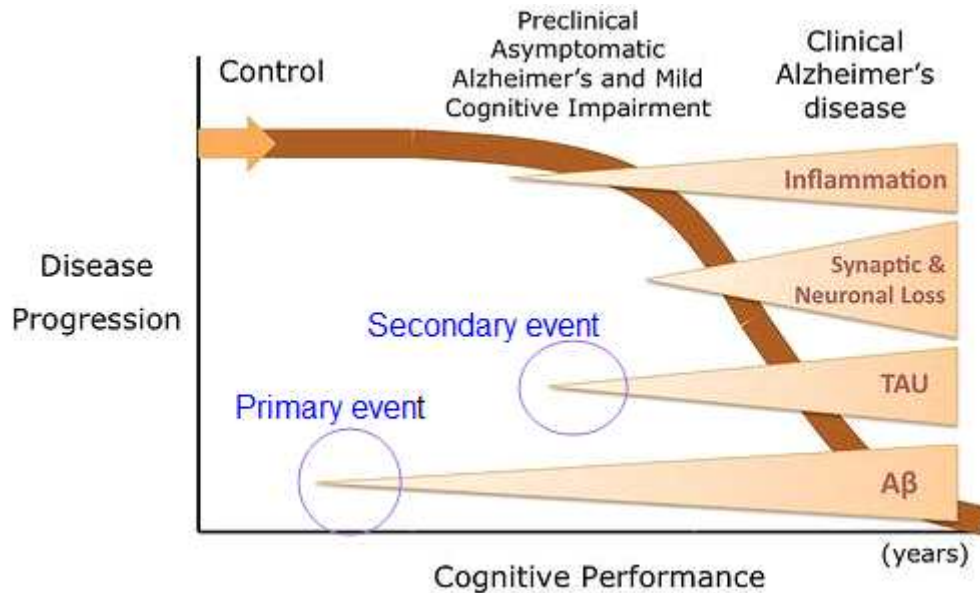
○ 알츠하이머질환, 파킨슨질환과 크루츠펠트-야콥 질환 등의 질환은 비가역성 치매 (irreversible dementia)를 유발하는 가장 중요한 요인임. 앞서 언급한 것처럼 이들 질환의 공통적인 특성은 단백질의 misfold에 의한 뇌 신경세포의 기능 저하 및 손상임. 따라서 단백질의 misfold에 대한 이해가 중요하며 예방 및 치료제 개발을 위한 다음과 같은 핵심 이슈(Key issue)에 대한 접근이 요구됨.

- ① 왜 정상적인 단백질에서 misfold가 발생하는가?
- ② Misfold는 언제 어디서 최초로 발생하는가?
- ③ Misfold 단백질은 뇌에서 molecule-to-molecule spreading(분자에서 분자로의 확산)과 cell-to-cell spreading(세포에서 세포로의 확산)이 어떻게 이루어지는가?
- ④ Misfold에 의한 인지 및 운동 기능의 저하를 유도하는 핵심 경로는 무엇인가?
- ⑤ Misfold에 의한 뇌 신경세포의 죽음을 초래하는 세포내 정상적인 과정(intracellular processes)을 어떻게 파괴하는가?

3. 알츠하이머 질환과 Key issue: Misfold는 언제 어디서 최초로 발생하는가?

3-1) 베타-아밀로이드 플라크(β -amyloid<A β > plaque)가 tau protein의 축적보다 선행

- 알츠하이머의 초기증상은 인지능력과 기억력의 감소가 대표적임. 최근까지 알츠하이머 질환의 진행에 있어서 가장 대표적인 원인인 베타-아밀로이드 플라크(β -amyloid<A β > plaque)가 tau protein의 축적보다 선행하는 것으로 이해되었음.
- <그림-2>에서처럼 알츠하이머의 초기 증상으로 대표되는 인지수행(cognitive performance)의 장애 유발에 있어서 가장 선행되는 요인으로 A β 플라크이며 그 다음으로 타우단백질(tau protein) 축적으로 진행된다는 것을 나타낸 것임.
- 따라서 근본적인 치료 방법이 없는 알츠하이머 질환의 예방 및 질환의 진행을 지연시키기 위해서는 뇌에서의 A β 플라크 생성의 신속한 확인임. 즉, 인지장애(cognitive impairment)의 선행 요인인 A β 플라크 확인이 최우선적 병리생화학적 바이오마크(path-biochemical biomarker)가 됨.



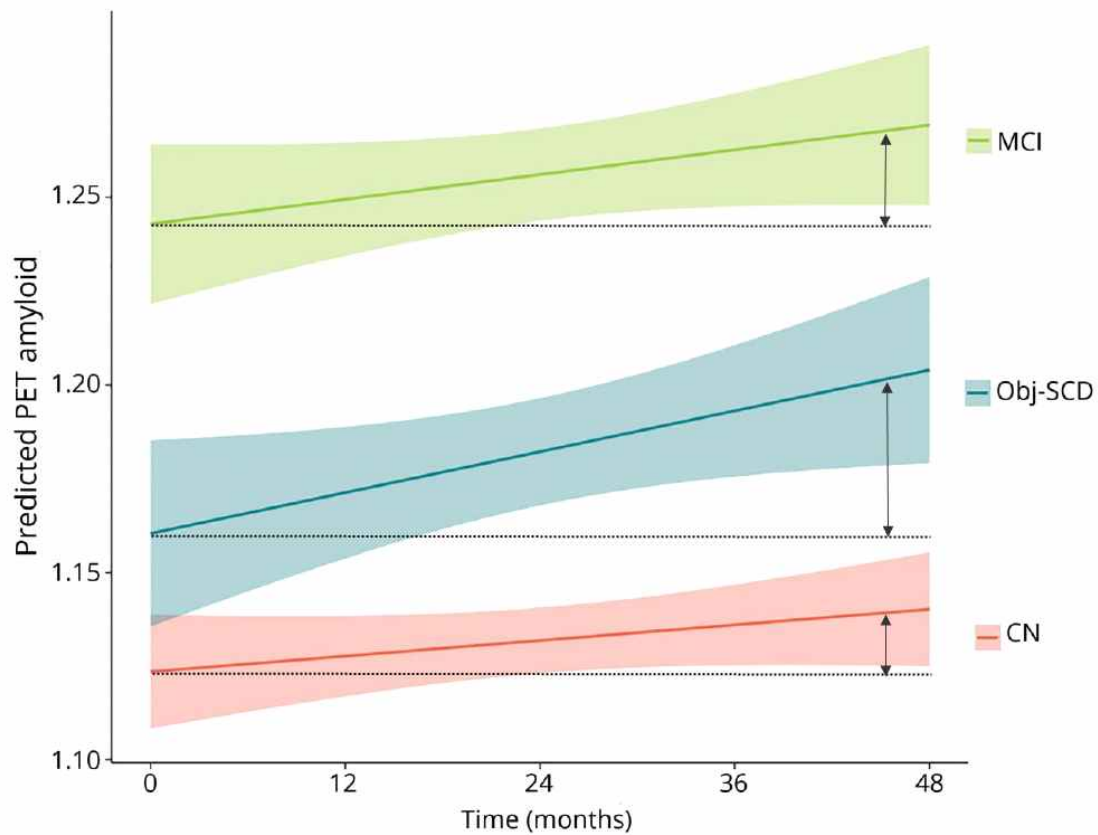
<그림-2> 알츠하이머 질환의 초기 증상인 인지장애의 발생에 있어서 선행요인
<<https://bigthink.com/the-brain-plaques-and-tangles-that-cause-alzheimers-disease>.
The Brain Plaques and Tangles That Cause Alzheimer's Disease>

3-2) Beta-amyloid plaques 형성 보다 타우단백질의 신경섬유다발의 선행성

- 베타-아밀로이드 베타(amyloid- β)는 신경세포의 세포자멸(apoptosis)을 수 시간 내에 유도하지만 타우단백질에 의한 신경섬유다발은 수년 또는 수십년 동안에 걸쳐 발생함. 특히 타우단백질의 과인산화는 베타-아밀로이드에 의한 아파토시스를 피하기 위한 신경세포의 방어기전으로 이해되고 있음.
- Beta-amyloid plaques 형성과 타우단백질의 신경섬유다발이 알츠하이머 질환의 주요 기전은 확실하지만, beta-amyloid plaques가 알츠하이머 질환의 선행인자라는 것에 대한 의문이 최신 연구에 의해 제시되었음. 뇌의 인지기능의 변화가 베타 아밀로이드 플라크의 형성보다 선행된 사실이 밝혀지며, 베타 아밀로이드가 알츠하이머의 원인이 아니라는 결론이 나온 것이다. Thomas 등(2020) 연구에 따르면 베타 아밀로이드 플라크가 생성 이전에 인지기능의 변화가 선행된다는 것이 확인되었음. 이는 베타 아밀로이드가 알츠하이머의 원인이 아니라는 것을 의미함.
- <그림-3>는 아밀로이드 축적과 신경퇴행과 관련하여 미세한 인지(기억력과 사고력) 어려움 가진 환자군(subtle cognitive difficulties, Obj-SCD)의 153명, Obj-SCD보다 정

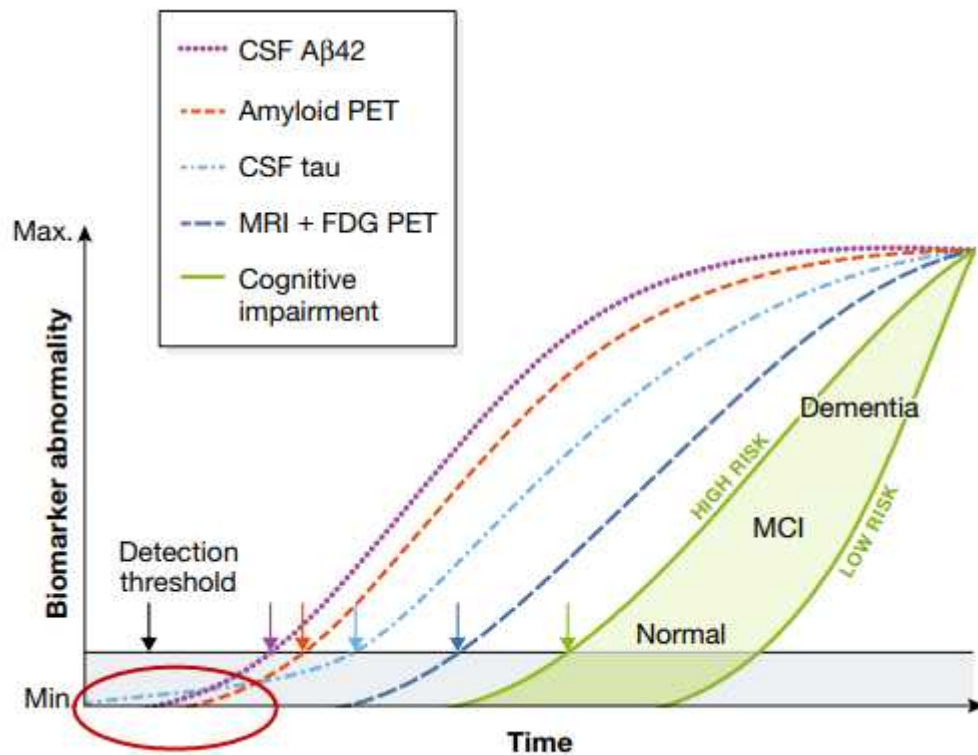
상인 환자군(CN=cognitively normal)의 305명, 그리고 경도인지장애(mild cognitive impairment, MCI)환자군의 289명 등 전체 747 알츠하이머 환자를 대상으로 4년 동안 1년마다의 베타 아밀로이드 플라크 수준을 양전자방출단층촬영(positron emission tomography, PET) 결과임.

- 미세한 인지(기억력과 사고력) 어려움을 가진 환자군(subtle cognitive difficulties, Obj-SCD)에서 Obj-SCD보다 정상인 환자군(CN=cognitively normal)보다 아밀로이드 축적이 빠르게 나타남(Figure 1 depicts the trajectories of amyloid PET by group and table 3 shows the model estimates. There was a significant interaction between cognitive group and time such that, relative to CN participants, participants with Obj-SCD had a faster increase in amyloid PET SUVR ($t[1109.08] = 2.58$, $p = 0.010$, $r = 0.077$). Participants with MCI did not differ from CN participants ($t[1133.51] = 1.13$, $p = 0.258$, $r = 0.034$) or participants with Obj-SCD($t[1173.95] = 1.59$, $p = 0.113$, $r = 0.046$) in the rate of amyloid accumulation over 48 months).
- 특히 뇌 부위 중 내후각피질(entorhinal cortex)도 훨씬 더 빠르게 얇아지는 것이 관찰되었다. 또한 경도인지장애(mild cognitive impairment, MCI)환자군에서 아밀로이드 축적은 양적인 측면에서는 많지만, 축적 속도는 정상인 환자군(CN=cognitively normal)보다 차이가 없었음. 즉 알츠하이머 환자군에서 인지능력이 정상인 사람에서보다 미세한 인지능력이 있는 환자군에서 아밀로이드 축적속도가 빠른 것으로 확인됨.



<그림-3> Trajectories of amyloid PET by cognitive group: Model-predicted values adjusted for age, education, sex, APOE $\epsilon 4$ allele frequency, and baseline amyloid PET summary standardized uptake value ratio. CN = cognitively normal; MCI = mild cognitive impairment; Obj-SCD = objectively defined subtle cognitive difficulties. Shaded area represents 95% confidence intervals (Thomas 등, 2020).

- 이전 연구에서도 <그림-4>의 붉은 원에서처럼 알츠하이머 환자 50명을 상대로 타우단백질과 A β 를 측정 한 결과, 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)에서 타우단백질(파란색 선)의 발생이 A β (자주색 선)를 선행한다는 것을 확인할 수 있음(Jack 등, 2013).



<그림-4> 알츠하이머 환자에서 선행 바이오마크: 붉은 원에서처럼 알츠하이머 환자 50명을 상대로 타우단백질과 A β 를 측정 한 결과, 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)에서 타우단백질(파란색 선)의 발생이 A β (자주색 선)를 선행한다는 것을 확인할 수 있다(Jack 등, 2013).

3-3) 알츠하이머 질환에 의한 초기 인지장애의 치료제 개발의 방향성

- 이는 알츠하이머 치매의 원인으로 베타 아밀로이드 단백질(beta-amyloid protein) 플라크와 타우 단백질(tau protein) 응집 중 베타 아밀로이드 플라크가 알츠하이머 치매의 원인이 아니라는 것을 의미함. 그 동안 베타 아밀로이드 플라크가 **알츠하이머 발병의 최초 원인**으로 표적을 삼아 개발된 수많은 알츠하이머 질환의 **초기 치료제 후보약물**들이 임상시험에서 실패하고 치료제가 없는 이유가 여기에 있는 것으로 추정됨. Thomas 등의 2020년 연구에서도 이와 같은 이유로 알츠하이머에 의한 **초기 치매 치료제 개발**을 위해 표적을 바꿔야 한다고 주장하였음, 이에 알츠하이머 원인 중 베타 아밀로이드 플라크보다 타우단백질 응집에 의한 **초기 인지장애의 초기 치료제 개발**에 있어서 더 연구가 집중할 것으로 예상될 수 있음(Zhang 등, 2024).

<참고문헌>

Coghlan, A. Universal plaque-busting drug could treat various brain diseases. LIFE 19 July 2015

Sweeney P, Park H, Baumann M, Dunlop J, Frydman J, Kopito R, McCampbell A, Leblanc G, Venkateswaran A, Nurmi A, Hodgson R. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. Transl Neurodegener. 2017 Mar 13;6:6.

Basha S, Mukunda DC, Rodrigues J, Gail D'Souza M, Gangadharan G, Pai AR, Mahato KK. A comprehensive review of protein misfolding disorders, underlying mechanism, clinical diagnosis, and therapeutic strategies. Ageing Res Rev. 2023 Sep;90:102017.

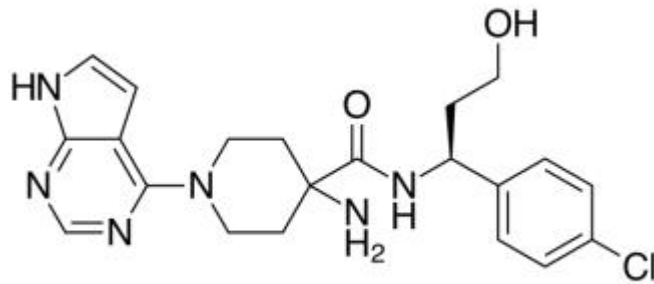
Jack CR, Holtzman DM (2013). Biomarker modeling of Alzheimer's disease. Neuron 80: 1347 – 1358.

Kelsey R. Thomas, Katherine J. Bangen, Alexandra J. Weigand, Emily C. Edmonds, Christina G. Wong, Shanna Cooper, Lisa Delano-Wood, Mark W. Bondi. Objective subtle cognitive difficulties predict future amyloid accumulation and neurodegeneration. Neurology, 2020;94:e1–e10.

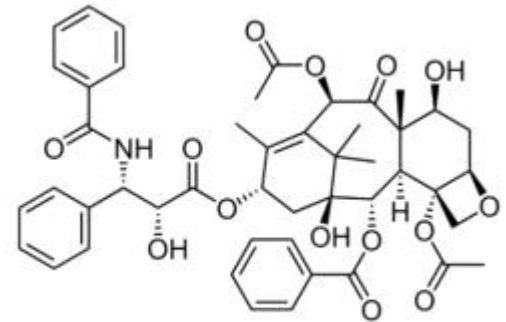
Xingyu Zhang et al., Tau in neurodegenerative diseases: molecular mechanisms, biomarkers, and therapeutic strategies. Translational Neurodegeneration (2024) 13:40

3. 최근 항암제 병용요법의 약리학적 및 독성학적 분석의 예시

- 아스트라제네카, 유방암 치료제 ‘티루캡’ 항암화학요법의 **티루캡·파클리탁셀 병용요법** 임상 실패(헬스조선 입력 2024.06.20.)
- 티루캡의 원물질 ‘capivasertib’ 파클리탁셀(paclitaxel) – Taxol



Capivasertib



Paclitaxel

① <1995년의 논문> Sonnichsen DS, Liu Q, Schuetz EG, Schuetz JD, Pappo A, Relling MV. Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. J Pharmacol Exp Ther. 1995 Nov;275(2):566–75. (원문:(Inhibitor experiments suggest that typical CYP3A substrates/inhibitors (e.g., cyclosporin, epipodophyllotoxins) may significantly interact with paclitaxel in vivo. CYP3A4 catalytic activity is important to overall paclitaxel metabolism in humans))

- 따라서 Paclitaxel은 CYP3A 특히 인체에서 CYP3A4의 기질임

② <2024년의 논문> Miller C, Sommovilla R, O'Bryant CL, Barve M, Dowlati A, Luke JJ, Khatun M, Morris T, Cullberg M. Pharmacokinetic study of capivasertib and the CYP3A4 substrate midazolam in patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol. 2024 Apr 20. doi: 10.1007/s00280-024-04667-3. (원문: This study evaluated the drug-drug interaction risk of capivasertib with the cytochrome P450 3A substrate midazolam in previously treated adults with advanced solid tumors. The up to 1.75-fold increase in midazolam exposure indicates capivasertib is a weak CYP3A inhibitor at 400 mg BID on an intermittent schedule)

- 인체 말기 고형암에서 진정제이면서 CYP3A4의 기질인 midazolam과 capivasertib의 병용 투여에 의해 midazolam이 혈중농도가 1.75배 증가. 따라서 capivasertib은 CYP3A inhibitor(저해제)

③ <2020년의 논문> Schmid P, Abraham J, Chan S, Wheatley D, Brunt AM, Nemsadze G, Baird RD, Park YH, Hall PS, Perren T, Stein RC, Mangel L, Ferrero JM, Phillips M, Conibear J, Cortes J, Foxley A, de Bruin EC, McEwen R, Stetson D, Dougherty B, Sarker SJ, Prendergast A, McLaughlin-Callan M, Burgess M, Lawrence C, Cartwright H, Mousa K, Turner NC. Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. J Clin Oncol. 2020 Feb 10;38(5):423-433.

- Table 3은 Capivasertib+Paclitaxel 병용투여의 제2상임상시험에서 여러 adverse effect 빈도 및 유의성 검증을 나타낸 것임. 가장 높은 빈도로 나타나는 Diarrhea와 Rash에서 유의한 증가는 국소적으로는 장내 그리고 전신적으로는 심혈관계에서 Paclitaxel 농도가 병용투여에 의해 더 높은 농도에 기인하는 것으로 추정됨.
- 이와 같은 결론은 CYP3A 또는 CYP3A4의 기질인 Paclitaxel이 CYP3A 또는 CYP3A4의 활성 저해제인 Capivasertib의 약물상호작용에 의해 대사가 되지 않아 농도 증가에 기인하는 추정됨

TABLE 3. AEs Occurring in $\geq 8\%$ of Patients in ≥ 1 Treatment Group

AE	No. (%) ^a					
	Paclitaxel + Capivasertib (n = 68)		Paclitaxel + Placebo (n = 70)		P†	
	All Grades	Grade 3/4	All Grades	Grade 3/4	All Grades	Grade 3/4
Patients with ≥ 1 AE	66 (97.1)	37 (54.4)	64 (91.4)	18 (25.7)	0.27	< 0.01
Diarrhea	49 (72.1)	9 (13.2)	19 (27.1)	1 (1.4)	< 0.01	< 0.01
Fatigue	30 (44.1)	3 (4.4%)	18 (25.7)	0	0.03	0.12
Nausea	24 (35.3)	1 (1.5)	23 (32.9)	0	0.86	0.49
Rash	28 (41.2)	3 (4.4)	11 (15.7)	0	< 0.01	0.12
Neuropathy	17 (25.0)	1 (1.5)	13 (18.6)	0	0.41	0.49
Stomatitis	18 (26.5)	1 (1.5)	10 (14.3)	0	0.09	0.49
Infection	15 (22.1)	3 (4.4)	10 (14.3)	1 (1.4)	0.27	0.36
Decreased appetite	14 (20.6)	0	8 (11.4)	0	0.17	1.00
Alopecia	11 (16.2)	0	9 (12.9)	0	0.63	1.00
Vomiting	13 (19.1)	1 (1.5)	6 (8.6)	1 (1.4)	0.09	1.00
Constipation	5 (7.4)	0	10 (14.3)	0	0.27	1.00
Abdominal pain	7 (10.3)	0	7 (10.0)	0	1.00	1.00
Dry skin	10 (14.7)	0	2 (2.9)	0	0.02	1.00
Dyspnoea	6 (8.8)	0	5 (7.1)	0	0.76	1.00
Headache	8 (11.8)	0	3 (4.3)	0	0.13	1.00
Edema	6 (8.8)	0	4 (5.7)	0	0.53	1.00
Dysgeusia	7 (10.3)	0	3 (4.3)	0	0.20	1.00
Joint pain	2 (2.9)	0	6 (8.6)	0	0.27	1.00
Neutropenia	6 (8.8)	2 (2.9)	2 (2.9)	2 (2.9)	0.16	1.00
Cough	1 (1.5)	0	6 (8.6)	0	0.12	1.00
Hyperglycemia	6 (8.8)	1 (1.5)	1 (1.4)	0	0.06	0.49

NOTE: Worst toxicity for each patient during the entire treatment is reported. AE instances with missing grade are not included in table.

Abbreviation: AE, adverse event.

^aAll percentages are based on the total No. of patients in that arm who received ≥ 1 dose of the study drug, with patients analyzed according to the treatment they actually received (safety population).

†P values are 2-sided.

44. 유한양행 비소세포폐암치료제 렉라자의 독성학적 성공 요인에 대한 고찰

- 유한양행의 비소세포폐암치료제 ‘렉라자(LECLAZA®)’의 성분명은 레이저티닙(Lazertinib)
- Lazertinib은 epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI)
- 수많은 허들이 존재하였을 것으로 생각되지만, 다음과 같이 여러 가지 측면에서 성공이 가능하였을 것으로 단순히 추정됨.

1) 돌연변이형 EGFR-TKI에 대한 높은 선택성: Wild type의 EGFR-TKI에 대한 낮은 결합은 암세포의 성장 억제라는 정상적 작용에는 미미한(sparing) 영향이며 돌연변이형 EGFR-TKI에 대한 선택적 결합으로 암세포의 성장 억제(Lim, 2021; Dhillon, 2021)

2) 뇌혈관-장벽(brain-blood barrier, BBB)의 투과성: Lazertinib은 비소세포암의 폐에 대한 표적치료제를 넘어 뇌혈관장벽 투과를 통해 전이성 암에 대한 항암 효능(Lee 등, 2023).

3) 안전성약리학적 치명성의 낮음: 대부분 항암제는 부작용을 가지고 있으며 특히 심혈관계, 호흡계, 신경계 등에 대한 치명성이 문제가 됨. 그러나 Lazertinib은 심독성과 관련된 QTc 연장, 좌심실 구출율 감소 등과 같은 심혈관계에 대한 영향이 낮음(USFDA HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION, 2024)

4) 암세포의 다약제 내성(multiple drug resistance, MDR)에 대한 개선력: 일반적으로 암세포는 일정 기간의 약물 투여 후 구조적 및 기전적 유사한 약물에 대한 반응이 감소하는 MDR를 나타냄(Gottesman 등, 2016). 암세포 다약제 내성의 기전에는 여러 기전이 있지만 ATP-binding cassette drug efflux transporters(ABC 약물-배출 운반체)인 ABCB1와 ABCG2 등의 과다 발현임. 최근 연구에 따르면 Figure 7에서처럼 Lazertinib가 약물 세포 외 능동 운반체인 ABCB1와 ABCG2의 ATP-binding site에 결합 및 활성을 저해하여 다약제 내성을 개선하는 것으로 확인되었음(Fan 등, 2022).

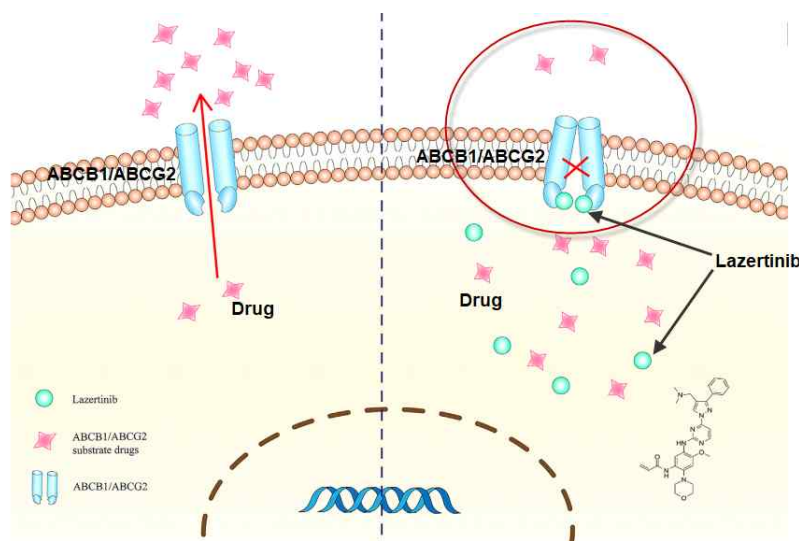


Figure 7. A schematic diagram illustrating the proposed mechanism contributing to MDR reversal by lazertinib
Left: In the absence of MDR inhibitor, ABCB1/ABCG2 substrate anticancer drugs are effectively pumped out of MDR cells, leading to low intracellular drug concentration and resistance. Right: Lazertinib inhibits the drug efflux function of ABCB1/ABCG2 to increase drug accumulation in MDR cells and circumvent drug resistance.

5) Lazertinib의 MOA(mechanism of action, 작용기전)는 soft electrophilic metabolite(경친성대사체)로 전환되는 small molecule

- Lazertinib의 돌연변이형 EGFR-TKI에 대한 결합은 비가역성(irreversible)이라고 알려짐. 이와 같은 비가역성은 Figure 3의 노란 부분처럼 T790M/V948R 돌연변이형 EGFR-TKI와 hydrogen bonds와 van der Waals 등을 통해 선택적 결합이 이루어짐(Heppner 등, 2022).

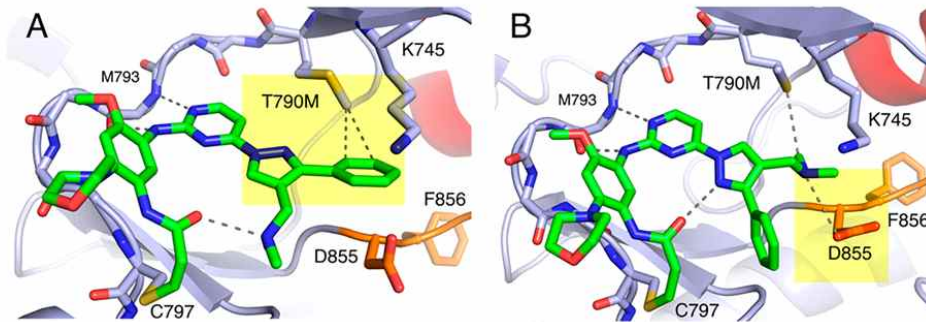
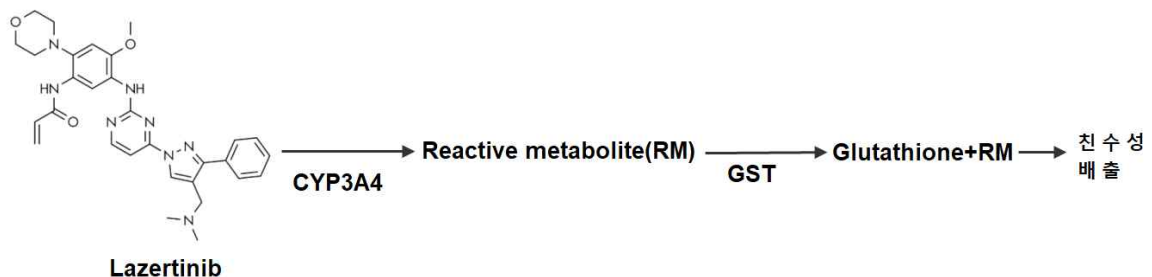


Figure 3. Lazertinib bound to inactive EGFR(T790M/V948R) with distinct conformations. (A) Lazertinib bound with phenyl ring anchored within van der Waals distance to the T790M methionine (~3.8 Å) and methane amine involved in intramolecular H-bonding. (B) A "flipped" conformation with outward phenyl and methyleneamine donating an H-bond to D855. Other interactions seen in this structure include an intramolecular dipole-dipole pyrazole to carbonyl (3.2 Å) as well as a van der Waals methyleneamine methyl to thioether (3.8 Å). P-loop cartoon removed for clarity. (PDB ID 7UKW).

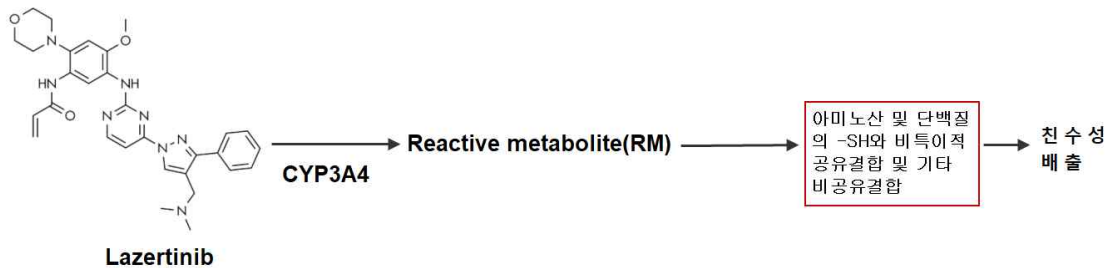
- Lazertinib의 체외 배출을 위한 대사는 HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION(USFDA, 2024)에서처럼 효소 및 비효소적 대사된다고 함<Metabolism: Lazertinib is primarily metabolized by glutathione conjugation, either enzymatic via glutathione S-transferase(GST) or non-enzymatic, as well as by CYP3A4>.

① 효소에 의한 대사: 제1상반응의 효소는 CYP3A4이며 제2상반응의 효소는 Glutathione-S-Transferase로 최종적으로 아래의 <그림-1>과 친수성 대사체로 전환되어 체외 배출되는 것으로 추정됨



<그림-1> Lazertinib의 enzymatic metabolism을 통한 체외 배출 추정 경로

② 비효소적 대사: <그림-2>에서처럼 제1상반응의 효소는 CYP3A4에 의해 생성된 Lazertinib의 Reactive metabolite는 친전자성으로 비특이적 단백질 및 아미노산의 친핵성 부위인 -SH와 결합하여 단백질 및 아미노산의 분해에 의한 체외 배출로 추정됨. 이와 같은 비효소적 대사 경로에 의해 Lazertinib의 평균 반감기가 3.7 days(USFDA, 2024)로 긴 것으로 추정됨.

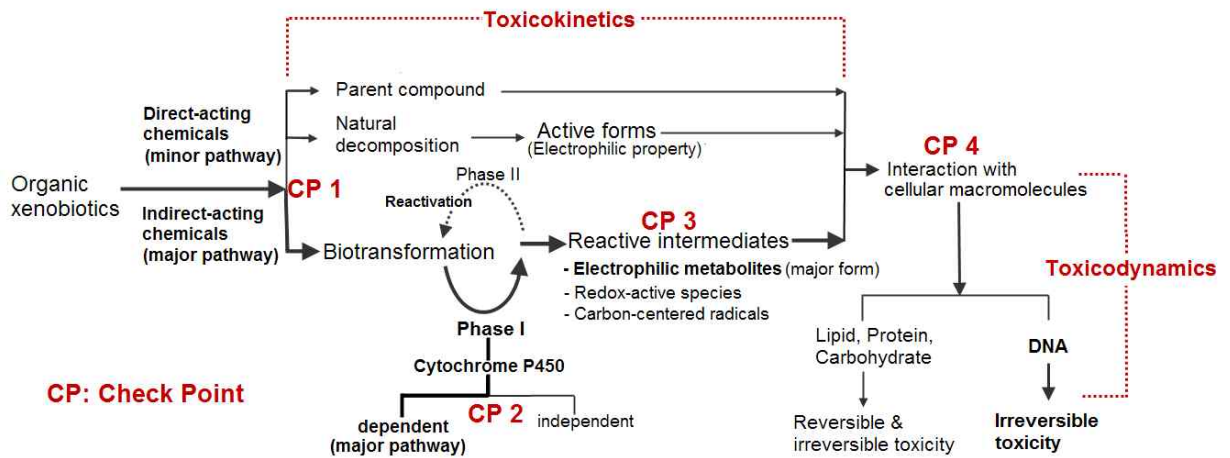


<그림-2> Lazertinib의 enzymatic metabolism을 통한 체외 배출 추정 경로

6) 독성학적 성공 요인에 대한 결론

① Lazertinib의 독성: 아래 <그림-3>의 CP 3와 같이 과잉약리작용보다 cytochrome P450에 의해 원물질의 reactive intermediates(metabolites) 생성에 기인하는 것으로 추정됨(박영철, 2011). 특히 reactive intermediates(metabolites)의 3 종류 중 electrophilic metabolite(친전자성 대사체)로 추정됨

② Lazertinib이 병용요법의 최적 조건이 hard electrophilic metabolite(중 친전자성 대사체)가 아니라 soft electrophilic metabolite(경친전자성 대사체)이라는 점: <표>에서처럼 hard electrophilic metabolite인 경우에는 DNA의 친핵성 염기 결합으로 돌연변이 및 또 다른 발암으로 연결되지만 반면에 soft electrophilic metabolite은 단백질 및 아미노산 등의 -SH에 결합하여 돌연변이 이외의 독성이 유발됨. 따라서 Lazertinib에 의한 부작용은 대부분은 단백질 및 아미노산 등과의 결합을 통해 유도되는 것으로 추정됨(LoPachin 등, 2005; 박영철, 2010). 이는 toxicity-benefit 분석을 기반한 적절한 개발의 방향이라고 추정됨



<그림-3> 유기화합물의 독성기전에 대한 Central dogma

<표-2> Hard 및 Soft Electrophiles과 Hard 및 Soft Nucleophiles의 종류

Electrophiles

Hard:

Alkyl carbonium ions, Benzylic carbonium ions

Soft:

Acrylamide, Acrolein, Acrylonitrile, Quinone

Nucleophiles

Hard:

Oxygen atoms of purine/pyrimidine bases in DNA
Endocyclic nitrogens of purine bases in DNA
Oxygen atoms of protein serine and threonine residues

Soft:

Protein thiol groups
Sulfhydryl groups of glutathione
Primary/secondary amino groups of protein lysine and histidine residues

7) 독성학적 측면에서 의미와 향후 개발 방향

- **식약처의 능력: Lazertinib가** 항암제가 첫 번째로 USFDA의 승인이 되었고 2021년 이미 우리나라에서 승인되었다는 것은 식약처의 승리이기도 함.
- **대장암의 병용요법의 잠재성:** Lazertinib가 경구 투여용이며 soft electrophilic metabolite(경전전자성 대사체)라는 점은 대장암의 항암제와 병용치료제 개발로의 가능성이 높음, CYP3A4는 장에 가장 많은 cytochrome p450이며 비흡수적 Lazertinib의 CYP3A4에 의한 soft electrophilic metabolite 생성은 대장암세포의 대사적 장애 등의 암세포에 영향을 통해 원 항암제의 효능에 대한 시너지 효과를 유도할 것으로 추정됨,

<참고문헌>

- Heppner DE, Wittlinger F, Beyett TS, Shaurova T, Urul DA, Buckley B, Pham CD, Schaeffner IK, Yang B, Ogboo BC, May EW, Schaefer EM, Eck MJ, Laufer SA, Hershberger PA. Structural Basis for Inhibition of Mutant EGFR with Lazertinib (YH25448). ACS Med Chem Lett. 2022 Nov 10;13(12):1856–1863.
- Lee B, Ji W, Lee JC, Song SY, Shin YS, Cho YH, Park JE, Park H, Choi CM. Efficacy of lazertinib for symptomatic or asymptomatic brain metastases in treatment-naïve patients with advanced EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer: Protocol of an open-label, single-arm phase II trial. Thorac Cancer. 2023 Aug;14(22):2233–2237.
- Fan Y, Tao T, Guo Z, Wah To KK, Chen D, Wu S, Yang C, Li J, Luo M, Wang F, Fu L. Lazertinib improves the efficacy of chemotherapeutic drugs in ABCB1 or ABCG2 overexpression cancer cells in vitro, in vivo, and ex vivo. Mol Ther Oncolytics. 2022 Feb 16;24:636–649.
- Gottesman, M.M., Lavi, O., Hall, M.D., and Gillet, J.P. (2016). Toward a better understanding of the complexity of cancer drug resistance. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56, 85–102.
- USFDA HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. LAZCLUZE™ (lazertinib) tablets, for oral use Initial U.S. Approval: 2024
- Lim J-Y. Yuhan's lung cancer treatment lazertinib wins approval [media release]. 18 Jan 2021.
- Dhillon S. Lazertinib: First Approval. Drugs. 2021 Jun;81(9):1107–1113.
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Kim B, Lee J, Jang H, Lee N, Mehta J, Jang SB. Effects of Acid-Reducing Agents on the Pharmacokinetics of Lazertinib in Patients with EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. Adv Ther. 2022 Oct;39(10):4757–4771.
- LoPachin, Richard M., Anthony P. DeCaprio., Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity, 2005, TOXICOLOGICAL SCIENCES, 2005, 86(2), 214–225.

45. 항암제 병용요법의 성공을 위한 비교 분석 및 독성학적 check point

- 아래의 <표>와 같이 두 항암제의 병용요법에 대한 비교분석을 통해 병용요법의 방향성을 추정하였음

	적응증 및 원래의 치료제	병용요법의 치료제	임상결과
아스트라제네카	<ul style="list-style-type: none"> • 유방암 치료제 • 티루캡(Capivasertib) 	<ul style="list-style-type: none"> • Paclitaxel 	<ul style="list-style-type: none"> • 실패 (2024년 6월)
유한양행	<ul style="list-style-type: none"> • 비소세포폐암치료 • Amivantamab 	<ul style="list-style-type: none"> • Lazertinib 	<ul style="list-style-type: none"> • 성공 (2024년 8월)

1) Check point-1: Anticancer drug vs Anticancer prodrug

- Anticancer drug(항암제): 원물질(parent compound) 자체가 암세포를 공격하여 항암 효능을 나타내는 기전을 가진 small molecule
- Anticancer prodrug(항암전구약물): 원물질 자체가 항암효능을 나타내는 것이 아니라 생체 내에서 자연분해 또는 cytochrome P450에 의해 대사 후 대사체가 항암 효능을 나타내는 기전을 가진 항암제
- <그림>은 Anticancer drug와 Anticancer prodrug가 cytochrome P450의 CYP3A4에 의해 대사되어 전자는 항암 효능을 상실하여 체외로 배출되고 후자는 대사되어 항암 효능을 발휘함(Wang 등, 2023)

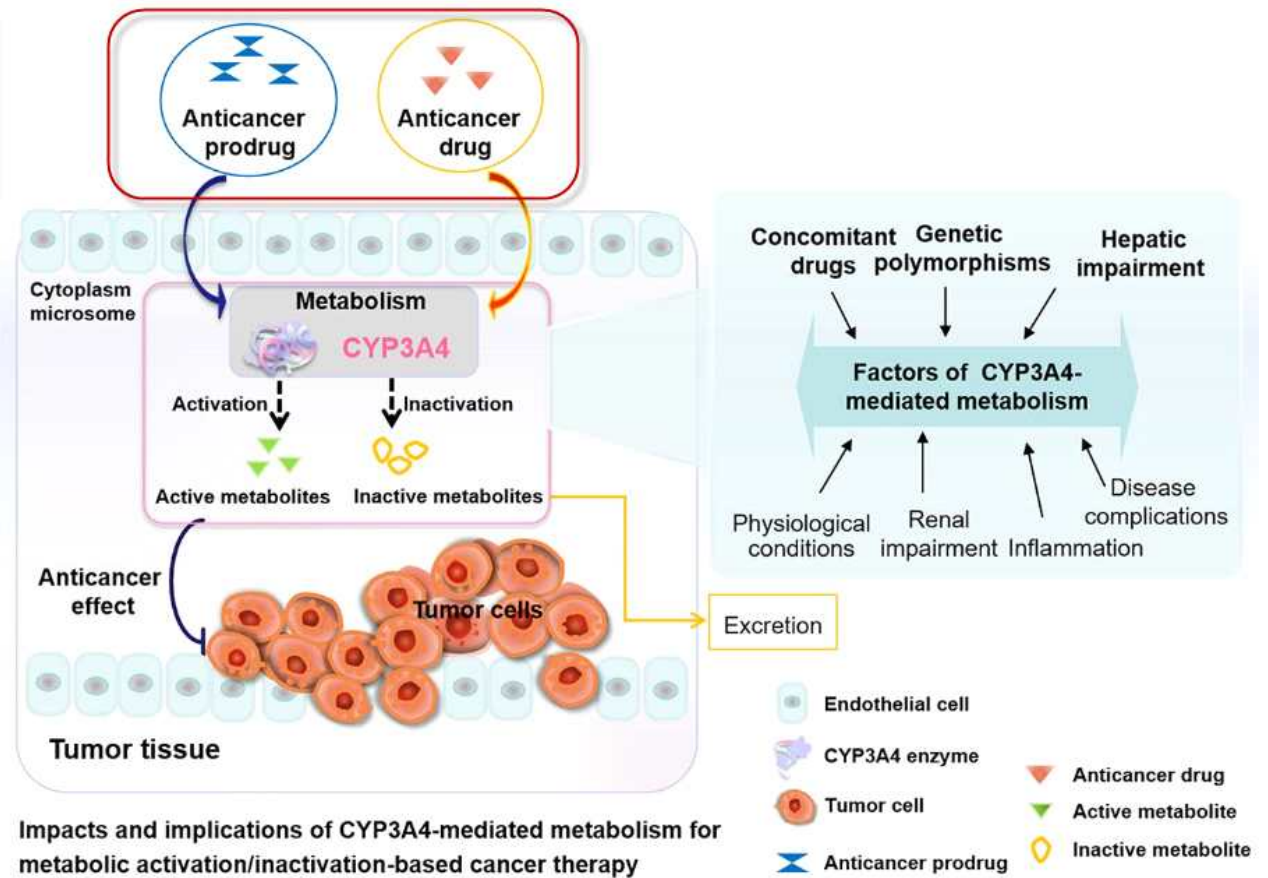


Fig. 1. Schematic diagram of the main factors affecting the activity, expression, and function of CYP3A4 in the regulation of CYP3A4-mediated drug metabolism in tumor tissue. ↑ indicates increase; ↓ indicates decrease.

- 아스트라제네카의 Paclitaxel 및 유한양행의 lazertinib 등 모두 대사 전에 항암 효능을 나타내고 CYP3A4에 의해 독성대사체로 전환 그리고, 제2상반응의 glutathione 포함반응으로 체외 배출됨

	• Anticancer drug(항암제)	• Anticancer prodrug(항암전구약물)
아스트라제네카	Paclitaxel	
유한양행	Lazertinib	

2) Check point-2: 항암기전과 표적에 대한 차이

- 일반적으로 항암제는 항암기전은 다음과 같이 3가지 기전으로 요약됨
 - ① Cytotoxic drug: 특정 표적이 없이 암세포를 사멸 또는 괴사시키는 기전
 - ② Targeted drugs: 암세포의 항원, 돌연변이 유전자 및 발현 단백질을 표적으로 암세포 증식 억제 기전
 - ③ Hormonal drugs: 길항작용 호르몬 주입으로 암의 성장을 정지시키는 기전
- 다음의 <표>에서처럼 Paclitaxel은 세포주기와 관련된 정상적인 신호전달체계의 단백질을 표적으로 하였으며 반면에 유한양행의 lazertinib은 세포주기와 관련된 돌연변이형 단백질을 표적의 기전인 항암제. 이와 같은 차이는 부작용 < 효능 또는 부작용 > 효능을 결정하는 요인임.

	병용요법 약물	Targeted drug의 기전 및 Target
아스트로제네카	Paclitaxel	• 전사인자 E2F의 활성 억제
유한양행	lazertinib	• 돌연변이형 EGFR-TKI에 대한 선택적 결합

3) Check point-3: Alkylating agent 유무

- Alkylating agent란 DAN에 직접 결합하여 구조 손상을 통해 암세포를 사멸시키는 기전으로 하는 물질

	병용요법 약물	Alkylating agent - 돌연변이 유무
아스트로제네카	Paclitaxel	• DNA-상해 유도하며 암세포는 DNA-repair 시스템을 발현시켜 항암제 내성 유도(Ayoola 등, 2024)
유한양행	lazertinib	• 돌연변이를 유발하지 않음(USFDA, 2024)

- 항암제의 Alkylating agent 유무는 cytochrome P450에 의해 대사 후 생성된 친전자성 대사체(electrophilic metabolite)의 입자 밀집도에 의해 DNA의 친핵성 부위 또는 단백질의 친핵성 부위에 결정됨. 다음의 <표>에서처럼 입자 밀집도가 높은 친전자성 대사체를 중 친전자성 대사체(hard electrophilic metabolite), 입자 밀집도가 낮은 친전자성 대사체를 경 친전자성 대사체(soft electrophilic metabolite)이라고 함. 이와 같은 중 및 경 친전자성 대사체의 차이는 공유결합의 강도를 결정하여 강한 친핵성을 띠는 DNA 염기 및 약한 친핵성을 띠는 단백질의 친핵성 부위에 결합하는 차이를 가져옴. 이와 같은 결과로 중 친전자성대사체는 더욱 강한 독성을 유발하며 경 친전자성 대사체는 다소 약한 독성을 유발하게 됨(LoPachin 등, 2005; 박영철, 2010).

<표> Hard 및 Soft Electrophiles과 Hard 및 Soft Nucleophiles의 종류

Electrophiles	
Hard:	Alkyl carbonium ions, Benzylic carbonium ions
Soft:	Acrylamide, Acrolein, Acrylonitrile, Quinone
Nucleophiles	
Hard:	Oxygen atoms of purine/pyrimidine bases in DNA Endocyclic nitrogens of purine bases in DNA Oxygen atoms of protein serine and threonine residues
Soft:	Protein thiol groups Sulfhydryl groups of glutathione Primary/secondary amino groups of protein lysine and histidine residues

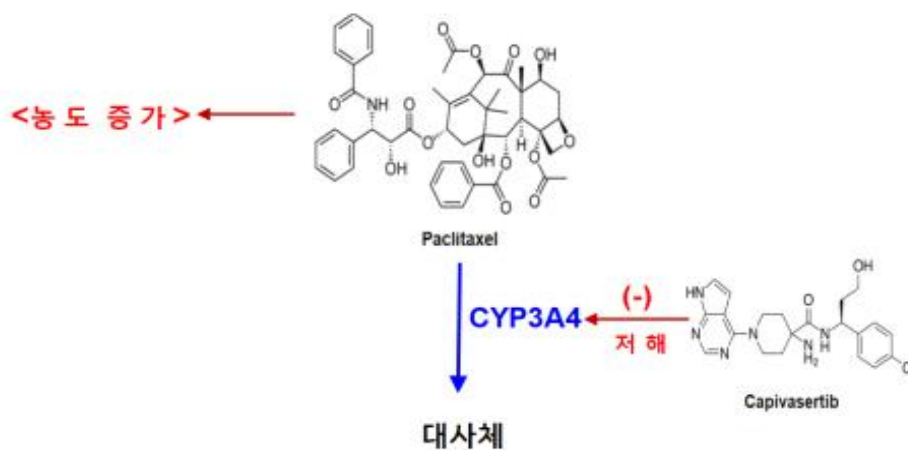
- 아래의 <표>에서처럼 Paclitaxel의 Hard이며 lazertinib는 Soft electrophilic metabolite임. 이는 결과적으로 독성 강도의 차이를 유발하는 것으로 추정됨

	병용요법 약물	Electrophilic metabolite 종류
아스트로제네카	Paclitaxel	Hard
유한양행	lazertinib	Soft

4) Check point-4: 약물상호작용(Drug-Drug interaction, DDI)

- 병용요법의 독성과 관련하여 중요한 요소가 약물상호작용(Drug-Drug interaction, DDI)임

① 아스트라제네카의 티루캡(Capivasertib)과 병용요법의 파클리탁셀의 약물상호작용: 티루캡(Capivasertib)에 Paclitaxel의 추가에 의한 약물 상호작용은 다음과 같은 <그림>과 같은 기전으로 CYP3A4에 대한 기질 및 저해물질로 상호작용하여 환자의 개인차에 따라 상당히 차이의 독성 및 효능을 유도함.



<그림> 병용요법의 파클리탁셀이 Capivasertib의 CYP3A4 저해를 통한 약물작용기전

② 유한양행의 lazertinib과 amivantamab와 병용요법: 병용요법의 대상인 Amivantamab은 이중항체이므로 영양물질과 같은 과정을 통해 대사됨으로 적어도 lazertinib과의 biotransformation 측면에서 약물상호작용에 의한 부작용 없음.

5) 결론

- 항암제의 병용요법으로 적절한 항암제는 다음과 같이 요약됨.
- ① Soft electrophilic metabolite의 drug 또는 prodrug
 - ② DDI를 유발하는 약물 사용의 억제
 - ③ 가능한 biologics + small molecule 유형의 병용요법 또는 ADC(antibody-drug conjugate)

<참고문헌>

- Wang F, Zhang X, Wang Y, Chen Y, Lu H, Meng X, Ye X, Chen W. Activation/Inactivation of Anticancer Drugs by CYP3A4: Influencing Factors for Personalized Cancer Therapy. Drug Metab Dispos. 2023 May;51(5):543–559.
- Ayoola O. Awosika; Maela C. Farrar; Tibb F. Jacobs. Paclitaxel. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024
- USFDA HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. LAZCLUZE™ (lazertinib) tablets, for oral use Initial U.S. Approval: 2024
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Kim B, Lee J, Jang H, Lee N, Mehta J, Jang SB. Effects of Acid-Reducing Agents on the Pharmacokinetics of Lazertinib in Patients with EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. Adv Ther. 2022 Oct;39(10):4757–4771.
- LoPachin, Richard M., Anthony P. DeCaprio., Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity, 2005, TOXICOLOGICAL SCIENCES, 2005, 86(2), 214–225.

46. IADR에 의한 신약 개발의 실패 예방을 위한 투여용량에 대한 이해

1) 제약 시장에서 철수되는 가장 중요한 요인

- NDA(new drug approval) 후 시장에서 철수되거나 경고표지(Black Box Warning, BBW)은 IADR(idiosyncratic adverse drug response, 개체-특이적 약물이상반응)을 기인함.
- IADR은 <표 1-4>에서처럼 개체의 유전적 차이에 기인하여 임상에서 발생하는 독성이기 때문에 유전적 동질성을 가진 동물을 대상으로 가이드라인에 따른 독성시험으로 확인하기에는 불가능함 (박영철, 2019; 박영철 2023)
- 이에 환자 투약에서 발생하는 IADR 예측을 비임상연구에서 할 수 있다면 신약 개발 성공을 높이는 요인 중의 하나임.

<표 1-4> 가이드라인 독성시험과 관련하여 본질적 독성과 개체-특이적 독성의 차이점

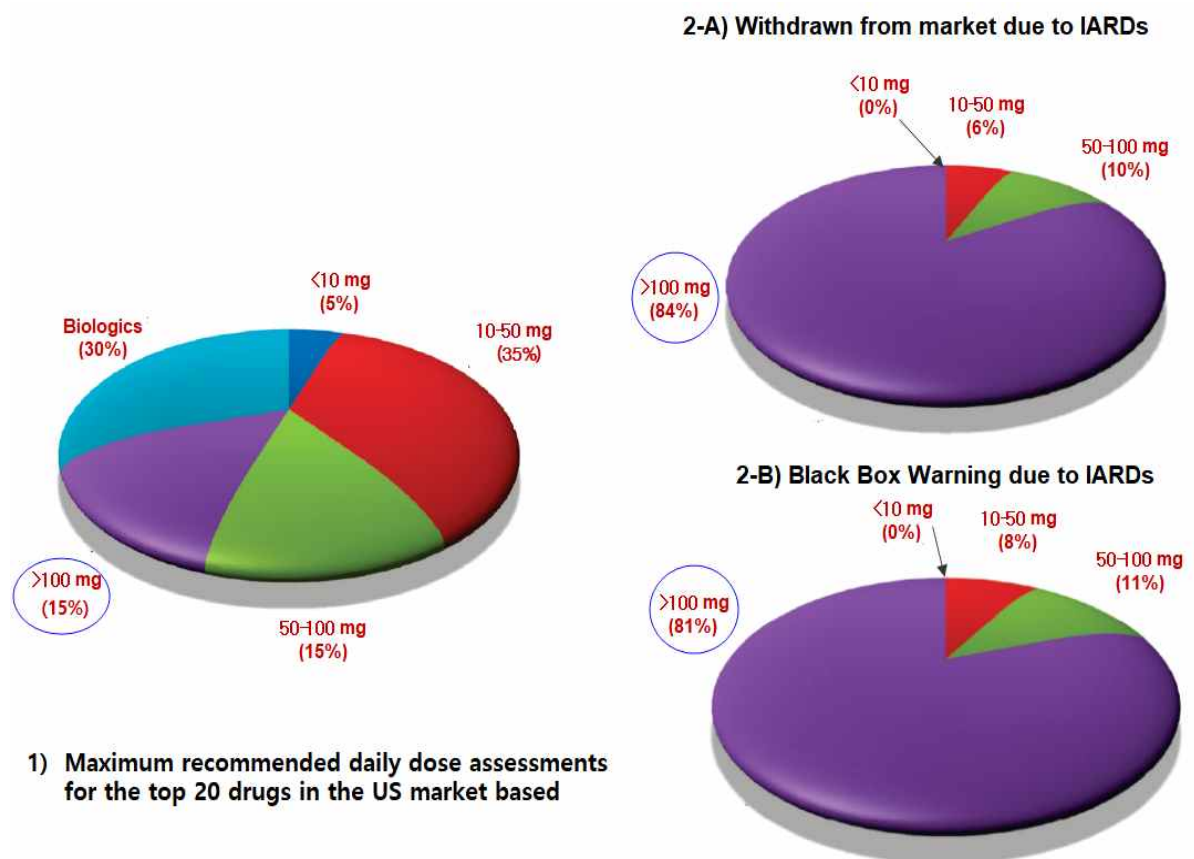
영향의 특성	Intrinsic toxicity (본질적 독성)	Idiosyncratic toxicity (개체-특이적 독성)
개체 vs 개체군	• 특정 용량에서 모든 개체의 개체군에 영향	• 유전적 차이에 의한 감수성이 있는 개체에만 영향
용량-의존성	• 확실한 용량-의존성 영향	• 모호한 용량-의존성 영향
잠복기	• 노출 후 독성의 발생까지 잠복기에 대한 예측 가능	• 노출 후 독성의 발생에 대한 예측 불가능
병리학적 형태	• 표적기관독성의 확실한 병리학적 특징	• 표적기관독성에 대한 병리학적 특성이 불명확함
가이드라인 독성 시험과의 관계	• 가이드라인 독성시험의 주요 목적	• 가이드라인 독성시험으로 확인이 불가능함

2) IADR(idiosyncratic adverse drug response, 개체-특이적 약물이상반응)의 원인

- IADR의 발생에 대한 원인은 약물 자체적 특성으로는 ① Cytochrome P450에 의한 reactive metabolite로의 전환(Uetrecht 등, 2022), ② 투여용량(Stepan 등, 2011), 환자 측면에서는 ③ 다양한 유전적 변이(Genetic variants: human leukocyte antigens, T cell receptor, drug-metabolizing enzymes 그리고 drug-transporter; Wang 등, 2022)임.

3) 투여용량에 의한 IADR 발생률

- 아래의 <그림-1> 미국의 제약산업에서 가장 많이 사용되는 약물(그림에서 1)과 환자 또는 투약을 한 집단에서 IADR에 기인하여 시장에서 철수되거나 경고표지(Black Box Warning, BBW)를 받은 약물(그림에서 2-A와 2-B)임(Stepan 등, 2011).
- 비교 대상은 <그림-1>에서 파란 원의 1일 최대투여용량이 >100 mg. 즉 100 mg 이상임. 미국에서 Top 20 약물은 >100 mg 투여용량이 15%를 차지하지만 IADR에 기인하여 시장에서 철수되거나 경고표지를 붙은 약물에서는 80% 이상의 약물임.



<그림-1> 제약산업에서 Top 20 약물과 IADR-유도한 약물의 투여용량 비교

4) 투여용량 측면에서 IADR을 예측하는 비임상 연구에서 용량 예측

① MRSD 산출 방법

- <표-1>과 <표 11-5>는 반복투여독성시험에서 추정된 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대비독성용량)을 이용하여 임상시험에서 1일 투여용량인 MRSD(maximum recommended starting dose, 최대권장초기용량)를 산출하는 공식을 나타낸 것임(박영철, 2023)

<표-1> MRSD 산출방법

- $MRSD = HED / SF(10)$
- $HED(\text{Human equivalent dose: 종간 차이에 대한 안전계수인 동물-인체등가용량}) = NOAEL \times (\text{Animal Km}/\text{Human Km})$
- $SF(\text{Safety Factor}):$ 종내 감수성 차이에 대한 안전계수

<표 11-5> 체표면적 기준으로 동물용량을 HED로 전환하는 Km 계수

종(species)	표준 체중 (kg)	적용 체중 범위	체표면적 (m ²)	Km
성인	60	-	1.62	37
어린이	20	-	0.80	25
마우스	0.02	0.011-0.34	0.007	3
햄스터	0.08	0.047-0.157	0.016	5
랫드	0.15	0.08-0.270	0.025	6
담비	0.3	0.16-0.54	0.043	7
기니어피그	0.4	0.208-0.7	0.05	8
토끼	1.8	0.9-3.0	0.15	12
개	10	50-17	0.50	20
영장류				
• Monkeys	3	1.4-4.9	0.25	12
• Marmoset	0.35	0.14-0.72	0.06	6
• Squirrel monkey	0.6	0.29-0.97	0.09	7
• Baboon	12	7-23	0.60	20
마이크로 피그	20	10-33	0.74	27
미니 피그	40	25-64	1.14	35

Monkeys: cynomolgus, rhesus, stump-tail.

② 임상시험에서 100 mg의 투여용량과 랫드를 이용한 반복투여독성시험에서 NOAEL 용량 추정

- 임상에서 성인 60 kg 1일 투여 용량: 100 mg/60kg/day
- $100 \text{ mg}/60\text{kg}/\text{day} = 1.67 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$
- $HED = MRSD \times 10 = 1.67 \times 10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day} = 16.7 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$
- $HED = NOAEL \times (\text{Animal Km}/\text{Human Km})$
- $16.7 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day} = NOAEL \times (6/37)$

- $NOAEL = 16.7 \text{ mg/kg/day} \times (37/6) = 102.9 \text{ mg/kg/day}$
- 따라서 반복투여독성에서 NOAEL이 102.9 mg/kg/day 이상이면 임상에서 IADR 가능성이 4-5배 높을 것으로 추정됨

5) 결론

- 제약 시장에서 퇴출되거나 경고표지를 부착해야 하는 약물의 원인은 IADR(idiosyncratic adverse drug response, 개체-특이적 약물이상반응)을 기인함.
- IADR의 원인은 ① Cytochrome P450에 의한 reactive metabolite로의 전환, ② 투여용량(Stepan 등, 2011), ③ 다양한 유전적 변이(Genetic variants: human leukocyte antigens, T cell receptor, drug-metabolizing enzymes 그리고 drug-transporter; Wang 등, 2022)임.
- IADR의 투여용량 측면에서 성인 60kg 체중 용량은 >100 mg이며 퇴출될 확률이 낮은 용량의 약물보다 4-5배 정도 높음
- 비임성 반복투여독성시험 측면에서 NOAEL 용량이 102.9 mg/kg/day 이상일 경우에 이보다 낮은 용량의 약물보다 IADR을 유발할 확률이 약 4-5 배 정도 높을 것으로 추정됨
- 특히 항암제에 의한 부작용은 약물의 독성학적 특성을 고려할 때 이와 같은 수준의 투여용량에서 훨씬 심각한 부작용을 유발할 것으로 예상되어 저용량 및 투여 간격도 반영의 필요성이 있을 것으로 사료됨.
- 또한 병용용법에서 이와 같은 용량은 약물상호작용 등에 의한 독성을 가속화를 유도할 것으로 추정됨

<참고문헌>

- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-72023
- 박영철 (2023). 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주). ISBN: 979-11-6983-817-7
- Uetrecht J. Idiosyncratic Drug Reactions: A 35-Year Chemical Research in Toxicology Perspective. Chem Res Toxicol. 2022 Oct 17;35(10):1649-1654.
- Stepan AF, Walker DP, Bauman J, Price DA, Baillie TA, Kalgutkar AS, Aleo MD. Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. Chem Res Toxicol. 2011 Sep 19;24(9):1345-410.
- Wang CW, Preclaro IAC, Lin WH, Chung WH. An Updated Review of Genetic Associations With Severe Adverse Drug Reactions: Translation and Implementation of Pharmacogenomic Testing in Clinical Practice. Front Pharmacol. 2022 Apr 25;13:886377.

47. 중앙지법 서관 514호 법정

• 소환 통보받고 2024년 9월 11일 법정에 증인으로 출석. 법정은 검사, 변호사, 판사 등을 의미함

- 가슴기살균제와 관련된 논문 두편
- ✓ 김하영, 정용현, 박영철. 마우스의 기도 내 점적을 통한 가슴기살균제 CMIT/MIT와 사망 간의 원인적 연관성에 관한 연구. 한국환경보건학회지, 제43권 제4호(2017), 2017; 43(4): 247-256
- ✓ 강병훈, 김민선, 박영철. 가슴기살균제 CMIT/MIT의 기도 점적투여를 통한 임신마우스의 사산에 대한 영향. 한국환경보건학회지, 2018; 44(5): 468-479.
- 위 논문 2편의 저자로 서울중앙지방법원 서관 514호 법정(6번 법정출입구)에 2024년 9월 11일 출석 요청
- 증인 3명 중 1명
- 법정: 심문 시작하겠습니다. 논문 2편 작성하셨는데 이유?
- 증인: CMIT/MIT는 중간 차이가 없는 독성물질. 미생물 및 가슴기살균제 노출에 의한 건강 피해자 존재하는데 그 중간을 잇기 위한 실험. 이로 CMIT/MIT는 중간 차이가 없이 모든 생물체에서 독성 유발하는 것을 입증
- 법정: 챔버를 이용한 흡입독성시험에서 경미한 손상이 확인되었는데
- 증인: 시험방법에 따라 차이가 있으며 자료를 주시면 두 논문을 분석하여 그 이유를 설명해 드리겠습니다
- 법정: EPA는 Safety factor 280을 적용하였는데 왜 800?
- 증인: 더 보수적으로 safety factor 적용하였음.
- 법정: NOAEL과 공간 농도 ppm.....
- 증인: 그런 지표는 새로운 물질이 나온 경우에 정해진 가이드라인 독성시험으로 수행 및 전 세계가 공유하는 자료임. 지금 상황은 CMIT/MIT 1972년부터 사용되었고 1988년에 피부 알레르기 발생 그리고 현재 우리나라에서 노출에 의해 발생하였기 때문에 그런 지표 논하는 것은 의미가 없음.
- 법정: 동물실험은 다 의미가 없다는 말씀이며 이미 결론을 내리고 증언하는 것 같음
- 증인: 발암물질은 4등급으로 나뉨. 2등급은 동물에서만 발생하는 것이 확인되었지만 인체에서는 확인이 되지 않은 발암물질임. 1등급은 동물 및 인체에서도 모두 발생하는 발암물질이지만 동물에서도 발생하지 않고 인체에서만 확인되어도 1등급으로 분류. 오늘날의 가슴기살균제에 대한 혼란은 CMIT/MIT 노출에 의한 인체 손상 정황증거가 존재하는데 이를 다시 동물시험에서 확인하는 절차적 오류 및 인과적 과정에 대한 이해 부족에 기인함.

- 법정: 지금까지 CMIT/MIT에 흡입독성을 유발한다는 자료는 우리나라에만 존재
- 증인: CMIT/MIT를 가습기살균제로 사용한 나라는 우리나라 밖에 없음.

(후기: 국회에서 증인 신문은 ‘예 및 아니요’로만 대답하라고 하는 모습을 보고 판사께서 내가 말하는 모든 것을 제지하지 않고 배려해 주는 것을 보고 다소 놀랐음)

48. 남성형 탈모 치료제 - 피나스테리드(finasteride)의 안전성과 대책 방안

1. 현재 상황

- 유럽 규제당국인 유럽의약품청(EMA)이 탈모약 성분의 안전성 우려에 따라 조사에 착수하면서 국내 식품의약품안전처도 검토에 나섰다.
- 10일 관련 업계 및 로이터 등 외신에 따르면 EMA)은 남성형 탈모, 즉 안드로겐성 탈모의 치료에 사용되는 약물인 ‘피나스테리드’와 ‘두타스테리드’를 주성분으로 하는 의약품에 관한 자살 생각·행동 부작용 우려에 대해 최근 조사를 시작했다. 자살충동을 불러일으킨다는 가능성이 제기됐기 때문이다.(홍수현. 이데일리, 2024. 10. 10. 08:18)

2. Finasteride의 약리작용기전(mode of action)

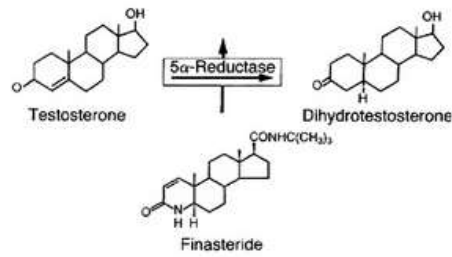
- 안드로겐성 탈(androgetic alopecia, AGA), 또는 남성형 탈모는 5-alpha reductase 효소에 의해 남성호르몬인 testosterone의 dihydrotestosterone(DHT)로 전환되는 대사에 기인함



<그림-1> dihydrotestosterone(DHT)에 의한 탈모기전

(Dihydrotestosterone (DHT) causes hair to growth back progressively thinner in a process called miniaturization)(<https://nyhairloss.com/finasteride-propecia>)

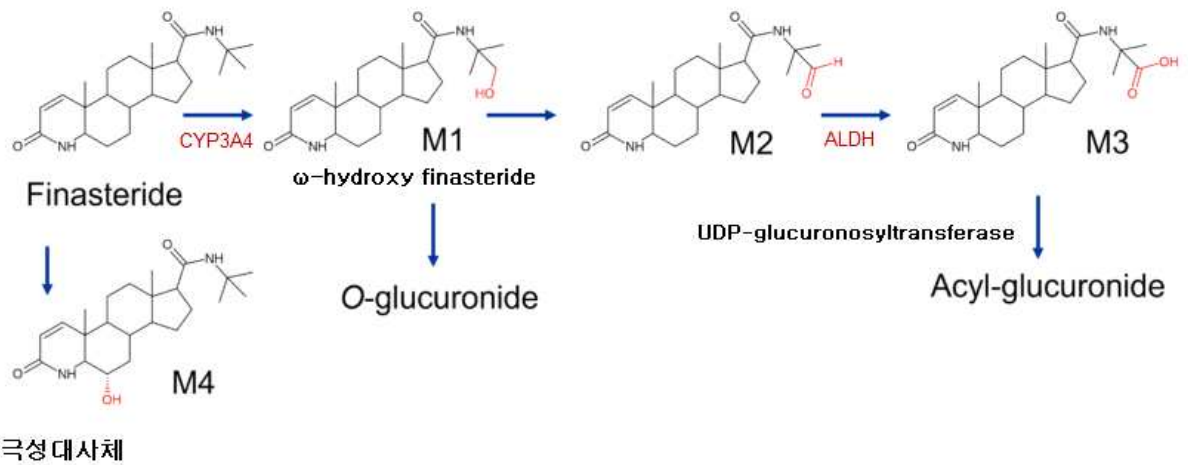
- Finasteride는 <그림-2>에서처럼 5-alpha reductase 효소 활성을 억제하여 dihydrotestosterone(DHT) 전환을 저해하여 항탈모 효능 기전으로 1994년 최초로 설명됨(Rittmaster 등, 1994). Finasteride는 5-알파 환원효소 억제제(5-alpha-reductase inhibitor)로 1998년 USFDA에 의해 경구복용 탈모치료제로 승인됨.



<그림-2> Finasteride의 항탈모 약리기전

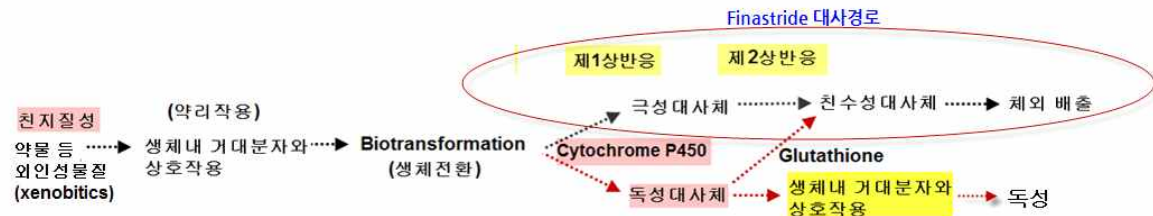
3. Finasteride 대사 및 독성대사체 생성 유무

- <그림-3>에서처럼 CYP3A4에 의해 수산화 그리고 UDP-glucuronosyltransferase에 의해 당이 포함되어 친수성으로 전환됨(Lundahl 등, 2009)



<그림-3> Finasteride의 CYP3A4와 UDP-glucuronosyltransferase에 의한 대사과정

- <그림-4>에서처럼 약물 대사의 가장 전형적인 형태로 제1상반응과 제2상반응을 통해 독성대사체로 전환되지 않고 원물질 자체가 약리작용을 하는 active drug임



<그림-4> Finasteride의 체외 배출을 위한 대사과정

4. Finasteride의 Psychiatric effects

- Römer 등(2010)의 연구에 따르면 수컷 마우스에 7일 동안 **Finasteride**의 피하주사를 통해 뇌의 5 α -dihydrotestosterone이 감소와 더불어 Fig 2와 3에서처럼 우울증(depression)과 관련된 hippocampus에서의 신경세포 증식과 분화가 약 25% 감소되는 것이 관찰되었음

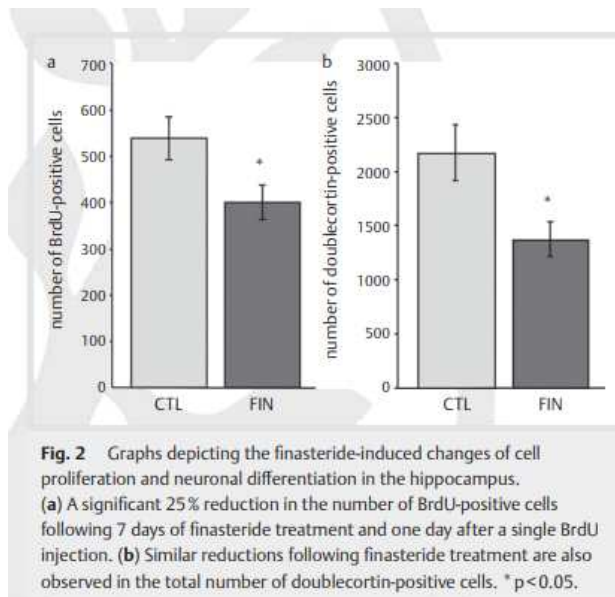
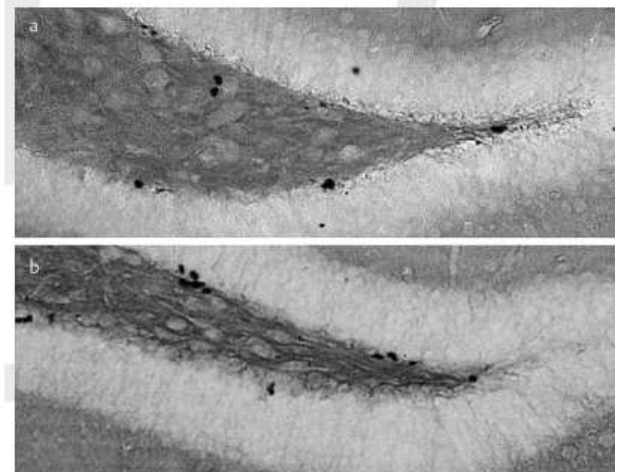


Fig. 3 immunohistochemically stained BrdU positive cells in the SGZ. Mice treated for 7 day with finasteride (a) show less BrdU-positive cells compared to control animals treated with vehicle (b).

- Römer 등(2010)의 또 다른 연구에 따르면 5- α -reductase 활성의 감소에 의해 depressive symptom, 즉 우울 증상이 설치류 및 사람에서 증가되는 것이 확인됨 (Reduced 5- α -reductase activity has been observed during depressive illness in humans. Finasteride inhibits 5- α -reductase and can robustly induce anxious and depressive behaviors in rodents. In humans finasteride treatment has been linked to an increase of depressive symptoms)
- Altomare 등(2002)의 연구에 따르면 저용량(finasteride 1mg) 복용한 17명의 환자로부터 moderate-severe depression이 확인됨.
- 우울증 척도인 Beck's Depression Inventory(BDI) and Hospital Anxiety and Depression Scale(HADS) depression scores에 대한 finasteride의 영향 연구가 수행됨. 환자 128명의 finasteride 복용 전후를 통해 BDI score가 12.11 ± 7.50 에서 12.80 ± 7.64 로 증가(HADS score는 4.04 ± 2.52 에서 4.61 ± 3.19 (p-value 0.005)로 유의하게 증가 (Rahimi-Ardabili 등, 2006).
- 자살충동(suicidal thoughts) 및 우울증상에 대한 finasteride 3개월 이상 복용 중단 환자

61명을 대상으로 수행됨. Finasteride-복용군에서 대조군보다 64% 증가하였으며 자살충동은 대조군 3%, 그리고 복용군에서 44%로 유의성($p < 0.0001$)이 확인됨(Irwig 등, 2012)

- Finasteride 복용에 의한 자살-관련 연구가 finasteride 복용 환자 69,786명을 대상으로 수행됨(Laanani 등, 2023). 환자 자살율이 18 suicide deaths(0.57/1000 person-years)와 자해(self-harm)율이 34 self-harm hospitalisations(1.08/1000)로 어떤 자살율 통계와 비교하여도 위험비(hazard ratio)가 1.2로 다소 높지만 유의성이 없었음. 반면에 우울증을 가진 finasteride 복용 환자는 위험비가 1.6으로 finasteride 복용과 자살이 연관성이 있는 것으로 추정되었음(Laanani 등, 2023)

5. Finasteride의 독성학적 고찰

- Finasteride은 CYP3A4에 의해 극성대사체 그리고 UDP-glucuronosyltransferase에 의해 대사되어 <그림-5>와 같이 reactive metabolite의 독성대사체가 인체에서 생성되지 않음. 이와 같은 대사경로는 약물의 안전성이 높으며 개별 심각한 약물이상반응(idiosyncratic-adverse drug response)을 유도할 가능성이 거의 없을 것으로 추정됨.
- In vivo 및 in vitro 실험을 통해 다음과 같은 영향이 확인되었음(Diviccaro, 2019). 그러나 이와 같은 비임상에서의 Finasteride 영향은 다음의 <표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교에서처럼 동물에는 CYP3A4가 없기 때문에 대사 효소 차이에 의한 대사체 차이에 기인하거나 단기간 급성 투여에 의해 기인하는 것으로 추정됨(Konstandi, 2014; 박영철, 2019).

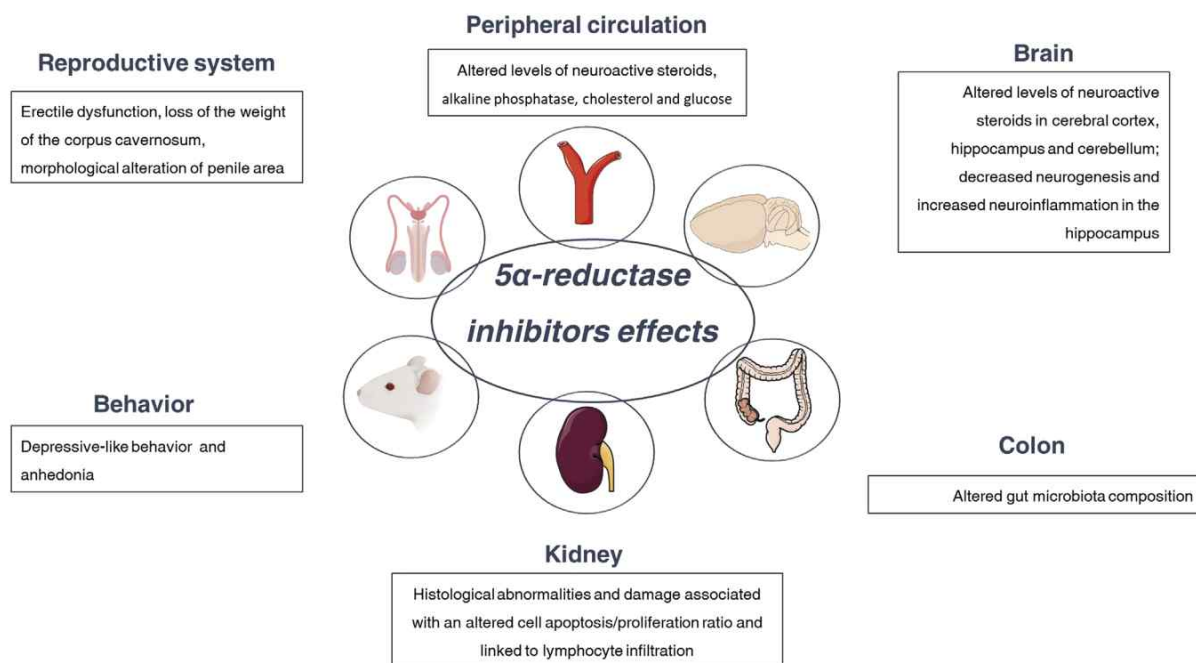


Fig. 3. Side effects of treatment with 5 alpha-reductase inhibitors in experimental models. For details, see text.

<표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교

CYP family	CYP subfamily	CYP isozyme			
		Human	Monkey	Rat	Mouse
CYP1	CYP1A	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1
		CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2
	CYP1B	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1
CYP2	CYP2A	CYP2A6	CYP2A23	CYP2A1	CYP2A4
		CYP2A7	CYP2A24	CYP2A2	CYP2A5
		CYP2A13		CYP2A3	CYP2A12
	CYP2B	CYP2B6	CYP2B17	CYP2B1	CYP2A22
		CYP2B7		CYP2B2	CYP2B9
				CYP2B3	CYP2B10
	CYP2C	CYP2C8	CYP2C20	CYP2C6	CYP2C29
		CYP2C9	CYP2C43	CYP2C7	CYP2C37
		CYP2C18		CYP2C11	CYP2C38
		CYP2C19		CYP2C12	CYP2C39
				CYP2C13	CYP2C40
				CYP2C22	CYP2C44
				CYP2C23	CYP2C50
	CYP2D				CYP2C50
					CYP2C55
		CYP2D6	CYP2D17	CYP2D1	CYP2D9
		CYP2D7	CYP2D19	CYP2D2	CYP2D10
		CYP2D8	CYP2D29	CYP2D3	CYP2D11
			CYP2D30	CYP2D4	CYP2D12
			CYP2D42	CYP2D5	CYP2D13
				CYP2D18	CYP2D22
	CYP2E				CYP2D26
					CYP2D34
					CYP2D40
CYP3	CYP3A	CYP3A4	CYP3A8	CYP3A1	CYP3A11
		CYP3A5		CYP3A2	CYP3A13
		CYP3A7		CYP3A9	CYP3A16
		CYP3A43		CYP3A18	CYP3A25
				CYP3A62	CYP3A41
					CYP3A44
인체 CYP에 대한 일치율			4/15 = 27%	4/28 = 14.3%	4/34 = 11.8%

(Konstandi, 2014)

6. Finasteride의 장기 복용 및 안전성을 위한 대책

- Finasteride는 기본적으로 호르몬 대사에 영향을 줌으로 장기 복용 및 복용 중단에 의한 금단증상인 post-finasteride syndrome(PFS)가 발생할 수 있음(Diviccaro 등, 2020)

POST-FINASTERIDE SYNDROME



- ✓ Altered levels of neuroactive steroids in plasma and CSF
- ✓ Upregulation of AR in the prepuce
- ✓ Different frequencies in AR polymorphisms according to symptoms
- ✓ Epigenetic modifications in CSF of SRD5A2
- ✓ Sexual dysfunction
- ✓ Abnormal somatosensory evoked potentials of the pudendal nerve
- ✓ Depressive symptomatology
- ✓ Abnormal MRI signals in brain regions involved in depression and sexual arousal

Fig. 2. Clinical features reported in patients affected by post-finasteride syndrome. For details, see text. AR: androgen receptor; CSF: cerebrospinal fluid; MRI: magnetic resonance imaging; SRD5A2: 5 alpha reductase type 2 gene.

- 이와 같은 PFS은 경구 투여 장기 복용으로 기인하는 것으로 추정되고 있음(Diviccaro 등, 2020), 그러나 Piraccini 등(2022)의 인체를 대상으로 한 연구에서 경구 투여 및 머리 도포를 통해 효능에서 차이가 없지만 안전성 및 PFS가 머리 도포 또는 분사에 의해 유의하게 감소되는 것이 확인되었음
- Figure 1은 Finasteride 0.25% 스프레이를 통해 머리 분사하는 모습



Figure 1 Finasteride 0.25% spray applicator and mode of administration on the scalp.

- Figure 3은 경구 투여와 머리 분사를 통해 Finasteride에 의한 미리카락 개수가 차이가 없음을 나타내는 것임

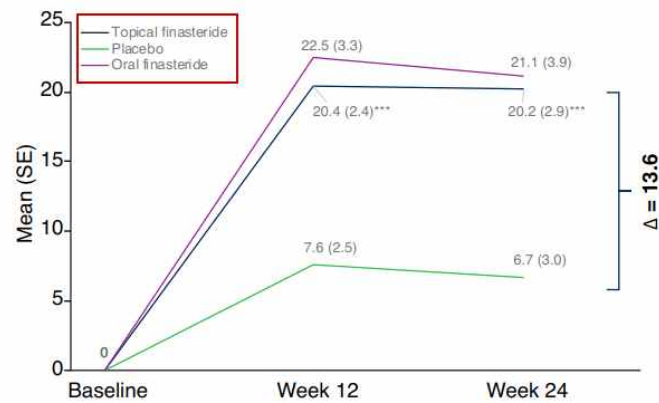


Figure 3 Adjusted mean change from baseline in target area hair count in the vertex at week 12 and at week 24 (primary efficacy endpoint) in the intention to treat population. *** $P < 0.001$ vs. placebo. SE, standard error.

- Figure 5는 5-alpha reductase 효소에 의해 남성호르몬인 testosterone의 dihydrotestosterone(DHT)으로 전환 혈중 용량 변화가 머리 분사보다 경구 복용이 훨씬 큰 것으로 확인됨.

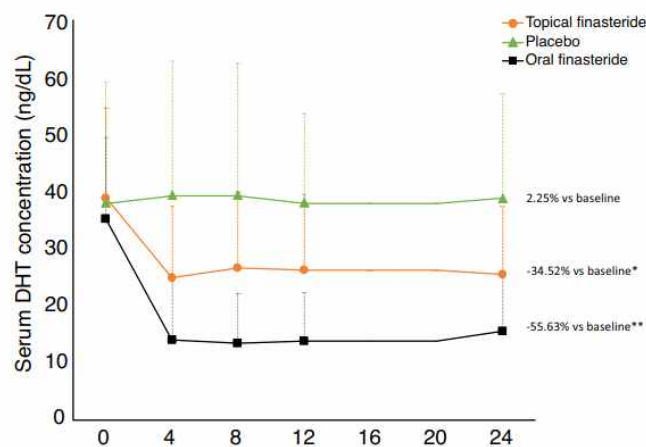


Figure 5 Mean serum dihydrotestosterone (DHT) concentrations during treatment for 24 weeks with topical finasteride, placebo, or oral finasteride. The difference in mean values from baseline to week 24 is shown at the end of each line. * $P < 0.05$ vs. placebo and oral finasteride at all time points; ** $P < 0.05$ vs. placebo at all time points. Note: error bars indicate standard deviation.

- Figure 6은 머리 분사보다 경구 복용에 의해 부작용이 다소 많지만 머리 분사의 중단에 의한 금단증상인 post-finasteride syndrome(PFS)가 훨씬 감소되었음

Table 4 Frequency of treatment emergent adverse events (TEAEs) in the safety population

	Topical finasteride (N = 181)	Placebo (N = 181)	Oral finasteride (N = 84)	Total (N = 446)
Patients with TEAEs, n (%)	75 (41.4)	76 (42.0)	41 (48.8)	192 (43.0)
Mild	59 (32.6)	60 (33.1)	33 (39.3)	152 (34.1)
Moderate	32 (17.7)	31 (17.1)	19 (22.6)	82 (18.4)
Severe†	4 (2.2)	3 (1.7)	2 (2.4)	9 (2.0)
Patients with TEAEs leading to study discontinuation, n (%)	5 (2.8)	4 (2.2)	6 (7.1)	15 (3.4)
Patients with treatment-related TEAEs‡, n (%)	18 (9.9)	12 (6.6)	10 (11.9)	40 (9.0)
Patients with treatment-related TEAEs leading to study discontinuation	4 (2.2)	2 (1.1)	2 (2.4)	8 (1.8)
Patients with treatment-emergent serious AEs	4 (2.2)	5 (2.8)	1 (1.2)	10 (2.2)
Patients with treatment-related serious AEs	0	0	0	0

†Cases of unknown intensity were assumed to be severe.

‡Includes AEs considered related or possibly related to study drug and AEs with unknown or missing relationship to study drug.

7. 결론

- Finasteride는 대사적으로 상당히 관용과 안전성이 높은 약물임
- 특히 항원성을 유발하지 않기 때문에 개별 심각한 약물이상반응(idiosyncratic-adverse drug response)은 발생하지 않을 것으로 추정됨
- 동물연구를 통해 확인된 우울증 및 hippocampus 등에 대한 Finasteride의 영향은 Cytochrome P450의 차이에 의한 대사 차이에 기인하는 것으로 추정됨
- 우울증과 자살충동과는 역학조사를 통해 Finasteride 장기복용에 의한 연관성이 없는 것으로 추정되었음
- 다만 호르몬에 대한 영향으로 복용 중단에 의한 금단증상인 post-finasteride syndrome(PFS)이 발생할 수 있으므로 경구복용보다 머리 국소 스프레이가 바람직한 치료방법으로 사료됨.

<참고문헌>

- Laanani, M., Weill, A., Jollant, F. et al. Suicidal risk associated with finasteride versus dutasteride among men treated for benign prostatic hyperplasia: nationwide cohort study. Sci Rep 13, 5308 (2023).
- Irwig MS. Depressive symptoms and suicidal thoughts among former users of finasteride with persistent sexual side effects. J Clin Psychiatry. 2012;73(9):1220-1223.
- Rahimi-Ardabili B, Pourandarjani R, Habibollahi P, Mualeki A. "Finasteride induced depression: a prospective study. BMC Clin Pharmacol. 2006;7(6):7.
- Altomare G, Capella GL. Depression circumstantially related to the administration of finasteride for androgenetic alopecia. J Dermatol. 2002;29:665-669.

- Romer B, Gass P. Finasteride-induced depression: new insights into possible pathomechanisms. *J Cosmet Dermatol*. 2010;9(4):331–332.
- Römer, B., Pfeiffer N, Lewicka S, et al. “Finasteride treatment inhibits adult hippocampal neurogenesis in male mice.” *Pharmacopsychiatry*. 2010;43(5):174–178.
- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7
- Konstandi, M. (2014). Consequences of psychophysiological stress on cytochrome P450-catalyzed drug metabolism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 45:149–167.
- Metabolically Stable tert-Butyl Replacement. David Barnes-Seeman, Monish Jain, Leslie Bell, Suzie Ferreira, Scott Cohen, Xiao-Hui Chen, Jakal Amin, Brad Snodgrass, and Panos Hatsis. *ACS Med. Chem. Lett*. 2013, 4, 6, 514–516
- Diviccaro S, Melcangi RC, Giatti S. Post-finasteride syndrome: An emerging clinical problem. *Neurobiol Stress*. 2019 Dec 26;12:100209.
- Roger S. Rittmaster. Finasteride. *N Engl J Med* 1994;330:120–125
- Piraccini BM, Blume-Peytavi U, Scarci F, Jansat JM, Falqués M, Otero R, Tamarit ML, Galván J, Tebbs V, Massana E; Topical Finasteride Study Group. Efficacy and safety of topical finasteride spray solution for male androgenetic alopecia: a phase III, randomized, controlled clinical trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022 Feb;36(2):286–294. doi: 10.1111/jdv.17738. Epub 2021 Oct 25. Erratum in: *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2023 Feb;37(2):452.
- Hirshburg JM, Kelsey PA, Therrien CA, Gavino AC, Reichenberg JS. Adverse Effects and Safety of 5- α Reductase Inhibitors (Finasteride, Dutasteride): A Systematic Review. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016 Jul;9(7):56–62.
- Traish AM. Health Risks Associated with Long-Term Finasteride and Dutasteride Use: It's Time to Sound the Alarm. *World J Mens Health*. 2020 Jul;38(3):323–337.
- Anna Lundahl, Hans Lennernäs, Lars Knutson, Ulf Bondesson and Mikael Hedeland. Identification of Finasteride Metabolites in Human Bile and Urine by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* October 2009, 37 (10):2008–17.

49. 약물 유래-나이트로사민류 불순물의 1일 섭취허용량에 대한 자료

1. 약물 유래-나이트로사민류 불순물인 N-nitroso cinacalcet(N-니트로소시나칼셋) 생성하는 약물의 현황

- 투석을 받는 만성신부전 환자의 이차성부갑상선기능항진에 사용되는 '레그파라정(시나칼세트염산염)'에서 불순물이 N-nitroso cinacalcet(N-니트로소시나칼셋)이 검출되면서, 동일 성분제제인 제네릭의약품까지 파장이 일 것으로 보인다. 지난 2017년 특허만으로 제네릭이 시장에 빠른 속도로 진입하면서 현재 시나칼셋 성분으로 허가받은 아래의 <표>와 같이 12개 제네릭 품목에 달한다(데일리팜. 2024-11-25)

<표> 시나칼셋 성분으로 허가받은 국내 제네릭 생산의 제약사 현황

제품명	업체명	허가일
레그파라정25밀리그램(시나칼세트염산염)	한국교와기린(주)	2010-03-04
레그파라정75밀리그램(시나칼세트염산염)	한국교와기린(주)	2010-03-04
칼세파라정25mg(시나칼세트염산염)	(주)휴온스	2016-10-14
시나파라정25mg(시나칼세트염산염)	한화제약(주)	2016-10-31
레파트진정25mg(시나칼세트염산염)	대원제약(주)	2016-11-10
시나세트정(시나칼세트염산염)	알보젠코리아(주)	2016-11-10
베네프정(시나칼세트염산염)	(주)유유제약	2018-07-31
시나칼정(시나칼세트염산염)	(주)휴온스메디텍	2018-08-20
퍼슨시나칼셋정25밀리그램(시나칼세트염산염)	(주)퍼슨	2018-08-21
레나트라정25밀리그램(시나칼세트염산염)	(주)일화	2020-04-29
레그칼정25밀리그램(시나칼세트염산염)	(주)새한제약	2020-05-15
시나비엠정25밀리그램(시나칼세트염산염)	(주)팜젠사이언스	2020-08-14
칼레그나정25밀리그램(시나칼세트염산염)	(주)라이트팜텍	2020-11-19

▲ 시나칼셋 성분으로 허가 받은 의약품 목록

2. 약물 유래-나이트로사민류 불순물 및 N-nitroso-cinacalcet의 1일 섭취허용량

- 미국 FDA는 2023년 8월 4일 ‘A final guidance on Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities (NDSRI)’ 즉, 제조 및 보관 과정에서 발생하는 **약물 유래-나이트로사민류 불순물(NDSRI)**에 대하여 잠재적 발암물질로 분류하여 노출 허용 권장 제한치에 대한 최종보고서를 발행. (우리나라에서는 약물 제조 과정에서 생성하는 물질 및 안정성 시험 중 생성될 수 있는 분해생성물을 유연물질이라고 함)
- FDA의 Center for Drug Evaluation and Research (CDER)는 2024년 11월 20일까지 274종 NDSRIs 및 노출 허용 권장 제한치를 NDSRI AI(Acceptable Intake) limits를 <별첨-1>과 설정하였으며 발암강도에 따라 5 category 분류하여 제시하였음.
- N-nitroso-cinacalcet의 발암잠재력에서 3등급으로 권장 AI limit는 1일 400 ng/day임**

FDA Recommended AI Limits for Certain Hypothetical NDSRIs and Other Identified Nitrosamine Impurities(Updated: 11/20/2024)			
Nitrosamine Name	Source*	Carcinogenic Potency Category	Recommended AI Limit
N-nitroso-cinacalcet	Cinacalcet	3	400 ng/day

Table 1. The Five Predicted Carcinogenic Potency Categories and Associated Recommended AI Limits for NDSRIs

Potency Category	Recommended AI (ng/day)	Comments
1	26.5	The recommended AI limit of 26.5 ng/day* is equal to the class-specific limit for nitrosamine impurities based on the most potent, robustly tested nitrosamine, <i>N</i> -nitrosodiethylamine (NDEA).** NDSRIs assigned to Category 1 are predicted to have carcinogenic potency no higher than the class-specific limit for nitrosamine impurities.
2	100	The recommended AI limit of 100 ng/day is representative of two potent, robustly tested nitrosamines, <i>N</i> -nitrosodimethylamine (NDMA) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-(butanone) (NNK), which have recommended AI limits of 96 ng/day and 100 ng/day, respectively. NDSRIs assigned to Category 2 are predicted to have carcinogenic potency no higher than NDMA and NNK.
3	400	Compared to Potency Category 2, NDSRIs in this category have lower carcinogenic potency due to, for example, the presence of a weakly deactivating structural feature. The recommended AI limit was set to reflect a 4-fold decrease in carcinogenic potency from Category 2.
4	1500	NDSRIs assigned to Category 4 may be metabolically activated through an alpha-hydroxylation pathway but are predicted to be of low carcinogenic potency, for example, because the pathway is disfavored due to steric or electronic influences, or because clearance pathways are favored. The recommended AI limit of 1500 ng/day is set at the TTC per ICH M7(R2).***
5	1500	NDSRIs assigned to Category 5 are not predicted to be metabolically activated via an alpha-hydroxylation pathway due to steric hindrance or the absence of alpha-hydrogens, or are predicted to form unstable species that will not react with DNA. The recommended AI limit of 1500 ng/day is set at the TTC per ICH M7(R2).***

AI = acceptable intake; ng = nanogram; NDSRI = nitrosamine drug substance-related impurities; TTC = t

- 2024년 6월에 [민원인 안내서-1209-02] '의약품 중 변이원성·발암성 불순물 안전관리 가이드라인 - 불순물 중 "니트로사민류"를 중심으로'에서 **니트로사민류**에 대한 1일 섭취허용량을 제시하였음.
- 그러나 [민원인 안내서-1209-02]에서는 **103 가지에 대한 1일 섭취허용량만 제시되었음**. 따라서 <별표-1>에서 274종을 참고하여 추가적으로 약물-유래 **니트로사민류**에 대한 1일 섭취허용량을 제시하여 능동적인 대처가 필요함.

<참고문헌>

- 데일리팜. 이해경. 신장약 '시나칼세트' 불순물 검출...제네릭 파장 불가피. 데일리팜. 2024-11-25 12:00:24
- 식약처. 2024-06-26. 의약품 중 변이원성·발암성 불순물 안전관리 가이드라인 [민원인안내서]- 불순물 중 "니트로사민류"를 중심으로
- Center for Drug Evaluation and Research (CDER). USFDA. A final guidance on Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities (NDSRI)

<별첨-1> 미국 FDA의 약물 유래-니트로사민 불순물 274종의 발암잠재성 등급과 1일 섭취허용량

CDER Nitrosamine Impurity Acceptable Intake Limits FDA			
Nitrosamine Name	Source*	Potency Category	Recommended AI Limit
N-nitroso-abacavir	Abacavir	5	1500 ng/day
N-nitroso-acarbose	Acarbose	5	1500 ng/day
N-nitroso-acebutolol	Acebutolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-albuterol	Albuterol	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-almotriptan	Almotriptan	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-amitriptyline	Amitriptyline	1	26.5 ng/day
N-nitroso-amlodipine	Amlodipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-amoxapine	Amoxapine	3	400 ng/day
N-nitroso-arformoterol	Arformoterol	4	1500 ng/day
N-nitroso-argatroban	Argatroban	4	1500 ng/day
N-nitroso-articaïne	Articaïne	4	1500 ng/day
N-nitroso-atenolol	Atenolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-avacopan	Avacopan	5	1500 ng/day
N-nitroso-avanafil	Avanafil	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-azithromycin	Azithromycin	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-bedaquiline	Bedaquiline	1	26.5 ng/day

N-nitroso-belumosudil	Belumosudil	5	1500 ng/day
N-nitroso-benazepril	Benazepril	5	1500 ng/day
N-nitroso-bendroflumethiazide	Bendroflumethiazide	5	1500 ng/day
N-nitroso-benzonatate	Benzonatate	3	400 ng/day
N-nitroso-berotralstat	Berotralstat	2	100 ng/day
N-nitroso-betaxolol	Betaxolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-bicisate	Bicisate	4	1500 ng/day
N-nitroso-bisoprolol	Bisoprolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-brilliant blue g	Brilliant Blue G	5	1500 ng/day
N-nitroso-brinzolamide	Brinzolamide	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-brompheniramine	Brompheniramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-bumetanide	Bumetanide	4	1500 ng/day
N-nitroso-bupropion	Bupropion	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-cabergoline	Cabergoline	1	26.5 ng/day
N-nitroso-cangrelor	Cangrelor	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-carbinoxamine	Carbinoxamine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-carteolol	Carteolol	5	1500 ng/day
N-nitroso-carvedilol	Carvedilol	3	400 ng/day
N-nitroso-caspofungin	Caspofungin	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-chlophedianol	Chlophedianol	1	26.5 ng/day
N-nitroso-chloroquine	Chloroquine	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-chlorpheniramine	Chlorpheniramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-chlorpromazine	Chlorpromazine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-cinacalcet	Cinacalcet	3	400 ng/day
N-nitroso-ciprofloxacin	Ciprofloxacin	4	1500 ng/day **
N-nitroso-desmethyl-citalopram	Citalopram	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-clarithromycin	Clarithromycin	4	1500 ng/day
N-nitroso-clevidipine	Clevidipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-clomipramine	Clomipramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-clozapine	Clozapine	5	1500 ng/day
N-nitroso-colistin a hydrogen methanesulfonate-1	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin a hydrogen methanesulfonate-2	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin a hydrogen methanesulfonate-3	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin a hydrogen methanesulfonate-4	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin a hydrogen methanesulfonate-5	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin b hydrogen methanesulfonate-1	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin b hydrogen methanesulfonate-2	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin b hydrogen methanesulfonate-3	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin b hydrogen methanesulfonate-4	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-colistin b hydrogen methanesulfonate-5	Colistin	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-cyclobenzaprine	Cyclobenzaprine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-dabigatran etexilate	Dabigatran Etxilate	3	400 ng/day

N-nitroso-desmethyl-demeclocycline	Demeclocycline	3	400 ng/day
N-nitroso-desipramine	Desipramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desloratadine	Desloratadine	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-desvenlafaxine	Desvenlafaxine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-deucravacitinib	Deucravacitinib	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-dexbrompheniramine	Dexbrompheniramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-dexchlorpheniramine	Dexchlorpheniramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-diclofenac	Diclofenac	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-diltiazem	Diltiazem	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-diphenhydramine	Diphenhydramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-dipivefrin	Dipivefrin	2	100 ng/day
N-nitroso-dobutamine	Dobutamine	4	1500 ng/day
N-nitroso-dorzolamide	Dorzolamide	2	100 ng/day **
N-nitroso-desmethyl-cidoxepin	Doxepin	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-doxepin, (e)-	Doxepin	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-doxycycline	Doxycycline	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-doxylamine	Doxylamine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-duvelisib	Duvelisib	5	1500 ng/day
N-nitroso-elagolix	Elagolix	4	1500 ng/day
N-nitroso-enalapril	Enalapril	5	1500 ng/day
N-nitroso-enalaprilat	Enalaprilat	5	1500 ng/day
N-nitroso-ephedrine	Ephedrine	4	1500 ng/day
N-nitroso-epinephrine	Epinephrine	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-eravacycline	Eravacycline	3	400 ng/day
N-nitroso-ertapenem	Ertapenem	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-erythromycin	Erythromycin	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-erythromycin ethylsuccinate	Erythromycin Ethylsuccinate	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-escitalopram	Escitalopram	1	26.5 ng/day
N-nitroso-esketamine	Esketamine	5	1500 ng/day
N-nitroso-esmolol	Esmolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-ethambutol	Ethambutol	4	1500 ng/day
N-nitroso-etravirine	Etravirine	5	1500 ng/day
N-nitroso-exametazime	Exametazime	4	1500 ng/day
N-nitroso-felodipine	Felodipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-fenfluramine	Fenfluramine	3	400 ng/day
N-nitroso-fenoldopam	Fenoldopam	2	100 ng/day
N-nitroso-finerenone	Finerenone	5	1500 ng/day
N-nitroso-flecainide	Flecainide	4	1500 ng/day
N-nitroso-florbetaben f-18	Florbetaben F-18	2	100 ng/day
N-nitroso-florbetapir f-18	Florbetapir F-18	2	100 ng/day
N-nitroso-flutemetamol f-18	Flutemetamol F-18	2	100 ng/day
N-nitroso-folic acid	Folic Acid	4	1500 ng/day
N-nitroso-formoterol	Formoterol	4	1500 ng/day
N-nitroso-fosdenopterin-1	Fosdenopterin	5	1500 ng/day
N-nitroso-fosdenopterin-2	Fosdenopterin	5	1500 ng/day
N-nitroso-fostamatinib-1	Fostamatinib	5	1500 ng/day

N-nitroso-fostamatinib-2	Fostamatinib	5	1500 ng/day
N-nitroso-frovatriptan	Frovatriptan	3	400 ng/day
N-nitroso-furosemide	Furosemide	4	1500 ng/day
N-nitroso-gatifloxacin	Gatifloxacin	4	1500 ng/day
N-nitroso-hydrochlorothiazide	Hydrochlorothiazide	4	1500 ng/day
N-nitroso-hydroxychloroquine	Hydroxychloroquine	5	1500 ng/day
N-nitroso-imatinib	Imatinib	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-imipramine	Imipramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-isoproterenol	Isoproterenol	4	1500 ng/day
N-nitroso-isradipine	Isradipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-ivacaftor	Ivacaftor	5	1500 ng/day
N-nitroso-ketamine	Ketamine	5	1500 ng/day
N-nitroso-labetalol	Labetalol	4	1500 ng/day
N-nitroso-leniolisib	Leniolisib	5	1500 ng/day
N-nitroso-leucovorin-1	Leucovorin	4	1500 ng/day
N-nitroso-leucovorin-2	Leucovorin	4	1500 ng/day
N-nitroso-levabuterol	Levabuterol	5	1500 ng/day
N-nitroso-levamlodipine	Levamlodipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-levmetamfetamine	Levmetamfetamine	3	400 ng/day
N-nitroso-levobunolol	Levobunolol	5	1500 ng/day
N-nitroso-levoleucovorin-1	Levoleucovorin	4	1500 ng/day
N-nitroso-levoleucovorin-2	Levoleucovorin	4	1500 ng/day
N-nitroso-levomefolic acid-1	Levomefolic Acid	4	1500 ng/day
N-nitroso-levomefolic acid-2	Levomefolic Acid	4	1500 ng/day
N-nitroso-lisinopril	Lisinopril	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-maralixibat	Maralixibat	2	100 ng/day
N-nitroso-maribavir	Maribavir	5	1500 ng/day
N-nitroso-mecamylamine	Mecamylamine	5	1500 ng/day
N-nitroso-meclofenamic acid	Meclofenamic Acid	5	1500 ng/day
N-nitroso-mefloquine	Mefloquine	4	1500 ng/day
N-nitroso-meropenem	Meropenem	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-methadone	Methadone	3	400 ng/day
N-nitroso-methamphetamine	Methamphetamine	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-methylene blue	Methylene Blue	2	100 ng/day
N-nitroso-metolazone	Metolazone	5	1500 ng/day
N-nitroso-metoprolol	Metoprolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-mifepristone	Mifepristone	2	100 ng/day
N-nitroso-migalastat	Migalastat	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-minocycline-1	Minocycline	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-minocycline-2	Minocycline	3	400 ng/day
N-nitroso-mirabegron	Mirabegron	3	400 ng/day
N-nitroso-mitoxantrone-1	Mitoxantrone	4	1500 ng/day
N-nitroso-mitoxantrone-2	Mitoxantrone	2	100 ng/day
N-nitroso-moexipril	Moexipril	5	1500 ng/day
N-nitroso-moxifloxacin	Moxifloxacin	4	1500 ng/day
N-nitroso-methylphenylamine or N-nitroso-N-methylaniline (NMPA)	Multiple	2	100 ng/day

N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA)	Multiple	4	1500 ng/day
N-nitroso-isopropylethylamine (NIPEA) or N-nitroso-ethylisopropylamine (NEIPA)	Multiple	3	400 ng/day
N-nitroso-diisopropylamine (NDIPA)	Multiple	5	1500 ng/day
N-nitroso-nadolol	Nadolol	5	1500 ng/day
N-nitroso-nebivolol	Nebivolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-neratinib	Neratinib	2	100 ng/day
N-nitroso-neratinib	Neratinib	5	1500 ng/day
N-nitroso-nicardipine	Nicardipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-nifedipine	Nifedipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-nimodipine	Nimodipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-nintedanib	Nintedanib	5	1500 ng/day
N-nitroso-nisoldipine	Nisoldipine	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-nizatidine	Nizatidine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-nizatidine-1	Nizatidine	2	100 ng/day
N-nitroso-nizatidine-2	Nizatidine	3	400 ng/day
N-nitroso-nortriptyline	Nortriptyline	1	26.5 ng/day
N-nitroso-olanzapine	Olanzapine	5	1500 ng/day
N-nitroso-oliceridine	Oliceridine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-olodaterol	Olodaterol	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-olopatadine	Olopatadine	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-omadacycline-1	Omadacycline	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-omadacycline-2	Omadacycline	3	400 ng/day
N-nitroso-omadacycline	Omadacycline	1	26.5 ng/day
N-nitroso-omidenepag isopropyl	Omidenepag Isopropyl	4	1500 ng/day
N-nitroso-oritavancin-1	Oritavancin	4	1500 ng/day
N-nitroso-oritavancin-2	Oritavancin	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-orphenadrine	Orphenadrine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-ozanimod	Ozanimod	3	400 ng/day
N-nitroso-ozenoxacin	Ozenoxacin	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-padimate o	Padimate O	2	100 ng/day
N-nitroso-pafolacianine	Pafolacianine	4	1500 ng/day
N-nitroso-perindopril	Perindopril	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-pheniramine	Pheniramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-phenylephrine	Phenylephrine	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-phenyltoloxamine	Phenyltoloxamine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-pindolol	Pindolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-plazomicin-1	Plazomicin	4	1500 ng/day
N-nitroso-plazomicin-2	Plazomicin	2	100 ng/day
N-nitroso-plerixafor-1	Plerixafor	2	100 ng/day
N-nitroso-plerixafor-2	Plerixafor	2	100 ng/day
N-nitroso-plerixafor-3	Plerixafor	2	100 ng/day
N-nitroso-polythiazide	Polythiazide	5	1500 ng/day
N-nitroso-pramipexole	Pramipexole	3	400 ng/day
N-nitroso-prilocaine	Prilocaine	4	1500 ng/day
N-nitroso-primaquine	Primaquine	5	1500 ng/day
N-nitroso-proline	Proline	4	1500 ng/day

N-nitroso-desmethyl-promethazine	Promethazine	3	400 ng/day
N-nitroso-propafenone	Propafenone	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-propoxyphene	Propoxyphene	1	26.5 ng/day
N-nitroso-propranolol	Propranolol	4	1500 ng/day
N-nitroso-propylhexedrine	Propylhexedrine	3	400 ng/day
N-nitroso-protriptyline	Protriptyline	1	26.5 ng/day
N-nitroso-pseudoephedrine	Pseudoephedrine	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-pyrimidine	Pyrimidine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-quinapril	Quinapril	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-quinupristin	Quinupristin	2	100 ng/day
N-nitroso-racepinephrine	Racepinephrine	2	100 ng/day
N-nitroso-ramipril	Ramipril	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-ranitidine	Ranitidine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-ranitidine-1	Ranitidine	3	400 ng/day
N-nitroso-ranitidine-2	Ranitidine	2	100 ng/day
N-nitroso-rasagiline	Rasagiline	2	100 ng/day
N-nitroso-relebactam	Relebactam	3	400 ng/day
N-nitroso-ribociclib-2	Ribociclib	5	1500 ng/day
N-nitroso-ribociclib-1	Ribociclib	3	400 ng/day
N-nitroso-rifabutin	Rifabutin	5	1500 ng/day
1-methyl-4-nitrosopiperazine (MNP)	Rifampin	3	400 ng/day
1-cyclopentyl-4-nitroso-piperazine (CPNP)	Rifapentine	3	400 ng/day
N-nitroso-rilpivirine-1	Rilpivirine	5	1500 ng/day
N-nitroso-rilpivirine-2	Rilpivirine	5	1500 ng/day
N-nitroso-risdiplam	Risdiplam	5	1500 ng/day
N-((2-isopropylthiazol-4-yl)methyl)-N-methyl nitrous amide (NITMA) aka N-nitroso-2,4-thiazoleamine (NNTA)	Ritonavir	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-rivastigmine	Rivastigmine	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-rizatriptan	Rizatriptan	1	26.5 ng/day
N-nitroso-rolapitant	Rolapitant	5	1500 ng/day
N-nitroso-safinamide	Safinamide	3	400 ng/day
N-nitroso-salmeterol	Salmeterol	3	400 ng/day
N-nitroso-sapropterin-1	Sapropterin	4	1500 ng/day
N-nitroso-sapropterin-2	Sapropterin	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-sarecycline	Sarecycline	3	400 ng/day
N-nitroso-sertraline	Sertraline	2	100 ng/day **
N-nitroso-silodosin	Silodosin	4	1500 ng/day
7-Nitroso-3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,2,4]triazolo-[4,3-a]pyrazine (NTTP)	Sitagliptin	2	100 ng/day
N-nitroso-sotalol	Sotalol	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-spinosad factor a	Spinosad	2	100 ng/day
N-nitroso-desmethyl-spinosad factor d	Spinosad	2	100 ng/day
N-nitroso-streptomycin	Streptomycin	4	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-sumatriptan	Sumatriptan	1	26.5 ng/day
N-nitroso-tafenoquine	Tafenoquine	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-tamoxifen	Tamoxifen	1	26.5 ng/day
N-nitroso-tamsulosin	Tamsulosin	4	1500 ng/day

N-nitroso-desmethyl-tapentadol	Tapentadol	1	26.5 ng/day
N-nitroso-telavancin-1	Telavancin	3	400 ng/day
N-nitroso-telavancin-2	Telavancin	4	1500 ng/day
N-nitroso-telavancin-3	Telavancin	4	1500 ng/day
N-nitroso-telavancin-4	Telavancin	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-telithromycin	Telithromycin	4	1500 ng/day
N-nitroso-terbutaline	Terbutaline	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-tetracaine	Tetracaine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-tetracaine	Tetracaine	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-tetracycline	Tetracycline	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-thonzylamine	Thonzylamine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-ticagrelor	Ticagrelor	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-tigecycline-1	Tigecycline	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-tigecycline-2	Tigecycline	2	100 ng/day
N-nitroso-tigecycline	Tigecycline	5	1500 ng/day
N-nitroso-timolol	Timolol	5	1500 ng/day
N-nitroso-tirofiban	Tirofiban	4	1500 ng/day
N-nitroso-torsemide	Torsemide	5	1500 ng/day
N-nitroso-desmethyl-tramadol	Tramadol	1	26.5 ng/day
N-nitroso-trandolapril	Trandolapril	5	1500 ng/day
N-nitroso-trientine	Trientine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-trimethobenzamide	Trimethobenzamide	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-trimipramine	Trimipramine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-desmethyl-ulipristal acetate	Ulipristal Acetate	2	100 ng/day
N-nitroso-vancomycin	Vancomycin	4	1500 ng/day
N-nitroso-varenicline	Varenicline	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-venlafaxine	Venlafaxine	1	26.5 ng/day
N-nitroso-vibegron	Vibegron	5	1500 ng/day
N-nitroso-vilanterol	Vilanterol	3	400 ng/day
N-nitroso-viloxazine	Viloxazine	2	100 ng/day
N-nitroso-vortioxetine	Vortioxetine	3	400 ng/day
N-nitroso-desmethyl-zolmitriptan	Zolmitriptan	1	26.5 ng/day

50. ASO(Antisense oligonucleotide), siRNA(small interfering RNA) 등의 독성 시험 가이드라인 비교분석

1. 식품의약품안전평가원의 가이드라인

- 평가원은 2024년 11월 28일 합성 올리고뉴클레오타이드 의약품의 임상시험 시 비임상시험 가이드라인의 [민원인 안내서: 안내서-1396-01호] 발간함.

2. 미국 FDA의 가이드라인

- 미국 FDA의 CDER(Center for Drug Evaluation and Research)은 다음과 같이 올리고뉴클레오타이드와 관련된 가이드라인을 질환의 중증 정도에 따라 2가지 draft guideline으로 발간하였음.

- ① 2024년: Nonclinical Safety Assessment of Oligonucleotide-Based Therapeutics – 우리나라 평가원이 2024년 발간한 [민원인 안내서: 안내서-1396-01호]의 원본 가이드라인
- ② 2021년: Nonclinical Testing of Individualized Antisense Oligonucleotide Drug Products for Severely Debilitating or Life-Threatening Disease - SDLT (severely debilitating or life-threatening Disease or conditions) disease 즉, 심각하게 심신을 악화시키거나 생명을 위협하는 질환의 치료를 위한 올리고뉴클레오타이드 치료제로 주로 antisense oligonucleotides (ASOs)와 small interfering ribonucleic acids (siRNAs)의 치료제 개발을 위한 비임상의 독성시험 및 약리시험을 위한 가이드라인임

2. 목적

- 미국 FDA에서 발간된 oligonucleotide 약물 개발을 위한 가이드라인이 일반적인 질환 치료제와 SDLT 치료제 개발을 위한 2가지 가이드라인을 발간함. 일반적인 질환의 올리고뉴클레오타이드 치료제 개발에 대한 가이드라인은 유사함.
- 반면에 2021년에 발간된 ‘Nonclinical Testing of Individualized Antisense Oligonucleotide Drug Products for Severely Debilitating or Life-Threatening Disease’ 가이드라인은 생명에 위협이 있는 중증 환자 치료를 위한 올리고뉴클레오타이드 치료제 개발을 위한 독성시험에 가이드라인임
- 따라서 국내에서 중증환자를 위한 올리고뉴클레오타이드 치료제를 개발한다면 미국의 가이드라인을 제시하여 IND를 위한 독성시험 수행할 필요성이 있음. 이는 비용 및 시간을 절약하여 개발에 큰 도움이 되기를 바라는 것이 목적임

3. 미국 FDA에 의해 승인된 ASO 및 siRNA 약물

- 2024년 3월 현재 미국 FDA와 유럽의 EMA에 의해 승인된 합성 올리고뉴클레오타이드 약물은 총 20종으로 1 aptamer, 12 antisense oligonucleotides (ASOs), 6 small interfering ribonucleic acids (siRNAs), 그리고 1 개의 single-stranded and double-stranded polydeoxyribonucleotides 혼합형(Vinjamuri 등, 2024).
- 여기서 aptamer를 다루지 않은 이유는 단순히 oligonucleotides 형태가 아니라 oligonucleotide + linker + small molecule의 연결 형태. 이는 독성시험에서 linker 및 small molecule 등을 분리하여 독성에 대해 고려하여야 함
- 이들 약물은 intravenous (IV), subcutaneous (SC) 경로 투여이며 2종의 intravitreal (IVT, 유리체강)과 1종의 intramuscular(IM, 근육내) 투여임.

4. 뉴클레오타이드의 갯수

- 아래와 같이 대부분의 이들 약물의 길이는 최소 18개서 최대 30개의 뉴클레오타이드로 구성됨

FDA Approved Synthetic Oligonucleotide Drugs

Proprietary name	Active ingredient	Category	Length of Oligonucleotide
VITRAVENE	Fomivirsen sodium	Phosphorothioate ASO	21
MACUGEN	Pegaptanib sodium	Phosphate oligonucleotide aptamer	28
KYNAMRO	Mipomersen sodium	Phosphorothioate ASO	20
EXONDYS 51	Eteplirsen	Phosphorodiamidate morpholino ASO	30
SPINRAZA	Nusinersen sodium	Phosphorothioate ASO	18
ONPATTRO	Patisiran sodium	Double-stranded siRNA	19+2 (antisense)
TEGSEDI	Inotersen sodium	Phosphorothioate ASO	20
GIVLAARI	Givosiran sodium	Double-stranded siRNA	21+2 (antisense)
VYONDYS 53	Golodirsen	Phosphorodiamidate morpholino ASO	25
VILTEPSO	Viltolarsen	Phosphorodiamidate morpholino ASO	21
OXLUMO	Lumasiran	Double-stranded siRNA	21+2 (antisense)
AMONDYS 45	Casimersen	Phosphorodiamidate morpholino ASO	22
LEQVIO	Inclisiran	Double-stranded siRNA	21+2 (antisense)
AMVUTTRA	Vutrisiran	Double-stranded siRNA	21+2 (antisense)

5. 독성시험의 비교분석

- (평가원의 합성 올리고뉴클레오타이드 의약품의 임상시험 시 비임상시험 가이드라인 + 미국 FDA에서 2024년 발간된 Nonclinical Safety Assessment of Oligonucleotide-Based Therapeutics) vs (Nonclinical Testing of Individualized Antisense Oligonucleotide Drug Products for Severely Debilitating or Life-Threatening Disease)의 독성시험 비교

독성시험 항목	2024년 평가원과 2024년 미국 FDA 가이드라인	2021년 미국 FDA 가이드라인	해석
단 회 투 여 독성시험	<ul style="list-style-type: none"> • 용량 증가 시험 (dose escalation studies), 단기 용량 범위 시험 (short-term dose-ranging studies), 약리 시험, 반복투여 독성시험 등을 통해 급성 독성에 대한 정보를 얻을 수 있다면 별도의 단독투여 독성시험은 권고되지 않는다. 	<ul style="list-style-type: none"> • 언급 자체가 없음 	<ul style="list-style-type: none"> • 단회투여독성시험의 목적은 LD₅₀과 개략치사량 드이 지표를 구하여 외인성물질인 small molecule의 독성에 대한 상대적 비교 • Oligonucleotide는 내인성물질이며 분자량이 1000 이상으로 LD₅₀과 개략치사량을 통해 small molecule과의 비교 필요성이 없음. 따라서 내인성물질을 외인성물질과의 독성 비교는 의미가 없음
반 복 투 여 독성시험	<p>① 설치류 및 비설치류의 2종</p> <p>② 표적 독성 평가는 가급적 약리학적 효과 또는 생물학적 활성을 나타내는 동물 종 1종 이상에 대해 평가한다.</p> <p>※ ①과 ② 항목은 서로 모순적이라는 것을 확인할 수 있음. Nucleotide는 1종으로 독성시험을 수행할 수 있는데 small molecule의 대한 독성시험 2종을 사용하다보니 1</p>	<p>① 설치류 또는 비설치류 중 1종</p> <p>② 독성시험을 위한 1종의 동물종은 약리작용을 증명하는 proof of concept을 위해 사용된 동물종을 사용하는 것이 바람직함. 이는 nucleotide와 이에 반응하는 체내 receptor와의 약리작용의 과잉에 의한 독성이 발현할 수 있기 때문임.</p> <p>③ 시험기간: 질환의 임상적 진행이 빠르지 않다면 3개월 독성시험의 자료가 요구됨. 그러나 질환의 빠른</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nucleotide는 합성일지라도 내인성물질이며 small molecule과 대사 과정이 다름. • Nucleotide는 영양물질로 인체 및 동물 사이의 대사 과정이 차이가 없음. 반면에 small molecule의 대사는 cytochrome P450에 의해 대사됨. 대사 과정에서 무독성대사체와 독성대사체 생성이 cytochrome P450의 차이에 의해 달라질 수 있음. 특히 cytochrome P450은 종간 차이가 있기 때문에 1종이 아니라 2종의 동물종으로 독성시험이 수행됨 • 결과적으로 nucleotide는 내인성물질이며 종간 차이가 없기 때문에 1종의 동물종으로 수행되어도 무방함. • 시험기간은 3개월 반복투여독성

	<p>중 이상과 2중 수행이라는 것 모순적으로 서술됨.</p> <p>③ 시험기간: 가역성 시험을 포함하여 의약품의 비임상시험 가이드라인 참고</p>	<p>진행으로 사망이나 비가역적 병적상태의 임상적 형태를 보이는 질환이라면 3개월 독성시험 기간으로부터 생산된 최소한 2주 동안의 생존 동안의 자료는 제출되어야 함. 그러나 진행이 완만히 이루어질 경우에 3개월 독성시험 자료가 제출되어야 함.</p>	<p>시험으로 고정되었지만 질환의 진행 정도에 따라 제출할 자료에 대한 융통성이 제시됨. 예를 들어 아주 심각한 증상을 보이는 질환일 경우에는 약물 자체가 아주 강하여 독성시험에서 개체의 죽음을 유도할 수 있으니 최소한 2주 정도의 살아있는 개체에 대한 독성시험 자료의 제출을 요구함.</p>
유전독성	<ul style="list-style-type: none"> 구조적인 변형이 생긴 경우(예: 화학적 변형, 약물전달체, 링커 등)에는 이들 구조적 변형물 뿐만 아니라 그의 대사체, 분해산물의 유전독성 발생 위험도 고려 	<ul style="list-style-type: none"> 의미가 없어 수행 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> Cytochrome P450에 발생한 small molecule의 친전자성대사체에 의해 유전독성이 발생함. ASO 및 siRNA는 linker를 사용하지 않고 구조적 변이가 일어나도 체내의 nucleotide 대사와 같이 동일하게 대사되기 때문에 유전독성 발생과 무관함 평가원의 자의적 해석으로 불필요한 유전독성을 요구하는 것으로 이해됨.
생식발생독성시험	<ul style="list-style-type: none"> 합성 올리고뉴클레오티드의 약품의 생식.발생 독성시험은 「의약품등의 독성시험 기준 (식약처 고시)」 [별표 3] 및 「생명공학의약품의 비임상 안전성평가 (ICH S6(R1))」을 참고하여 평가하여야 하며, 개별 시험의 조합(package)은 목표 환자군 및 	<ul style="list-style-type: none"> 언급 없음 	

	특정 올리고뉴클레오티드에 대한 약리학적 효과에 따라 결정		
발 암 성 시험	<ul style="list-style-type: none"> 합성 올리고뉴클레오티드 종류에 따라 신생물질 신호, 종양유전자 활성화, 세포분열지수 등과 같은 연구를 위한 적절한 시험관 내/생체 내 모델을 사용하여 종양형성 및 발암 가능성이 연구되어야 한다. 이미 공개된 자료도 위험성 평가에 이용 가능하다. 	<ul style="list-style-type: none"> 언급 없음 	
안 전 성 약 리 시험	<ul style="list-style-type: none"> 수행 	<ul style="list-style-type: none"> 언급 없음 	

6. 결론

- 중요성:** Oligonucleotide-Based Therapeutics인 antisense oligonucleotides(ASO) 및 small interfering ribonucleic acids (siRNAs) 약물은 일반적인 질환보다 생명에 영향을 줄 정도의 질환을 치료하기 위해서 개발되는 것이 일반적임. 만약 이와 같은 중증 질환을 치료하는 신약에도 올리고뉴클레오티드 약물임에도 불구하고 식품의약품안전평가원의 합성 올리고뉴클레오티드 의약품의 임상시험 시 비임상시험 가이드라인에 따라 독성시험 및 비임상시험을 수행한다면 비용 증가 및 장시간이 소요됨.
- 결론:** SDLT(Severely Debilitating or Life-Threatening) 질환에 해당되는 ASO나 siRNA 신약을 개발한다면 미국 FDA의 Nonclinical Testing of Individualized Antisense Oligonucleotide Drug Products for Severely Debilitating or Life-Threatening Disease 가이드라인이 제시한 독성시험의 제안과 수행 필요성을 식약처에 사전 협의가 필요함

<참고문헌>

- 식품의약품안전평가원(2024) 합성 올리고뉴클레오타이드 의약품의 임상시험 시 비임상시험 가이드라인의 [민원인 안내서: 안내서-1396-01호]
- FDA CDER(2021). Guidance for Industry: Nonclinical Safety Assessment of Oligonucleotide-Based Therapeutics:
- FDA CDER(2024). IND Submissions for Individualized Antisense Oligonucleotide Drug Products: Administrative and Procedural Recommendations Guidance for Sponsor-Investigators.
- Vinjamuri BP, Pan J, Peng P. A Review on Commercial Oligonucleotide Drug Products. J Pharm Sci. 2024 Jul;113(7):1749-1768. doi: 10.1016/j.xphs.2024.04.021. Epub 2024 Apr 26.

51. 임상시험 CRO의 글로벌 변화와 국내 비임상 CRO의 엣지

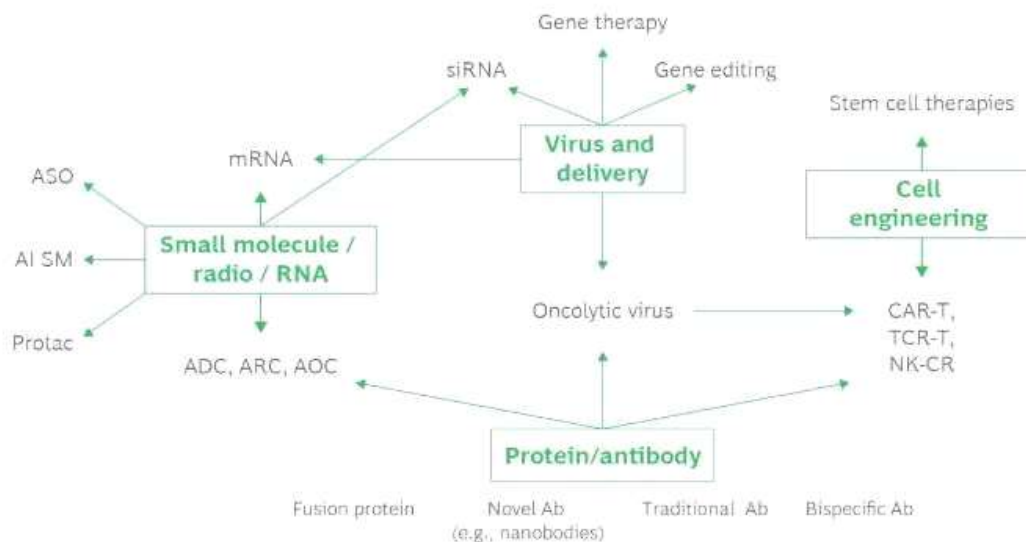
1. 임상시험의 End-to-End CRO 및 환자 중심 모델 (patient-centered model) 활성화

- 다음과 같이 임상시험 CRO 선택에 있어서 5가지 요소가 있지만 여러 단계로 구성된 임상시험 과정에서 전문성을 높이는 방향으로 reshape 즉, End-to-End CRO 활성화 및 환자 중심 모델(patient-centered model) 활성화(Bennani 등, 2024; Macdonald, 2024)
 - ① Capabilities for technical demands of your study
 - ② QA Process
 - ③ Experience
 - ④ Outsourcing Cost
 - ⑤ Communicate
- 일반적으로 임상시험 설계, 관리, 모니터링, 결과분석 등 업무 전부가 특정 CRO에 의해 수행되는 서비스 모델을 full service model이라고 함. 그러나 이들은 임상시험 전 과정에서 완벽한 전문성을 가질 수는 없음. 따라서 임상시험의 특정 단계에 대한 전문성을 극대화하기 위해 특정 단계의 **전문성을 기반으로** 임상시험의 시장에 참여하는 CRO 기업의 활성화. 이와 같은 전문성을 가진 End-to-End CRO 활성화.
- Digital technology과 AI을 응용한 **환자 중심 모델(patient-centered model)** 활성화: 기존의 질병 중심 관점에서 주로 질병을 치료하거나 예방할 수 있는 의약품 개발뿐만 아니라 규제기관의 승인과 품목허가를 목표로 하는 **관료-중심 임상시험**에서 탈피하여 유사한 과거 임상시험의 빅데이터를 이용하여 환자에게 최적의 임상시험이 이루어질 수 있는 모델

2. 신약 개발의 Platform Approach의 더욱 활성화

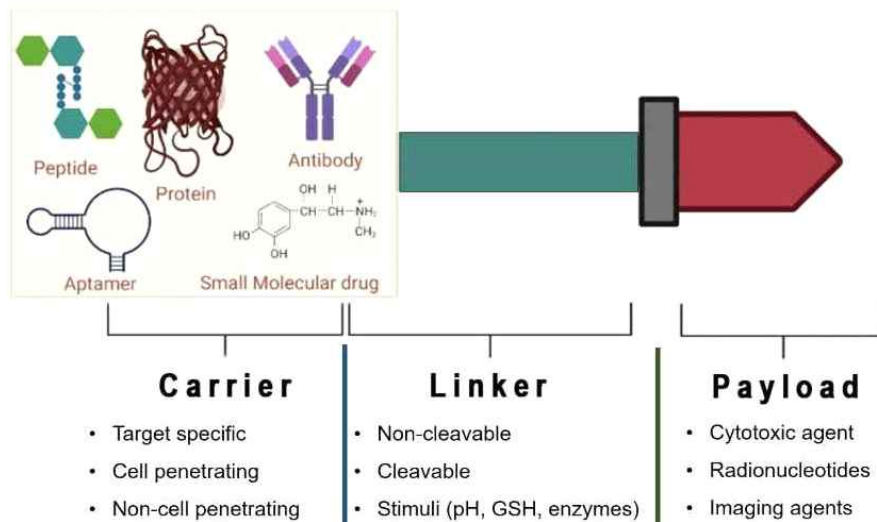
- 신약의 역사는 약물 전달체 개발과 표적-특이성(target-specificity) 탐색의 역사. 이들 특 성의 효율적 달성을 위해 전문성을 기반한 platform technology의 발달과 새로운 조합.
 - ① Protein/Antibody Platform,
 - ② Small-Molecule, Radio, and RNA Platform.
 - ③ Virus and Delivery Platform
 - ④ Cell Engineering Platform
- 이와 같은 Platform Approach는 <Exhibit-3>와 같이 4가지로 분류되어 합종연행을 통해 시너지 효과로 새로운 blockbuster 창출의 근간이 됨. 이와 같은 platform-기반 신약 개발은 더욱 활성화(Boston consulting group, 2023)

Exhibit 3 - Four Platforms Create a Foundation for Reinforcing Advantages Across Modalities



3. 2025년 신약 승인의 특성과 약물 복합체 개발의 활성화

- 2024년 11월 발표된 논문(Rim 등, 2024)에 따르면 다음과 같은 약물이 승인될 추정되어 신약의 특성은 **항암제로 세포치료제, 그리고 초희귀 질환(ultra-rare diseases)의 치료제** 개발의 특성
 - ① 담관암, 위장암, 췌장암 그리고 유방암 등에 대한 항암세포치료제
 - ② 희귀질환 치료제, 유전맥관부종(hereditary angioedema), 황반부 모세혈관 확장 증(macular telangiectasia), 선천성 부신과다형성증(congenital adrenal hyperplasia), 바스증후군(Barth syndrome) 등의 희귀 및 초희귀 질환(rare and ultra-rare diseases) 치료제
- Carrier-Linker-Payload로 구성된 저분자 복합체는 주로 암세포를 표적하여 다양한 carrier 개발의 활성화와 더불어 방사선 동위원소(radionucleotide) 등을 이용한 특수부위 조영술 약물 개발도 활성화(Zhu 등, 2024; Hong 등, 2024; Bethany등, 2021)



<그림> Conjugate drug의 개별적 특성

4. 비임상-CRO 엣지(Edge)

- 가장자리라는 뜻을 가진 '엣지(Edge)'라는 단어가 첨단 기술과 우리의 일상을 특별한 의 미로 연결. IT에서는 네트워크 기술과 연결되며 효율성과 혁신을 상징하고, 일상에서는 독특하고 감각적인 디자인을 뜻함.
- 국내외의 부정적 영향에도 불구하고 안정적인 매출-기반한 경영을 위해서는 국내 독성시험-기반 CRO는 다음과 같은 엣지가 요구됨

- ① **미국 CRO 및 규제기관과의 협력 및 교류:** 신약 개발과 관련하여 국내 고시 및 가이드라인은 ICH 및 독성학적 이론이 배제되어 규제기관의 자의적 해석을 통한 과도한 독성시험의 요구가 많음. 안전성이라는 표면적 이유이지만 이러한 요구는 대부분 전문성의 부족에 기인함. 개발자의 입장에서는 포기하고 싶을 정도로 고통스러움. 새로운 약물 모달리티가 증가하고 약물의 첨단기술화로 이와 같은 독성시험 gap은 미국을 포함한 글로벌 스탠다드와의 차이가 더욱 심화될 것임. 그러나 이와 같은 gap에 대한 인식과 자체 해결 능력이 부재하여 CRO 및 규제기관 측면에서 미국의 비임상 CRO 기업 및 규제기관과의 실질적인 협력 및 교류를 통한 다방면의 노력이 요구됨. 그리고 **신약과 관련된 고시 및 가이드라인에 대한 전반적인 재검토가 필요하여 규제기관의 연구과제화 필요성이 있음.**
- ② **투여 기술의 첨단화:** 새로운 약물 모달리티는 대부분 비경구적 투여로 대량 합성이 가능한 small molecule과는 다르게 제한적 생산과 제한된 투여용량의 특성. 특히 고도의 투 여 기술이 요구되어 투여의 실수와 작은 차이는 추가적인 비용과 결과의 오류. 따라서 숙련된 기술과 첨단 장비와의 조합은 다양한 약물 모달리티의 독성시험 성공을 위한 중요한 요소
- ③ **노동-집약적 특성과 첨단 지식의 결합을 통한 서비스 제공 시스템:** 국내 비임상 시험의 마케팅 방법은 가격의 흥정을 기반으로 하는 '견적서 마케팅'으로 이루어짐. 이는 독성시험-CRO의 기본적인 특성인 노동-집약적 특성에서 벗어나기 어렵고 이윤 폭의 증가에 한 계임. 지식-기반 마케팅을 위해서는 비임상시험-CRO에 추가적인 IND-enabling package 를 수행 가능한 팀이 요구됨. 이러한 요구는 빅 파마보다 고객의 대부분인 바이오기업에 더욱 절실함. 미래의 비임상시장은 바이오의약품 경험이 풍부한 비임상시험기관과 IND-enabling package 수행 컨설팅 기업의 통합을 통한 마케팅 전략에 의해 좌우될 것으로 추정됨.

<참고문헌>

- Rim MH, Dean C, Aliaj E, Karas BL, Barada F, Levitsky AM. Recent and anticipated novel drug approvals (3Q 2024 through 2Q 2025). Am J Health Syst Pharm. 2024 Nov 7;81(22):1103-1108
- Bethany M. Cooper, Jessica Iegre, Daniel H. O' Donovan, Maria Ölwegård Halvarsson and David R. Spring. Peptides as a platform for targeted therapeutics for cancer: peptide–drug conjugates (PDCs). Chemical Society Reviews. 2021; 50:1480-1494.
- Zhu, Yi-Shen et al. "Advances in conjugate drug delivery System: Opportunities and challenges." International journal of pharmaceutics (2024): 124867 .
- Hong J, Li K, He J, Liang M. A New Age of Drug Delivery: A Comparative Perspective of Ferritin-Drug Conjugates (FDCs) and Antibody-Drug Conjugates (ADCs). Bioconjug Chem. 2024 Aug 21;35(8):1142-1147.
- Chris Bennani, Clemens Möller, Satty Chandrashekhar, and Sean R. McMaster. Big Changes Are Coming to Pharma Contract Research Organizations. Boston consulting group. November 21, 2024
- Gareth Macdonald. Patient centricity will change the CRO space, according to new research Posted Clinical Insider on 27 November 2024
- Boston consulting group, 2023.
www.bcg.com/publications/2023/benefits-and-risks-of-new-drug-modalities

52. Prodrug을 이용한 New drug modality 소개

1. Small molecule의 항암기전을 위한 화학적 특성

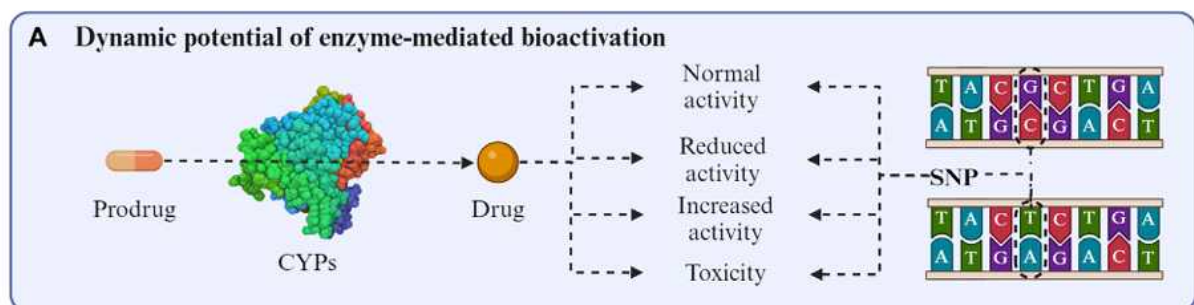
- Small molecule의 신약 개발에 있어서 필수적으로 이해해야 할 필요성 부분이 Cytochrome P450에 의한 Biotransformation(생화학적 전환)임
- 생물체에서 유래한 바이오의약품은 당, 단백질, 지질 및 핵산으로 구성되어 있어 모든 생물체에서 중간 차이가 없이 동일하게 효소에 의해 대사됨.
- 반면에 small molecule은 제1상반응에 의해 극성대사체 그리고 제2상반응에 의해 친수성 대사체로 배출되며 대부분의 약물이 이와 같은 biotransformation(생화학적 전환)을 거쳐 배출됨.
- 그러나 대부분의 항암제 및 일부 질환을 치료하는 small molecule은 제1상반응을 통해 친전자성대사체로 전환됨. 이는 세포내의 DNA 및 단백질의 친핵성 부위에 공유결합하여 세포사멸 및 효소활성을 억제하여 cell cycle arrest를 통해 항암효능
- 따라서 항암제의 친전자성은 cytochrome P450에 의해 전환되어 암세포를 살해하는 기전으로 개발됨.



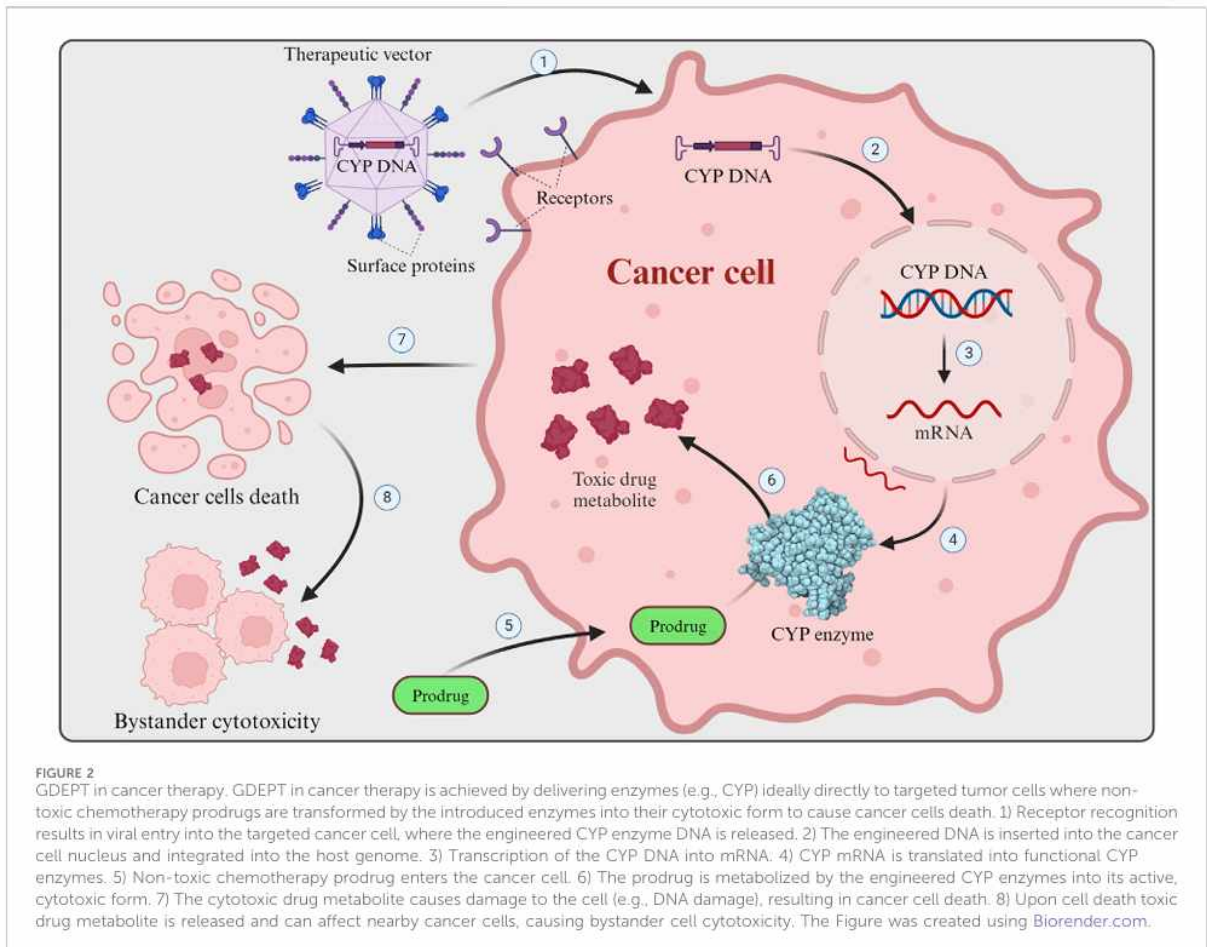
<그림> Small molecule과 바이오의약품(biologics)의 대사 차이점

2. Prodrug의 New drug modality

- 2002년 Chen 등은 Gene-directed enzyme prodrug therapy(GDEPT)이라는 신약 개발 방법을 최초로 소개함.
- GDEPT는 prodrug을 친전자성대사체로 전환시키는 cytochrome P450 유전자를 도입하여 암세포를 사멸시키는 기전으로 유전자치료제의 일종임.
- <그림-A>에서처럼 cytochrome P450 유전자의 SNP(single nucleotide polymorphysm, 단일염기다형성)에 기인하여 Prodrug 항암제의 친전자성대사체 생성 정도에 차이에 의하여 약리와 독성에서 개인차이가 있다는 점을 나타낸 것임(Carrera-Pacheco 등, 2024)



- 2024년 Carrera-Pacheco 등은 cytochrome P450 유전자를 함유하고 암세포 수용체와 결합하는 바이러스 벡터를 개발함. 이 벡터는 prodrug 항암제를 경구투여하여 암세포에 도달하면 친전자성대사체로 전환하여 암세포를 사멸시키는 기전임.



3. Prodrug의 New drug modality에 대한 결론

- **단점:** 이 약물의 모달리티에 의한 부작용 최소화를 위해서는 prodrug의 친전자성 활성이 아주 약한 cytochrome P450 선택과 이에 대한 기질의 약물 개발의 어려움
- **장점:** 전신으로 전이된 암을 치료하는데 가장 좋은 방법으로 사료됨

<참고문헌>

- Chen, L., and Waxman, D. J. (2002). Cytochrome P450 gene-directed enzyme. prodrug therapy (GDEPT) for cancer. Curr. Pharm. Des. 8, 1405–1416.
- Carrera-Pacheco SE, Mueller A, Puente-Pineda JA, Zúñiga-Miranda J, Guamán LP. Designing cytochrome P450 enzymes for use in cancer gene therapy. Front Bioeng Biotechnol. 2024 May 24;12:1405466.

53. 항비만치료제 기전과 polypeptide vs small molecule의 비교분석

1. 항비만치료제의 MOA(mechanism of action)

1) GLP-1/GIP receptor dual agonist의 기전

- Incretin 호르몬의 일종으로 위장에서 분비되는 GLP-1 (glucagon-like peptide 1, 글루카곤 유사 펩타이드 1)와 소장의 K세포에서 분비되는 GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide, 포도당 의존성 인슐린분비 폴리펩타이드)의 수용체(receptor)에 대한 이중작용제(dual agonist)
- GLP-1/GIP receptor의 이중작용제로 대표적인 항비만치료제는 아래의 <FIGURE 2>에서처럼 Tirzepatide(티르제파이드)임(Zaffina 등, 2023).

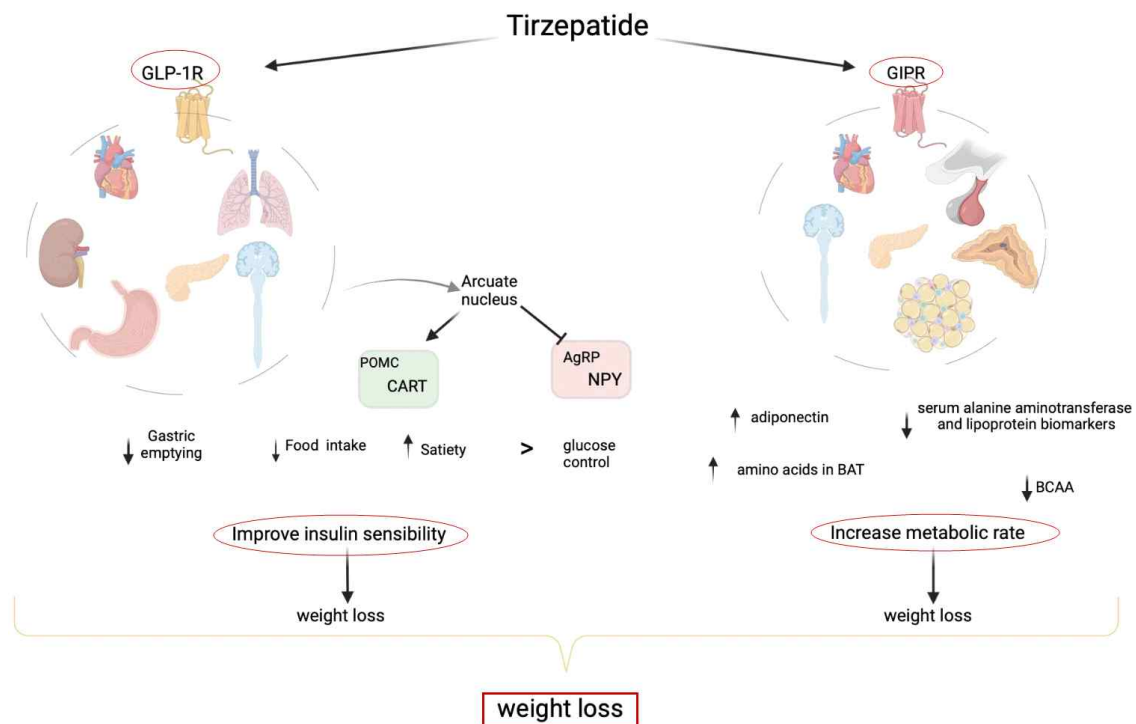
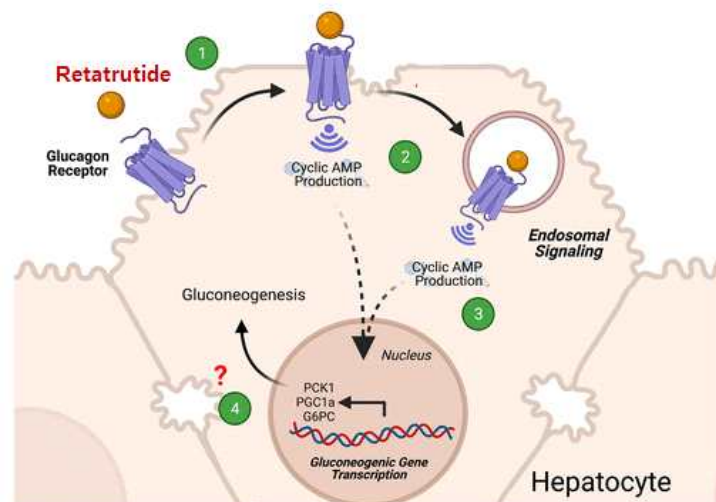


FIGURE 2. Physiological mechanism of incretins and a dual GIP/GLP-1 receptor agonist on weight loss. proopiomelanocortin(POMC), agouti-related peptide(AgRP), cocaine-and amphetamine-regulated transcripts(CART), branched-chain amino acids(BCAAs), central nervous system(CNS)

2) GLP-1/GIP/Glucagon receptor triple agonist

- GLP-1/GIP receptor의 이중작용제에 GCGR(glucagon receptor, 글루카곤 수용체) 작용제가 추가된 삼중작용제
- GCGR 작용제는 글루카곤 수용체에도 작용하여 산소 소모와 지질 이화작용, 열 발생 등을 통해 에너지 소모를 높임(Urva 등, 2022; Cajulao 등, 2202). **GCGR은 소화계에서도 소량으로 발현되지만 주로 간과 신장에서 발현됨**(Glucagon receptors are mainly expressed in liver and in kidney with lesser amounts found in heart, adipose tissue, spleen, thymus, adrenal glands, pancreas, cerebral cortex, and gastrointestinal tract)(Wikipedia, 2024).
- 삼중작용제의 대표적인 치료제는 retatrutide<LY3437943>로 임상2상시험을 마친 상태로 다음과 같이 48주 동안 22.8%에서 24.2% 감소 효능이 확인됨(Sanyal 등, 2024): A **48-week phase 2 obesity study** demonstrated weight reductions of **22.8% and 24.2%** with retatrutide 8 and 12 mg, respectively.



<그림> Retatrutide의 glucagon receptor에 대한 작용예상기전

3) GLP-1/GIP/Glucagon receptor에 대한 작용제 조합을 통한 항비만치료제 개발

- 아래 Fig. 2에서처럼 GLP-1/GIP/Glucagon receptor 등 3가지의 항비만과 관련하여 역할을 기반으로 Fig. 1에서처럼 수용체 조합인 monoagonist, dual agonist 그리고 triple agonist 으로 항비만치료제가 개발되고 있음(Tschöp 등, 2023).

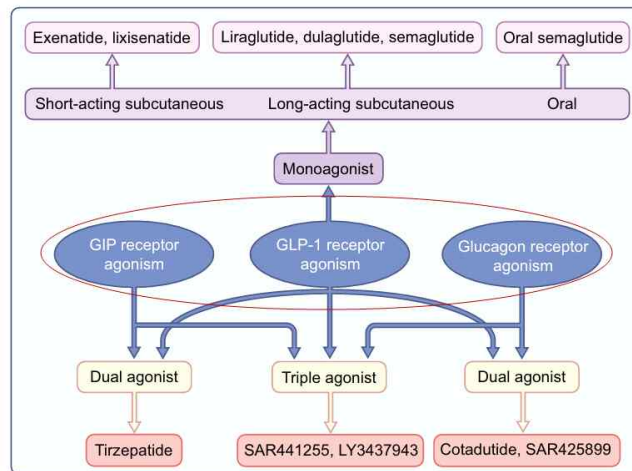


Fig. 1 Schematic illustration of monoagonists, dual agonists and triple agonists based on GLP-1, GIP and glucagon receptor activation alone or in combination.

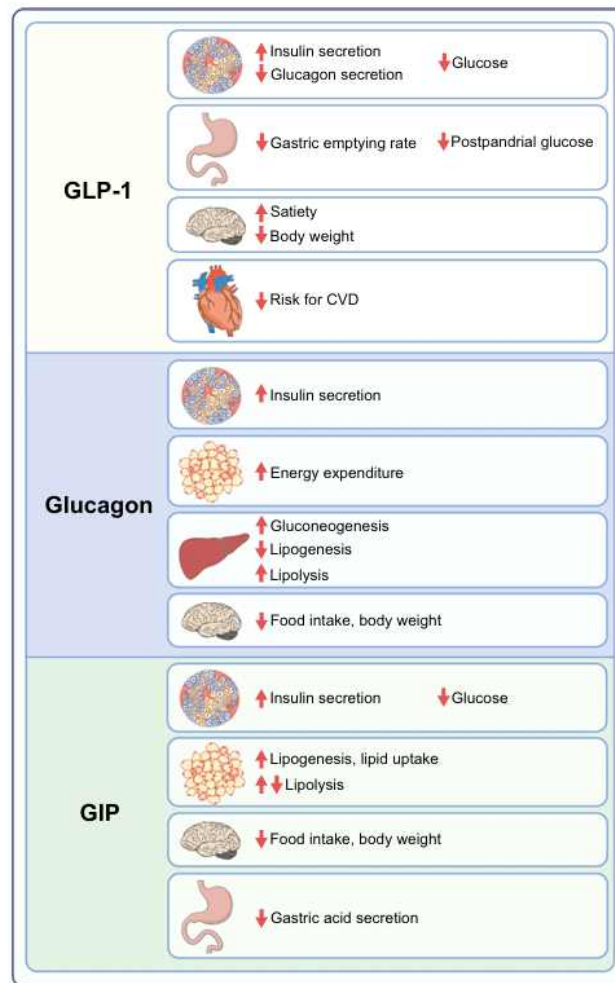


Fig. 2 The clinically most relevant mechanisms of action of GLP-1, glucagon and GIP.

2. 약물 모달리티에 따른 항비만치료제

1) 합성펩타이드(synthetic peptides)

- 아래의 <표>에서처럼 2024년 8월 현재 13종류의 합성펩타이드가 **GLP-1/GIP/Glucagon receptor에 대한 이중작용제(dual agonist)와 삼중작용제(triple agonist)로 개발 중인**(DimaBiotech. 2024-08-08). GIPGR과 GLP-1R에 대한 dual agonist인 티르제파이드(Tirzepatide)가 2022년 5월부터 Mounjaro라는 이름으로 제2형 당뇨병 치료용으로 승인되었음. 티르제파이드는 이중작용제로 체중평균 15-21%가 감소 효능이 확인되었음(Zaffina 등, 2023).
- **삼중작용제의 가장 먼저 개발 중인 대표적인 치료제인 retatrutide<LY3437943>**은 임상2상시험을 마친 상태로 22.8%에서 24.2% 감소 효능이 확인됨(Sanyal 등, 2024). 현재는 임상3상시험 중임.

<표> GLP-1/GIP/Glucagon receptor에 대한 이중작용제(dual agonist)와 삼중작용제(triple agonist)로 개발 중인 합성펩타이드(DimaBiotech. 2024-08-08)

Drug	Targets	Indications	Company	Phase
Tirzepatide	GIPR x GLP-1R	Obesity, Type 2 Diabetes, Non-alcoholic Fatty Liver Disease	Lexaria Bioscience Corp., Eli Lilly & Co.	Approved
HRS-9531	GIPR x GLP-1R	Obesity, Diabetes	Shendi Pharmaceuticals	Phase III
Retatrutide	GCGR x GIPR x GLP-1R	Atherosclerosis, Chronic Kidney Disease, Type 2 Diabetes	Eli Lilly & Co.	Phase III
BGM-0504	GIPR x GLP-1R	Obesity, Diabetes	Borui Innovations	Phase II
CT-388	GIPR x GLP-1R	Obesity, Type 2 Diabetes	Carmot Therapeutics, Inc., Roche Holding AG	Phase II
CT-868	GIPR x GLP-1R	Type 1 Diabetes, Obesity	Roche Holding AG, Carmot Therapeutics, Inc.	Phase II
eHS20094	GIPR x GLP-1R	Obesity, Type 2 Diabetes	Hansoh Pharmaceutical	Phase II
VK-2735	GIPR x GLP-1R	Obesity, Metabolic Diseases, Non-alcoholic Fatty Liver Disease	Viking Therapeutics, Inc.	Phase II
DR10627	GIPR x GLP-1R	Diabetes, Non-alcoholic Fatty Liver Disease	Doer Biotech	Phase I
HDM1005	GIPR x GLP-1R	Obesity, Diabetes	Huadong Medicine Co.,Ltd	Phase I
LY-3493269	GIPR x GLP-1R	-	Eli Lilly & Co.	Phase I
THDBH120	GIPR x GLP-1R	Obesity, Type 2 Diabetes	Tonghua Dongbao Pharmaceutical	Phase I
UBT-251	GCGR x GIPR x GLP-1R	Obesity, Type 2 Diabetes, Non-alcoholic Fatty Liver Disease	Federal Biologics	Phase I

2) Small molecules

- 아래의 <표>에서처럼 2024년 8월 현재 6종류의 small molecule가 GLP-1/GIP/Glucagon receptor에 대한 단일작용제(monoagonist), 이중작용제(dual agonist)와 삼중작용제(triple agonist)로 개발 중임(DimaBiotech. 2024-08-08). 삼중작용제로는 한미약품의 HM-15275가 임상1상시험 중임.

Drug	Targets	Indications	Company	Phase
HM-15211	GCGR x GIPR x GLP-1R	Non-alcoholic Fatty Liver Disease	Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.	Phase II
HM-15275	GCGR x GIPR x GLP-1R	Obesity	Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.	Phase I
HZ-012	GIPR x GLP-1R	Obesity	Heze Pharmaceutical	Phase I
LY-3537021	GIPR	-	Eli Lilly & Co.	Phase I
SCO-094	GIPR x GLP-1R	Diabetes, Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Obesity	Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.	Phase I
KP-405	GIPR x GLP-1R	Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease	Kariya Pharmaceuticals ApS	Early Phase I

3. Eli Lilly의 이중작용제 Tirzepatide와 한미약품의 삼중작용제 HM-15275의 약물 모달리티 측면에서 비교분석

3-1. 이중작용제 Tirzepatide

1) Eli Lilly의 이중작용제 Tirzepatide의 약물 모달리티 특성

- 피하주사로 개발 – 80% 생체이용율(PDB-101, 2024) .
- Transporter – albumin
- Figure 1과 같이 분자량이 4813.45과 39개 아미노산으로 합성된 직선형. 2개의 비암호형 Aib(α -amino isobutyric acid)가 2번과 13번에 위치. Aib는 albumin에 결합력을 높이며 peptidase에 의한 분해를 방지하여 반감기 120 hrs 정도로 길게함.
- C20 residue lysine에 C20 fatty acid moiety (eicosanedioic acid)의 hydrophilic linker 존재. Linker은 유동성을 가져 표적 수용체에 결합이 잘될 수 있는 최적화됨(Chavda 등, 2022)

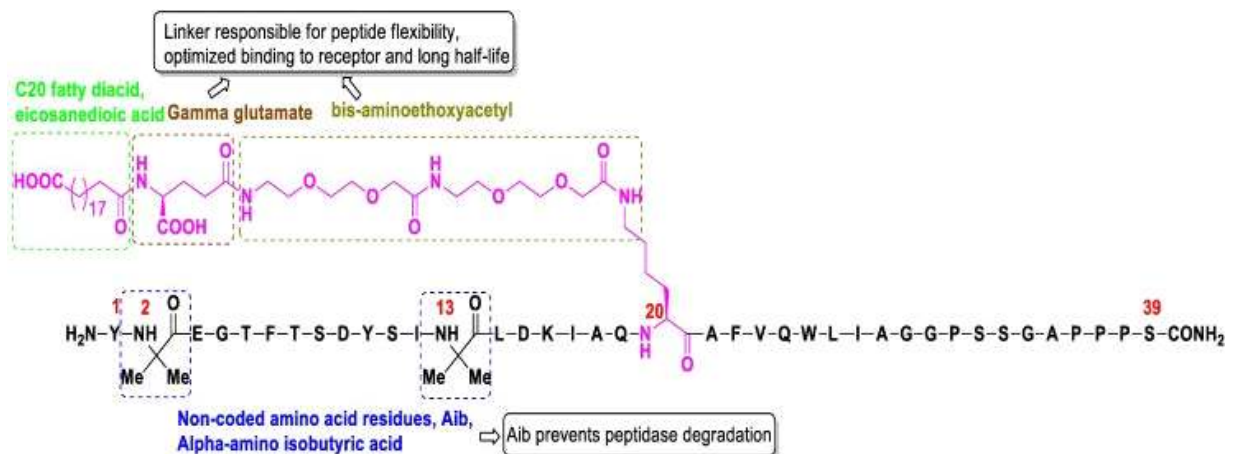


Fig. 1. Structure of tirzepatide.

2) Tirzepatide-Target Complex

① **GLP-1R와의 비공유결합 형태:** 아래의 원문과 Figure 2와 같이 Tirzepatide가 GLP-1R에 수소성 및 극성의 비공유결합(non-covalent bond)으로 이루어짐 . 공유결합이 아니기 때문에 약리작용 후 결합이 분리되어 peptidase에 의해 분해됨(Sun 등, 2022).

- <원문> The EM structure of Tirzepatide bound to the complete GLP-1R and G-proteins (Figure 2, PDB ID 7rgp , Sun et al., 2022) shows **some hydrophobic and some specific polar interactions between the peptidic drug and the GLP-1 receptor molecule**. At the N-terminus, the Tyr1 of Tirzepatide forms weak hydrogen bonds with the side chain of Gln234. The Glu3 forms an ionic bond with Arg190 and a network of hydrogen bonds with Tyr152 and Tyr148 of the receptor (not shown here for clarity). These two Tyr residues in turn form pi-pi interactions. The Thr 7 forms a hydrogen bond with Lys197, while Asp9 forms a hydrogen bond with Arg380. The Ser8 and Ser11 of Tirzepatide form a network of hydrogen bonds involving the receptor residue Thr298. The Gln19 of Tirzepatide forms a hydrogen bond network with Thr35 and Val30 of the receptor, while the backbone atoms of Ile27 forms a hydrogen bond with Tyr69. Several of these interactions are similar to those seen in the binding of GLP-1 with GLP-1R. The C-terminal eight amino acids of the Tirzepatide are not visible in the structure so are not shown here.

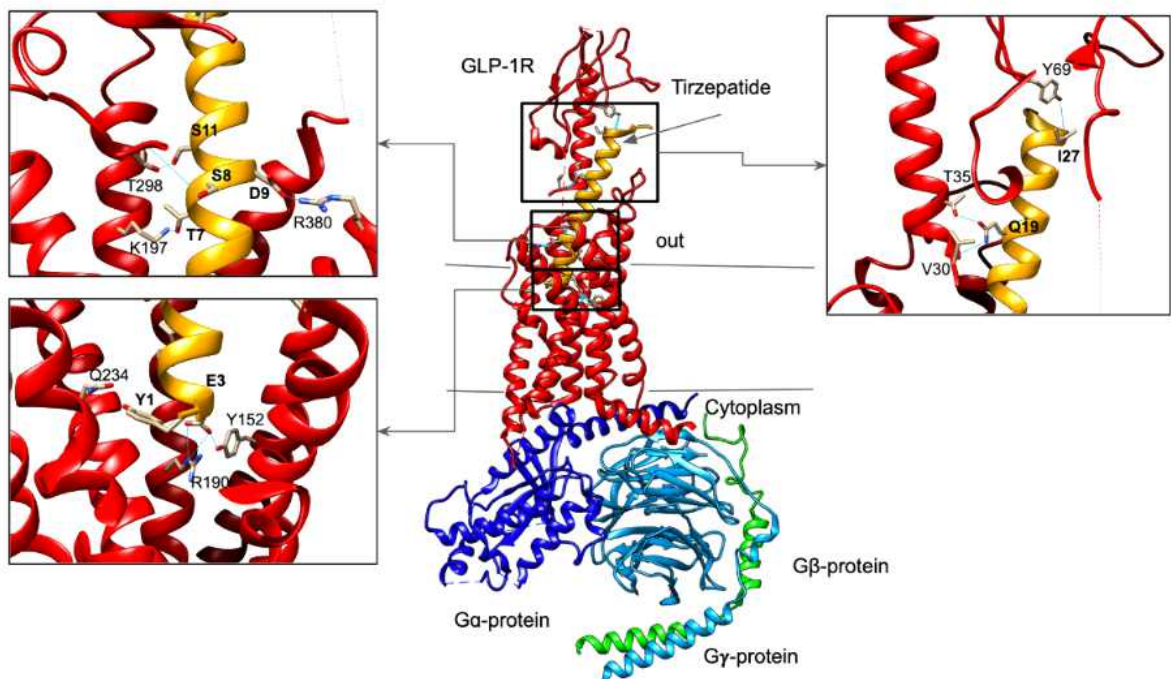


Figure 2. EM structure of GLP-1R (red) with bound Tirzepatide (gold) (PDB ID 7rgp, Sun et al., 2022). Location of the membrane, and G-proteins associated with the receptor are also shown. The insets show a close up of specific polar interactions between the Tirzepatide and the GLP-1R.

② **GIPR과의 비공유결합**: 마찬가지로 아래의 원문과 Figure 3와 같이 Tirzepatide가 GIPR에 소수성 및 극성의 비공유결합(non-covalent bond)으로 이루어짐. 공유결합이 아니기 때문에 약리작용 후 결합이 분리되어 peptidase에 의해 분해됨(Sun 등, 2022).

<원문> The EM structure of Tirzepatide bound to the complete GIPR and G-proteins (Figure 3, PDB ID 7rbt, Sun et al., 2022) shows **some hydrophobic and some specific polar interactions between the peptidic drug and the GIP receptor molecule**. At the N-terminus, the Tyr1 of Tirzepatide makes Van der Waals contact with the receptor residues, the Glu3 forms an ionic bond with Arg183 and a network of hydrogen bonds with Tyr145 and Ser381 of the receptor. The Asp9 forms a hydrogen bond with Arg370, while Ser8 and Ser11 of Tirzepatide form a network of hydrogen bonds involving the receptor residue Glu288, Arg 289, and Asn290. The Asp15 of Tirzepatide forms a hydrogen bond with Ala32 of the receptor, the backbone atoms of Ile27 forms a hydrogen bond with Arg113 of the receptor, and the side chain of Tirzepatide's Ser32 forms a hydrogen bond with Tyr200 of the GIPR. Several of these interactions are similar to those seen in the binding of GLP-1 with GLP-1R. The C-terminal seven amino acids of the Tirzepatide are not visible in the structure so are not shown here.

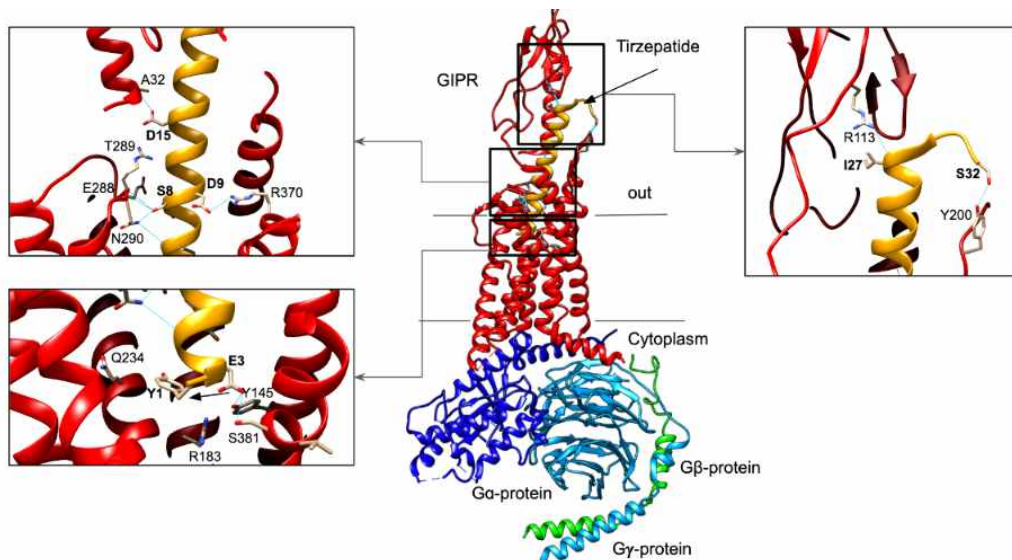


Figure 3. EM structure of GIPR (red) with bound Tirzepatide (gold) (PDB ID 7rbt, Sun et al., 2022). Location of the membrane, and G-proteins associated with the receptor are also shown. The insets show a close up of specific polar interactions between the Tirzepatide and the GIPR.

3-2. 한미약품의 삼중작용제 HM-15275

1) 한미약품의 삼중작용제 HM-15275의 약물 모달리티 측면

- HM-15275은 GLP-1/GIP/Glucagon receptor에 결합하는 삼중작용제의 small molecule로 구조 및 대사 과정에 대한 확인이 어려움.
- 현재 정상인과 더불어 비만인을 포함하여 90명을 대상으로 임상1상시험(NCT06481098) 중임

1 Clinical Trials associated with HM-15275

NCT06481098 / Recruiting Phase 1

A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single- and Multiple-Ascending Dose Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of HM15275 in Healthy and Obese Subjects

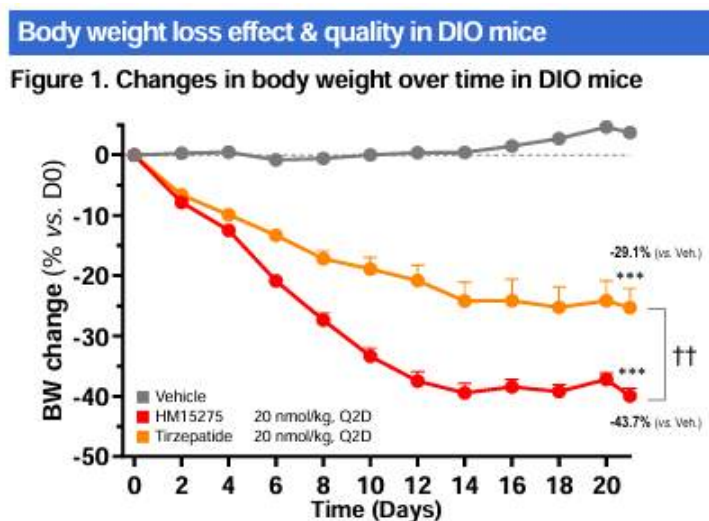
This Study is a Phase 1 Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of HM15275 in Healthy and Obese Subjects.

Start Date: 28 May 2024

Sponsor / Collaborator: Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.

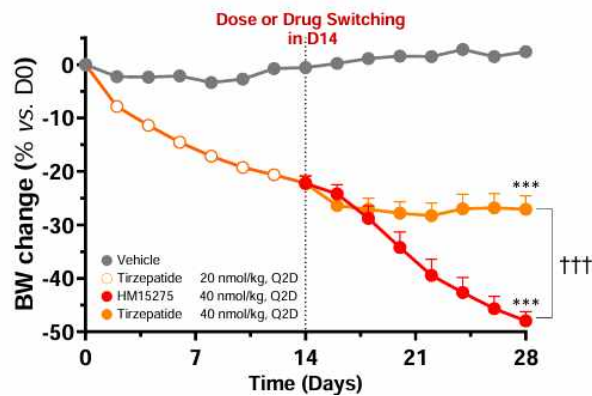
2) 비임상연구의 Poster를 체중감소 효과와 기전

- Kim 등(2024)이 11월 발표한 포스터에 따르면 Figure 1에서처럼 삼중작용제 HM-15275는 DIO mice(high fat diet-induced mice, 식이유도 비만쥐)를에 3주간 투여한 결과, 대조군 대비 이중작용제인 Tirzepatide의 29.1%보다 훨씬 높은 비율인 43.7%의 체중 감소를 유도한 것으로 확인됨.



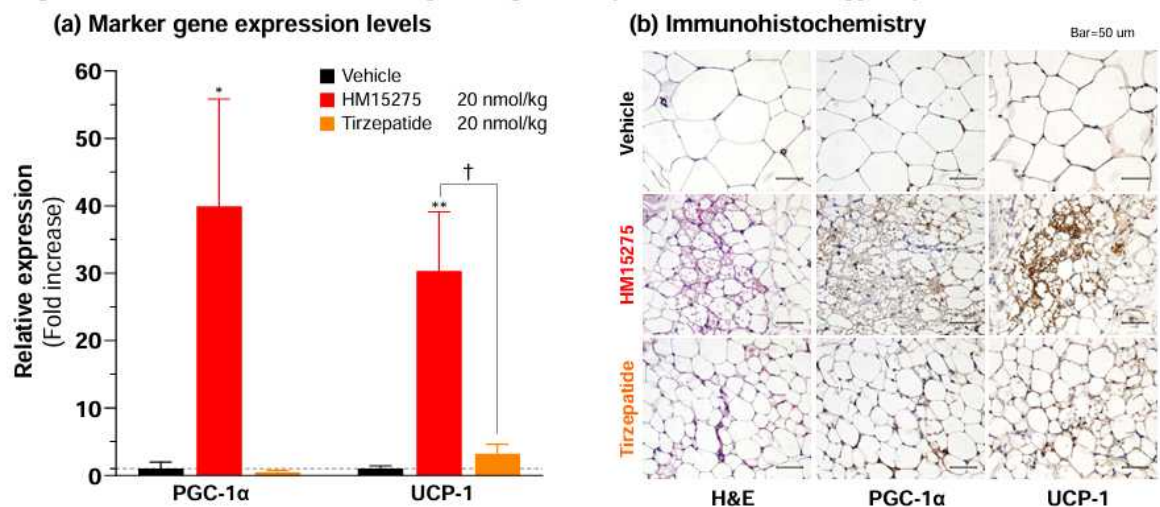
- Figure 2에서처럼 2주 동안 이중작용제인 Tirzepatide 투여 후 삼중작용제 HM-15275를 투여한 결과, 약 30% 수준에서 멈춘 체중감소가 대조군 대비 약 50% 정도까지 이루어 지는 것이 확인됨. 추정컨대 지속적인 삼중작용제 HM-15275 투여가 이루어지면 50% 이상의 체중감소가 일어날 것으로 사료됨.

Figure 6. Changes in body weight over time under switching conditions



- 산화 대사를 촉진하여 지방 저장을 억제하는 PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 - alpha)과 갈색지방에서 활성화하여 열발생을 촉진하는 UCP 1(uncoupling protein 1) 발현 증가를 유도하는 기전으로 설명됨

Figure 5. Immunohistochemistry and gene expression for energy expenditure

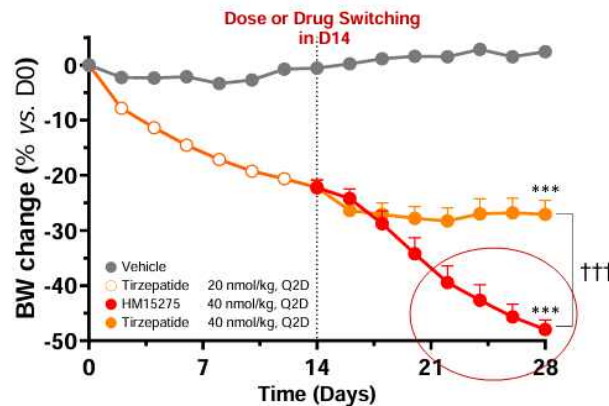


➤ In DIO mice, HM15275 substantially reduced lipid droplet size of white adipose tissue. Additionally, PGC-1 α and UCP-1 expression and tissue staining indicated that HM15275 could provide more potent fat browning effect than tirzepatide.

4. Eli Lilly의 이중작용제 Tirzepatide와 한미약품의 삼중작용제 HM-15275의 체중감소 및 기전 이해를 통한 조심스러운 추정

- 신약개발을 위한 초기단계에서 확인할 중요한 요소는 ① 후보물질이 Target-특이성과 ② Target 결합의 reversibility
- 논문 검토를 통해 Tirzepatide는 표적에 대한 **비공유결합**을 하며 반감기가 120시간으로 확인됨.
- 신약개발의 개발에서 적응증에 따라 후보물질의 표적과 결합의 가역성을 달리하여야 함. 예를 들어 암세포가 표적이라면 후보물질은 공유결합을 통한 비가역적 결합으로 사멸을 유도하여야함. 반면에 비만과 같이 **체내 항상성 유지 장애에 의한 적응증이고 표적이라면 후보물질은 비공유결합의 가역적 결합을 통한 기전**이 필요함.
- 이와 같은 이론적 근거를 통해 아래의 Figure 6의 결과를 이해하여 본다면 삼중작용제 HM-15275은 cytochrome P450에 의하여 경친전자성대사체(soft electrophilic metabolite) 전환되어 GLP-1/GIP/Glucagon receptor와 공유결합에 기인하는 것으로 추정됨. 이와 같은 경친전자성대사체(soft electrophilic metabolite)는 다양한 표적과 cross-activity를 통해 돌이킬 수 없는 심각한 부작용의 우려가 있음. 따라서 ② Target 결합의 reversibility에 대한 확인이 반드시 필요할 것으로 사료됨. Tirzepatide는 모든 동물과 인간이 가지고 있는 Peptidase에 의해 분해되어 배출 또는 재이용되는 것으로 추정됨. 반면에 cytochrome P450에 의해 대사되는 HM-15275은 중간 차이가 있으므로 임상시험에서 예정하는 용량과 투여기간의 조절이 필요할 것으로 사료됨.
- **추가내용:** 투여 10일 후 거의 체중 감소가 거의 포화된 상태임. 이에 20nmol에서 40mol을 증가하여도 추가적인 감소가 없음. 이는 20nmol을 Q2D를 지속하여도 GLP-1/GIP 수용체가 포화된 상태로 더 이상의 체중감소가 어렵다는 의미임. 삼중작용제 HM15275 투여에 의한 추가적인 감소는 GLP-1/GIP 수용체의 작용보다 추가적으로 glucagon receptr에 작용에 기인하는 것으로 추정됨. 따라서 HM15275은 Glucagon receptor 작용만으로도 약 20% 체중 감소를 유도할 수 있다는 것을 보일 필요성이 있음. Tirzepatide는 반감기가 120시간의 5일임. Tirzepatide는 Q5D로 투여가 바람직함. HM15275의 경친전자성대사체 가능성에 대한 추론은 아래의 그림6에서 HM15275에 의해 급격하게 멈춤이 없이 감소된다는 것임. 이러한 감소는 HM15275의 경친전자성 대사체가 GLP-1/GIP/Glucagon receptor에 결합할 뿐 만이라 다른 대사 과정에 관여한 효소와의 공유결합에 기인하는 것으로 추정되기 때문임. 이는 임상에서 헵턴 형성에 의한 개체-특이적 면역반응에 의한 독성이 예측됨. 따라서 HM15275의 대사과정이 좀 더 명확한 이해를 통해 임상시험에서는 부작용을 막을 수 있는 방법을 찾아 문제적 요인을 최소화할 필요성이 있음.

Figure 6. Changes in body weight over time under switching conditions



<참고문헌>

Yohan Kim et al., Potent Weight Loss Effect and Mechanism of a Novel Long-acting GLP-1/GIP/GCG Triple Agonist, HM15275, in Animal Model of Obesity. Poster-335. Obesityweek, San Antonio TX USA; November 3-6, 2024

Chavda, V. P., et al., Tirzepatide, a New Era of Dual-Targeted Treatment for Diabetes and Obesity: A Mini-Review, *Molecules*, 2022, 27(13): 4315.

Zhao, F.; Zhou, Q.; Cong, Z.; Hang, K.; Zou, X.; Zhang, C.; Chen, Y.; Dai, A.; Liang, A.; Ming, Q.; et al. Structural insight into multiplexed pharmacological actions of tirzepatide and peptide 20 at the GIP, GLP-1 or glucagon receptors. *Nat. Commun.* 2022;13:1057–1073.

PDB-101(2024)<https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/incretins/drug/tirzepatide/tirzepatide>

Sun, B., Willard, F.S., Feng, D., Alsina-Fernandez, J., Chen, Q., Vieth, M., Ho, J.D., Showalter, A.D., Stutsman, C., Ding, L., Suter, T.M., Dunbar, J.D., Carpenter, J.W., Mohammed, F.A., Aihara, E., Brown, R.A., Bueno, A.B., Emmerson, P.J., Moyers, J.S., Kobilka, T.S., Coghlan, M.P., Kobilka, B.K., Sloop, K.W. (2022) Structural determinants of dual incretin receptor agonism by tirzepatide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 119, e2116506119.

Yohan Kim et al., Potent Weight Loss Effect and Mechanism of a Novel Long-acting GLP-1/GIP/GCG Triple Agonist, HM15275, in Animal Model of Obesity. Poster-335. Obesityweek, San Antonio TX USA; November 3-6, 2024

Sanyal AJ, Kaplan LM, Frias JP, Brouwers B, Wu Q, Thomas MK, Harris C, Schloot NC, Du Y, Mather KJ, Haupt A, Hartman ML. Triple hormone receptor agonist retatrutide for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: a randomized phase 2a trial. *Nat Med.* 2024 Jul;30(7):2037-2048.

Tschöp M, Nogueiras R, Ahrén B. Gut hormone-based pharmacology: novel formulations and future possibilities for metabolic disease therapy. *Diabetologia*. 2023 Oct;66(10):1796-1808.

Urva S, Coskun T, Loh MT, Du Y, Thomas MK, Gurbuz S, Haupt A, Benson CT, Hernandez-Illas M, D'Alessio DA, Milicevic Z. LY3437943, a novel triple GIP, GLP-1, and glucagon receptor agonist in people with type 2 diabetes: a phase 1b, multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomised, multiple-ascending dose trial. *Lancet*. 2022 Nov 26;400(10366):1869-1881. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02033-5. Epub 2022 Oct 27.

Cajulao JMB, Hernandez E, von Zastrow ME, Sanchez EL. Glucagon receptor-mediated regulation of gluconeogenic gene transcription is endocytosis-dependent in primary hepatocytes. *Mol Biol Cell*. 2022 Sep 1;33(10):ar90.

Zaffina I, Pelle MC, Armentaro G, Giofrè F, Cassano V, Sciacqua A, Arturi F. Effect of dual glucose-dependent insulintropic peptide/glucagon-like peptide-1 receptor agonist on weight loss in subjects with obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Feb 22;14:1095753.

DimaBiotech. GIP Receptor (GIPR): A Novel Target for Glycemic Control and Weight Loss. 2024-08-08. www.dimabio.com.

54. Biopharma Trends 2025 – 보스턴컨설팅그룹의 논고 번역 및 요약

- 바이오이약품의 시장은 상당히 역동적이고 변화가 심하여 이를 개발하는 biopharma(생물 약제개발기업)은 변화에 의한 역풍을 상수로 두고 기업 운영이 필요함. 새로운 기전을 가진 새로운 모달리티 출현의 주기는 상당히 짧아 졌고 개발에서 혁신은 예상을 훨씬 초과하고 있음. 특히 강도높은 경쟁, 투자자의 압력 그리고 급진화된 특허기간 등은 기업의 사업 모델의 생존을 좌우할 수 있을 정도로 빠르게 변화하고 있음. 이와 같은 위험에 노출된 biopharma는 이판사판으로 사업을 진행할 정도의 시장 상황이라고 할 수 있음. 그러나 이와 같은 경쟁적 상황은 어쩌면 전세계에 퍼져있는 환자들에게는 생명을 구하는 또 다른 기회일 수도 있다는 점이 위안이 됨(Boston Consulting Group. 2025-01-08).
- Here's our take on how biopharma companies can navigate and thrive amid the industry's complexities

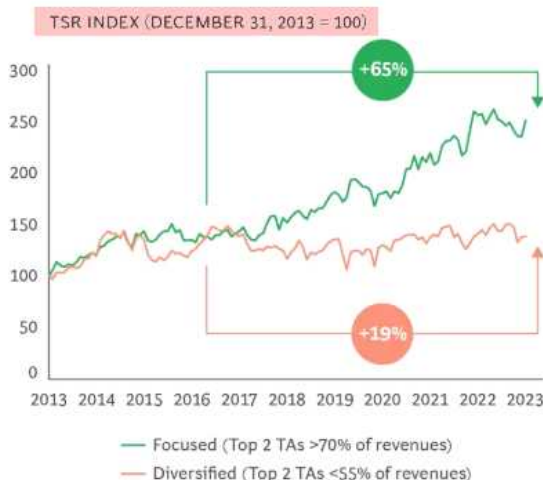
1. Total shareholder return의 관점

- **Top 2 therapeutic areas:** 전체 개발 중의 치료 영역(therapeutic areas)에서 단지 Top 2개 치료 영역에 집중한 회사들이 총수익의 70% 또는 그 이상을 창출하였으며 이는 주주들의 총수익률을 의미하는 총주주수익률(total shareholder return, TSR)이 65% 증가를 가져왔음. 이와 같이 단지 Top 2개 치료 영역에 집중한 회사들의 TSR은 더 다양한 치료 영역을 가진 회사들의 TSR인 19%보다 약 3.5배 정도 높다는 것을 확인할 수 있음(See Exhibit 1.) 마찬가지로 기업가치표평가(equity valuation)도 Top을 가진 회사들이 더 높다는 것을 확인이 가능함.

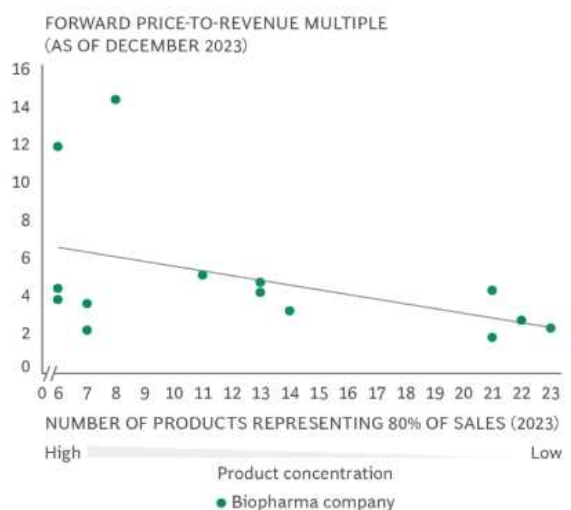
EXHIBIT 1

Investors Have Rewarded Companies Whose Portfolios Are Focused

TSRs favor companies whose portfolios are more focused



Equity valuations tend to be higher for companies with greater product concentration



Sources: S&P Capital IQ; EvaluatePharma; BCG ValueScience Center.

Note: Company names in the forward price-to-revenue multiple chart are New York Stock Exchange ticker abbreviations. TA = therapeutic area; TSR = total shareholder return.

2. First-in-Class drug의 중요성

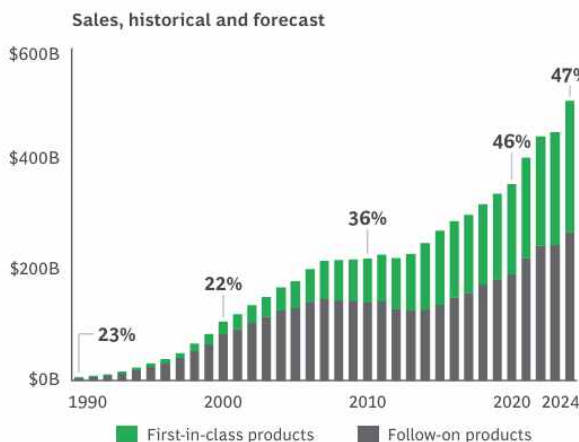
- **First-in-Class drug 개발에 집중:** 새로운 과학적 지식을 기반으로 최초의 기전으로 개발되는 혁신신약(First-in-Class drug)의 시장 점유율은 2000년 22%이지만 2024년 현재 47%임 (see EXHIBIT 2). 또한 새로운 약물 modality(novel drug modality)가 2020년에 5%에 불과하지만 2030년에는 15%에 도달할 것으로 추정됨. 대표적인 first-in-class는 척수근 근 위축증(spinal muscular atrophy), 혈우병 A(hemophilia A), 겸상적혈구병(sickle cell disease) 등에 대한 유전자치료제와 다발골수증(multiple myeloma)에 대한 CAR-T 등의 세포유전자치료제 등이 있음.

EXHIBIT 2

A Combination of Better Understanding of Causal Biology and Novel Modalities Is Fueling the Growth of **First-in-Class Products**

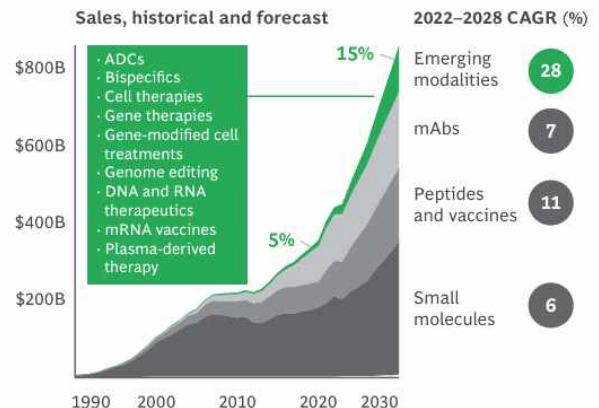
Market share of first-in-class products doubled in past 20 years

US SALES OF FIRST-IN-CLASS VS FOLLOW-ON PRODUCTS, 1990–2024 (\$BILLIONS)



Novel modalities will account for 15% of total market by 2030

US SALES BY DRUG MODALITY, 1990–2030 (\$BILLIONS)



Sources: EvaluatePharma; BCG analysis.

Note: Analysis includes all assets with 1990–2030 FDA approval. ADC = antibody drug conjugate; mAbs = monoclonal antibodies.

- 이와 같은 빠른 약물시장에 변화에서 우리가 가야할 방향은 ① First-in-class & ② Best-in-class 등 2가지 방향. Fast follower에 의해 First-in-class보다 효능이 더 좋은 Best-in-class을 개발하더라도 시장의 First-in-class 지배력을 극복하기 어렵다는 것이 현실. 우리나라에서는 국가든 기업이든 연구비의 비율은 거의 대부분 Best-in-class에 대한 비율이 높음. 좀 더 First-in-class 신약에 대한 **올바른 정의와 기준**을 잘 마련하여 향후 비율을 높일 필요성이 있음.

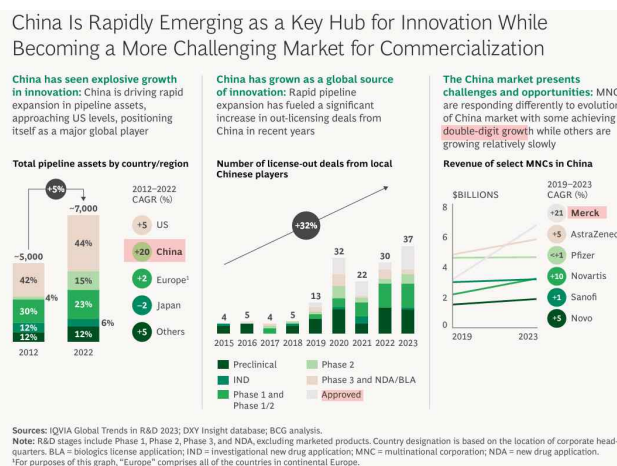
3. 신약개발의 새로운 접근에 대한 투자의 중요성

1) AI(인공지능)의 영향: 비임상연구에서 비용 및 시간 등에서 30-50% 감소와 임상1상에서 85%까지 성공률을 높이는 결과가 확인됨. 그러나 신약개발 과정에서 AI 적용은 40% 정도에 불과함. 마가 가장 많이 적용되는 치료제 영역은 항암제이며 약물 모달리티는 small molecule로 확인됨.

2) 새로운 기전 증명 모델(New translational models): 전통적인 In vitro 및 생화학적 in vitro 연구에서 확인된 결과가 인간에게로의 외삽을 통해 일치성(concordance) 낮음. 약물의 영향에 대한 보다 정밀한 외삽을 위해서는 전임상연구에서부터 보다 선진화된 도구인 organoids 및 organ-on-a chip technologies 등과 같은 도구가 요망됨. 특히 2012년부터 2024년까지 오르가노이드-연관 해석 모델(organoid-adjacent translational models)을 인용하는 논문이 약 11배 증가하였음.

3) 중국의 혁신신약 허브와 투자 사례

- 중국은 혁신신약 개발의 기회를 제공하면서 엄청 빠르게 혁신신약의 허브로 등장하고 있음. 그러나 이와 같은 중국의 잠재성은 무역장벽과 관세 등에 기인하여 주춤거리는 상황임. 중국이 이와 같이 혁신신약의 허브로써 리더가 된 이유는 오랜 전부터 활성약물원료 특히 항암제 등의 가장 큰 생산기지로서의 역할에 기인함. 이러한 기반을 바탕으로 규제혁신, R&D 투자와 더불어 약 1600 바이오텍 회사 설립 등이 이루어졌음. 이를 통해 지난 2010년부터 2022년까지 미국 5%, 일본이 -2% 등의 성장일 때 중국은 20%의 신약 pipeline이 증가하였음.
- 글로벌 신약 pipeline 자산 비중도 2012년 4%에서 2022년 15%로 크게 증가하였음. 또한 바이오텍 등의 회사에 의한 비임상연구에서부터 신약 승인까지의 약물 개발이 2015년에서 2023년까지 32%로 증가하였음. 특히 글로벌 다국적 빅파(MNC)인 Merck에서 21%의 두자리 숫자 성장이 이루어졌음.



<중국의 독성학 수준에 대한 개인적 의견: 저서와 논문을 작성하다보면 많은 자료를 리뷰하게 됨. 리뷰하는 논문을 백분비율로 나타내면 서구를 포함한 미국과 중국의 비율이 70:30 정도임. 때로는 중국의 논문이 미국보다 더 깊이가 있고 의미있는 논문도 많았음. 중국의 독성학 분야의 발전에 부럽기도 하면서 신약개발의 분야도 상당히 발전될 것으로 사료되었음>

4. 약물 간 불일치 결과에 대한 정보의 활용

- 약물들 사이 임상적 결과의 차이가 존재할 때 위축되는 것보다 신약 개발 중 다양한 환자를 처방을 하다보면 예외적인 경험하는 환자 사례를 다양한 투자자에게 설명할 필요성이 있음
- 이와 같은 사실이 실제 존재한다는 것을 신약 개발에 참여하는 모든 연구자들이 공유하여 책임을 질 수 있는 자세를 유지할 필요성이 있음

5. 수익과 비용 압력에 대한 이해

- 전세계적으로 연간 3500억 달러 가치의 약물이 2030년까지 특허 상실할 것이며 이로 인하여 제약사의 특허권은 급진하 경사로 빠르게 진입하게 됨. 특히 Top 20개 제약사의 수익 상실이 80%에 해당됨.
- 특허에 의한 독점 상실율은 2010년부터 2015년까지 12%와 비교하여 2026년부터 2030년까지 8%로 유사하지만 적어도 2가지 측면에서 차이가 있음(EXHIBIT 3).
- 첫 번째 다수의 바이오로직스가 독점 상실(loss of exclusivity)에 직면할 것이며 바이오시밀러의 부상으로 경쟁력 증가가 예상됨. 처음에는 바이오시밀러의 개발이 매우 느렸지만 오늘날에는 상당히 빠른 속도로 개발이 이루어지고 있음. 즉 빅파마들이 특허가 상실된 바이오로직스의 끝자락을 잡고 수익을 창출하려는 집착을 더 이상하지 않음. 두번째는 비록 독점적 지배력이 없지만 오리지날이나는 사실에 기인하여 가격책정에 있어서 유리한 측면이 있음.

EXHIBIT 3

Although the Share of Revenue That Will Lose Exclusivity by 2030 Is Roughly in Line With Previous Patent Cliffs, More Biologics Are at Risk This Time

TOTAL WORLDWIDE REVENUE IMPACT/REVENUE AT RISK FROM LOE FOR BIOLOGICS VERSUS SMALL MOLECULES, 2010-2030 (\$BILLIONS)



Sources: EvaluatePharma; BCG analysis.

Note: Innovative market size is calculated for each year as total sales across all NMEs still patented in that year. Revenue impact percentage is calculated by dividing revenue impact from LoEs over a five-year period by total innovative market size over the same five-year period. Total revenue impact/revenue at risk is calculated as sales in the last year prior to LoE. Major LoEs are defined as LoEs with a revenue impact exceeding \$1 billion. LoE = loss of exclusivity; NME = new molecular entity.

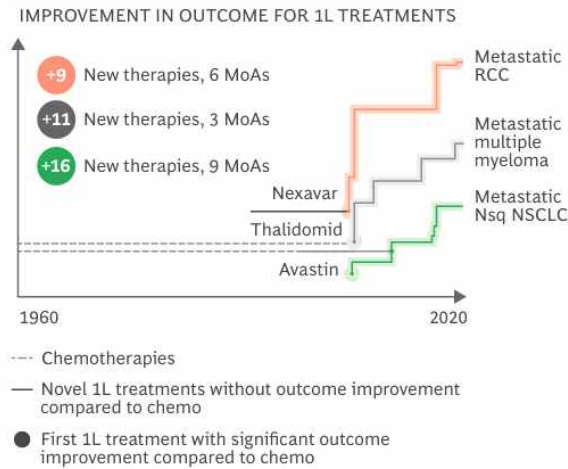
6. 핵심 질환(Key deases) 영역에서 신약의 짧은 호흡과 치열한 경쟁

- 약물시장에서의 배타적 독점 상실로 발생하는 수익 창출의 압력과 더불어 신약 출시에 의한 시장 점유하는데 있어서 장점을 누릴 수 있는 기간도 훨씬 짧아 졌음. 이유는 비소세포폐암, 전이성-다발성 골수종(metastatic multiple myeloma), 전이성신장세포암(metastatic renal cell carcinoma), 비편평상피-비소세포폐암(metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer) 그리고 건선(psoriasis) 등과 같이 핵심질환에 다수의 제약사들이 혁신신약 개발에 불붙듯 경쟁이 치열하기 때문임(EXHIBIT 4, 왼쪽).
- 특히, 무엇보다도 새로운 약리작용기전(mechanism of action, MOA)을 가진 치료법이 시장에서 성공을 거두면서 치료 패러다임이 빠르게 진화하고 있음. 동일한 MOA를 가진 약물들 사이 시장에 신규로 진입하는 시간이 훨씬 단축되었음. 예를 들어 첫 약물 개발 후 동일한 MOA를 가진 두 번째 약물이 시장에 출시되는 시간이 2000년대에는 약 8년의 터울이 있었지만 2020년대부터는 그 터울이 1년 이하로 줄었음(EXHIBIT 4, 오른쪽). 이와 같은 결과로 선두 약물의 시장 점유율은 90%에서 70%로 감소되었음.
- 이와 같은 신약개발의 특성과 시장 점유의 사이클 등을 고려하여 빅파마들은 시장에서의 리더를 유지하기 위해 신약의 시장 지배 사이클 및 차세대 치료법, 병용요법 등에 대한 관심을 높이고 있음.

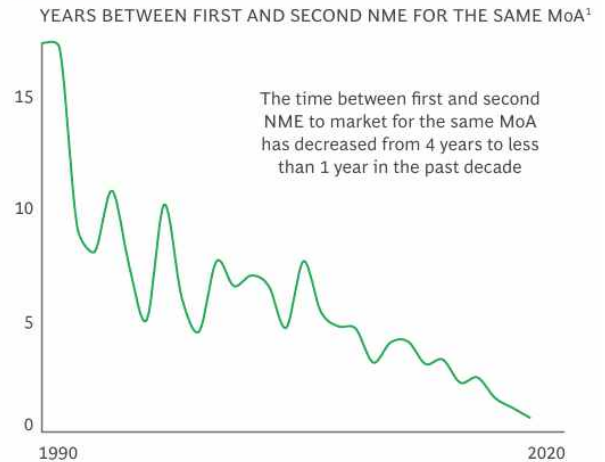
EXHIBIT 4

The Period of Market Advantage Is Shortening as Rapid Innovation Fuels Heated Competition in Key Disease Areas

Treatment paradigms have evolved quickly as new therapies with varying MoAs have emerged



The time between market entrants has shortened, even within the same MoA



Sources: American Society for Clinical Oncology; American Cancer Society; US Food and Drug Administration; Decision Resource Guide; EvaluatePharma.
Note: Data comprises worldwide approved, marketed, R&D, and filed drugs. 1L = first-line; MoA = method of action; NME = new molecular entity; NSCLC = non-small-cell lung cancer; Nsq = non-squamous; RCC = renal cell carcinoma.

¹ Industry average number of years from first FDA approval of a drug with novel MoA to second FDA approval for a new drug with the same MoA across all therapeutic areas. Graph covers the period 1991–2018.

7. 핵심 요약

- 급속적으로 빠르고 민첩하게 변화하고 있는 신약개발의 시장에서 살아남기 위해서는 혁신과 효율성을 발휘할 수 있는 **회사 자체의 핵심 치료제 영역**에 집중할 필요성이 있음.
- 인간 생명에 영향을 줄 수 질병을 유발하는 생물학적 요인에 대한 과학적 이해는 그렇게 완벽하지 못하였음. 그러나 경험하지 못한 이해가 필요한 질환 치료의 신약개발을 통해 돌파구를 찾아내는 새로운 신기술 물결이 도래하고 있음.
- 오늘날 신약개발 과정의 복잡성과 투자의 위험성을 돌파하기 위해서는 강정을 가진 치료 영역에서 R&D 그리고 상업화의 전문성과 자원을 집중할 필요성이 있음 이는 환자와 투자자 모두에게 바람직한 결과를 가져올 수 있음.
- 이와 같은 주장은 다음과 사실을 통해서도 설득력이 있음: 제약사가 자체의 Top 2 치료 영역에 70% 이상의 자원과 역량을 집중하는 제약사는 총주주수익률(total shareholder return, TSR)이 65% 증가를 가져왔지만 문어발식 다양한 치료영역에 역량을 분산하는 회사는 19% TSR 증가에 불과하였음.

<참고문헌>

- Boston Consulting Group. 2025-01-08. Biopharma Trends 2025. Focusing on Innovation amid Complexity January 2025 By Margot Bleys, Bilal Khan, John Wu, and Priya Chandra

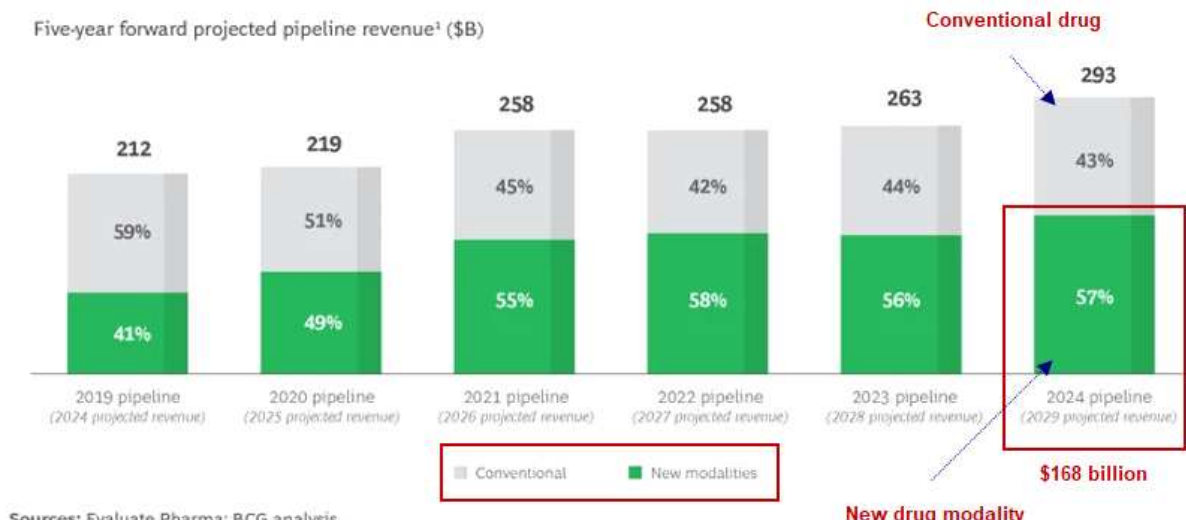
55. 2024년의 New Drug Modality에 대한 분석과 예상 – BCG 보고서 참고

- 다음의 컨설팅보고서를 요약 및 개인 생각을 첨언하였음
- Lu Chen, Brian Bush, Mike Brochu, and Gian King. New Drug Modalities 2024. Boston Consulting group. SEPTEMBER 24, 2024

1. New modality의 급격한 성장

- 2019년부터 2021년 사이 단클론항체(monoclonal antibody, mAb) 항체-약물복합체(antibody-drug conjugate, ADC), 재조합단백질(recombinant protein), 이중특이항체(bispecific antibody, BsAb), 그리고 mRNA-기반 약물의 출현으로 New modality의 연평균 성장률(compound annual growth rate, CAGR)이 28%가 증가하였음. 그리고 이후에도 여전히 new drug modality의 pipeline에 대한 기존의 drug modality에 비해 높은 55%-57%로 유지되며 2024년 경우에 투자비용이 1680억달러로 2023년보다 14% 증가하였음(Exhibit 1).

Exhibit 1 - New Modalities Continue to Represent the Majority of Pipeline Revenue



Sources: Evaluate Pharma; BCG analysis.

¹The five-year forward pipeline revenue is defined as the projected pipeline revenue five years in the future; for example, \$263 billion is the projected 2028 revenue from all pipeline products as of 2023.

2. Top 10 Big Pharma의 Top 약물 모달리티

- Exhibit 2에서처럼 2024년 현재 Top 10 글로벌제약사들의 시장장악을 하는 약물의 7개가 new drug modality임. Pfizer/BioNTech's and Moderna' 등이 Covid-19 백신과 AbbVie사의 항체의약품인 Humira는 Top 10에 들지 못하였음. 대신에 단일클론항체의약품인 Darzalex, Skyrizi과 Jardiance 등이 Top 10에 되었음.
- 나머지 7 약물은 여전히 시장 지배력이 높거나 높아지고 있고 특히 **Keytruda**는 변함없는 판매액에서 리더임.
- 그러나 추정하건대 2029년도에 대한 Top 10은 9개가 교체될 것이며 이중 5개 정도의 재조합단백질(특히 GLP-1<Glucagon-like peptide-1> 작용제)이 포함될 것으로 예상됨. 그러나 면역관문단백질인 PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) 및 PD-1(Programmed cell death protein 1) 등의 억제 항체도 Top 10에 포함될 가능성이 있음.

Exhibit 2 - The Top Ten Biopharma Products by Sales Globally

2024 (actual)			2029 (projected)		
Product	Modality	Worldwide sales (\$B)	Product	Modality	Worldwide sales (\$B)
Keytruda	mAb	28	Ozempic	Recombinant	25
Ozempic	Recombinant	18	Dupixent	mAb	22
Dupixent	mAb	14	Mounjaro	Recombinant	21
Biktarvy	Conventional	13	Keytruda	mAb	20
Eliquis	Conventional	13	Wegovy	Recombinant	19
Darzalex	mAb	12	Zepbound	Recombinant	19
Stelara	mAb	11	Skyrizi	mAb	19
Opdivo	mAb	11	Darzalex	mAb	18
Skyrizi	mAb	11	CagriSema	Recombinant	15
Jardiance	Conventional	11	Biktarvy	Conventional	14

■ Conventional modalities ■ New modalities

Sources: Evaluate Pharma; BCG analysis.

Note: mAb = monoclonal antibody.

3. New drug modality의 분류와 증가 현황

- Small molecule을 제외한 new drug modality는 Exhibit 3에서처럼 6개 카테고리로 나눔. 각 카테고리에 따라 2023년과 2024년의 **전임상시험(네이비)**, **임상시험(blue)** 그리고 **시장 출시(green)** 등에 해당하는 약물 수를 비교한 것임.
- **항체의약품:** 항체의약품에서는 항체-약물복합체인 ADC가 19%, 그리고 이중특이성항체의약품 29%가 증가. 그러나 단클론항체의 품목수가 워낙 많아 수적으로 많이 증가하였지만 9%로 착시현상이 있을 수 있음.
- **단백질과 펩타이드의약품:** 현상유지이지만 모달리티별로의 품목 수는 항체의약품의 다음으로 많은 혁신신약임.
- **세포치료제:** 살아있는 세포를 체외에서 증식·선별하는 등 물리적·화학적·생물학적 방법으로 특성을 변화시켜 치료하는 세포치료제는 CAR-T(Chimeric Antigen Receptor-T)를 넘어 TCR-T(T cell receptor specific T), 즉 T세포 수용체-특이적(T cell receptor, TCR) 세포치료제 개발이 14% 증가하였음. 종양 조직 내부에 침투하는 Tumor infiltrating lymphocytes(TIL) 세포치료제도 14% 증가하였음. Stem cell 치료제는 5% 증가하였지만 세포치료제의 중요한 접근 방법으로 개발되고 있음
- **유전자치료제:** 유전자 조작을 기반으로 치료 타겟 유전자를 병소에 이입하는 치료기법인 유전자치료제는 돌연변이 등으로 기능을 상실한 유전자를 삽입하는 gene augmentation 치료제가 대부분이고 약 9% 증가하였음.
- **핵산치료제:** mRNA를 LNP에 주입하여 발현 또는 mRNA 합성이 가능한 바이러스를 LNP 주입하여 self-amplification을 유도하여 치료하는 mRNA 치료제가 37%로 대폭 증가하였음.
- **기타 혁신치료제:** 특정 단백을 제거하기 위해 만들어진 Chimera 치료제인 PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimeras) 모달리티는 품목 수는 적지만 15% 증가. 그리고 인체에 서식하는 '미생물(microbe)'과 '생태계(biome)'를 합친 용어인 마이크로바이옴(microbiome) 치료제는 2023년 4월 처음으로 이른바 '먹는 미생물'로 FDA에 의해 의약품으로 승인받았음. '제2의 게놈'이라는 평가를 받고 있을 정도로 자가면역질환, 대장염, 비만, 심혈관계 질환 등 대부분의 질병이 마이크로바이옴과 관련성이 높다는 연구결과가 잇따라 마이크로바이옴 치료제는 40% 증가.

Exhibit 3 - Definition and Pipeline Snapshot by Modality



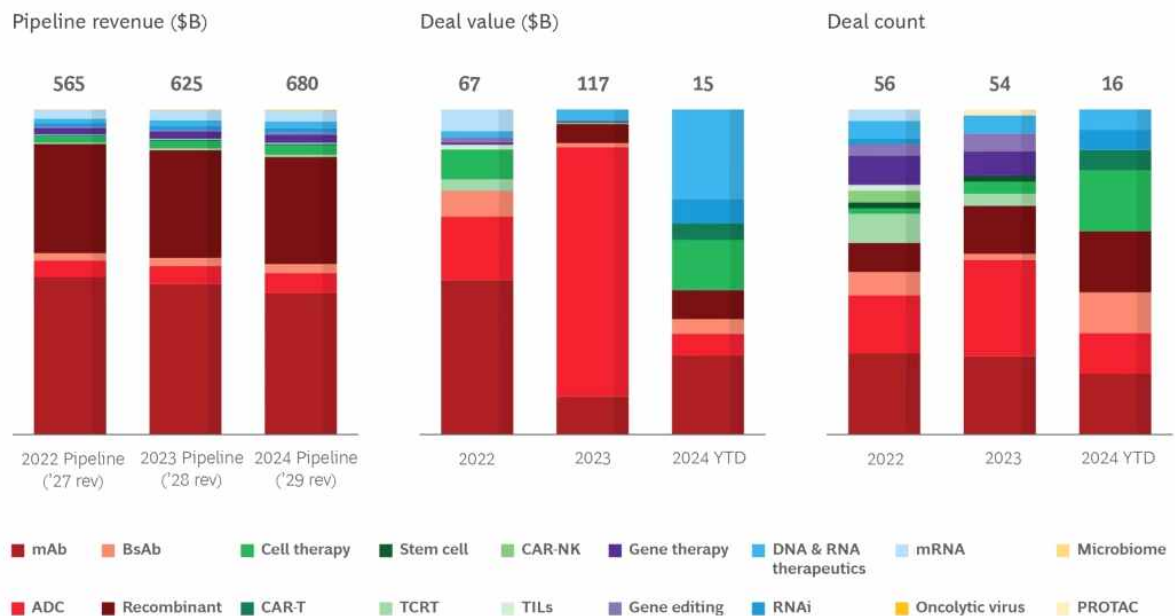
Sources: Evaluate Pharma; BCG analysis.

Notes: ADC = antibody-drug conjugate; BsAb = bispecific antibody; CAR-NK = chimeric antigen receptor-transduced natural killer cell; CAR-T = chimeric antigen receptor T cell; mAb = monoclonal antibody; PROTAC = proteolysis-targeting chimera; TCRT = T-cell receptor therapy; TIL = tumor-infiltrating lymphocyte.

4. New drug modality 분야에서 거래 분석

- 글로벌 바이오기업들이 인수 및 판권에 대한 거래를 분석하다보면 새로운 약물 모달리티에 대한 특성 확인이 가능함. 2022년에서 2024년 사이 바이오빅파마 새로운 약물 모달리티 인수에 거의 2000억달러를 지출하였음(Exhibit 5). 특히 Pfizer가 Seagen을 430억 달러를 인수한 2023년에 거래량이 가장 높았음.

Exhibit 5 - Big Pharma Deals by Modality, 2022 to 2024 YTD



Sources: Evaluate Pharma; BCG analysis.

Note: One deal can include multiple products. The pipeline revenue is defined as the projected pipeline revenue five years in the future; for example, for 2022 the projected 2027 revenue is shown. 2024 deal value and deal count includes data until May 2024. ADC = antibody-drug conjugate; BsAb = bispecific antibody; CAR-NK = chimeric antigen receptor-transduced natural killer cell; CAR-T = chimeric antigen receptor T cell; mAb = monoclonal antibody; NA = not applicable; PROTAC = proteolysis-targeting chimera; TCRT = T-cell receptor therapy; TIL = tumor-infiltrating lymphocyte.

5. ADC는 새로운 모달리티 인수에서 선도적 리더

- Exhibit 6은 전임상이나 임상1상을 마친 모달리티와 임상2상 이상을 마친 모달리티를 구별하여 인수 및 금액을 나타낸 것임.
- 근래에 파이프라인 가치가 올라가고 있는 ADC, CAR-T 그리고 RNAi 등의 모달리티에 대하여 활발한 인수가 집중되고 있음을 알 수 있음. 특히 **ADC는 새로운 모달리티의 인수에 있어서 가장 많은 거래가 개발 초기부터 이루어지고 있음.**

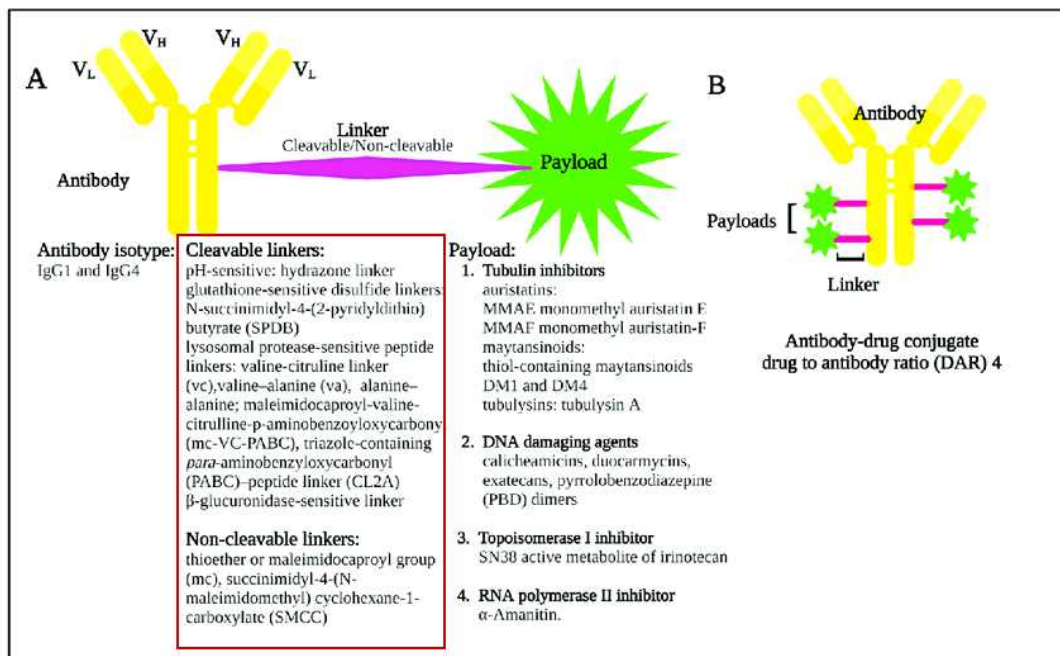
	Deal value (\$M)	Deal count	Average deal size (\$M)		Deal value (\$M)	Deal count	Average deal size (\$M)
mAb				Gene therapy			
M&A	31,935	7	4,562	M&A	88	4	22
Licensing - Early stage	6,968	9	7,74	Licensing - Early stage	450	2	225
Licensing - Late stage	1,500	5	300	Licensing - Late stage	400	2	200
ADC				Gene editing			
M&A	43,180	5	8,636	Licensing - Early stage	60	3	20
Licensing - Early stage	33,812	12	2,819	Licensing - Late stage	—	—	—
Licensing - Late stage	25,562	5	5,112	DNA & RNA therapeutics			
BsAb				M&A	1,110	1	1,110
M&A	3,170	3	1,057	Licensing - Early stage	—	—	—
Licensing - Early stage	4,320	3	1,440	Licensing - Late stage	55	1	55
Licensing - Late stage	—	—	—	RNAi			
Recombinant				M&A	—	1	—
M&A	4,446	4	1,112	Licensing - Early stage	5,405	2	2,703
Licensing - Early stage	3,765	6	628	Licensing - Late stage	4,110	2	2,055
Licensing - Late stage	38	3	13	mRNA			
Cell therapy				M&A	—	—	—
M&A	310	1	310	Licensing - Early stage	4,500	1	4,500
Licensing - Early stage	—	2	—	Licensing - Late stage	—	—	—
Licensing - Late stage	350	2	175	Oncolytic virus			
CAR-T				M&A	—	—	—
M&A	—	1	—	Licensing - Early stage	—	—	—
Licensing - Early stage	8,005	4	2,001	Licensing - Late stage	—	—	—
Licensing - Late stage	—	—	—	Microbiome			
Stem Cell				M&A	—	—	—
M&A	—	—	—	Licensing - Early stage	—	—	—
Licensing - Early stage	—	—	—	Licensing - Late stage	—	—	—
Licensing - Late stage	780	1	780	PROTAC			
TCRT				M&A	—	—	—
M&A	—	1	—	Licensing - Early stage	—	1	—
Licensing - Early stage	—	—	—	Licensing - Late stage	—	—	—
Licensing - Late stage	—	—	—	Total			
CAR-NK				M&A	84,238	28	3,008
M&A	—	—	—	Licensing - Early stage	68,240	48	1,422
Licensing - Early stage	—	2	—	Licensing - Late stage	32,795	21	1,562
Licensing - Late stage	—	—	—				
TILs							
M&A	—	—	—				
Licensing - Early stage	955	1	955				
Licensing - Late stage	—	—	—				

Sources: Evaluate Pharma; BCG analysis.

Note: Numbers may not sum due to rounding. ADC = antibody-drug conjugate; BsAb = bispecific antibody; CAR-NK = chimeric antigen receptor-transduced natural killer cell; CAR-T = chimeric antigen receptor T cell; mAb = monoclonal antibody; NA = not applicable; PROTAC = proteolysis-targeting chimera; TCRT = T-cell receptor therapy; TIL = tumor-infiltrating lymphocyte. One deal can include multiple products. Early stage includes preclinical and Phase I; late stage includes Phase II, Phase III, filed, approved, and marketed; average deal value is likely underestimated due to deal terms not being disclosed, and numerous assets being part of a single deal.

6. 결론(개인생각)

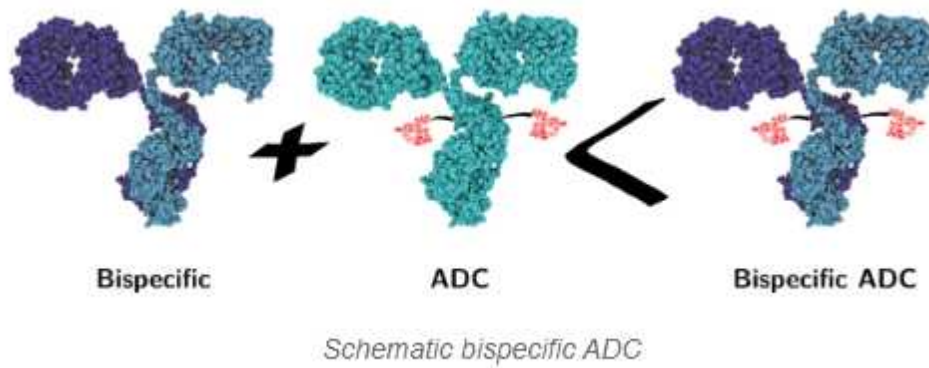
- 향후 몇 년 동안은 다음과 같은 이유로 ADC(antibody-drug conjugate)가 새로운 모델리티로 개발에 시간과 비용이 투자될 것이며 FDA 승인도 많을 것으로 예상
- ① 세포항원에 대한 항체 개발만 잘 이루어지면 특허가 끝난 1세대 항암제의 무제한 사용으로 표적 암치료제의 개발의 용이성과 기간과 비용 단축
- ② Antibody + Linker + Payload(drug)로 구성된 ADC에서 linker 선택이 어려웠고 또한 사용하지 않은 linker인 경우 독성시험도 필요했음. 그러나 현재 아래의 <그림>에서처럼 많은 linker가 개발되었고 안전성도 다수 확인 되었음(Ray 등, 2023).



(A) Diagram showing the basic components of an antibody-drug conjugate, including some of the possible linker and payload combinations. (B) Model structure of an antibody-drug conjugate with a drug to antibody ratio of 4 4.

- ③ 단일항체를 가진 ADC에 항체 하나를 더 결합하여 Bispecific ADC는 표적을 초정밀하게 공격이 가능하여 부작용을 줄이고 효능을 높이는 잠재성을 가짐(Acro, 2024).

<참고문헌>



Acro (2024). Bispecific Antibody Drug Conjugates (ADCs).
<https://myemail.constantcontact.com/Bispecific-Antibody-Drug-Conjugates>

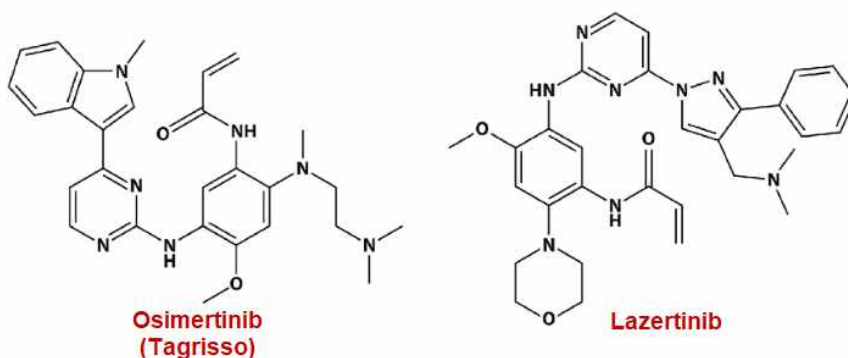
Ray U, Orlowski RZ. Antibody-Drug Conjugates for Multiple Myeloma: Just the Beginning, or the Beginning of the End? *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Apr 14;16(4):590.

Lu Chen, Brian Bush, Mike Brochu, and Gian King. *New Drug Modalities 2024*. Boston Consulting group. SEPTEMBER 24, 2024.

56. Big data 및 AI-기반 병용요법 항암제 개발과 독성 예측

1. 목적

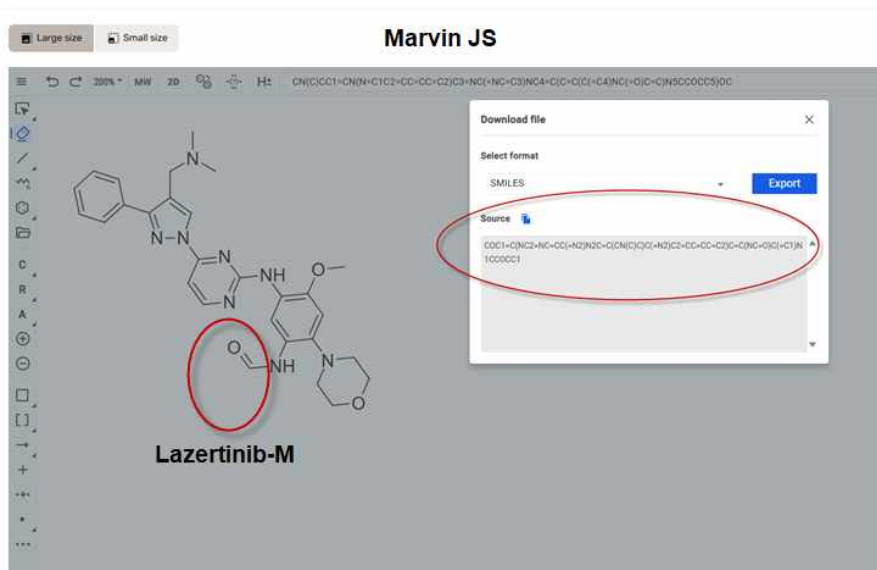
- 첨부된 자료인 '병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발' 97 페이지에 제시한 내용과 실제 Big-data 및 AI-기반 신약 개발 프로그램을 활용하여 항암제 개발의 예시와 비교.
- 이를 위해 2가지 약물과 활용. 아스트라제네카와 유한양행의 비소세포폐암치료제인 osimertinib과 lazertinib은 2024년 유사한 기간에 FDA 승인을 받았음. 둘다 epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI)로 항체항암제의 병용요법으로 처방됨.
- 공통적인 것인 둘다 구조적으로 대단히 유사하며 특히 경 친전자성대사체의 약리작용을 가지고 있음. 만약 이들의 구조를 변형하여 효능은 유사하지만 독성 및 부작용을 낮춘다면 좀 더 경쟁력을 갖춘 병용요법 RTKI 개발이 가능하지 않을까 하는 생각으로 접근. 그러나 방법론적 제시이지 성공을 염두한 것은 아님



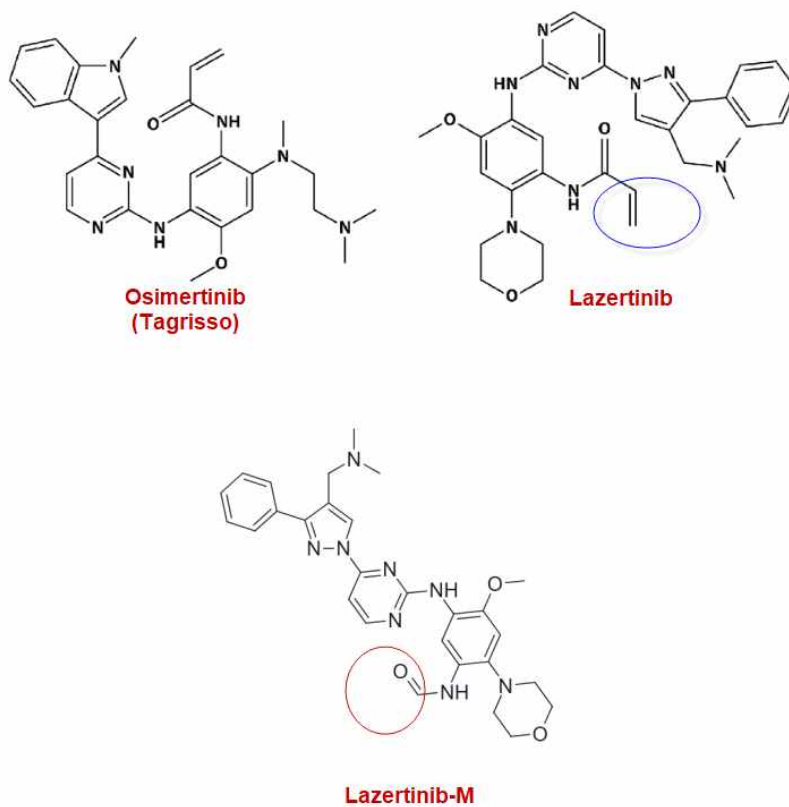
Chemical structures of lazertinib and osimertinib.

2. Marvin JS 프로그램을 활용하여 구조 변경

- 먼저 Marvin JS를 이용하여 Lazertinib의 $C=CH_2$ 를 제거하여 SMILES를 추정하여 Lazertinib-M으로 명명
- Lazertinib SMILES
CN(C)CC1=CN(N=C1C2=CC=CC=C2)C3=NC(=NC=C3)NC4=C(C=C(C(=C4)NC(=O)C=C)N5CCOCC5)OC
- Lazertinib-M SMILES
COC1=C(NC2=NC=CC(=N2)N2C=C(CN(C)C)C(=N2)C2=CC=CC=C2)C=C(NC(=O)C(=C1)N1CCOCC1



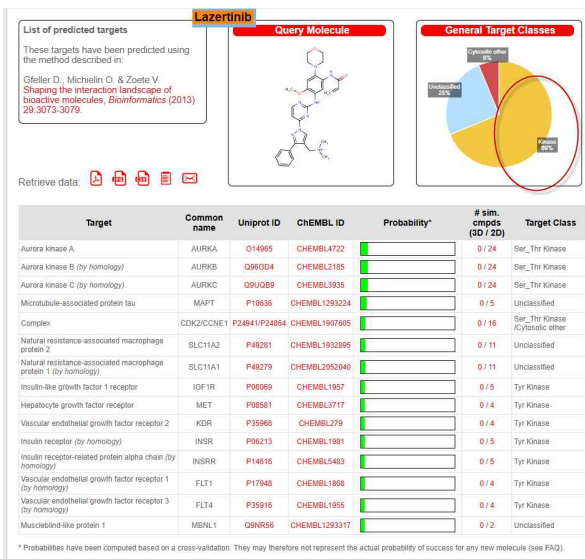
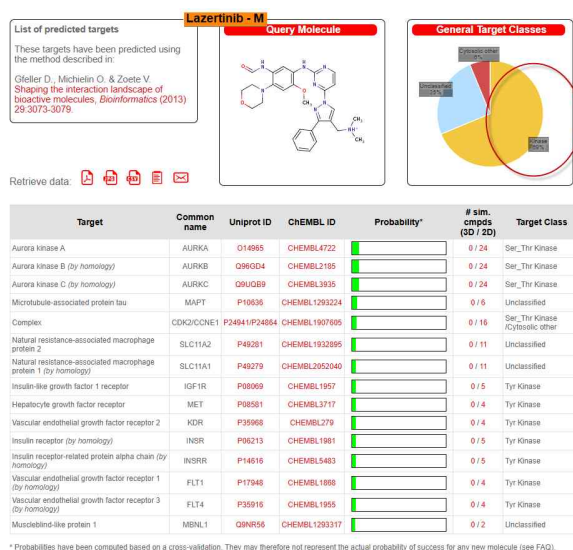
- 아래의 <그림>에서처럼 일부 기(group)를 제거하여 좀더 직선형적 모양을 가진 Lazertinib-M을 도출



<그림> osimertinib과 lazertinib 및 Lazertinib-M구조

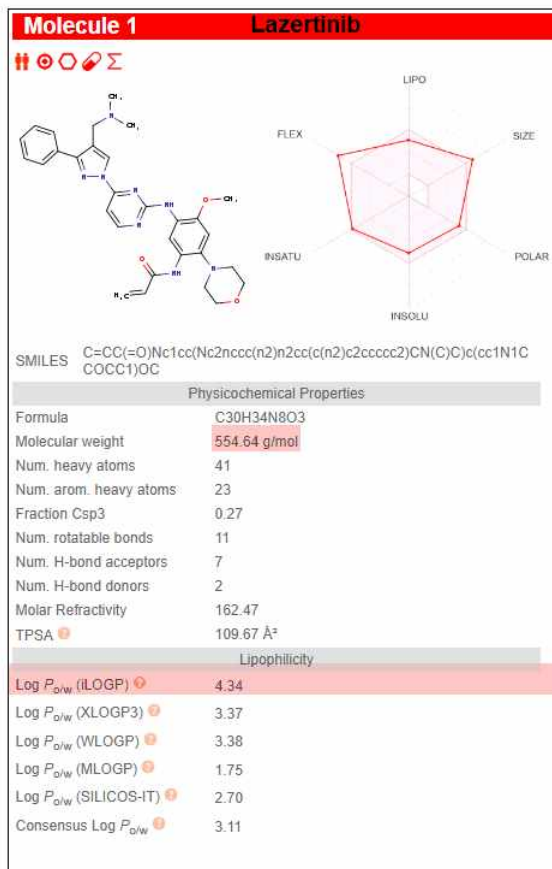
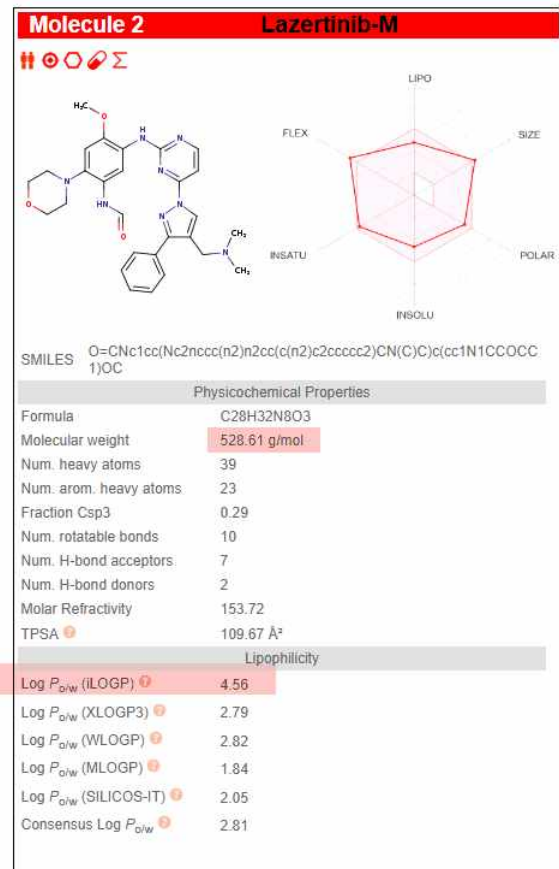
3. Receptor tyrosine kinase inhibitor로써의 가능성

- 먼저 kinase 저해제로의 가능성을 확인하기 위해 Swiss Target prediction 프로그램을 이용하여 Kinase에 대한 표적-가능성을 확인한 결과, 아래 <그림>에서처럼 Lazertinib과 Lazertinib-M의 확률이 60%로 유사하게 확인되었음.



3. 동태학적 특성 및 Prodrug 대사체 확인 비교

- 동태학적 특성은 SWISS ADME 프로그램을 이용하였음. 동태학적 특성에 크게 차이는 없지만 Lazertinib-M이 친수성보다 지질성이 높아졌고 이는 bioavailability를 증가시킨 요인이 됨. 반면에 Lazertinib이 구조 자체의 유연성(flexibility)이 높아 Kinase에 대한 affinity가 더 높을 것으로 추정됨.



- 아스트라제네카와 유한양행의 비소세포폐암치료제인 osimertinib과 lazertinib 등은 대사 후 대사체가 약리작용을 하는 prodrug임. 따라서 cytochrome P450에 대한 이해가 주요함. SWISS ADME 프로그램에서는 CYP inhibition에 대한 내용으로 Prodrug에 대한 정보를 얻기가 쉽지 않음. Lazertinib 및 Lazertinib-M의 저해성에 대한 차이는 없는 것으로 추정

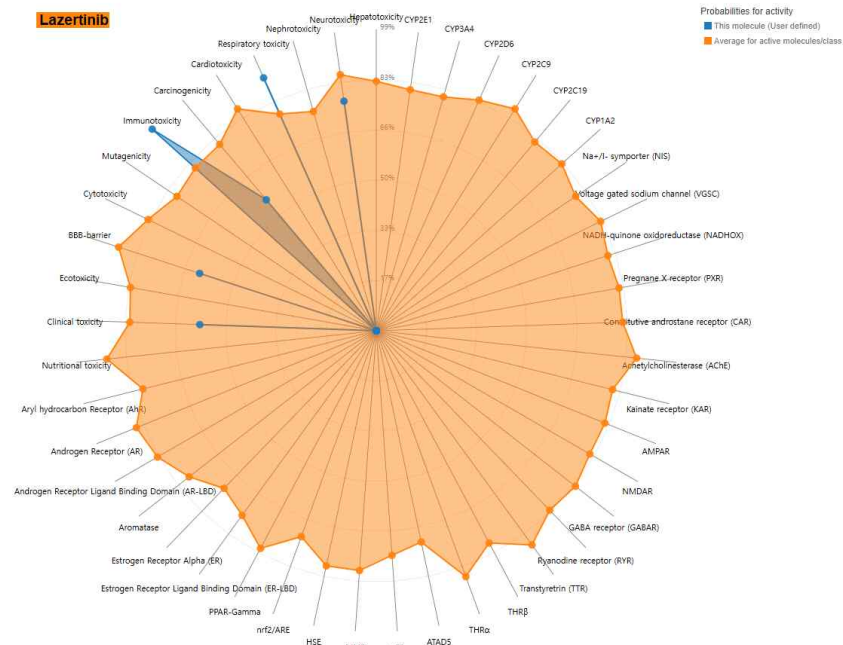
Lazertinib	Lazertinib-M
Water Solubility Log S (ESOL) -5.09 Solubility 4.50e-03 mg/ml ; 8.11e-06 mol/l Class Moderately soluble Log S (Ali) -5.35 Solubility 2.47e-03 mg/ml ; 4.45e-06 mol/l Class Moderately soluble Log S (SILICOS-IT) -8.30 Solubility 2.78e-06 mg/ml ; 5.01e-09 mol/l Class Poorly soluble	Water Solubility Log S (ESOL) -4.65 Solubility 1.18e-02 mg/ml ; 2.23e-05 mol/l Class Moderately soluble Log S (Ali) -4.75 Solubility 9.41e-03 mg/ml ; 1.78e-05 mol/l Class Moderately soluble Log S (SILICOS-IT) -7.89 Solubility 6.87e-06 mg/ml ; 1.30e-08 mol/l Class Poorly soluble
Pharmacokinetics GI absorption High BBB permeant No P-gp substrate Yes CYP1A2 inhibitor No CYP2C19 inhibitor Yes CYP2C9 inhibitor Yes CYP2D6 inhibitor Yes CYP3A4 inhibitor Yes Log K _p (skin permeation) -7.29 cm/s	Pharmacokinetics GI absorption High BBB permeant No P-gp substrate Yes CYP1A2 inhibitor No CYP2C19 inhibitor Yes CYP2C9 inhibitor Yes CYP2D6 inhibitor Yes CYP3A4 inhibitor Yes Log K _p (skin permeation) -7.54 cm/s
Druglikeness Lipinski No; 2 violations: MW>500, NorO>10 Ghose No; 3 violations: MW>480, MR>130, #atoms>70 Veber No; 1 violation: Rotors>10 Egan Yes Muegge Yes Bioavailability Score 0.17	Druglikeness Lipinski No; 2 violations: MW>500, NorO>10 Ghose No; 3 violations: MW>480, MR>130, #atoms>70 Veber Yes Egan Yes Muegge Yes Bioavailability Score 0.17
Medicinal Chemistry PAINS 0 alert Brenk 1 alert: michael_acceptor_1 Leadlikeness No; 2 violations: MW>350, Rotors>7 Synthetic accessibility 4.60	Medicinal Chemistry PAINS 0 alert Brenk 1 alert: aldehyde Leadlikeness No; 2 violations: MW>350, Rotors>7 Synthetic accessibility 4.42

- Lazertinib 및 Lazertinib-M의 cytochrome P450의 기질에 유무에 대한 확인을 위해 ATMETlab 3.0 프로그램을 통해 교차 확인하였음. 두 물질 모두 CYP1A2, CYP2D6 그리고 CYP3A4 등의 기질로 확인되었음. 이와 같이 대부분의 AI-기반 및 Big data-기반 프로그램을 통해 prodrug의 핵심 대사체인 경 친전자성대사체 생성 유무를 확인은 어려움. 따라서 인체 간세포의 S9 fraction을 통해 경 친전자성대사체 확인이 필요함

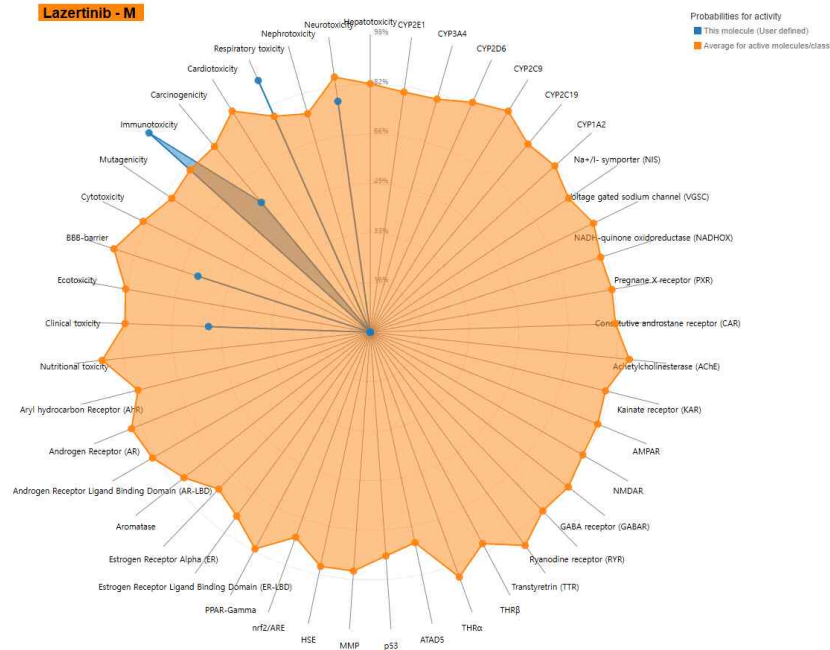
METABOLISM	Lazertinib		METABOLISM	Lazertinib - M	
CYP1A2 inhibitor	---	i	CYP1A2 inhibitor	---	i
CYP1A2 substrate	+++	i	CYP1A2 substrate	+++	i
CYP2C19 inhibitor	---	i	CYP2C19 inhibitor	---	i
CYP2C19 substrate	--	i	CYP2C19 substrate	--	i
CYP2C9 inhibitor	---	i	CYP2C9 inhibitor	---	i
CYP2C9 substrate	-	i	CYP2C9 substrate	-	i
CYP2D6 inhibitor	---	i	CYP2D6 inhibitor	---	i
CYP2D6 substrate	+++	i	CYP2D6 substrate	+++	i
CYP3A4 inhibitor	+	i	CYP3A4 inhibitor	--	i
CYP3A4 substrate	+++	i	CYP3A4 substrate	+++	i
CYP2B6 inhibitor	---	i	CYP2B6 inhibitor	---	i
CYP2B6 substrate	---	i	CYP2B6 substrate	---	i
CYP2C8 inhibitor	---	i	CYP2C8 inhibitor	---	i
HLM Stability	---	● i	HLM Stability	---	● i

4. 독성 예측

- Lazertinib 및 Lazertinib-M의 독성 예측을 위해 Pro-Tox II 프로그램을 활용하여 비임상 독성시험과 관련하여 표적독성을 등을 확인하였음. 두 물질의 독성 양상은 유사하며 대부분의 독성은 일반적인 small molecule의 독성 이하로 확인되었지만 면역독성 및 호흡기 독성은 small molecule의 일반적인 독성 수준보다 높았음. 특히 면역독성은 약리작용의 핵심 대사체인 경친전자성대사체가 일반 단백질의 -SH와 결합하여 헵텐 형성을 통한 항원자공으로 기인할 것으로 추정됨.



Lazertinib - M



5. 결론

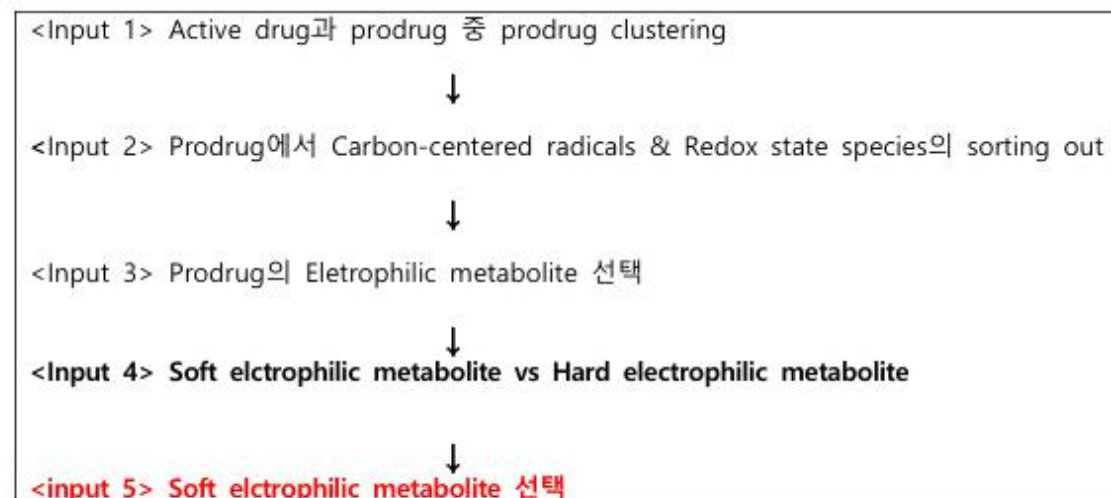
- ① 첨부된 자료인 '병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발'의 4. 결론에서처럼 두 약물의 약리기전 주체인 prodrug으로써 soft electrophilic metabolite을 기존 Big-data 및 AI-기반 프로그램으로 검색은 불가능. 따라서 Input 1에서 Input 5를 감안한 프로그램 개발이 시급히 필요하다고 사료됨

4. 결론

EGFR의 TK-domain inhibitor인 Osimertinib와 Lazertinib의 특성은 다음과 같은 공통성을 가짐

	Osimertinib	Lazertinib
TK-domain의 돌연변이 특성	• T790M mutant	• T790M mutant
공유결합 부위	• C797S	• Cys797
Electrophilic metabolite	• Soft	• soft
Cytochrome P450	• CYP3A4	• CYP3A4
결론	표적이 단백질일 경우에는 Soft electrophilic metabolite로 전환되는 small molecule 선택	

- 결론적으로 병용요법 항암제 개발을 위한 알고리즘 개발을 위한 small molecule의 최종 도달지 Soft electrophilic metabolite로 전환되는 특성을 가진 물질을 clustering



- ② Big-data를 기반한 여러 프로그램은 data 특성 즉, 약물 또는 환경물질 등에 따라서 독성 예측에서 차이가 있을 수 있기 때문에 독성예측을 위해서는 적절한 프로그램을 사용할 필요성이 있음.

57. 다음 보고서의 재평가: <48>의 남성형 탈모 치료제 - 피나스테리드의 안전성과 대책 방안

- 일반적으로 유기화학물질의 biotransformation은 제1상반응과 제2상반응으로 이뤄짐. 제1상반응을 통해 극성대사체 그리고 독성대사체가 생성되며 극성대사체는 glucuronidation(당화)을 통해 친수성대사체로 전환되어 배출됨. 반면에 독성대사체는 유일하게 glutathione에 의해 결합되어 친수성대사체로 전환되어 체외로 배출됨.
- 독성대사체의 재독성(reactivation)은 glutathione이 분리되어 재활성으로 독성이 유발됨. 그러나 현재 문제가 되고 있는 탈모치료제이면서 전립선비대증 치료제 성분인 **Finasteride**는 cytochrome P450이 아니라 ALDH(acetaldehyde dehydrogenase)에 의해 carboxylic acid가 형성됨. 특히 중요한 것은 이 부분에 제2상반응의 glucuronidation으로 acyl glucuronide가 형성되는 것을 확인하였음. 이는 대단히 특이한 독성기전임
- 최근 Mitra 등(2022)에 따르면 carboxylic-containing 약물은 acyl glucuronide 대사체 형성과 더불어 CoA(coenzyme A)과 포합을 통해 개체-특이적 간독성(idiosyncratic hepatic injury), 신장장애(renal impairment), 용혈성빈혈(hemolytic anemia), 소화계염증(gastrointestinal inflammation) 등을 비롯하여 심지어 방광암까지 유발하는 것으로 확인되었음.
- 이미 2020년 발효된 미국 FDA의 'Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry'에 의해 acyl glucuronide에 대한 업근이 있었지만 이에 대한 기준은 없음.
- 이러한 점을 고려하고 약물의 안전성을 위해 다음과 같은 연구 결과를 소개하고 우리나라에도 시급하게 적용할 필요성이 있다고 사료됨.
- Gunduz 등(2017)에 따르면 모든 Acyl glucuronide이 독성이 있는 것이 아님. 이들 연구에 따르면 5가지 조건에서 glutathione과 결합 유무 및 그리고 LC-MS 칼럼에서 반감기가 10시간 기준으로 "**Safe(안전)**," "**warning(경고)**," 그리고 "**withdrawn(철수)**" 등 3가지로 분류하는 방법을 제시함. 이 논문을 보고서와 함께 첨부하오니 규제 결정에 도움이 되면 좋겠습니다.

1. 48번 보고서인 "남성형 탈모 치료제 - 피나스테리드(finasteride)의 안전성과 대책 방안"에 대한 결론을 다음과 같이 제시하였음.

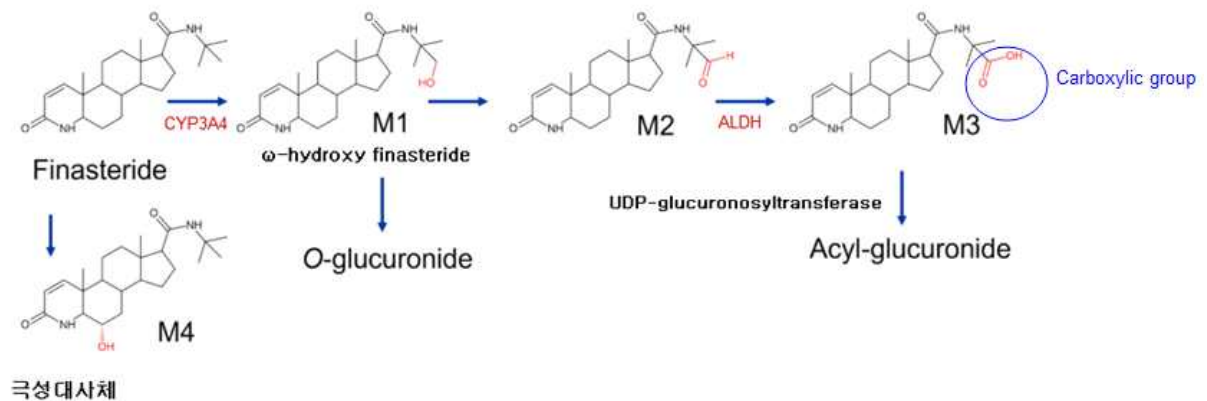
<7. 결론>

- **Finasteride는 대사적으로 상당히 관용과 안전성이 높은 약물임**
- 특히 항원성을 유발하지 않기 때문에 개별 심각한 약물이상반응(idiosyncratic-adverse drug response)은 발생하지 않을 것으로 추정됨
- 동물연구를 통해 확인된 우울증 및 hippocampus 등에 대한 Finasteride의 영향은 Cytochrome P450의 차이에 의한 대사 차이에 기인하는 것으로 추정됨
- 우울증과 자살충동과는 역학조사를 통해 Finasteride 장기복용에 의한 연관성이 없는 것으로 추정되었음
- 다만 호르몬에 대한 영향으로 복용 중단에 의한 금단증상인 post-finasteride syndrome(PFS)이 발생할 수 있으므로 경구복용보다 머리 국소 스프레이가 바람직한 치료방법으로 사료됨.

2. 문제점

1) 문제적 내용

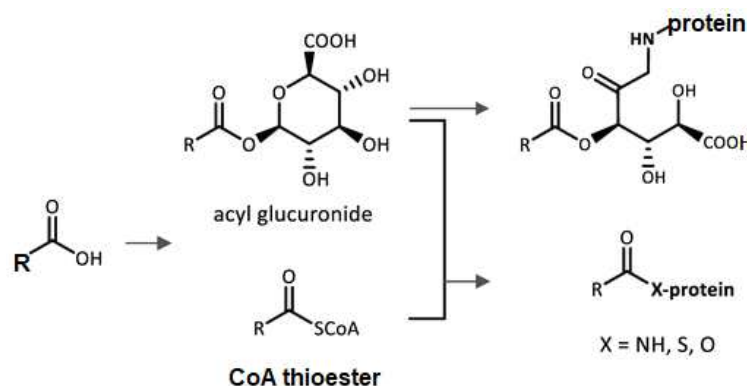
- Finasteride 대사와 독성대사체 생성 유무에 내용으로 **48번 보고서의 <그림-3>**에서처럼 CYP3A4에 의해 수산화 그리고 UDP-glucuronosyltransferase에 의해 당이 포함되어 친수성으로 전환됨(Lundahl 등, 2009)으로 별 문제가 없음으로 제시하였음. 이와 같이 친전자성대사체가 생성되는 독성대사체 생성의 문제는 없음.
- ALDH(acetaldehyde dehydrogenase)에 의한 제1상반응으로 M2가 carboxylic group를 가진 대사체 M3가 생성됨. M3 대사체는 제2상반응의 UDP-glucuronosyltransferase 촉매반응에 의한 당화(glucuronidation)로 acyl-glucuronide 대사체로 전환되어 독성 가능성이 있음(Van Vleet 등, 2017).



<그림-3> Finasteride의 CYP3A4와 UDP-glucuronosyltransferase에 의한 대사과정

2) Carboxylic group-containing 대사체의 독성기전

- Mitra 등(2022)에 따르면 UDP-glucuronosyltransferase에 의해 acyl glucuronide 대사체 형성과 더불어 CoA(coenzyme A)과 포합을 통해 아래의 <그림>과 같이 protein adduct를 유발함. 이를 통해 특이적 간독성(idiosyncratic hepatic injury), 신장장애(renal impairment), 용혈성빈혈(hemolytic anemia), 소화계염증(gastrointestinal inflammation) 등이 유발함. 특히 이들 독성대사체는 DNA와도 결합하여 방광암(bladder cancer)도 유발하는 것으로 확인되었음. 또한 에너지 생성과 관련된 TCA cycle에서 역할하는 등 생체 내 대사과정에서 중요한 역할을 하는 CoA와 포합하여 생성되는 CoA thioester는 심각한 대사 경로에 영향을 줌.
- Acyl glucuronide 대사체와 CoA thioester의 독성학적 기전은 주변의 단백질의 친핵성 부분과 공유결합을 하는 자연발생적 친전자성의 직접작용-독성물질에 기인함. 대부분의 친전자성 대사체는 glutathione에 의해 제거됨. 물론 acyl glucuronide도 glutathione과 결합하여 친수성으로 전환된 thio-acyl-glutathione drug으로 배출됨. 더욱 문제가 되는 것은 이들 친수성대사체 역시 쉽게 단백질의 친핵성 부위에 쉽게 acylation되거나 Amadori rearrangement에 의한 glycation으로 protein adduct를 형성하여 독성을 유발한 다한다는 점 (Boelsterli 등, 2002; Grillo 등, 2011)



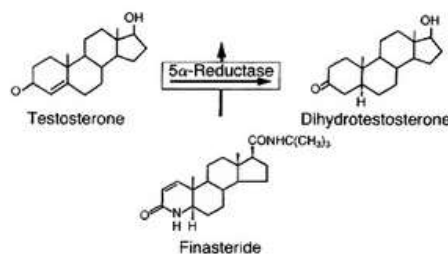
<그림> Carboxylic group-containing 대사체의 독성기전 (Mitra 등, 2022)

3. 피나스테리드(finasteride)의 Acyl glucuronide

- 과거에는 피나스테리드의 대사체로 acyl glucuronide가 인체 소변과 담즙산에서 발견되지 않았지만 발전된 검출기기를 통해 Undahl 등(2009)에 의해 <그림-3>에서 처음으로 확인되었음:
- <원문: M1 and M3 were glucuronidated in vitro by specific human UDP-glucuronosyltransferases, UGT1A4 and UGT1A3, respectively. M1 glucuronide was not identified in vivo, and **M3 glucuronide, an acyl glucuronide, was present in low amounts in bile from a few individuals**>

4. Finasteride의 작용기전과 Acyl glucuronide에 의한 독성 추정

- 안드로겐성 탈(androgenetic alopecia, AGA), 또는 남성형 탈모는 5-alpha reductase 효소에 의해 남성호르몬인 testosterone의 **dihydrotestosterone(DHT)**로 전환되는 대사에 기인함
- Finasteride는 <그림-2>에서처럼 5-alpha reductase 효소 활성을 억제하여 dihydrotestosterone(DHT) 전환을 저해하여 항탈모 효능 기전으로 1994년 최초로 설명됨(Rittmaster 등, 1994). Finasteride는 5-알파 환원효소 억제제(5-alpha-reductase inhibitor)로 1998년 USFDA에 의해 **경구복용 탈모치료제**로 승인됨.



<그림-2> Finasteride의 항탈모 약리기전

- 이와 같이 Finasteride는 기본적으로 호르몬 대사에 영향을 줌으로 장기 복용 및 복용 중단에 의한 금단증상인 post-finasteride syndrome(PFS)가 발생할 수 있음(Diviccaro 등, 2020). 그러나 호르몬의 변화는 누구에게나 발생할 수 있는 것으로 자연적이거나 가역적인 현상일 수 있음. PTS에서 일부 비가역적인 현상은 Acyl glucuronide에 의한 독성으로 추정될 수 있음. Mitra 등(2022)에 따르면 carboxylic-containing 약물은 acyl glucuronide 대사체 형성과 더불어 CoA(coenzyme A)과 포합을 통해 개체-특이적 간독성(idiosyncratic hepatic injury), 신장장애(renal impairment), 용혈성빈혈(hemolytic anemia), 소화계염증(gastrointestinal inflammation) 등을 비롯하여 심지어 방광암까지 유발하는 것으로 알려졌다. 따라서 비가역적인 현상인 PTS의 일부는 Finasteride 복용에 의한 **Acyl glucuronide 대사체 형성에 기인하는 것으로 추정됨.**

POST-FINASTERIDE SYNDROME



- ✓ Altered levels of neuroactive steroids in plasma and CSF
- ✓ Upregulation of AR in the prepuce
- ✓ Different frequencies in AR polymorphisms according to symptoms
- ✓ Epigenetic modifications in CSF of SRD5A2
- ✓ Sexual dysfunction
- ✓ Abnormal somatosensory evoked potentials of the pudendal nerve
- ✓ Depressive symptomatology
- ✓ Abnormal MRI signals in brain regions involved in depression and sexual arousal

Fig. 2. Clinical features reported in patients affected by post-finasteride syndrome. For details, see text. AR: androgen receptor; CSF: cerebrospinal fluid; MRI: magnetic resonance imaging; SRD5A2: 5 alpha reductase type 2 gene.

5. Finasteride의 성분 약물과 안전성 확인을 위한 대책

1) Finasteride 약물

- 피나스테리드의 원조는 미국 머크사의 프로스카와 프로페시아지만 특허 기간이 끝나서 동일한 성분의 약을 우리나라에서도 <표>에서처럼 생산 및 판매하고 있음(나무위키, 2024)

약품명	유통사
피나모정1mg	(주)대한파마
헤어피나정1mg	동성제약(주)
베아리모정	(주)대웅제약
피나테드정	한미약품(주)
모나스타정1mg	JW중외제약(주)
모모드정1mg	(주)메타약품
알로시아정	동아에스티(주)
페로시아정1mg	(주)유한양행
모나리드정1mg	진양제약(주)
알로팩정	(주)동구바이오제약
헤어그로정1mg	한올바이오파마(주)
헤어페시아정	동화약품(주)
다모페시아정	(주)메디카코리아
모나필정1mg	제일약품(주)
모나페시아정	(주)티디에스팜
미노페시아정1mg	현대약품(주)
모나드정	제이더블유신약(주)
피나필로정1mg	(주)에스트라
피나베린정1mg	영일제약(주)
피나스로정1mg	알리코제약(주)
피나시딜정	동국제약(주)
피나온정1mg	(주)라온파마
바로피나정	신풍제약(주)
메디페시아정1mg	고려제약(주)
네오페시아정1mg	(주)녹십자
유나시아정	한국유나이티드제약(주)
마이시아정	씨티씨바이오
마이페시아정	한국콜마(주)
피나모린정	태극제약(주)

다모케어정	명문제약(주)
메리나정	휴온스
그로모정1mg	에이프로지제약(주)
대웅바이오피나스테리드정1mg	대웅바이오
두피나정	하원제약(주)
모나정	서울제약(주)
모더페시아정1mg	다산제약(주)
모페시아정	휴비스트제약(주)
베르모나정1mg	아이월드제약(주)
씨제이피나스테리드정1mg	씨제이헬스케어
티나제정1mg	크리스탈생명과학(주)
페로시아정1mg	(주)유한양행
프로시정	케이엠에스제약(주)
모모페시아정	(주)더유제약
알로스칸정	(주)경동제약

- 여기서부터는 프로페시아의 제네릭이 아닌, 프로스카 계열임. 오리지널 약의 상표명인 프로페시아(Propecia)로 잘 알려져 있음. 탈모약으로 유명해졌지만 피나스테리드는 원래 전립선비대증 치료를 위해 만들어진 약이며 이 방면에서도 매우 효과적인 치료제임. 전립선 비대증을 치료할 때(5mg)는 탈모 치료(1mg)를 할 때보다 훨씬 고용량으로 복용함. 한국에서는 프로스카라는 상표명으로 판매되고 있음(나무위키, 2024)

약품명	제조사/유통사	유형
프로스카정	한국엠에스디 ^[23]	오리지널
프로피나정	신풍제약	삼각형, 십자선 없음
한올피나스테리드정	한올바이오파마	
알파스카정	이연제약	
프로리드정	유연제약	
푸로스타정	영풍제약	
파나스카정	유한양행	원형, 십자선 없음
스카렉스정	아주약품	원형, 십자선 있음
스카테론정	메디카코리아	
유로피나정	고려제약	
일양피나스테리드정	일양약품	
프로엠정5mg	일성신약	
피나스타정	제이더블유중외제약	
피나이스정	한독	
핀카정	대원제약	
보령피나스테리드정	보령제약	

5mg		
유로리드정	동구바이오제약	
트로피나정	동성제약	
파나드정	삼천당제약	
프로스몰정	종근당제약	
피나베린정	영일제약	
피나스티드정	국제약품	
피나스틴정	부광약품	
한림피나스테리드정	한림제약	
유로스칸정	경동제약	
피로이드정	제이더블유신약	
푸로케어정	하나제약	

2) Finasteride 약물의 안전성 대책

- **현재 상황:** 유럽 규제당국인 유럽의약품청(EMA)이 탈모약 성분의 안전성 우려에 따라 조사에 착수하면서 국내 식품의약품안전처도 검토에 나섰다. 10일 관련 업계 및 로이터 등 외신에 따르면 EMA은 남성형 탈모, 즉 안드로겐성 탈모의 치료에 사용되는 약물인 '피나스테리드'와 '두타스테리드'를 주성분으로 하는 의약품에 관한 자살 생각·행동 부작용 우려에 대해 최근 조사를 시작했다. 자살충동을 불러일으킨다는 가능성이 제기됐기 때문이다.(홍수현. 이데일리, 2024. 10. 10. 08:18)
- Acyl glucuronide의 독성은 1984년 Faed의 논문에 의해 최초로 제시되었으며 이에 대한 우려는 2020년 발효된 **미국 FDA의 'Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry'에 의해 확인됨.**
- 이후 이에 대한 연구를 통해 Gunduz 등(2017)에 의해 Acyl glucuronide 측정과 독성 평가 방법이 제시되었음. Gunduz 등(2017)에 따르면 모든 Acyl glucuronide이 독성이 있는 것이 아님. 이들 연구에 따르면 5가지 조건에서 glutathione과 결합 유무 및 그리고 LC-MS 칼럼에서 반감기가 10시간 기준으로 **"Safe(안전)," "warning(경고)," 그리고 "withdrawn(철회)"** 등 3가지로 분류하는 방법을 제시함.
- 따라서 규제기관과 제품 생산 기업은 첨부된 논문 'Gunduz M, Argikar UA, Cirello AL, Dumouchel JL. New Perspectives on Acyl Glucuronide Risk Assessment in Drug Discovery: Investigation of In vitro Stability, In situ Reactivity, and Bioactivation. Drug Metab Lett. 2018;12(2):84-92.을 참고하여 **Finasteride의 acyl glucuronide에 대한 "Safe(안전)," "warning(경고)," 그리고 "withdrawn(철회)"** 등의 판정을 할 필요성이 있음.

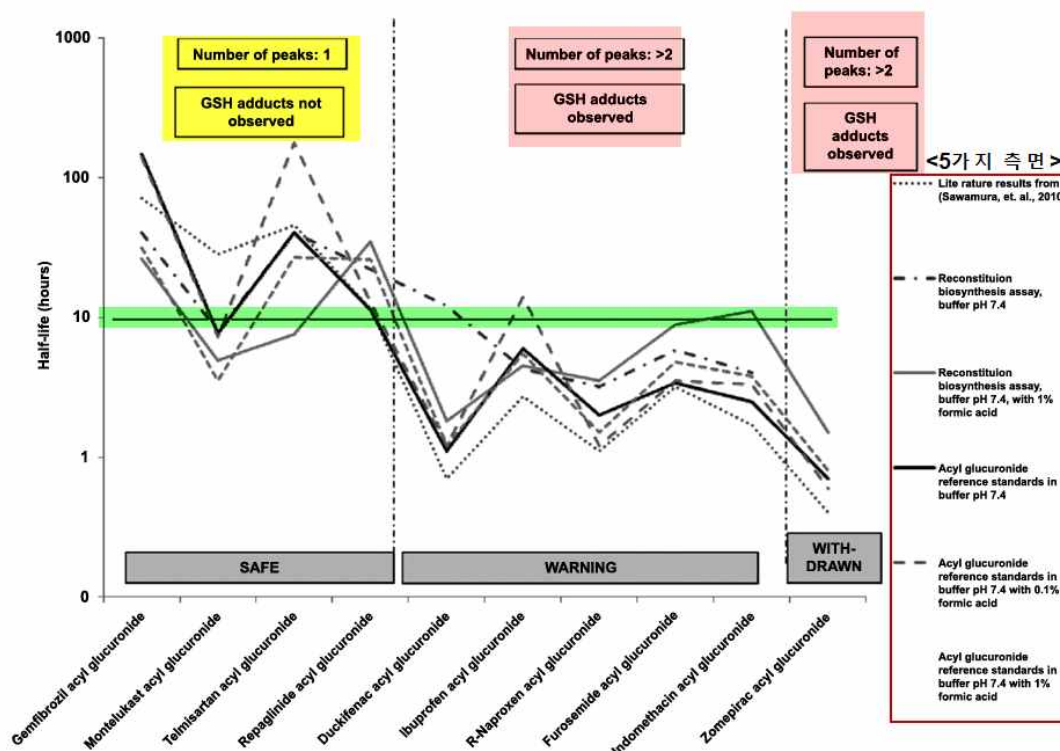


Fig. (2). Trend analysis of half-lives of acyl glucuronides. Half-lives (in hours) for each acyl glucuronide are shown under various assay conditions. The acyl glucuronides tested were either authentic reference standards obtained from commercial sources, or were biosynthesized. A half live greater than 10 hours in almost all conditions, a single peak, *i.e.* no rearrangement observed on the liquid chromatography column (after reconstitution with 1% formic acid) and no observed adducts upon reaction with GSH were the hallmarks of acyl glucuronides from the 'safe' category.

<참고문헌>

- Faed, EM, 1984, Properties of Acyl Glucuronides: Implications for Studies of the Pharmacokinetics and Metabolism of Acidic Drugs, Drug Metab Rev, 15, 1213–1249.
- Van Vleet TR, Liu H, Lee A, Blomme EAG. Acyl glucuronide metabolites: Implications for drug safety assessment. Toxicol Lett. 2017 Apr 15;272:1-7.
- Mitra, Kaushik. (2022). Acyl Glucuronide and Coenzyme A Thioester Metabolites of Carboxylic Acid-Containing Drug Molecules: Layering Chemistry with Reactive Metabolism and Toxicology. Chemical Research in Toxicology. 35. 10.1021/acs.chemrestox.2c00188.
- Anna Lundahl, Hans Lennernäs, Lars Knutson, Ulf Bondesson and Mikael Hedeland. Identification of Finasteride Metabolites in Human Bile and Urine by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Drug Metabolism and Disposition October 2009, 37 (10):2008-17.
- Boelsterli, U.A. Xenobiotic acyl glucuronides and acyl CoA thioesters as protein-reactive metabolites with the potential to cause idiosyncratic drug reactions.

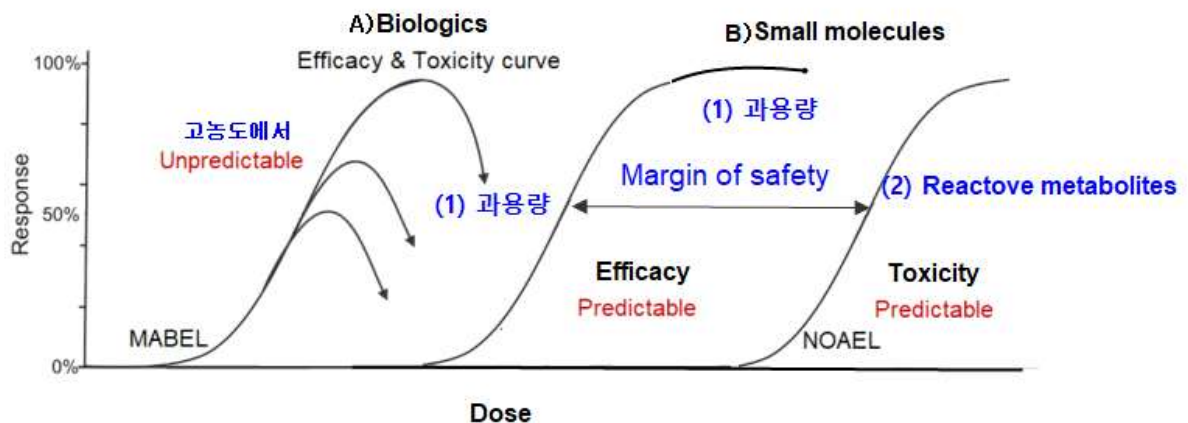
Curr. Drug Metab., 2002, 3, 439-450.

- Grillo, M.P. Drug-S-acyl-glutathione thioesters: Synthesis, bioanalytical properties, chemical reactivity, biological formation and degradation. Curr. Drug Metab., 2011, 12, 229-244.
- Gunduz M, Argikar UA, Cirello AL, Dumouchel JL. New Perspectives on Acyl Glucuronide Risk Assessment in Drug Discovery: Investigation of In vitro Stability, In situ Reactivity, and Bioactivation. Drug Metab Lett. 2018;12(2):84-92.

58. 신약개발에서 독성의 회피와 응용을 위한 Big-data 및 AI-기반 프로그램 검증

1. Small molecule과 biologics의 용량-반응곡선에 대한 이해

- Big-data 및 AI-기반 프로그램을 통한 독성예측의 기준이 무엇인지를 이해하기 위해서는 <그림-1>과 같이 Small molecule과 Biologics의 효능과 독성의 용량-반응곡선의 비교에 대한 이해가 필요함.
- A)의 Biologics는 효능과 독성이 하나의 용량-반응곡선에 존재. 반면에 B)의 small molecule의 효능과 독성이 분리된 2개의 용량-반응곡선임.
- 이와 같이 두 약물 모달리티에서 용량-반응곡선의 이와 같은 차이는 바이오의약품의 독성은 ① 과잉용량, small molecule의 독성은 ① 과잉용량과 ② Reactive metabolite(활성대사체) 등의 2가지에 기인하기 때문임
- 이와 같은 차이로 biologics는 과잉용량과 연관된 독성이 나타나며 대부분 1개월 내에 나타나는 급성적인 독성임. 반면에 small molecule는 초반에는 과잉용량에서 비롯된 독성현상이 일관되게 나타나지만 몇 개월 몇 년이 지나 초반에 나타난 독성현상과 전혀 다른 암과 같이 만성독성 현상이 나타남.



<그림-1> Small molecule과 Biologics의 효능과 독성의 용량-반응곡선

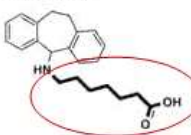
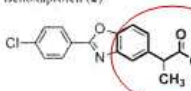
2. Reactive metabolites의

- Reactive metabolite의 가장 중요한 독성학적 기전은 자체의 친전자성과 체내의 DNA 및 단백질의 친핵성 부분과의 공유결합임. 이와 같이 공유결합을 하는 Reactive metabolite 생성하는 parent compound의 구조를 **structural alert**라고 함.
- 때로는 이들 물질들은 비임상 및 임상시험에서 확인이 되지않아 시장에서 **IADR(idiosyncratic adverse drug reaction, 개체특이-이상반응)**에 기인하여 Table 1과 2에서 처럼 퇴출되거나 경고문구를 레버링하게 됨(Stephen 등, 2011).

Chemical Research in Toxicology

REVIEW

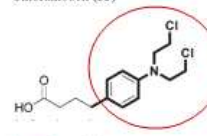
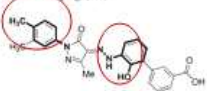
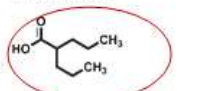
Table 1. **Structural Alert** and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADRs

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA ^a (Å ²)	Reason for Withdrawal	Daily Dose ^b (mg)	Alerts	Reactive Metabolite Formation ^c
Amineptine (1)	Antidepressant	Acid	337	2.51	49.30	Hepatotoxicity Cutaneous ADRs	200	Short to medium chain fatty acid	Yes ^{10, 16}
									
Ibuprofen (2)	NSAID	Acid	301	3.82	58.90	Hepatotoxicity	300-600	Arylacetate acid	Yes ^{20, 28, 29}
									
Bromfenac (3)	NSAID	Acid	334	3.28	80.40	Hepatotoxicity	25-50	Aniline, Arylacetate acid	Yes ²²

Chemical Research in Toxicology

REVIEW

Table 2. **Structural Alert** and RM Analysis for Drugs Associated with a Black Box Warning (BBW) Due to IADRs

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA ^a (Å ²)	Reason for BBW	Daily Dose ^b (mg)	Alerts	Reactive Metabolite Formation ^c
Chlorambucil (33)	Anticancer	Acid	304	3.63	40.54	Blood Bone marrow suppression	12	Nitrogen mustard, Alkyl halide, <i>p</i> -Alkylaniline	Yes ¹¹¹
									
Eltrombopag (35)	Thrombocytopenia	Acid	442	5.24	114.60	Hepatotoxicity	75	<i>o</i> -Hydroxyaniline, <i>p</i> -Alkylaniline, Hydrazine	Yes ¹¹²
									
Valproic acid (36)	Anticonvulsant	Acid	144	2.76	37.30	Hepatotoxicity	1000-2400	Short to medium chain carboxylic acid	Yes ^{117, 120}
									

3. Reactive metabolites를 생성하는 structural alert의 small molecule은 신약으로 개발이 어려운가?

- 대부분의 합성항암제는 Reactive metabolites 생성하거나 자연적으로 친전자성을 띠 수 있는 물질들임. 심지어 최근 개발된 수용체-타이로신 카이네제 저해제도 친전자성을 띠는 structural alert을 가진 small molecule임.
- 그러나 암세포처럼 비가역적으로 표적을 제거하는 것이 아닌 항상성 유지 및 증진을 위한 약물의 경우에 친전자성대사체를 생성하는 small molecule은 IADR 발생에 의해 Table 1과 2에서처럼 대부분의 퇴출되거나 warning level을 부착하게 됨.
- 따라서 표적에 대한 가역성 또는 비가역성에 대한 이해를 통해 개발 초기부터 reactive metabolite 생성 유무를 기반으로 drug design이 이루어지는 것이 신약 개발에 실패할 확률을 줄일 수 있는 최선의 방법임.

4. Reactive metabolites 생성의 스크리닝 방법과 중간 차이

- Reactive metabolite는 biotransformation(생화학적 전환)의 제1상반응(Phase I reaction) 중 cytochrome P450 촉매반응으로 발생함. 이렇게 발생한 Reactive metabolite를 친수성으로 전환시켜 배출시키는 유일한 생체 내 물질은 glutathione(GSH)임. 만약 GSH에 포함되지 않으면 DNA와 단백질의 친핵성 부위에 결합하여 암세포를 사멸시키거나 정상세포의 항상성에 변화를 주게됨.
- 따라서 다량의 다양한 종류의 cytochrome P450이 포함된 간세포의 microsomal fraction인 S9 fraction에 small molecule과 함께 incubation 후 세포의 DNA 손상 또는 glutathione과의 결합 유무로 확인함.
- 그러나 간세포를 사용하지 않는다면 동물의 in vivo 및 in vitro 시험으로 cytochrome P450의 중간 차이에 기인하여 parent compound의 Reactive metabolite 생성 유무와 독성 예측이 어려움. 이는 비임상시험을 통한 임상시험의 예측에 가장 큰 장애가 됨.

5. Big-data 및 AI-기반 프로그램 검증

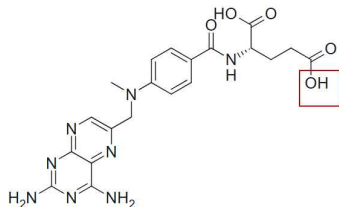
- 이와 같이 Reactive metabolite 생성하는 structure alert의 small molecule을 적응증 (indication)에 따라 다르게 적용하여야 효능과 독성을 위한 바람직한 MOA(mechanism of action)을 통한 신약개발의 성공률을 높일 수 있음.
- Big-data 및 기계학습 등이 가능한 AI-기반 프로그램을 이용하여 structure alert와 reactive metabolite 생성 가능한 방법 추정을 목적으로 하였음.
- 이러한 목적을 위해 아래와 같이 9-10개의 독성예측 프로그램을 통해 cytochrome P450 에 의한 대사과정을 비롯하여 친핵성 -SH를 가진 glutathione과 cysteine(-SH 포함)을 가진 단백질과 결합 유무를 확인하였음 또한 이들에 대한 분석을 통해 바람직하게 사용하는 방법을 모색하였음.

- ① Pubchem
- ② Marvin JS 프로그램
- ③ Pro-Tox 3.0 prediction 프로그램
- ④ Swissadme 프로그램
- ⑤ ADMETlab 3.0
- ⑥ BioTransformer 3.0 프로그램
- ⑦ TOXSTAR
- ⑧ ADMET-AI 프로그램 [ADMET-AI](#)
- ⑨ OECD QSAR toolbox
- ⑩ ADMETSAR 3.0 프로그램
- ⑪ AI Drug Lab [AI Drug Lab](#)
- ⑫ FP-ADMET [Vishwesh Venkatraman / FPADMET · GitLab](#)

1) Pubchem과 Marvin JS 프로그램: 대표적인 발암물질이며 reactive metabolite를 생성하는 항암제인 Methotrexate의 구조변경하여 smiles 확보하여 프로그램을 통해 예측함.

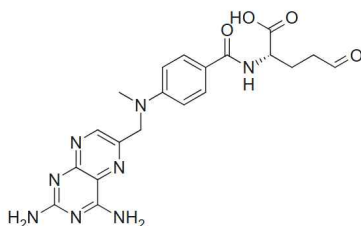
▶ Methotrexate의 smiles:

CN(CC1=CN=C2C(=N1)C(=NC(=N2)N)N)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)O



▶ Methotrexate의 -OH 제거된 test substance의 smiles

CN(CC1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)C1=CC=C(C=C1)C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)O



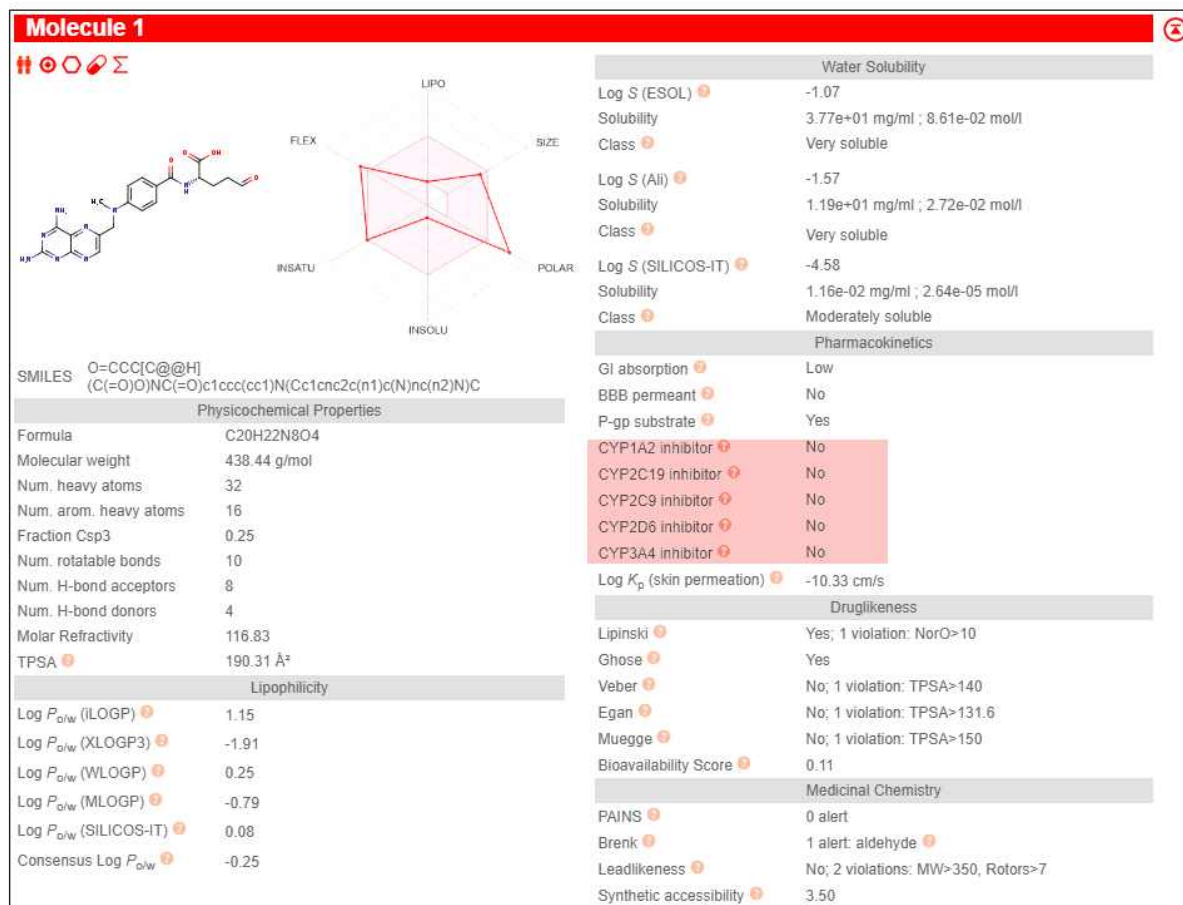
2) Pro-Tox 3.0 prediction 프로그램

- Test substance가 인체의 주요 cytochrome P450에 대한 기질이 되지 못하여 특히 이들 효소의 발현을 유도하는 핵수용체인 CAR 및 PXR도 불활성화됨. 단지 돌연변이원성 및 발암성도 음성이며 단지 임상학적 독성만 양성으로 이를 통해서는 reactive metabolite 생성 유무에 대한 스크리닝에 대한 확인은 어려움.

Toxicity Model Report				
Copy Excel CSV PDF				
Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.52
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.93
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.65
Toxicity end points	Clinical toxicity	clinical	Active	0.92
Molecular Initiating Events	Constitutive androstane receptor (CAR)	mie_car	Inactive	0.96
Molecular Initiating Events	Pregnane X receptor (PXR)	mie_pxr	Inactive	0.69
Metabolism	Cytochrome CYP1A2	CYP1A2	Inactive	0.98
Metabolism	Cytochrome CYP2C19	CYP2C19	Inactive	0.98
Metabolism	Cytochrome CYP2C9	CYP2C9	Inactive	0.71
Metabolism	Cytochrome CYP2D6	CYP2D6	Inactive	0.79
Metabolism	Cytochrome CYP3A4	CYP3A4	Inactive	0.97
Metabolism	Cytochrome CYP2E1	CYP2E1	Inactive	0.98

3) Swissadme 프로그램

- Test substance의 활성에 의한 cytochrome P450에 대한 활성저해 유무만 확인이 가능하며 reactive metabolite에 대한 정보는 어려움.



4) ADMETlab 3.0

- 아래의 <표>와 <그림>에서처럼 화학적 구조에서 유전독성 및 발암성을 나타낼 수 있는 group이 5개 정도 상존한다는 것이 추정됨. 특히 test substance의 cytochrome P450과의 관계에 대한 예측은 <metabolism>표에서처럼 거의 불가능할 정도로 확인되었음.

TOXICOPHORE RULES			
Aquatic Toxicity Rule	0		i
Genotoxic Carcinogenicity Mutagenicity Rule	5	⚠	i
NonGenotoxic Carcinogenicity Rule	0		i
Skin Sensitization Rule	5	⚠	i
Acute Toxicity Rule	0		i
NonBiodegradable	1	⚠	i
SureChEMBL Rule	1	⚠	i
FAF-Drugs4 Rule	2	⚠	i

Structure View



METABOLISM		
CYP1A2 inhibitor	---	i
CYP1A2 substrate	---	i
CYP2C19 inhibitor	---	i
CYP2C19 substrate	---	i
CYP2C9 inhibitor	---	i
CYP2C9 substrate	---	i
CYP2D6 inhibitor	---	i
CYP2D6 substrate	---	i
CYP3A4 inhibitor	---	i
CYP3A4 substrate	---	i
CYP2B6 inhibitor	---	i
CYP2B6 substrate	---	i
CYP2C8 inhibitor	---	i
HLM Stability	--	● i

- Lipinski rule은 경구 투여를 통한 ADME 측면에서 약물 가능성을 판단하는 기준임. 오늘날 같이 ADC 및 ApDC와 같은 새로운 약물 모달리티 발전으로 큰 의미는 없음. 이들 지표들은 약리학적 효능에 대한 평가를 나타내지 않기 때문에 이들 rule에 의존하여 신약 개발은 별 의미가 없다고 할 수 이 있음. 단 항상성 유지를 위한 경우에는 참고할 필요성이 있다고 사료됨.

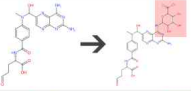
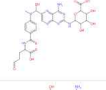
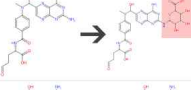
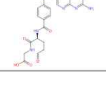
MEDICINAL CHEMISTRY		
Lipinski Rule	Rejected	● ⓘ
Pfizer Rule	Accepted	● ⓘ

5) BioTransformer 3.0 프로그램

- 아래의 <표>는 cytochrome P450인 CYP1A2와 CYP3A4에 의한 12가지 대사체 생성 가능성을 추정한 것임. 사실 AI-기반 신약 개발을 위해서는 양질의 데이터를 포함하고 이에 대한 알고리즘을 어떻게 기계학습을 하는 것이 중요하다고 사료됨. 본 프로그램이 이 정도의 추정은 차후 분석에 중요한 자료로 고려할 만하다고 사료됨. 특히 주어진 smiles는 제2상반응 및 기타 프로그램 활용에 편리할 것으로 사료됨.

Result ID	Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotope Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
1		<chem>N(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C19H20N8O4	424.1607	N-Dealkylation of mixed tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
2		<chem>CN(C1=CC=C(C=C1)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C13H16N2O4	264.111	N-Dealkylation of mixed tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
3		<chem>C(C1=CN=C2C(N1)C(=NC(=N2)N)=O</chem>	C7H6N6O	190.0603	N-Dealkylation of mixed tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
4		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C20H22N8O5	454.1713	Hydroxylation of non-terminal aliphatic carbon adjacent to aromatic ring	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
5		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C20H22N8O5	454.17132	Aldehyde oxidation	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
6		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C20H22N8O5	454.1713	N-Hydroxylation of primary arylamine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
7		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C20H22N8O5	454.1713	N-Hydroxylation of primary arylamine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
8		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C20H22N8O5	454.1713	alpha-Hydroxylation of carbonyl group	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
9		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C20H24N8O4	440.192	Reduction of aldehyde to alcohol	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 BioSystem: HUMAN	
10		<chem>CN(C(C1=CC=C(C=C1)C(=O)N(CCCC=O)C(O)=O)C2=CN=C3C(N)N=C(N)C3=N2)O</chem>	C20H22N8O5	454.17132	Hydroxylation from CyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 BioSystem: HUMAN	
11		<chem>C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)N(C3=CC=C(C=C3)C(=O)N(C)(CCC=O)C(O)=O</chem>	C19H20N8O4	424.16075	N-Dealkylation from CyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 BioSystem: HUMAN	
12		<chem>O=C</chem>	CH2O	30.01056	N-Dealkylation from CyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 BioSystem: HUMAN	

- 제1상반응에서 carboxylic acid을 가진 4번 대사체의 smiles를 이용하여 제2상반응의 결과를 아래의 <표>에서처럼 확인하였음. 특징은 제1상반응 후 -OH에 포합이 이루어지는 것이 보편적인데 -NH에 glucuronidation이 이루어짐. 또한 glucuronidation이 아닌 glycin의 아미노산 포합 반응이 이루어진 것이 약물의 친수성대사체 전환으로 빠르게 배출될 것으로 추정됨.
- CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O

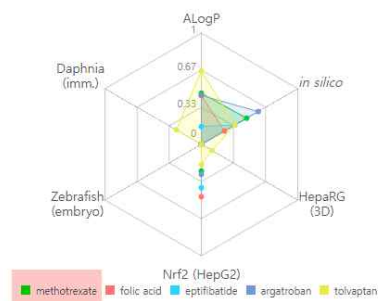
Result ID	Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotope Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
1		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(C(NC3OC(C(O)C(O)C3O)C(O)=O)C2=N1)O)C4=C(C=C(C4)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C26H30N8O11	630.2034	Glucuronidation of primary aromatic amine	Enzyme: UDP-glucuronosyltransferase BioSystem: HUMAN	
2		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(C(NC3OC(C(O)C(O)C3O)C(O)=O)N=C(N)C2=N1)O)C4=CC=C(C(=C4)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C26H30N8O11	630.2034	Glucuronidation of primary aromatic amine	Enzyme: UDP-glucuronosyltransferase BioSystem: HUMAN	
3		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(C(NC2=N1)O)C3=CC=C(C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(=O)NCC(C(O)=O</chem>	C22H25N9O6	511.1927	Glycine conjugation	Enzyme: Glycine N Acyltransferase BioSystem: HUMAN	

6) TOXSTAR

- 본 시험물질은 대표적인 발암물질이며 reactive metabolite를 생성하는 항암제인 Methotrexate의 구조변경하여 smilse 확보하여 프로그램을 통해 예측한 것임. 본 프로그램인 경우에 화학적으로 새로운 구조에 대한 대사적 예측을 하는 프로그램은 아닌 것으로 평가됨. 단지 아래의 <그림>에서처럼 유사한 구조의 화학물질을 제시하였고 시험물질의 원물질인 methotrexate와 92% 동일일한 구조로 확인됨. 따라서 새로운 물질에 대한 예측은 어렵다는 결론임.

Similarity Data

All Chart



7) ADMET-AI 프로그램

- 일단 cytochrome P450 저해에 대한 이해보다도 시험물질의 대사와 관련된 CYP2C9에 대한 기질이라는 것이 확인됨. 이들의 발현과 관련된 핵수용체에 대한 영향도 50% 이상이 기때문에 상호 어느 정도 일치성은 있다고 할 수 있음.
- 또한 모든 암의 50%와 관련된 p53에 대한 영향은 시험물질이 발암성을 가지고 해석할 수 있음. 돌연변이원과 약인성간독성으로 작용한다는 것은 본 시험물질이 reactive metabolite의 structure alert를 가진 구조로 해석할 수 있음.



Metabolism

Property	Prediction	DrugBank Percentile	Units
CYP1A2 Inhibition ②	0.02	39.78%	~
CYP2C19 Inhibition ②	0.01	14.89%	~
CYP2C9 Inhibition ②	0.02	43.04%	~
CYP2D6 Inhibition ②	0.02	37.42%	~
CYP3A4 Inhibition ②	0.02	39.36%	~
CYP2C9 Substrate ②	0.16	54.01%	~
CYP2D6 Substrate ②	0.02	14.50%	~
CYP3A4 Substrate ②	0.09	7.91%	~

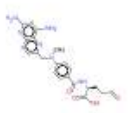


Property	Prediction	DrugBank Percentile	Units
hERG Blocking ⓘ	0.39	57.66%	-
Clinical Toxicity ⓘ	0.55	91.70%	-
Mutagenicity ⓘ	0.33	69.64%	-
Drug Induced Liver Injury ⓘ	0.97	93.41%	-
Carcinogenicity ⓘ	0.19	57.70%	-
Acute Toxicity LD50 ⓘ	2.24	31.87%	log(1/(mol/kg))
Skin Reaction ⓘ	0.24	26.83%	-
Androgen Receptor (Full Length) ⓘ	0.10	85.92%	-
Androgen Receptor (Ligand Binding Domain) ⓘ	0.06	86.08%	-
Aryl Hydrocarbon Receptor ⓘ	0.03	53.70%	-
Aromatase ⓘ	0.04	56.42%	-

Property	Prediction	DrugBank Percentile	Units
Estrogen Receptor (Ligand Binding Domain) ⓘ	0.02	52.89%	-
Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma ⓘ	0.03	78.40%	-
Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2/Antioxidant Responsive Element ⓘ	0.13	51.22%	-
ATPase Family AAA Domain-Containing Protein 5 (ATAD5) ⓘ	0.10	87.94%	-
Heat Shock Factor Response Element ⓘ	0.01	34.86%	-
Mitochondrial Membrane Potential ⓘ	0.04	51.69%	-
Tumor Protein p53 ⓘ	0.32	91.31%	-

8) OECD QSAR toolbox

- 핵산 및 단백질과 결합하는 schiff base로 기전과 유전독성 및 발상성의 group를 제시함.
그러나 대사체 및 cytochrome P450 등에 의한 대사 과정에 대한 정보는 없음.

Filter endpoint tree...		1 [target]
Structure		
+ Ecotoxicological Information		
+ Human Health Hazards		
Intermediate effects - mechanistic information		
- Profiling		
- Predefined		
Database Affiliation		Does not belong to an...
Inventory Affiliation		Does not belong to an...
OECD HPV Chemical Categories		Not categorized
Substance type		Discrete chemical
US-EPA New Chemical Categories		Aldehydes (Acute toxi...
- General Mechanistic		
DNA binding by OASIS		No alert found
DNA binding by OECD		Schiff base formers
Protein binding by OASIS		Schiff base formation
Protein binding by OECD		Schiff Base Formers
Protein binding potency Cys (DPRA 13...		DPRA above 21% (DP...
Protein binding potency Lys (DPRA 13%)		DPRA less than 9% (D...
- Endpoint Specific		
Carcinogenicity (genotox and nongen...		Primary aromatic amin...
DART scheme		Not known precedent...
DNA alerts for AMES, CA and MNT by...		No alert found
in vitro mutagenicity (Ames test) alert...		Primary aromatic amin...
in vivo mutagenicity (Micronucleus) al...		H-acceptor-path3-H-a...
Oncologic Primary Classification		Aldehyde Type Compo...
Protein binding alerts for Chromosom...		AN2
- Metabolism/Transformation		
- Observed Rat In vivo metabolism		Not tested
- Predefined		
Database Affiliation		No metabolites
Inventory Affiliation		No metabolites
OECD HPV Chemical Categories		No metabolites
Substance type		No metabolites
US-EPA New Chemical Categories		No metabolites

9) ADMETSAR 3.0 프로그램

- 본 프로그램을 통해 시험물질은 CYP3A4의 기질로 추정되며 또한 CYP1A2의 기질로도 가능성이 있음. 특히 일부 대사체는 glucuronidation 포함 가능성도 있음. 유전독성 및 발암성에서 양성 반응으로 추정되어 reactive metabolite를 생성하는 structure alert를 가진 small molecule로 추정됨. 특히
- FDAMDD<FDA Maximum (Recommended) Daily Dose Database>는 약물로 개발될 경우 MRSD가 1-3.4 mg/kg/day로 추정됨

Metabolism			
CYP1A2 inhibitor	0		2.5%
CYP3A4 inhibitor	0		0.5%
CYP2B6 inhibitor	0		5.8%
CYP2C9 inhibitor	0		0.4%
CYP2C19 inhibitor	0		0.7%
CYP2D6 inhibitor	0		2.5%
CYP1A2 substrate	0		32.7%
CYP3A4 substrate	1		54.5%
CYP2B6 substrate	0		11.4%
CYP2C9 substrate	0		11.3%
CYP2C19 substrate	0		24.3%
CYP2D6 substrate	0		11.3%
HLM	0		1.7%
RLM	0		3.2%
UGT substrate	1		65.7%

Toxicity endpoint		
Ames mutagenesis	1	56.2%
Mouse carcinogenicity	0	48%
Mouse carcinogenicity	3.98	100%
Rat carcinogenicity	1	68.7%
Rat carcinogenicity	4.06	84.24%
Rodents carcinogenicity	1	66.7%
Micronucleus	1	92.9%
Reproductive toxicity	1	99%
Mitochondrial toxicity	0	6.7%
Hemolytic toxicity	0	14.5%
Repeated dose toxicity	1	65.8%
Acute oral toxicity	1	76.7%
Acute oral toxicity	-1.98	59.2%
FDAMDD	1	88.1%
FDAMDD	3.4	62.94%

5. 결론

- 항암제 Methotrexate의 구조 변경을 통해 아래의 프로그램을 통해 새로운 물질의 대사 및 독성학적 관점에서 결과는 다음과 같이 추론됨

- ① Pubchem과 Marvin JS 프로그램
- ② Pro-Tox 3.0 prediction 프로그램
- ③ Swissadme 프로그램
- ④ ADMETlab 3.0
- ⑤ BioTransformer 3.0 프로그램
- ⑥ TOXSTAR
- ⑦ ADMET-AI 프로그램
- ⑧ OECD QSAR toolbox
- ⑨ ADMETSAR 3.0 프로그램

- Methotrexate 유사체인 시험물질은 제1상반응에서 CYP3A4의 기질로 추정되며 CYP1A2와 CYP2C9에 의해 다소 대사될 가능성이 있음.
- Methotrexate 유사체인 시험물질은 제2상반응에서 주로 glucuronidation 포함반응이 주를 이루고 아미노산 포함반응도 잠재성이 있음.
- 돌연변이원성 및 발암성에서 양성이 확인되어 시험물질은 schiff base로 전자 재배열을 통해 단백질 및 DNA의 결합하여 reactive metabolite를 생성하는 structural alert를 가진 물질로 추정됨. 따라서 항상성 유지를 위한 신약보다 항암제 개발의 방향으로 drug design이 요구됨.
- 각 프로그램의 특성은 가지고 있으며 데이터의 양과 질 그리고 특정 endpoint를 예측 가능하게 학습을 통한 알고리즘 등에서 다양하게 차이가 있음. 따라서 하나의 프로그램에 전적으로 의존하여 신약의 ADMET 추정은 다소 위험하니 여러 프로그램을 통해 교차검증이 요구됨.
- 오늘날 Big-data 및 AI-기반 신약개발을 위한 다양한 프로그램이 제시되고 있음. 여러 후보물질이 확인되면 ADMET의 지표를 위해 시뮬레이션을 하는 것은 다양하다고 할 수 있음. 그러나 무엇보다도 중요한 것은 structural alert 즉 reactive metabolite 생성 유무와 이에 대한 인간과 동물의 중간 차이에 대한 알고리즘 개발이 무엇보다도 필요하지만 여전히 미미함. Reactive metabolite 생성에 의한 독성 유발 가능성 때문에 개발을 포기할 필요는 없음. 적응증을 달리하여 개발을 지속할 수 있다고 사료됨. 이러한 접근을 위해서는 우선적으로 small molecule과 biologics에 대한 독성기전의 차이에 대한 이해가 그 출발점임.

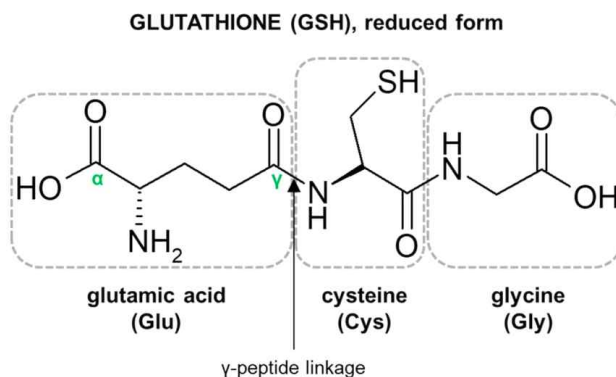
<참고문헌>

- Antonia F. Stepan, et al., Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. Chem. Res. Toxicol.2011, 24, 9, 1345-1410

59. Reactive metabolite 예측을 위한 AI-기반 프로그램 소개

1. Glutathione 포함반응에 대한 이해

- 앞선 컨설팅보고서 "58. 신약개발에서 독성의 회피와 응용을 위한 Big-data 및 AI-기반 프로그램 검증"에 다음과 같이 약물 모달리티에 따른 독성기전의 차이를 설명하였음.
- 두 약물 모달리티에서 용량-반응곡선의 이와 같은 차이는 바이오의약품의 독성은 ① 과잉용량, small molecule의 독성은 ① 과잉용량과 ② Ractive metabolite(활성독성대사체) 등의 2가지에 기인하기 때문임.
- Small molecule에 의한 독성 중 과잉용량에 독성은 용량을 줄이면 됨. 반면 Ractive metabolite(활성독성대사체)에 의한 독성은 단 하나의 생성으로도 암을 유발할 수 있음. 따라서 Ractive metabolite의 생성 여부를 초기에 예측하는 것은 신약개발 실패를 줄이는 가장 바람직한 방법임. 물론 모든 합성항암제는 Ractive metabolite의 생성하는 물질임. 그러나 항상성 유비와 관련된 질환에 적응증을 가진 신약에서 Ractive metabolite를 생성하는 sturcuture alert 구조를 반드시 확인할 필요성이 있음.
- 일반적으로 Ractive metabolite는 제1상반응의 cytochrome P450에 의해 생성됨. 제2상반응을 통해 Ractive metabolite를 제거하는 **유일한 물질은 glutathione**이며 이를 glutathione 포함(conjugation) 반응 또는 glutathionation이라고 함. 경구로 투입되는 모든 약물은 소장에서 간문맥을 통해 전신혈관계로 유입됨. 모든 약물은 전신혈관계로 들어가기 전에 간을 통하며 간에서만 glutathione이 합성되어 독성대사체 및 독성물질을 제거하기 때문에 간의 해독의 중추기관이 되는 이유임.
- 이와 같이 독성대사체 즉 ractive metabolite와 glutathione의 포함반응을 확인하면 약물이 Ractive metabolite 생성의 독성을 유발하는 후보물질을 확인이 가능함.
- Glutathione은 3가지 아미노산으로 구성됨

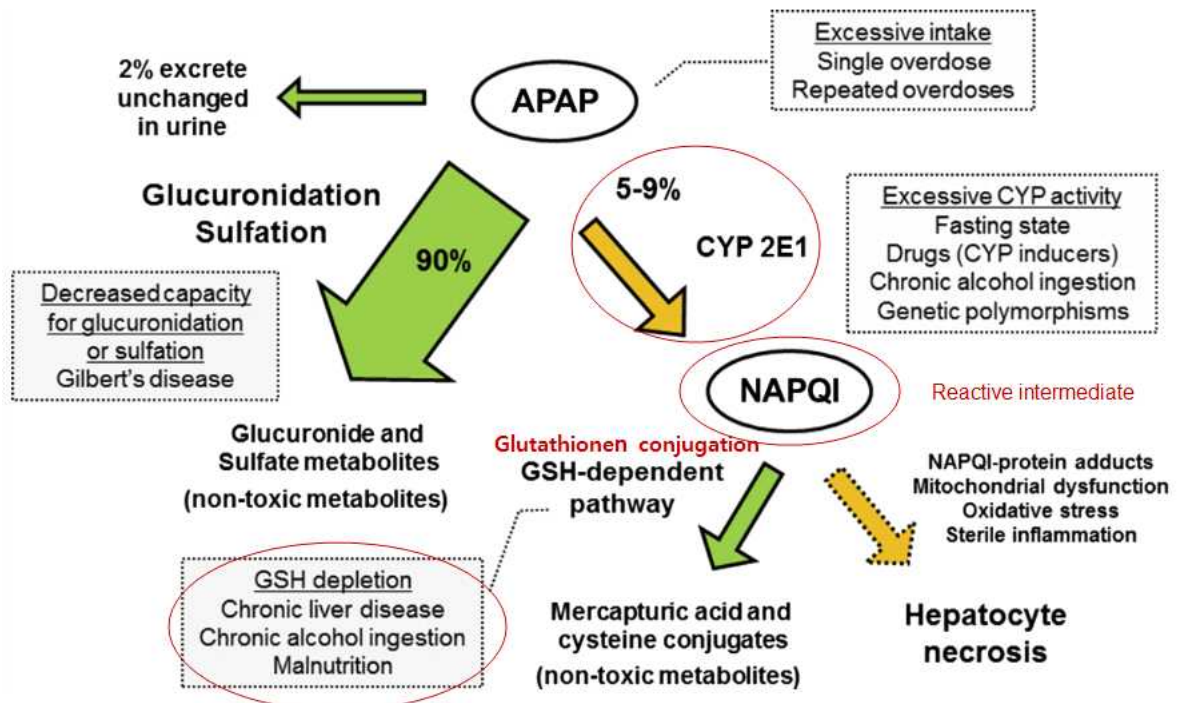


2. Way2drug – predictive service

- <https://www.way2drug.com/>: PASS Online predicts over 4000 kinds of biological activity, including pharmacological effects, mechanisms of action, toxic and adverse effects, interaction with metabolic enzymes and transporters, influence on gene expression, etc.

1) Acetaminophen 예시

① 독성기전: 아세트아미노펜(tyrenol)은 -OH기를 포함하여 바로 제2상반응을 통해 당화 및 황화 포함으로 배출됨. 그러나 약 5% 정도는 CYP2E1에 의해 대사되어 Reactive metabolite 인 NAPQI를 생성하여 독성을 유발함. 반면에 충분한 glutathione이 존재하면 포함에 의해 친수성대사체로 체외배출됨(Bunchorntavakul 등, 2013)



- ② [Services](http://www.way2drug.com/PASSOnline/services.php): www.way2drug.com/PASSOnline/services.php

Services

[Acute Rat Toxicity](#), prediction of acute rat toxicity for four administration routes.

[ADVER-Pred](#), prediction of adverse drugs effects on cardiovascular and hepatobiliary systems.

[AntiBac Pred](#), prediction of antibacterial activity.

[AntiFun Pred](#), prediction of antifungal activity.

[AntiHIV-Pred](#), prediction of antiretroviral activity and effects associated with treatment of HIV-associated comorbidities.

[AntiVir-Pred](#), prediction antiviral activity.

[Antitarget Prediction](#), prediction of interaction with the undesirable targets.

[CLC Pred](#), prediction of interaction with tumor and non-tumor cell lines.

[DDI-Pred](#), prediction of drug-drug interactions.

[DIGEP-Pred](#), prediction of drug-induced gene expression.

[Ecotoxicity](#), quantitative prediction of characteristics of ecotoxicity of chemical compounds.

[KinScreen](#), prediction of interaction of pharmacological substances with human kinome.

[MetaTox](#), prediction of toxicity taking into account the metabolism of drug.

[PASS Online](#), prediction of 4000 types of biological activity.

[PASS Targets](#), prediction of interaction with molecular targets.

[RA](#), prediction of reacting atoms during the biotransformation.

[Resistance](#), prediction of HIV-1 resistance based on analysis of nucleotide sequences of protease and reverse transcriptase.

[ROSC-Pred](#), prediction of organ-specific carcinogenicity.

[SMP](#), prediction of substrate's and metabolite's specificity to the biotransformation enzymes.

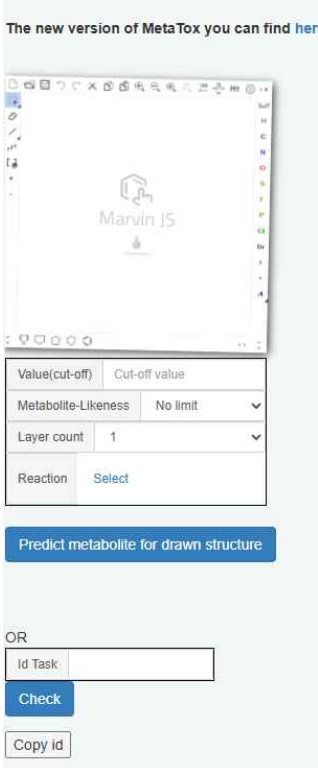
[SOMP](#), prediction of metabolism sites for pharmacological agents.

[SprOS](#), analysis of functional specificity of amino acid sequences of proteins.

In case of any question, please, [contact us](#).

③ **MetaTox**, prediction of toxicity taking into account the metabolism of drug

The new version of MetaTox you can find [here](#)



Value(cut-off)	Cut-off value
Metabolite-Likeness	No limit
Layer count	1
Reaction	Select

Predict metabolite for drawn structure

OR

Id Task:

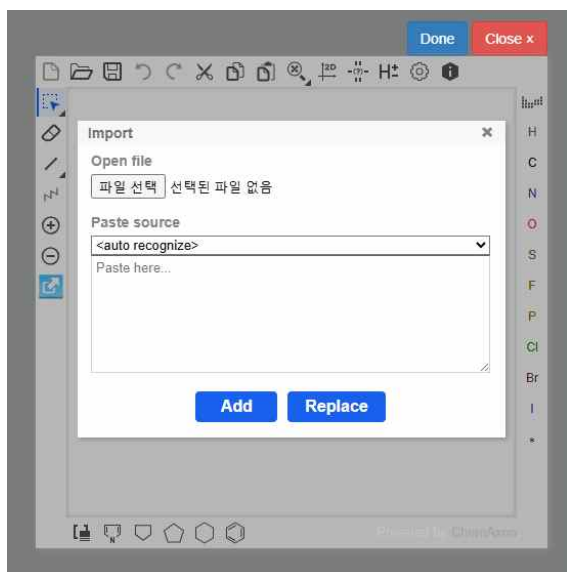
Check

Copy id

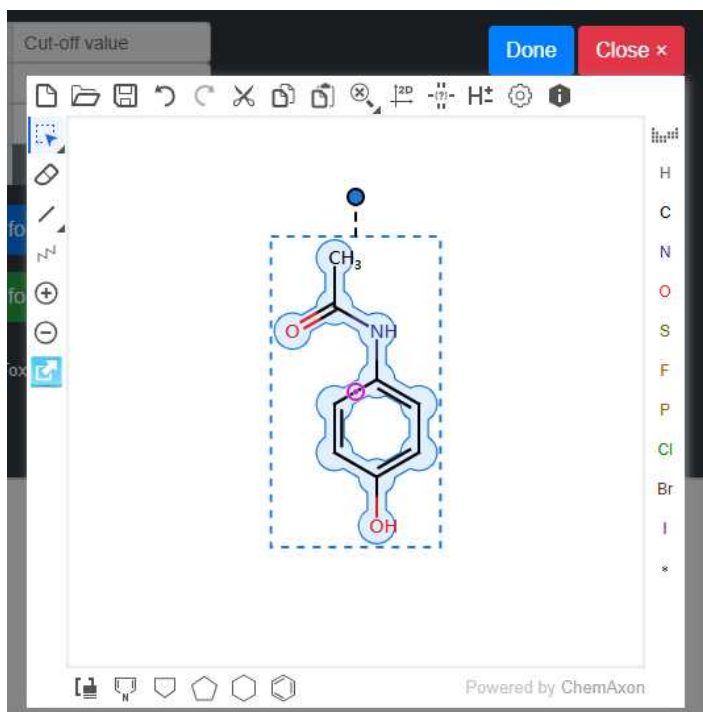
③ **Marvin-JS의 fold 클릭**



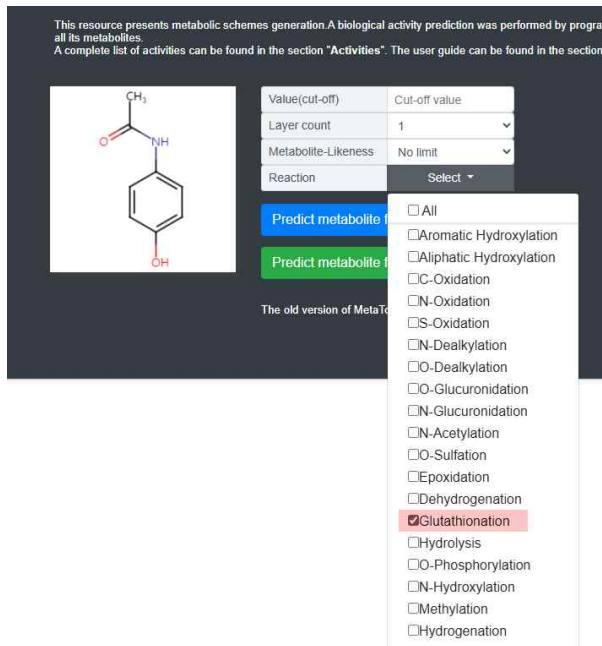
④ Phbchem에서 acetaminophen의 Smiles 복사하여 paste



⑤ SMILES: CC(=O)NC1=CC=C(C=C1)O 후 Done click



⑥ Reaction에서 select click 후 glutathionation 선택

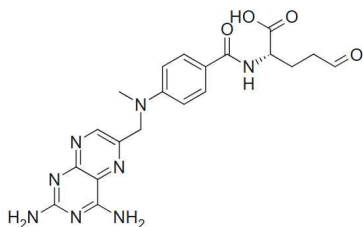


⑦ Predict metabolites for drawn structure 클릭

아래와 같이 4가지 group에 glutathione의 포함 반응을 확인이 가능함

2) 항암제 Methotrexate의 -OH 제거된 test substance의 smiles

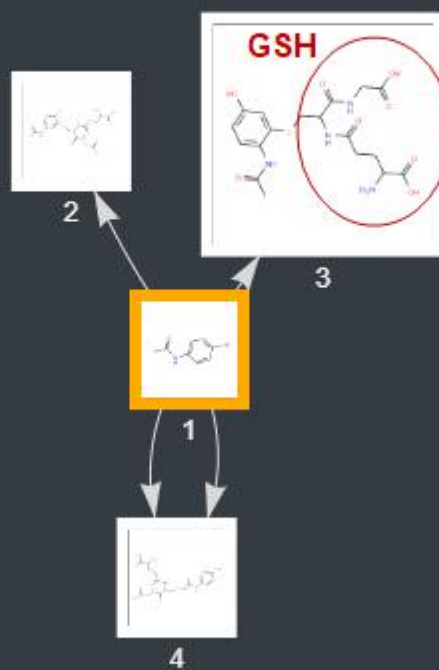
CN(CC1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)C1=CC=C(C=C1)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O

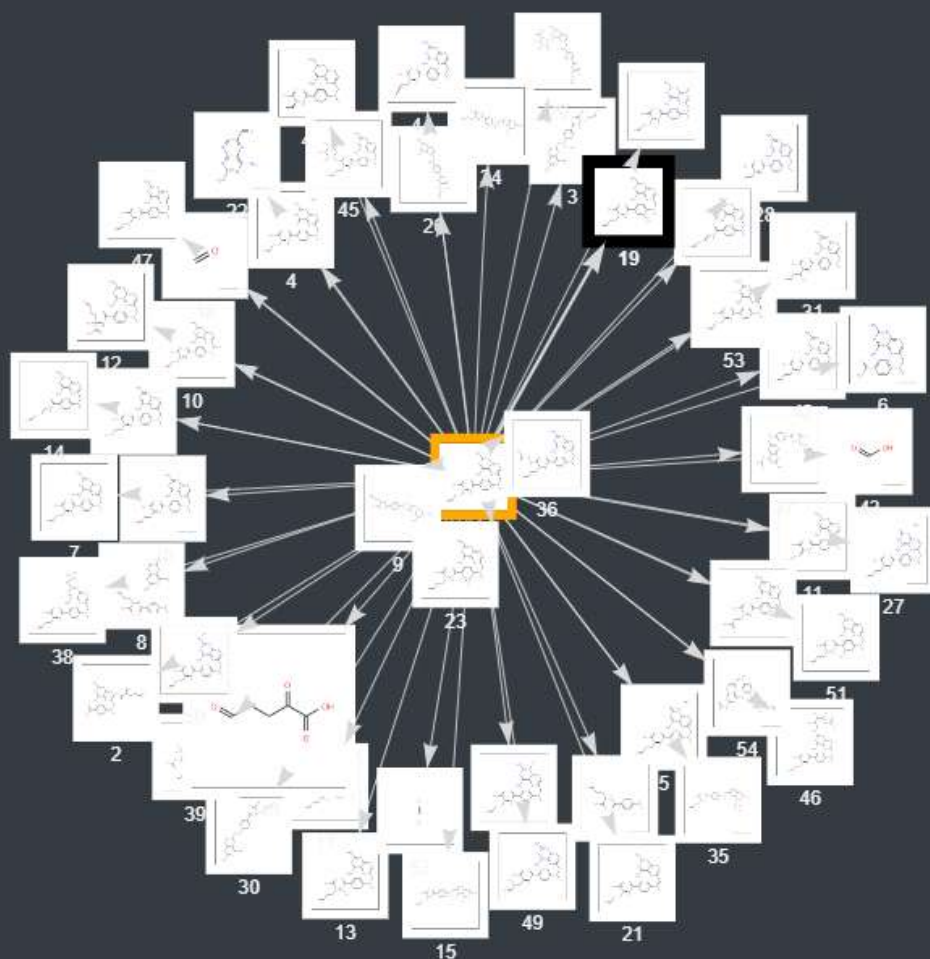


① Acetaminophen과 동일한 절차로 통해 확인

- 너무 많은 대사체로 일일이 확인이 어려움 S-O 또는 S-N 결합을 찾고 glutathione을 확인하며됨.

67a58e320161d





② 또 다른 방법은 Biotransformer 3.0을 이용

- BioTransformer 3.0은 영양물질의 1차대사체뿐만 아니라 외인성물질의 2차대사체를 함께 기계학습된 AI-기반 대사체 예측 프로그램으로 관장은 프로그램
- 특히 위 프로그램 제작사인 TMIC는 metabolomics 전문회사임 (metabolomicscentre.ca/software-databases/software-data-analysis)
- <http://biotransformer.ca/new> : BioTransformer 3.0 프로그램에서 각 대사체의 SMILES을 이용하여 Way2drug – predictive service에서 확인
- 아래의 <표>는 cytochrome P450인 CYP1A2와 CYP3A4에 의한 12가지 대사체 생성 가능성을 추정한 것임. 사실 AI-기반 신약 개발을 위해서는 양질의 데이터를 포함하고 이에 대한 알고리즘을 어떻게 기계학습을 하는 것이 중요하다고 사료됨. 본 프로그램이 이 정도의 추정은 차후 분석에 중요한 자료로 고려할 만하다고 사료됨. 특히 주어진 smiles는 제2상반응 및 기타 프로그램 활용에 편리할 것으로 사료됨.

Result ID	Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotope Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
1		<chem>N(CCC1=CC=CC=C1C(=O)N(C)C2=CC=CC=C2C(=O)N(C)C3=CC=CC=C3C(=O)N(C)C4=CC=CC=C4C(=O)N(C)C5=CC=CC=C5C(=O)N(C)C6=CC=CC=C6C(=O)N(C)C7=CC=CC=C7C(=O)N(C)C8=CC=CC=C8C(=O)N(C)C9=CC=CC=C9C(=O)N(C)C10=CC=CC=C10C(=O)N(C)C11=CC=CC=C11C(=O)N(C)C12=CC=CC=C12C(=O)N(C)C13=CC=CC=C13C(=O)N(C)C14=CC=CC=C14C(=O)N(C)C15=CC=CC=C15C(=O)N(C)C16=CC=CC=C16C(=O)N(C)C17=CC=CC=C17C(=O)N(C)C18=CC=CC=C18C(=O)N(C)C19=CC=CC=C19C(=O)N(C)C20=CC=CC=C20C(=O)N(C)C21=CC=CC=C21C(=O)N(C)C22=CC=CC=C22C(=O)N(C)C23=CC=CC=C23C(=O)N(C)C24=CC=CC=C24C(=O)N(C)C25=CC=CC=C25C(=O)N(C)C26=CC=CC=C26C(=O)N(C)C27=CC=CC=C27C(=O)N(C)C28=CC=CC=C28C(=O)N(C)C29=CC=CC=C29C(=O)N(C)C30=CC=CC=C30C(=O)N(C)C31=CC=CC=C31C(=O)N(C)C32=CC=CC=C32C(=O)N(C)C33=CC=CC=C33C(=O)N(C)C34=CC=CC=C34C(=O)N(C)C35=CC=CC=C35C(=O)N(C)C36=CC=CC=C36C(=O)N(C)C37=CC=CC=C37C(=O)N(C)C38=CC=CC=C38C(=O)N(C)C39=CC=CC=C39C(=O)N(C)C40=CC=CC=C40C(=O)N(C)C41=CC=CC=C41C(=O)N(C)C42=CC=CC=C42C(=O)N(C)C43=CC=CC=C43C(=O)N(C)C44=CC=CC=C44C(=O)N(C)C45=CC=CC=C45C(=O)N(C)C46=CC=CC=C46C(=O)N(C)C47=CC=CC=C47C(=O)N(C)C48=CC=CC=C48C(=O)N(C)C49=CC=CC=C49C(=O)N(C)C50=CC=CC=C50C(=O)N(C)C51=CC=CC=C51C(=O)N(C)C52=CC=CC=C52C(=O)N(C)C53=CC=CC=C53C(=O)N(C)C54=CC=CC=C54C(=O)N(C)C55=CC=CC=C55C(=O)N(C)C56=CC=CC=C56C(=O)N(C)C57=CC=CC=C57C(=O)N(C)C58=CC=CC=C58C(=O)N(C)C59=CC=CC=C59C(=O)N(C)C60=CC=CC=C60C(=O)N(C)C61=CC=CC=C61C(=O)N(C)C62=CC=CC=C62C(=O)N(C)C63=CC=CC=C63C(=O)N(C)C64=CC=CC=C64C(=O)N(C)C65=CC=CC=C65C(=O)N(C)C66=CC=CC=C66C(=O)N(C)C67=CC=CC=C67C(=O)N(C)C68=CC=CC=C68C(=O)N(C)C69=CC=CC=C69C(=O)N(C)C70=CC=CC=C70C(=O)N(C)C71=CC=CC=C71C(=O)N(C)C72=CC=CC=C72C(=O)N(C)C73=CC=CC=C73C(=O)N(C)C74=CC=CC=C74C(=O)N(C)C75=CC=CC=C75C(=O)N(C)C76=CC=CC=C76C(=O)N(C)C77=CC=CC=C77C(=O)N(C)C78=CC=CC=C78C(=O)N(C)C79=CC=CC=C79C(=O)N(C)C80=CC=CC=C80C(=O)N(C)C81=CC=CC=C81C(=O)N(C)C82=CC=CC=C82C(=O)N(C)C83=CC=CC=C83C(=O)N(C)C84=CC=CC=C84C(=O)N(C)C85=CC=CC=C85C(=O)N(C)C86=CC=CC=C86C(=O)N(C)C87=CC=CC=C87C(=O)N(C)C88=CC=CC=C88C(=O)N(C)C89=CC=CC=C89C(=O)N(C)C90=CC=CC=C90C(=O)N(C)C91=CC=CC=C91C(=O)N(C)C92=CC=CC=C92C(=O)N(C)C93=CC=CC=C93C(=O)N(C)C94=CC=CC=C94C(=O)N(C)C95=CC=CC=C95C(=O)N(C)C96=CC=CC=C96C(=O)N(C)C97=CC=CC=C97C(=O)N(C)C98=CC=CC=C98C(=O)N(C)C99=CC=CC=C99C(=O)N(C)C100=CC=CC=C100C(=O)N(C)C101=CC=CC=C101C(=O)N(C)C102=CC=CC=C102C(=O)N(C)C103=CC=CC=C103C(=O)N(C)C104=CC=CC=C104C(=O)N(C)C105=CC=CC=C105C(=O)N(C)C106=CC=CC=C106C(=O)N(C)C107=CC=CC=C107C(=O)N(C)C108=CC=CC=C108C(=O)N(C)C109=CC=CC=C109C(=O)N(C)C110=CC=CC=C110C(=O)N(C)C111=CC=CC=C111C(=O)N(C)C112=CC=CC=C112C(=O)N(C)C113=CC=CC=C113C(=O)N(C)C114=CC=CC=C114C(=O)N(C)C115=CC=CC=C115C(=O)N(C)C116=CC=CC=C116C(=O)N(C)C117=CC=CC=C117C(=O)N(C)C118=CC=CC=C118C(=O)N(C)C119=CC=CC=C119C(=O)N(C)C120=CC=CC=C120C(=O)N(C)C121=CC=CC=C121C(=O)N(C)C122=CC=CC=C122C(=O)N(C)C123=CC=CC=C123C(=O)N(C)C124=CC=CC=C124C(=O)N(C)C125=CC=CC=C125C(=O)N(C)C126=CC=CC=C126C(=O)N(C)C127=CC=CC=C127C(=O)N(C)C128=CC=CC=C128C(=O)N(C)C129=CC=CC=C129C(=O)N(C)C130=CC=CC=C130C(=O)N(C)C131=CC=CC=C131C(=O)N(C)C132=CC=CC=C132C(=O)N(C)C133=CC=CC=C133C(=O)N(C)C134=CC=CC=C134C(=O)N(C)C135=CC=CC=C135C(=O)N(C)C136=CC=CC=C136C(=O)N(C)C137=CC=CC=C137C(=O)N(C)C138=CC=CC=C138C(=O)N(C)C139=CC=CC=C139C(=O)N(C)C140=CC=CC=C140C(=O)N(C)C141=CC=CC=C141C(=O)N(C)C142=CC=CC=C142C(=O)N(C)C143=CC=CC=C143C(=O)N(C)C144=CC=CC=C144C(=O)N(C)C145=CC=CC=C145C(=O)N(C)C146=CC=CC=C146C(=O)N(C)C147=CC=CC=C147C(=O)N(C)C148=CC=CC=C148C(=O)N(C)C149=CC=CC=C149C(=O)N(C)C150=CC=CC=C150C(=O)N(C)C151=CC=CC=C151C(=O)N(C)C152=CC=CC=C152C(=O)N(C)C153=CC=CC=C153C(=O)N(C)C154=CC=CC=C154C(=O)N(C)C155=CC=CC=C155C(=O)N(C)C156=CC=CC=C156C(=O)N(C)C157=CC=CC=C157C(=O)N(C)C158=CC=CC=C158C(=O)N(C)C159=CC=CC=C159C(=O)N(C)C160=CC=CC=C160C(=O)N(C)C161=CC=CC=C161C(=O)N(C)C162=CC=CC=C162C(=O)N(C)C163=CC=CC=C163C(=O)N(C)C164=CC=CC=C164C(=O)N(C)C165=CC=CC=C165C(=O)N(C)C166=CC=CC=C166C(=O)N(C)C167=CC=CC=C167C(=O)N(C)C168=CC=CC=C168C(=O)N(C)C169=CC=CC=C169C(=O)N(C)C170=CC=CC=C170C(=O)N(C)C171=CC=CC=C171C(=O)N(C)C172=CC=CC=C172C(=O)N(C)C173=CC=CC=C173C(=O)N(C)C174=CC=CC=C174C(=O)N(C)C175=CC=CC=C175C(=O)N(C)C176=CC=CC=C176C(=O)N(C)C177=CC=CC=C177C(=O)N(C)C178=CC=CC=C178C(=O)N(C)C179=CC=CC=C179C(=O)N(C)C180=CC=CC=C180C(=O)N(C)C181=CC=CC=C181C(=O)N(C)C182=CC=CC=C182C(=O)N(C)C183=CC=CC=C183C(=O)N(C)C184=CC=CC=C184C(=O)N(C)C185=CC=CC=C185C(=O)N(C)C186=CC=CC=C186C(=O)N(C)C187=CC=CC=C187C(=O)N(C)C188=CC=CC=C188C(=O)N(C)C189=CC=CC=C189C(=O)N(C)C190=CC=CC=C190C(=O)N(C)C191=CC=CC=C191C(=O)N(C)C192=CC=CC=C192C(=O)N(C)C193=CC=CC=C193C(=O)N(C)C194=CC=CC=C194C(=O)N(C)C195=CC=CC=C195C(=O)N(C)C196=CC=CC=C196C(=O)N(C)C197=CC=CC=C197C(=O)N(C)C198=CC=CC=C198C(=O)N(C)C199=CC=CC=C199C(=O)N(C)C200=CC=CC=C200C(=O)N(C)C201=CC=CC=C201C(=O)N(C)C202=CC=CC=C202C(=O)N(C)C203=CC=CC=C203C(=O)N(C)C204=CC=CC=C204C(=O)N(C)C205=CC=CC=C205C(=O)N(C)C206=CC=CC=C206C(=O)N(C)C207=CC=CC=C207C(=O)N(C)C208=CC=CC=C208C(=O)N(C)C209=CC=CC=C209C(=O)N(C)C210=CC=CC=C210C(=O)N(C)C211=CC=CC=C211C(=O)N(C)C212=CC=CC=C212C(=O)N(C)C213=CC=CC=C213C(=O)N(C)C214=CC=CC=C214C(=O)N(C)C215=CC=CC=C215C(=O)N(C)C216=CC=CC=C216C(=O)N(C)C217=CC=CC=C217C(=O)N(C)C218=CC=CC=C218C(=O)N(C)C219=CC=CC=C219C(=O)N(C)C220=CC=CC=C220C(=O)N(C)C221=CC=CC=C221C(=O)N(C)C222=CC=CC=C222C(=O)N(C)C223=CC=CC=C223C(=O)N(C)C224=CC=CC=C224C(=O)N(C)C225=CC=CC=C225C(=O)N(C)C226=CC=CC=C226C(=O)N(C)C227=CC=CC=C227C(=O)N(C)C228=CC=CC=C228C(=O)N(C)C229=CC=CC=C229C(=O)N(C)C230=CC=CC=C230C(=O)N(C)C231=CC=CC=C231C(=O)N(C)C232=CC=CC=C232C(=O)N(C)C233=CC=CC=C233C(=O)N(C)C234=CC=CC=C234C(=O)N(C)C235=CC=CC=C235C(=O)N(C)C236=CC=CC=C236C(=O)N(C)C237=CC=CC=C237C(=O)N(C)C238=CC=CC=C238C(=O)N(C)C239=CC=CC=C239C(=O)N(C)C240=CC=CC=C240C(=O)N(C)C241=CC=CC=C241C(=O)N(C)C242=CC=CC=C242C(=O)N(C)C243=CC=CC=C243C(=O)N(C)C244=CC=CC=C244C(=O)N(C)C245=CC=CC=C245C(=O)N(C)C246=CC=CC=C246C(=O)N(C)C247=CC=CC=C247C(=O)N(C)C248=CC=CC=C248C(=O)N(C)C249=CC=CC=C249C(=O)N(C)C250=CC=CC=C250C(=O)N(C)C251=CC=CC=C251C(=O)N(C)C252=CC=CC=C252C(=O)N(C)C253=CC=CC=C253C(=O)N(C)C254=CC=CC=C254C(=O)N(C)C255=CC=CC=C255C(=O)N(C)C256=CC=CC=C256C(=O)N(C)C257=CC=CC=C257C(=O)N(C)C258=CC=CC=C258C(=O)N(C)C259=CC=CC=C259C(=O)N(C)C260=CC=CC=C260C(=O)N(C)C261=CC=CC=C261C(=O)N(C)C262=CC=CC=C262C(=O)N(C)C263=CC=CC=C263C(=O)N(C)C264=CC=CC=C264C(=O)N(C)C265=CC=CC=C265C(=O)N(C)C266=CC=CC=C266C(=O)N(C)C267=CC=CC=C267C(=O)N(C)C268=CC=CC=C268C(=O)N(C)C269=CC=CC=C269C(=O)N(C)C270=CC=CC=C270C(=O)N(C)C271=CC=CC=C271C(=O)N(C)C272=CC=CC=C272C(=O)N(C)C273=CC=CC=C273C(=O)N(C)C274=CC=CC=C274C(=O)N(C)C275=CC=CC=C275C(=O)N(C)C276=CC=CC=C276C(=O)N(C)C277=CC=CC=C277C(=O)N(C)C278=CC=CC=C278C(=O)N(C)C279=CC=CC=C279C(=O)N(C)C280=CC=CC=C280C(=O)N(C)C281=CC=CC=C281C(=O)N(C)C282=CC=CC=C282C(=O)N(C)C283=CC=CC=C283C(=O)N(C)C284=CC=CC=C284C(=O)N(C)C285=CC=CC=C285C(=O)N(C)C286=CC=CC=C286C(=O)N(C)C287=CC=CC=C287C(=O)N(C)C288=CC=CC=C288C(=O)N(C)C289=CC=CC=C289C(=O)N(C)C290=CC=CC=C290C(=O)N(C)C291=CC=CC=C291C(=O)N(C)C292=CC=CC=C292C(=O)N(C)C293=CC=CC=C293C(=O)N(C)C294=CC=CC=C294C(=O)N(C)C295=CC=CC=C295C(=O)N(C)C296=CC=CC=C296C(=O)N(C)C297=CC=CC=C297C(=O)N(C)C298=CC=CC=C298C(=O)N(C)C299=CC=CC=C299C(=O)N(C)C300=CC=CC=C300C(=O)N(C)C301=CC=CC=C301C(=O)N(C)C302=CC=CC=C302C(=O)N(C)C303=CC=CC=C303C(=O)N(C)C304=CC=CC=C304C(=O)N(C)C305=CC=CC=C305C(=O)N(C)C306=CC=CC=C306C(=O)N(C)C307=CC=CC=C307C(=O)N(C)C308=CC=CC=C308C(=O)N(C)C309=CC=CC=C309C(=O)N(C)C310=CC=CC=C310C(=O)N(C)C311=CC=CC=C311C(=O)N(C)C312=CC=CC=C312C(=O)N(C)C313=CC=CC=C313C(=O)N(C)C314=CC=CC=C314C(=O)N(C)C315=CC=CC=C315C(=O)N(C)C316=CC=CC=C316C(=O)N(C)C317=CC=CC=C317C(=O)N(C)C318=CC=CC=C318C(=O)N(C)C319=CC=CC=C319C(=O)N(C)C320=CC=CC=C320C(=O)N(C)C321=CC=CC=C321C(=O)N(C)C322=CC=CC=C322C(=O)N(C)C323=CC=CC=C323C(=O)N(C)C324=CC=CC=C324C(=O)N(C)C325=CC=CC=C325C(=O)N(C)C326=CC=CC=C326C(=O)N(C)C327=CC=CC=C327C(=O)N(C)C328=CC=CC=C328C(=O)N(C)C329=CC=CC=C329C(=O)N(C)C330=CC=CC=C330C(=O)N(C)C331=CC=CC=C331C(=O)N(C)C332=CC=CC=C332C(=O)N(C)C333=CC=CC=C333C(=O)N(C)C334=CC=CC=C334C(=O)N(C)C335=CC=CC=C335C(=O)N(C)C336=CC=CC=C336C(=O)N(C)C337=CC=CC=C337C(=O)N(C)C338=CC=CC=C338C(=O)N(C)C339=CC=CC=C339C(=O)N(C)C340=CC=CC=C340C(=O)N(C)C341=CC=CC=C341C(=O)N(C)C342=CC=CC=C342C(=O)N(C)C343=CC=CC=C343C(=O)N(C)C344=CC=CC=C344C(=O)N(C)C345=CC=CC=C345C(=O)N(C)C346=CC=CC=C346C(=O)N(C)C347=CC=CC=C347C(=O)N(C)C348=CC=CC=C348C(=O)N(C)C349=CC=CC=C349C(=O)N(C)C350=CC=CC=C350C(=O)N(C)C351=CC=CC=C351C(=O)N(C)C352=CC=CC=C352C(=O)N(C)C353=CC=CC=C353C(=O)N(C)C354=CC=CC=C354C(=O)N(C)C355=CC=CC=C355C(=O)N(C)C356=CC=CC=C356C(=O)N(C)C357=CC=CC=C357C(=O)N(C)C358=CC=CC=C358C(=O)N(C)C359=CC=CC=C359C(=O)N(C)C360=CC=CC=C360C(=O)N(C)C361=CC=CC=C361C(=O)N(C)C362=CC=CC=C362C(=O)N(C)C363=CC=CC=C363C(=O)N(C)C364=CC=CC=C364C(=O)N(C)C365=CC=CC=C365C(=O)N(C)C366=CC=CC=C366C(=O)N(C)C367=CC=CC=C367C(=O)N(C)C368=CC=CC=C368C(=O)N(C)C369=CC=CC=C369C(=O)N(C)C370=CC=CC=C370C(=O)N(C)C371=CC=CC=C371C(=O)N(C)C372=CC=CC=C372C(=O)N(C)C373=CC=CC=C373C(=O)N(C)C374=CC=CC=C374C(=O)N(C)C375=CC=CC=C375C(=O)N(C)C376=CC=CC=C376C(=O)N(C)C377=CC=CC=C377C(=O)N(C)C378=CC=CC=C378C(=O)N(C)C379=CC=CC=C379C(=O)N(C)C380=CC=CC=C380C(=O)N(C)C381=CC=CC=C381C(=O)N(C)C382=CC=CC=C382C(=O)N(C)C383=CC=CC=C383C(=O)N(C)C384=CC=CC=C384C(=O)N(C)C385=CC=CC=C385C(=O)N(C)C386=CC=CC=C386C(=O)N(C)C387=CC=CC=C387C(=O)N(C)C388=CC=CC=C388C(=O)N(C)C389=CC=CC=C389C(=O)N(C)C390=CC=CC=C390C(=O)N(C)C391=CC=CC=C391C(=O)N(C)C392=CC=CC=C392C(=O)N(C)C393=CC=CC=C393C(=O)N(C)C394=CC=CC=C394C(=O)N(C)C395=CC=CC=C395C(=O)N(C)C396=CC=CC=C396C(=O)N(C)C397=CC=CC=C397C(=O)N(C)C398=CC=CC=C398C(=O)N(C)C399=CC=CC=C399C(=O)N(C)C400=CC=CC=C400C(=O)N(C)C401=CC=CC=C401C(=O)N(C)C402=CC=CC=C402C(=O)N(C)C403=CC=CC=C403C(=O)N(C)C404=CC=CC=C404C(=O)N(C)C405=CC=CC=C405C(=O)N(C)C406=CC=CC=C406C(=O)N(C)C407=CC=CC=C407C(=O)N(C)C408=CC=CC=C408C(=O)N(C)C409=CC=CC=C409C(=O)N(C)C410=CC=CC=C410C(=O)N(C)C411=CC=CC=C411C(=O)N(C)C412=CC=CC=C412C(=O)N(C)C413=CC=CC=C413C(=O)N(C)C414=CC=CC=C414C(=O)N(C)C415=CC=CC=C415C(=O)N(C)C416=CC=CC=C416C(=O)N(C)C417=CC=CC=C417C(=O)N(C)C418=CC=CC=C418C(=O)N(C)C419=CC=CC=C419C(=O)N(C)C420=CC=CC=C420C(=O)N(C)C421=CC=CC=C421C(=O)N(C)C422=CC=CC=C422C(=O)N(C)C423=CC=CC=C423C(=O)N(C)C424=CC=CC=C424C(=O)N(C)C425=CC=CC=C425C(=O)N(C)C426=CC=CC=C426C(=O)N(C)C427=CC=CC=C427C(=O)N(C)C428=CC=CC=C428C(=O)N(C)C429=CC=CC=C429C(=O)N(C)C430=CC=CC=C430C(=O)N(C)C431=CC=CC=C431C(=O)N(C)C432=CC=CC=C432C(=O)N(C)C433=CC=CC=C433C(=O)N(C)C434=CC=CC=C434C(=O)N(C)C435=CC=CC=C435C(=O)N(C)C436=CC=CC=C436C(=O)N(C)C437=CC=CC=C437C(=O)N(C)C438=CC=CC=C438C(=O)N(C)C439=CC=CC=C439C(=O)N(C)C440=CC=CC=C440C(=O)N(C)C441=CC=CC=C441C(=O)N(C)C442=CC=CC=C442C(=O)N(C)C443=CC=CC=C443C(=O)N(C)C444=CC=CC=C444C(=O)N(C)C445=CC=CC=C445C(=O)N(C)C446=CC=CC=C446C(=O)N(C)C447=CC=CC=C447C(=O)N(C)C448=CC=CC=C448C(=O)N(C)C449=CC=CC=C449C(=O)N(C)C450=CC=CC=C450C(=O)N(C)C451=CC=CC=C451C(=O)N(C)C452=CC=CC=C452C(=O)N(C)C453=CC=CC=C453C(=O)N(C)C454=CC=CC=C454C(=O)N(C)C455=CC=CC=C455C(=O)N(C)C456=CC=CC=C456C(=O)N(C)C457=CC=CC=C457C(=O)N(C)C458=CC=CC=C458C(=O)N(C)C459=CC=CC=C459C(=O)N(C)C460=CC=CC=C460C(=O)N(C)C461=CC=CC=C461C(=O)N(C)C462=CC=CC=C462C(=O)N(C)C463=CC=CC=C463C(=O)N(C)C464=CC=CC=C464C(=O)N(C)C465=CC=CC=C465C(=O)N(C)C466=CC=CC=C466C(=O)N(C)C467=CC=CC=C467C(=O)N(C)C468=CC=CC=C468C(=O)N(C)C469=CC=CC=C469C(=O)N(C)C470=CC=CC=C470C(=O)N(C)C471=CC=CC=C471C(=O)N(C)C472=CC=CC=C472C(=O)N(C)C473=CC=CC=C473C(=O)N(C)C474=CC=CC=C474C(=O)N(C)C475=CC=CC=C475C(=O)N(C)C476=CC=CC=C476C(=O)N(C)C477=CC=CC=C477C(=O)N(C)C478=CC=CC=C478C(=O)N(C)C479=CC=CC=C479C(=O)N(C)C480=CC=CC=C480C(=O)N(C)C481=CC=CC=C481C(=O)N(C)C482=CC=CC=C482C(=O)N(C)C483=CC=CC=C483C(=O)N(C)C484=CC=CC=C484C(=O)N(C)C485=CC=CC=C485C(=O)N(C)C486=CC=CC=C486C(=O)N(C)C487=CC=CC=C487C(=O)N(C)C488=CC=CC=C488C(=O)N(C)C489=CC=CC=C489C(=O)N(C)C490=CC=CC=C490C(=O)N(C)C491=CC=CC=C491C(=O)N(C)C492=CC=CC=C492C(=O)N(C)C493=CC=CC=C493C(=O)N(C)C494=CC=CC=C494C(=O)N(C)C495=CC=CC=C495C(=O)N(C)C496=CC=CC=C496C(=O)N(C)C497=CC=CC=C497C(=O)N(C)C498=CC=CC=C498C(=O)N(C)C499=CC=CC=C499C(=O)N(C)C500=CC=CC=C500C(=O)N(C)C501=CC=CC=C501C(=O)N(C)C502=CC=CC=C502C(=O)N(C)C503=CC=CC=C503C(=O)N(C)C504=CC=CC=C504C(=O)N(C)C505=CC=CC=C505C(=O)N(C)C506=CC=CC=C506C(=O)N(C)C507=CC=CC=C507C(=O)N(C)C508=CC=CC=C508C(=O)N(C)C509=CC=CC=C509C(=O)N(C)C510=CC=CC=C510C(=O)N(C)C511=CC=CC=C511C(=O)N(C)C512=CC=CC=C512C(=O)N(C)C513=CC=CC=C513C(=O)N(C)C514=CC=CC=C514C(=O)N(C)C515=CC=CC=C515C(=O)N(C)C516=CC=CC=C516C(=O)N(C)C517=CC=CC=C517C(=O)N(C)C518=CC=CC=C518C(=O)N(C)C519=CC=CC=C519C(=O)N(C)C520=CC=CC=C520C(=O)N(C)C521=CC=CC=C521C(=O)N(C)C522=CC=CC=C522C(=O)N(C)C523=CC=CC=C523C(=O)N(C)C524=CC=CC=C524C(=O)N(C)C525=CC=CC=C525C(=O)N(C)C526=CC=CC=C526C(=O)N(C)C527=CC=CC=C527C(=O)N(C)C528=CC=CC=C528C(=O)N(C)C529=CC=CC=C529C(=O)N(C)C530=CC=CC=C530C(=O)N(C)C531=CC=CC=C531C(=O)N(C)C532=CC=CC=C532C(=O)N(C)C533=CC=CC=C533C(=O)N(C)C534=CC=CC=C534C(=O)N(C)C535=CC=CC=C535C(=O)N(C)C536=CC=CC=C536C(=O)N(C)C537=CC=CC=C537C(=O)N(C)C538=CC=CC=C538C(=O)N(C)C539=CC=CC=C539C(=O)N(C)C540=CC=CC=C540C(=O)N(C)C541=CC=CC=C541C(=O)N(C)C542=CC=CC=C542C(=O)N(C)C543=CC=CC=C543C(=O)N(C)C544=CC=CC=C544C(=O)N(C)C545=CC=CC=C545C(=O)N(C)C546=CC=CC=C546C(=O)N(C)C547=CC=CC=C547C(=O)N(C)C548=CC=CC=C548C(=O)N(C)C549=CC=CC=C549C(=O)N(C)C550=CC=CC=C550C(=O)N(C)C551=CC=CC=C551C(=O)N(C)C552=CC=CC=C552C(=O)N(C)C553=CC=CC=C553C(=O)N(C)C554=CC=CC=C554C(=O)N(C)C555=CC=CC=C555C(=O)N(C)C556=CC=CC=C556C(=O)N(C)C557=CC=CC=C557C(=O)N(C)C558=CC=CC=C558C(=O)N(C)C559=CC=CC=C559C(=O)N(C)C560=CC=CC=C560C(=O)N(C)C561=CC=CC=C561C(=O)N(C)C562=CC=CC=C562C(=O)N(C)C563=CC=CC=C563C(=O)N(C)C564=CC=CC=C564C(=O)N(C)C565=CC=CC=C565C(=O)N(C)C566=CC=CC=C566C(=O)N(C)C567=CC=CC=C567C(=O)N(C)C568=CC=CC=C56</chem>					

- 제1상반응에서 carboxylic acid을 가진 4번 대사체의 smiles를 이용하여 제2상반응의 결과를 아래의 <표>에서처럼 확인하였음. 특징은 제1상반응 후 -OH에 포합이 이루어지는 것이 보편적인데 -NH에 **glucuronidation**이 이루어짐. 또한 glucuronidation이 아닌 glycin의 아미노산 포합 반응이 이루어진 것이 약물의 친수성대사체 전환으로 빠르게 배출될 것으로 추정됨.

- CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O

Result ID	Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotope Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
1		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C26H30N8O11	630.2034	Glucuronidation of primary aromatic amine	Enzyme: UDP-glucuronosyltransferase BioSystem: HUMAN	
2		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C26H30N8O11	630.2034	Glucuronidation of primary aromatic amine	Enzyme: UDP-glucuronosyltransferase BioSystem: HUMAN	
3		<chem>CN(C(C1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)O)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O</chem>	C22H25N9O6	511.1927	Glycine conjugation	Enzyme: Glycine N Acyltransferase BioSystem: HUMAN	

<참고논문>

- Bunchorntavakul, C., & Reddy, K.R. (2013). Acetaminophen-related hepatotoxicity. Clinics in liver disease, 17 4, 587-607, viii .
- 2023년: 박영철 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7

60. AITOX의 사업 안내

1) 필요성 및 방법

- 오믹스 기술(omics technology) 및 AI-기반 기계학습(Machine Learning, ML) 모델을 활용하여 새로운 합성신약의 활성. 이는 신약 개발의 비용과 시간 측면에서 크게 단축하는 계기가 됨.
- 이에 첨단기술을 이용한 신약개발 활성은 임상에서 신약의 안전성에 대한 정확성 및 효용성을 기반한 예측에 대한 필요성이 크게 증가함.
- 결과적으로 기계학습을 이용하여 AI-기반 독성예측도 증가하였지만 in vitro-in vivo-임상 등의 연결된 platform 구축없이 독성예측이 이루어지고 있는 것도 사실임
- 특히, 영국의 통계학자인 George Box가 1975년 그의 논문에서 'All models are wrong, but some are useful' 문장은 오늘날 AI-분야에도 작용되고 있음.
- 근래 AI-기반 ADMET(absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity) 예측 프로그램을 검증 결과, 가격과는 상관없이 장단점이 존재함. 궁극적으로 원하는 것을 얻기 위한 완결성은 다양한 프로그램을 통해 비교 검토 및 선택이라는 것을 확인하여 George Box의 유명한 문구에 다음을 추가함.
- **'All models are wrong, but some are useful' And more useful when combined.**
- 또 하나 우려스러운 것은 다양한 연구의 결과가 대량으로 생산되는 오늘날 AI-기반 model이 얼마나 최신이고 질적으로 좋은 자료에 대한 것임.
- 따라서 **최소한 10개 이상의 다양한 AI-기반 model**로부터 combined data 및 big data를 통한 최신 자료의 반영으로 AITOX는 비임상 및 임상연구에서 독성 예측 및 컨설팅 목적

2) 약물의 AI-기반 예측 컨설팅 사업

① Reactive metabolite 생성 여부에 대한 AI-기반 예측: Small molecule-기반 다양한 약물 모달리티 적용 시 반드시 약물의 친전자성(electrophilic) 유무를 확인의 필요성

② AI-기반 ADMET와 **다양한 독성시험 및 인체 독성에 대한 예측**

- Rat Acute LD₅₀
- NOAEL prediction
- AMES Mutagenicity
- Reproductive and developmental toxicity
- Carcinogenicity
- Cytochrome P450 substrate and inhibition
- Drug-Induced Liver Inhibition
- Metabolic Stability
- Human Liver Microsomal metabolism and Stability
- T_{1/2} Human
- T_{1/2} Mouse
- T_{1/2} Rat
- Anticommensal Effect on Human Gut Microbiota
- Human Intestinal Absorption
- Human Plasma Protein Binding

- Drug affinity to human serum albumin
 - Oral Bioavailability
 - Blood–brain-barrier penetration
 - Drug-induced Ototoxicity
 - Neural toxicity
 - Respiratory Toxicity
 - Myelotoxicity: in vitro 유전독성 양성일 경우 소핵시험 음성에 대한 정당성 입증
 - hERG Cardiotoxicity
 - hERG Liability
 - Haemolytic Toxicity & 50% hemolytic dose
 - Urinary Toxicity
 - Mitochondrial Toxicity
 - Toxic Myopathy
 - Hepatic Steatosis
 - Phototoxicity human
 - Phototoxicity in vitro
 - Cytotoxicity HepG2 cell line
 - Cytotoxicity NIH 3T3 cell line
 - Cytotoxicity HEK 293 cell line
 - Cytotoxicity CRL-7250 cell line
 - Cytotoxicity HaCat cell line
 - Breast Cancer Resistance Protein Inhibition
 - Drug-Induced Cholestasis
 - Human multidrug and toxin extrusion Inhibition
 - Human Bile Salt Export Pump Inhibition
 - Phospholipidosis
 - Organic anion transporting polypeptide 1B1 binding
 - Organic anion transporting polypeptide 1B3 binding
 - Organic anion transporting polypeptide 2B1 binding
 - P-glycoprotein substrate and Inhibition
 - Organic Cation Transporter 2 Inhibition
 - pKa dissociation constant
 - logD Distribution coefficient (pH 7.4)
 - logS
 - MDCK(Madin-Darby canine kidney) permeability
 - Skin penetration
 - DMSO Solubility
 - Aqueous Solubility (in phosphate saline buffer)
- ③ AI-기반 구체적 대사체 예측 내용
- PHase I & II biotransformation에 의한 대사체 예측
 - Gut에서 human과 microbial transformation에 의한 대사체 예측
 - Environmen-Gut-Liver 등의 다단계 biotransformation에 의한 대사체 예측
 - 효소 촉매반응 결과에 따른 Enzyme Commission-based biotransformation에 의한 대사체 확인

3) Drug-like modality 평가

- 최신 자료를 통해 drug modality별 약물 가능성에 대한 평가

61. 비임상독성시험과 AI-기반의 독성예측에서의 조화와 완결성

1. 비임상독성시험의 내용과 특성

1) 비임상독성시험과 MRSD

- 의약품등의 안전성.유효성 심사에 관한 규정에 따라 다음과 같이 **in vitro** 및 **in vivo** 독성시험이 수행되됨.
- 의약품등의 안전성.유효성 심사에 관한 규정예의 독성에 관한 자료
 - 가. 단회투여독성시험자료
 - 나. 반복투여독성시험자료
 - 다. 유전독성시험자료
 - 라. 생식발생독성시험자료
 - 마. 발암성시험자료
 - 바. 기타독성시험자료
 - (1) 국소독성
 - (2) 의존성
 - (3) 항원성 및 면역독성

2) MRSD(maximum recommended starting dose, MRSD)

- 유전독성시험 및 생식발달독성스크리닝시험에 이상이 없으면 반복투여독성시험에서 MRSD 설정을 통해 임상1상시험에 진입. 이때 MRSD 산출을 위해 이용되는 지표가 반복투여독성시험에서 추정된 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독상용량)임.
- <표 11-3>은 소분자 합성의약품과 바이오의약품에 대한 인체 최초투여용량(first-in-human, FIH) 또는 임상최대권장초기용량(maximum recommended starting dose, MRSD)의 결정 방법을 나타낸 것임.
- 모달리티별 MRSD 추정에 있어서 독성용량기술치(toxic dose descriptor)와 안전계수(safe factor) 측면에서 차이가 있음. 예를 들어 소분자 합성의약품의 경우에 동물의 체중-기반 용량을 인체의 체표면적(body surface area, BSA)-기반 용량으로 전환되어 인체등가용량(human equivalent dose, HED) 추정됨.
- 반면에 바이오의약품은 경우에 용량의 중간 전환이 없고 동물용량과 인체용량의 동일 적용으로 안전용량이 산출됨. 소분자 합성의약품과 바이오의약품의 임상 안전용량 산출에 차이가 있을 뿐만 아니라 바이오의약품 중 성장호르몬, 사이토카인, 단클론항체, 면역강화제 등은 다른 바이오의약품과도 차이가 있음.

<표 11-3> 약물 모달리티별 임상시험에서 안전용량 추정 방법

항목	소분자 합성의약품	바이오효약품	성장호르몬, 사이토카인, 단클론항체, 면역강화제 등의 바이오효약품
독성용량기술치	NOAEL	NOAEL	MABEL
용량반응곡선의 특징	효능 및 독성의 곡선이 분리	효능 및 독성의 곡선이 분리	효능과 반응의 동일한 곡선
종내 차이에 대한 안전계수 (safety factor)	10	10	궁극적으로 전신혈관계 내에 존재하거나 전신혈관계로 이동하지 않는 다면 '1'
종간 차이에 대한 안전계수 (safety factor)	HED = NOAEL x 전환계수	AED(동물등가용량) = HED	SF = RO ratio = 사람 RO/동물 RO
MRSD(임상임상 최대권장초기용량)	MRSD = HED/10	MRSD = AED/10	MRSD = MABEL/(RO ratio)

NOAEL: no observed adverse effect level, 최대비독성용량, HED: human equivalent dose, 인체등가용량, MABEL: minimum anticipated biological effect level, 최소기대생물학적영향용량, AED: animal equivalent dose, 동물등가용량, RO; receptor occupancy, 수용체점유율

2. AI-기반 독성예측 모델의 특성과 흐름

1) Machine learning-기반 독성예측 모델과 문제점

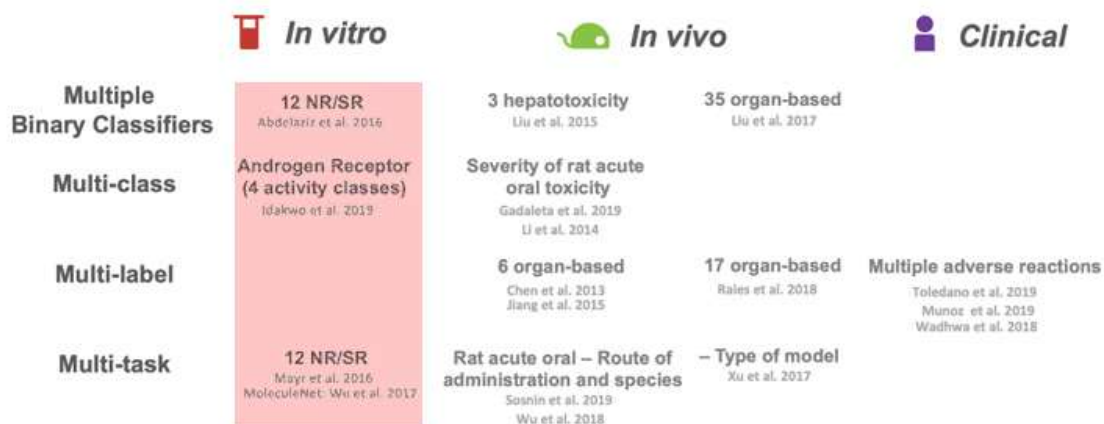
- 일반적으로 AI-기반 독성예측은 아래의 <그림>에서처럼 구조학적 특징과 in vitro, in vivo와 clinical test의 각 platform으로부터 확인된 단일한 생물학적 toxicity(adverse effect) endpoint의 기계학습(machine learning, ML)통해 독성예측하는 모델. 이와 같이 단일 플랫폼이 구분되어 ML을 통해 독성학적 특징을 예측하는 것을 single-task(단일과제) model이라고 함.
- 예를 들어 특정 물리화학적 특성이 단일한 독성시험 platform에서 단일한 독성의 endpoint, 즉 간독성 또는 유전독성 그 외 생물학적 으로 부정적 영향을 확인하는 독성예측하는 모델(Sharma 등, 2023)

Chemical Biological HTS	Adverse Events													
	In vitro AE						In vivo AE						Clinical AE	
													Failed/Approved	Side Effects
	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Mayr et al., 2016														
Abdelaziz et al., 2016														
Altac-Tran et al., 2017														
Fernandez et al., 2018														
Uesawa and Matsuzaka, 2019														
Jimenez-Carrtero et al., 2018														
TOPKAT, DEREK, ONCOLOGIC, MCAST														
Klopman et al., 2004														
Chen et al., 2013														
Sedykh et al., 2011														
Low et al., 2011														
Thomas et al., 2012														
Liu et al., 2012														
Liu et al., 2013														
Pu et al., 2019														
Bulat et al., 2018														
Gayvert et al., 2016														
Lysenko et al., 2018														
Munoz et al., 2017														
Liu et al., 2012														

<그림> 기계학습(machine learning)을 통해 single-task model

- 예를 들어 <아래의 <그림>에서의 Tox21 dataset의 경우에 세포에서 거의 10000 여개의 화학물질에 대해 특정 endpoint인 핵수용체와 5개 stress response를 12종류의 in vitro assay로 얻은 자료임. 그러나 대부분의 비임상 in vivo 독성시험은 이와 같은 특정 핵수용체와 전혀 관련 없는 toxic endpoint를 확인하여 in vitro와 in vivo 사이에 독성예측을 위한 일치성이 없음. 결국 이러한 점은 in vitro 및 in vitro 독성시험의 궁극적인 목적인 임상 임상에서의 독성예측을 감소시키는 결과를 가져온 ML 모델이었음.

- 실제로 <그림>에서처럼 각각의 시험 platform에는 화학물질별 다수의 toxic endpoint와 다수의 class 그리고 다표적기관 수준에서의 자료들이 생산됨. 이와 같이 다수의 platform에서 다수의 endpoint 및 다수의 조직 수준에서 독성이 예측이 가능한 multi-task의 문제임.
- 이와 같은 ML에 의한 독성예측 프로그램의 부족함을 극복하고 다수의 변수를 고려한 multi-task model의 독성예측을 위해 빠르게 DL(deep learning, 심화학습) model이 응용됨.



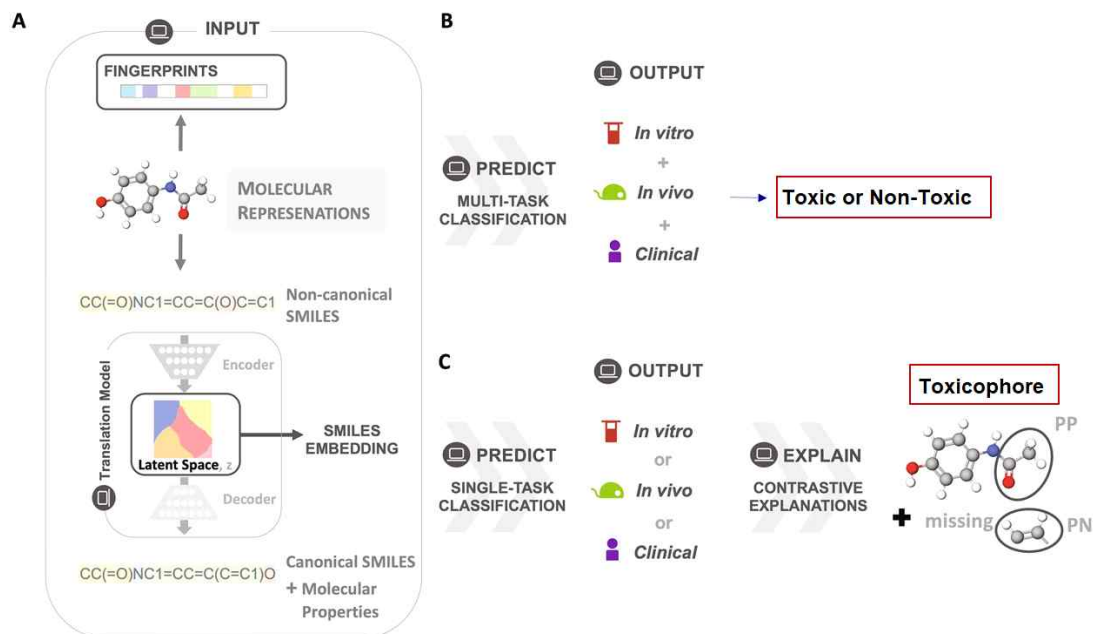
<그림> 각각의 시험 platform에서 다양한 toxic endpoint와 다양한 조직의 multi-task model

2) Deep learning-기반 독성예측 모델과 문제점

- 독성예측의 우수한 수행 능력임에도 불구하고 DL 모델에서 한계점은 'toxic 및 non-toxic'에 대한 결정과 이와 같은 결정에 대한 설득력이 있는 설명이 요구되고 있음.
- 이와 같은 독성의 결정은 양성과 음성 그리고 NOAEL이라는 toxic endpoint를 기반으로 대한 명확한 질적 및 양적 지표를 제시하는 비임상독성시험의 가이드라인을 넘을 수 없는 한계를 가지고 있음.
- 즉, 물질의 물리화학구조적 특징을 기반으로 하는 AI 모델이 독성의 구조적 특징을 기반한 'toxic 및 non-toxic'을 결정하는 것은 비임상독성시험의 결과를 넘어 **drug repositioning**까지 가능한 다목적 활용성을 증명하게 됨.
- 오늘날 DL-기반 독성예측 모델은 독성의 판정 그리고 독성의 원인에 대한 설명을 위한 방향으로 진행되고 있음

3) Single task와 multi task 독성예측을 위한 DL-model의 예시

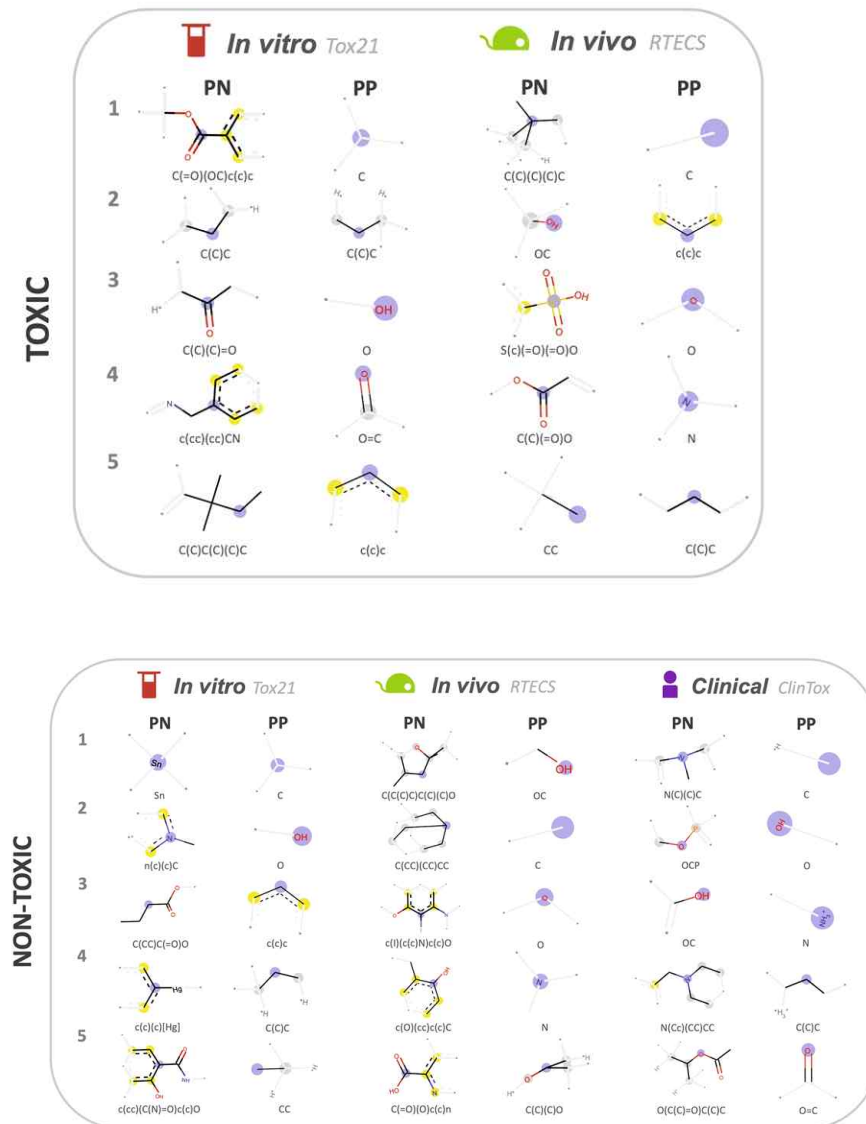
- 화학물질의 대표표현 방법인 small molecule 신약의 fingerprint와 Smiles 확보. 신약후보의 알려지지 않은 noncanonical smiles를 canical smiles로 전환하기 위해 in vitro,in vivo 그리고 clinical 시험의 dataset에서 확보된 smailes embedding 함수와 신경망-기반 전이 모델(neural network-based translation model)을 통한 deep learning 후 새로운 smailes와 각각의 platform에서의 다양한 toxic endpoint 확보.
- <그림>에서처럼 3개 시험 platform에서 확보된 다양한 생체 수준에서 다양한 toxic endpoint를 이용한 multi task model을 통해 'Toxic or Non-toxic' 결정. 그리고 각 플랫폼에서 결정된 독성 및 비독성으로 작용하는 화학구조 즉, toxicophore 결정을 통해 독성의 결정과 독성의 원인에 대한 대조비교를 통해 구조적 설명(Sharma 등, 2023).



<그림> Single task 및 multi task를 통한 독성의 결정과 원인을 확인하는 Deep learning model: PP(pertinent positive, 유의한 양성), PN(pertinent negative, 유의한 음성)
(독성 Dataset: In vitro의 Tox21, in vivo의 RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances) dataset. Clinic test의 ClinTox dataset)

4) Single task와 multi task를 통한 Deep learning model의 결과

- 모델을 통해 독성(toxic)과 비독성(nontoxic)에 대한 170000개 substructure의 PP(pertinent positive, 유의한 양성)와 PN(pertinent negative, 유의한 음성)을 확인하였으며 아래의 <그림>은 각 platform에 따른 toxic 및 nontoxic 10개의 PP와 PN substructure를 나타낸 것임



<그림> Deep learning model를 통한 시험의 platform별 toxic 및 nontoxic substructure

3. 결론

- 대부분의 합성의약품의 약리작용은 target-ligand의 결합을 기본으로 하는데 만약 in vitro 자료를 비임상독성시험의 자료를 아용하였다면 독성 및 비독성의 substructure 확인을 통해 독성 및 그 기전을 설명하는데 쉽지 않았을 것임.
- 따라서 비임상독성시험의 결과와 독성의 결정과 원인을 설명하는 deep-learning AI-기반 독성예측은 독성과 기전을 이해하고 임상시험에서 안전성을 확인하는 완결성 확보 방안 이라고 할 수 있음.

<참고논문>

- Sharma B, Chenthamarakshan V, Dhurandhar A, Pereira S, Hendler JA, Dordick JS, Das P. Accurate clinical toxicity prediction using multi-task deep neural nets and contrastive molecular explanations. Sci Rep. 2023 Mar 25;13(1):4908.
- 2023년: 박영철 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7

62. AITOX의 AI-기반 비임상독성시험 결과 및 독성예측의 최초 예시

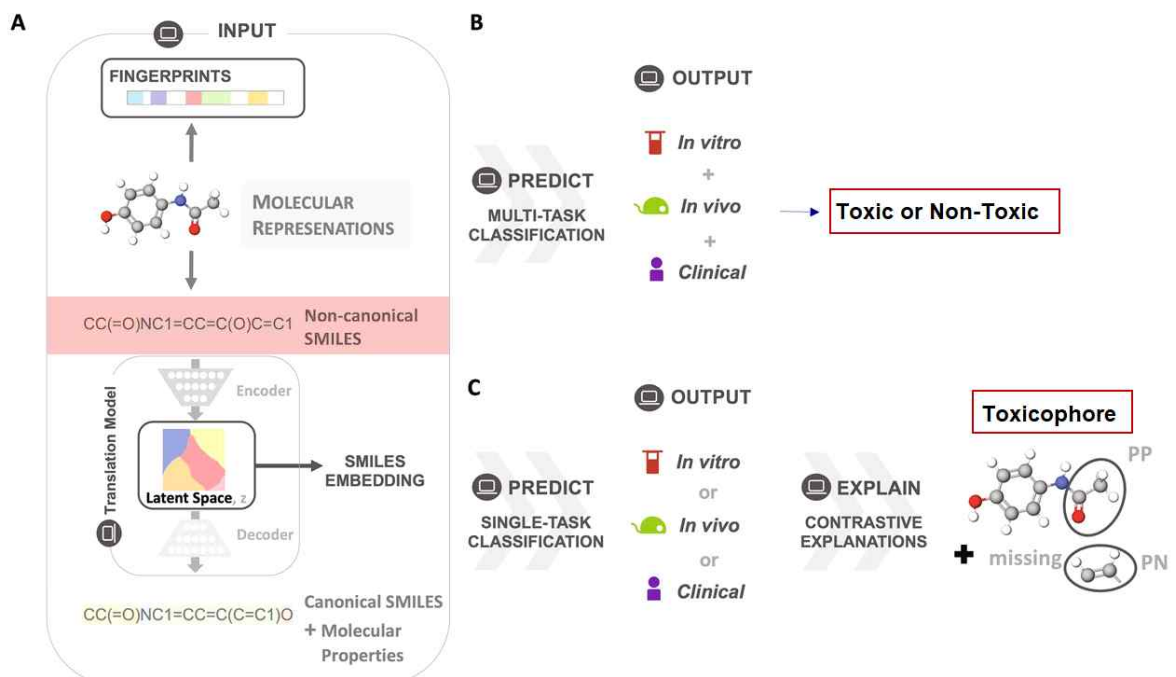
1. 수행의 목적

- 일반적으로 독성의 원인으로 신약개발의 실패는 약 30% 정도로 확인됨. 개발자의 입장에서 AI-기반 독성예측 방법이 Matching learning vs Deep learning model 그리고 single task model vs multitask model 등에는 관심이 없음. In house test 통해 유효성이 확인된 신약 후보물질이 단지 비임상시험 및 임상시험 전에 신약으로 개발하고자하는 독성학적 특성을 알고 적어도 독성의 문제로 개발의 실패를 줄이고자 하는 것임.

2. 수행의 방법

- AITOX는 CAS-NO로 확인이 불가능한 **non-canonical smiles**와 AI-기반 독성예측을 다양한 Tool를 사용하여 수행.
- Toxic endpoint는 신약의 인허가 독성시험과 및 약리-기전과 관련된 것이며 이를 기반으로 최소한 독성에 기인하여 신약 개발의 실패를 줄이도록 고객의 올바른 판정을 위한 AI-기반 자료 제공
- 시험물질: 아래의 논문에서 제시된 Non-canonical smiles인 **CC(C=O)NC1=CC=C(O)C=C1**

<논문> Sharma B, Chenthamarakshan V, Dhurandhar A, Pereira S, Hendler JA, Dordick JS, Das P. Accurate clinical toxicity prediction using multi-task deep neural nets and contrastive molecular explanations. Sci Rep. 2023 Mar 25;13(1):4908.



- QSAR Toolbox: CC(C=O)NC1=CC=C(O)C=C1 검색: 아래와 같이 분류와 독성예측이 불가능 확인

QSAR Toolbox 4.7.1 [Document 1]

QSAR TOOLBOX

Input Profiling Data Category definition Data Gap Filling Report

Profiling Custom profile

Apply View New Delete

Documents

Document 1

[C: 1;Md: 0;P: 0] Search chemical (do not)

Profiling methods

Options 8 Selected

f	Select All	Unselect All	Invert
☐	Aquatic toxicity classification by ECOSAR		
☐	Bioaccumulation - metabolism alerts		
☐	Bioaccumulation - metabolism half-lives		
☐	Biodegradation fragments (BioWIN MI)		
☐	Carcinogenicity (genotox and nongenotox)		
☐	DART scheme		
☒	DNA alerts for AMES, CA and MNT by...		
☐	Eye irritation/corrosion Exclusion rules		
☐	Eye irritation/corrosion Inclusion rules		
☐	in vitro mutagenicity (Ames test) alert		
☐	in vivo mutagenicity (Micronucleus) alert		

Metabolism/Transformations

Options 2 Selected

f	Select All	Unselect All	Invert
☒	Documented		
☒	Observed Mammalian metabolism		
☐	Observed Microbial metabolism		
☐	Observed Rat In vivo metabolism		
☐	Observed rat liver metabolism with qu...		
☐	Observed Rat Liver S9 metabolism		
☒	Simulated		
☒	Autoxidation simulator		
☐	Autoxidation simulator (alkaline medium)		
☐	Dissociation simulator		
☐	Hydrolysis simulator (acidic)		

Filter endpoint tree...

1 [target]

Structure

OECD HPV Chemical Categories Not categorized

Substance type Discrete chemical

US-EPA New Chemical Categories Aldehydes (Acute toxic...

Endpoint Specific

Acute Oral Toxicity Not categorized

DNA alerts for AMES, CA and MNT by... No alert found

Toxicological

Repeated dose (HESS) Acetaminophen (Hepa...

Metabolism/Transformation

Autoxidation simulator 7 metabolite(s)

Predefined

Database Affiliation 7 x Does not belong t...

Inventory Affiliation 7 x Does not belong t...

OECD HPV Chemical Categories 7 x Not categorized

Substance type 7 x Discrete chemical

US-EPA New Chemical Categories 2 x Aldehydes (Acute t...

Endpoint Specific

Acute Oral Toxicity 3 x Benzo(naphtho-)-q...

DNA alerts for AMES, CA and... 3 x AN2

Toxicological

Repeated dose (HESS) 1 x Acetaminophen (H...

Observed Mammalian metabolism

Predefined

Database Affiliation No metabolites

Inventory Affiliation No metabolites

OECD HPV Chemical Categories No metabolites

Substance type No metabolites

US-EPA New Chemical Categories No metabolites

Endpoint Specific

Acute Oral Toxicity No metabolites

DNA alerts for AMES, CA and... No metabolites

Toxicological

Repeated dose (HESS) No metabolites

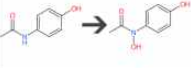
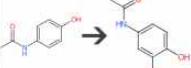
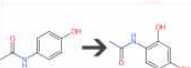
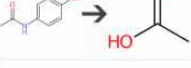
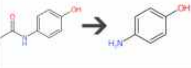
3. AI-기반 ADME 예측(CC(C=O)NC1=CC=C(O)C=C1)

- ADME = absorption, distribution, metabolism, excretion

Endpoint	Value	비고
Physicochemical Property	• Formula	C ₈ H ₉ NO ₂
	• MW	151.16 g/mol
	• No of heavy atom	11
	• No of arom. heavy atom	6
	• Fraction Csp	0.11
	• No of rotatable bonds	2
	• No of H-bond acceptor	2
	• No of H-bond donors	2
	• Molar refractivity	42.78
	• Topological surface area polar	49.33 Å ²
Absorption	• 물용해도(water solubility)	<ul style="list-style-type: none"> LogS = -1.34에서 -2.19으로 매우 수용성 약물의 수용성(water solubility)을 나타내는 지표로, 수치가 작을수록 물에 대한 용해도가 낮음을 의미. logS > -4: 수용성이 충분히 높아 경구용 제제로 적합. logS < -4: 용해도가 낮아 흡수 및 생체 이용률이 제한될 수 있음.
	• 친지질성(lipophilicity)	<ul style="list-style-type: none"> Log Po/w = -0.49에서 1.21로 평균 0.93 LogP = 1은 Organic : Aqueous = 10:1을 의미
	• 소장투과율	• 높음
	• Permeability-glycoprotein (Pgp)의 기질	<ul style="list-style-type: none"> 기질이 아님 Permeability-glycoprotein (Pgp)는 약물흡수 저해단백질로 약물 내성 유발, 기질일 경우 약물의 흡수력이 낮아져 효능이 낮음
	• Skin permeation	<ul style="list-style-type: none"> 투과계수(Permeability coefficient) = Log Kp = Log -6.98 cm/s 투과계수가 마이너스쪽일 경우 피부통과가 더욱 어려움을 의미
	• Pgp substrate	<ul style="list-style-type: none"> 아님 Permeability-glycoprotein (Pgp)는 약물흡수 저해단백질로 약물 내성 유발, 기질이 되면 약물흡수가 저해되어 약물효능이 감소됨
Distribution	• Bioavailability score	<ul style="list-style-type: none"> 55% 생체이용율로 정맥투여에 의한 AUC 대비 경구투여에 의한 AUC의 비율
	• PPB plasma protein binding(혈장단백질)	<ul style="list-style-type: none"> 45.94%으로 다소 높으며 이에 의해 반감기가 다소 김 PPB=plasma protein binding(혈장단백질)로 약물의 조직으로 분포 정도를 확인하는 지표 단백질에 결합하지 않은 free 형태가 되어야 약효를 나타낼 수 있고, 약물 대사의 기질이 됨.
	• Steady State Volume of Distribution	• 정상상태 분포량: 0.00 L/kg
	• BBB(brain-blood barrier)	<ul style="list-style-type: none"> 통과 BBB는 brain blood barrier(뇌-혈관장벽)으로 뇌로의 통과 유무를 결정하는 지표
		<ul style="list-style-type: none"> VD는 volume distribution(분포용적)으로 약물이 혈장이 아닌 신체 조직에 분포하는 정도 신체 조직의 총량/혈장농도 Average fold error 2와 3에 대한 모델의 수행 능력으로 2이하이면 성공적인 예측
Biotransformation	• 다음의 4. 인체에서의 Biotransformation 예측에서 확인	
Excretion	Half-life(T _{1/2})	<ul style="list-style-type: none"> 7.57 hr 경구투여 후 혈액에서 용량이 50% 감소하는 시간
	CL(Clearance)	<ul style="list-style-type: none"> 간세포: 79.97 uL/min/10⁶ cells
		<ul style="list-style-type: none"> Microsome: 7.43 uL/min/mg

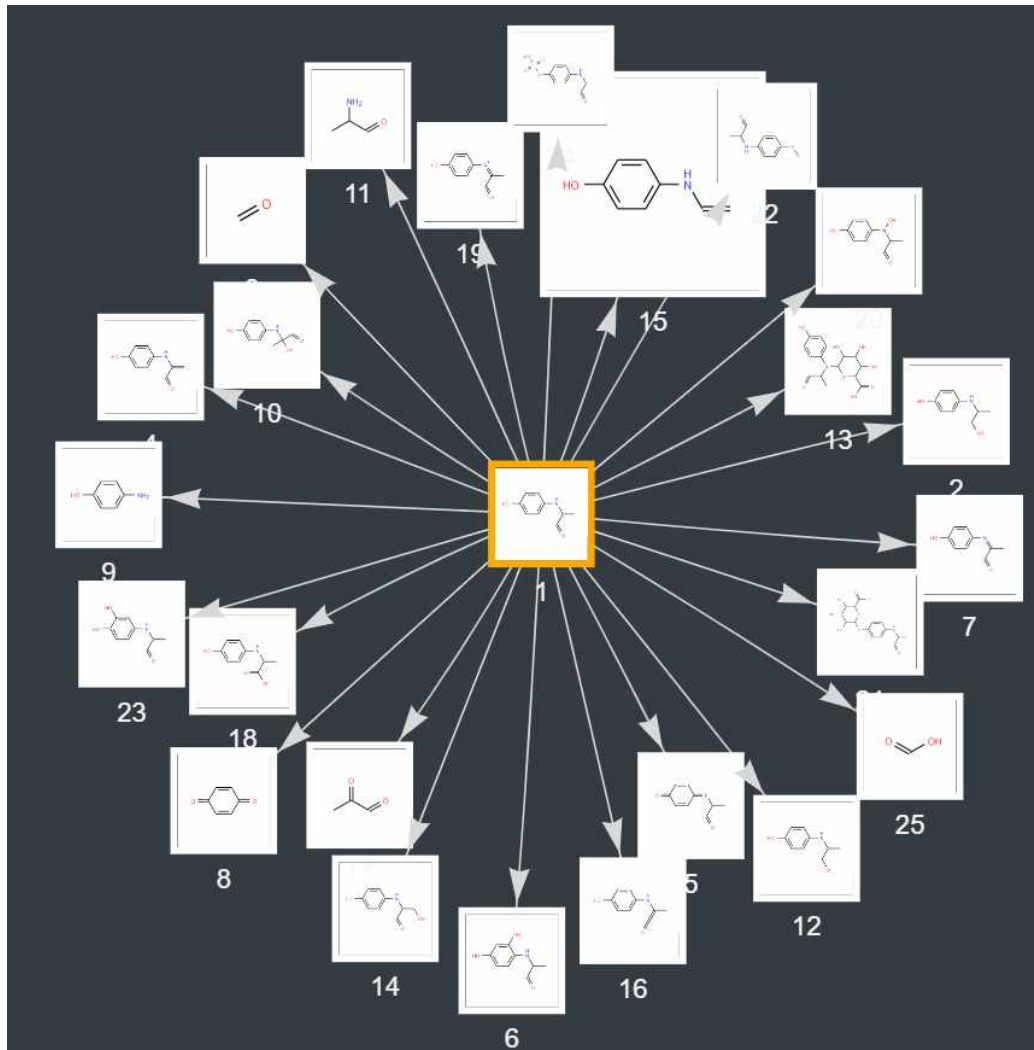
3) 장(gut)에서의 biotransformation

- 장(gut)에서의 제1상반응 biotransformation은 인체 간에서 대사체와 유사하며 제2상반응에서 acid amino 포함반응이 확인되어 독성학적으로 문제가 없는 것으로 추정됨

Result ID	Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotope Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
1		<chem>CC(=O)N(C1=CC=C(O)C=C1)O</chem>	CBH9NO3	167.0582	N-Dealkylation of hydrazine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
2		<chem>CC(=O)NC1=CC=C(O)C(=C1)O</chem>	CBH9NO3	167.0582	EAWAG_RULE_BT0394	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
3		<chem>CC(=O)NC1=CC=C(O)C(=C1)O</chem>	CBH9NO3	167.0582	Hydrolysis of thioether	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
4		<chem>CC(=O)N=C1C=CC(=O)C=C1</chem>	CBH7NO2	149.0476	EAWAG_RULE_BT0397_PAT TERN1	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
5		<chem>C1C(=O)NC1=CC=C(O)C=C1</chem>	CBH9NO3	167.0582	alpha-Hydroxylation of arylidimethylamine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 BioSystem: HUMAN	
6		<chem>CC(=O)NC12C(C=C(O)C=C1)O2</chem>	CBH9NO3	167.05824	epimerization of enol to keto	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 BioSystem: HUMAN	
7		<chem>CC(=O)O</chem>	C2H4O2	60.02112	EAWAG_RULE_BT0028	Enzyme: Unspecified microbial bile acid amino acid N-acetyltransferase BioSystem: ENVMICRO	
8		<chem>NC1=CC=C(O)C=C1</chem>	CBH7NO	109.0527	EAWAG_RULE_BT0028	Enzyme: Unspecified microbial bile acid amino acid N-acetyltransferase BioSystem: ENVMICRO	
9		<chem>CC(=O)NC1=CC=C(OC2OC(C(O)C(O)C2O)C(O)C1</chem>	C14H17NO8	327.0954	Decarboxylation of aromatic L-amino acid	Enzyme: UDP-glucuronosyltransferase BioSystem: HUMAN	

4) Epoxidation 및 Glutathione 포함반응에 대한 재확인

- AI-based 대사체 확인 모델을 통해 독성대사체의 잠재성을 epoxidation과 glutathione 포함반응을 재확인 결과, 없는 것으로 추정됨.



5. 비임상독성시험 및 in house Toxicity 예측(CC(C=O)NC1=CC=C(O)C=C1)

1) LD₅₀

- 개체군의 50%를 치사시키는 용량은 경구인 경우: 338mg/kg
- 다른 예측모델

Rat IP LD50 Log10(mmol/kg)	Rat IV LD50 log10(mmol/kg)	Rat Oral LD50 log10(mmol/kg)	Rat SC LD50 log10(mmol/kg)
0,478 in AD	-0,451 in AD	0,979 in AD	0,639 in AD

2) 반복투여독성시험 경구투여 NOAEL

- NOAEL - 84.922 mg/kg/day

3) 임상최대권장투여용량

- Maximum Recommended Therapeutic Dose: 4.939 mg/kg/day

4) 인허가와 관련된 독성시험 예측

- 유전독성시험에서 프로그램별 차이가 있어 복귀돌연변이시험 결과를 확인

독성시험 항목	Prediction	Probability	Confidence
Genotoxicity	양성	0.998	High
	음성	0.90	High
Carcinogenicity	양성	0.558	Low
Immunotoxicity	음성	0.99	High
Reprductive & developmental toxicity	음성	0.70	High
Clinical toxicity	음성	0.58	Low

- 유전독성의 복귀돌연변이 예측: 이러한 결과를 통해 유전독성은 음성이 가능성이 높음

Strain	Negative Probability	Confidence
TA97	99.9%	High
TA97 (+S9)	99.9%	High
TA98	95.7%	High
TA98 (+S9)	59.4%	High
TA100	100%	High
TA100 (+S9)	98.5%	High
TA102	96.8%	High
TA102 (+S9)	99.7%	Low
TA104	98.2%	High
TA104 (+S9)	94.4%	Low
TA1535	100%	High
TA1535 (+S9)	98.2%	Low
TA1537	100%	High

TA1537 (+S9)	100%	High
TA1538	100%	High
TA1538 (+S9)	99.5%	High

4) 세포독성 예측: 대부분 비독성으로 확인됨

세포종류	비독성 확률	신뢰도
• A549	100%	High
• BJeLR	100%	High
• Ba/F3	95.4%	High
• H1299	98.9%	High
• H69AR	97.9%	Low
• HEK293	61.6%	Low
• HEPG2	85.3%	Hugh
• HMLE sh Ecad	99.3%	Low
• HPDE-C7	97.7%	High
• HT1080	100%	High
• HUVEC	98.9%	High
• IEC-6	99.3%	High
• Jurkat	99.3%	High
• KKLEB	99.9%	High
• LL47	99.8%	High
• Immune cell cytotoxicity	83.7%	Low
• SK-BR-3	100%	High

5) 표적기관독성 예측

- 고용량인 경우 신경독성이 다소 우려됨

Target organ toxicity	Prediction	Probability	AOP(adverse outcome pathway)
Hepatotoxicity	양성	0.74	
Neurotoxicity	양성	0.80	Acetylcholinesterase와 상호작용에 기인하는 것으로 추정되었음
Nephrotoxicity	양성	0.57	
Respiratory toxicity	양성	0.52	
Cardiotoxicity	음성	0.89	hERG Blocking 가능성 낮음

6) 독성학적으로 잠재적 효소에 대한 Ki와 IC50

Quantitative prediction of antitarget interaction profiles for chemical compounds

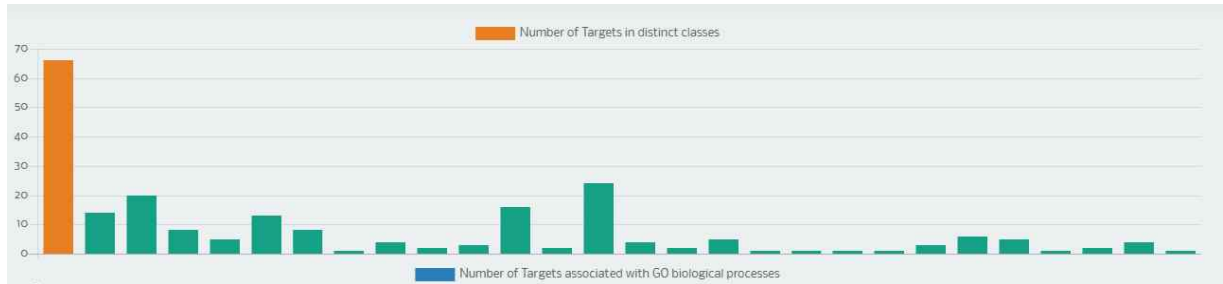
Activity	Prediction Value, - Log10(Value), Mole	Applicability Domain
5-hydroxytryptamine 1B receptor antagonist IC50	7,038	Out of AD
5-hydroxytryptamine 1B receptor antagonist Ki	6,526	In AD
5-hydroxytryptamine 2A receptor antagonist IC50	7,653	Out of AD
5-hydroxytryptamine 2A receptor antagonist Ki	4,780	Out of AD
5-hydroxytryptamine 2C receptor antagonist IC50	7,520	In AD
5-hydroxytryptamine 2C receptor antagonist Ki	5,780	Out of AD
alpha1a adrenergic receptor antagonist IC50	5,224	Out of AD
alpha1a adrenergic receptor antagonist Ki	4,871	Out of AD
alpha1b adrenergic receptor antagonist Ki	5,827	Out of AD
Alpha-2A adrenergic receptor antagonist IC50	5,545	In AD
Alpha-2A adrenergic receptor antagonist Ki	5,933	In AD
amine oxidase [flavin-containing] A inhibitor IC50	6,411	In AD
amine oxidase [flavin-containing] A inhibitor Ki	6,000	In AD
androgen receptor antagonist IC50	6,596	In AD
carbonic anhydrase I activator Kact	6,990	In AD
carbonic anhydrase I inhibitor Ki	6,401	In AD
Carbonic anhydrase 2 activator Kact	5,641	In AD
carbonic anhydrase II inhibitor Ki	7,360	In AD
D(1A) dopamine receptor antagonist IC50	4,565	In AD
D(1A) dopamine receptor antagonist Ki	6,903	In AD
D3 dopamine receptor antagonist Ki	7,082	Out of AD
delta-type opioid receptor antagonist Ki	5,689	Out of AD
estrogen receptor antagonist IC50	5,167	In AD
estrogen receptor antagonist Ki	6,461	In AD
kappa-type opioid receptor antagonist Ki	6,572	Out of AD
mu-type opioid receptor antagonist IC50	5,608	Out of AD
mu-type opioid receptor antagonist Ki	7,215	Out of AD
sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1 antagonist IC50	4,083	In AD
sodium-dependent dopamine transporter antagonist IC50	5,489	Out of AD
sodium-dependent dopamine transporter antagonist Ki	5,866	Out of AD
sodium-dependent serotonin transporter antagonist IC50	5,829	Out of AD
sodium-dependent serotonin transporter antagonist Ki	5,856	Out of AD

7) 시험물질과 에탄올과의 약물상호작용



6. 약리작용에 대한 예측

- List of proteins predicted as **possible direct targets**: ChEMBL ID 4897인 Serine/threonine-protein kinase PLK3dl 가장 높은 확률인 0.6182



7. Non-canonical smiles인 CC(C=O)NC1=CC=C(O)C=C1에 대한 결론 요약

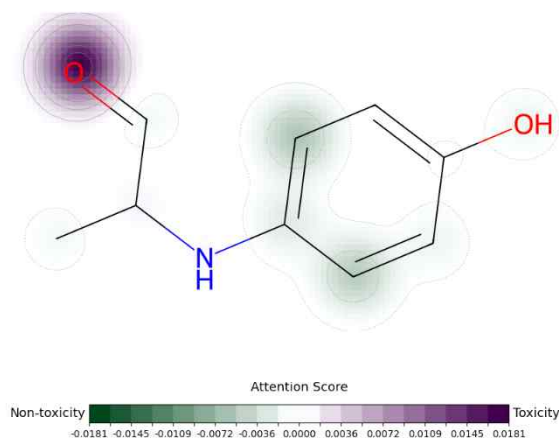
- 1) 유전독성 및 생식발생독성에서 음성으로 확인
- 2) 안전성약리시험에서 심장독성이 없는 것으로 추정
- 3) 반복투여독성시험 경구투여 NOAEL

- NOAEL - 84.922 mg/kg/day

4) 임상최대권장투여용량에 대한 AI-기반 추정

- Maximum Recommended Therapeutic Dose: 4.939 mg/kg/day

5) Non-canonical SMILES(CC(=O)NC1=CC=C(O)C=C1)의 **toxicophore**

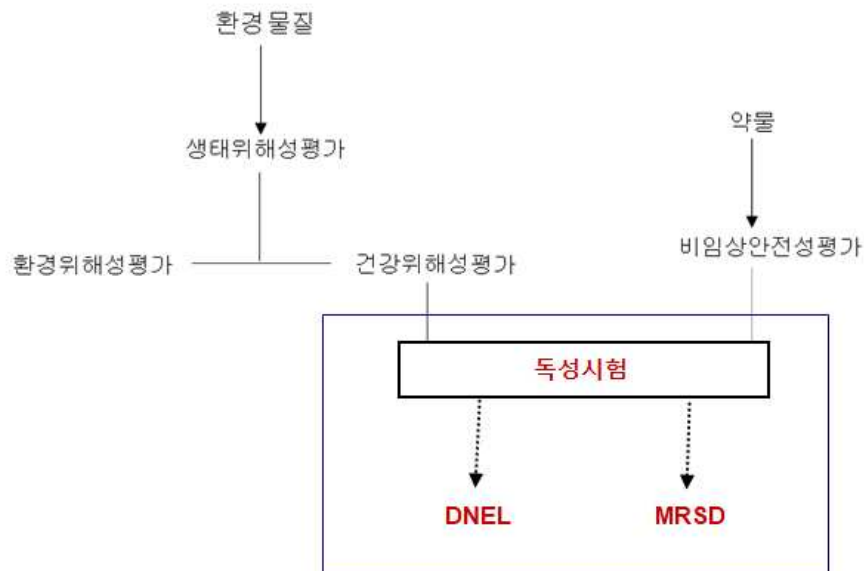


6) 최종결론: 오늘날 AI-기반 독성예측은 단 하나의 프로그램으로 추정이 불가능하고 다양한 프로그램을 통해 독성학적 지식을 기반이 요구됨. 독성학적 지식이 요구되는 이유는 ① 자료에 대한 Coarse vs fine, ② AI-기반 독성예측 프로그램이 약물의 물리화학적 특징으로 독성예측이 이루어지므로 이와 관련된 biotransformation 과정에서 독성대사체 유무를 판단하는 능력이 요구되기 때문. **아마 이와 같은 AI-기반 독성예측 프로그램은 전세계적으로 아직 없을 것으로 추정됨.**

63. IND및 Riskassessment를 위한AI-based 시뮬레이션

1. IND의 MRSD와 Risk assessment의 개념

- **목적:**IND(Investigational new drug, 임상시험 신청)을 위한 MRSD산출과 비의도적 노출 화학물질의 Riskassessment의1일노출안전용량인 DNEL을 AI-based toxicity prediction 프로그램을 통해 추정
- **IND의 MRSD:** 임상최대권장초기용량(maximum recommended safety dose)으로 비임상 독성시험을 통해 임상시험에서 최대로 투여할 수 있는 약물의 투여용량을 의미하며 단위는 mg/kg/day
- **위해성평가의 DNEL:**도출무영향용량(derived-no effect level),평생 동안 사람에게 독성을 유발하지 않고 비의도적노출의 용량수준



2. 인체유해성시험 =비임상독성시험

<표> 가이드라인 독성시험의 종류와 정량-정성적 지표

독성시험		개념	정성 및 정량 기술자
일반 독성 시험	단회투여독성시험	독성시험을 시험동물에 단회투여(24시간 이내의 분할 투여 경우도 포함)하였을 때 단기간 내에 나타나는 독성을 질적,양적으로 평가하는 시험	정량: LD ₅₀ 및 ALD, MTD
	반복투여독성시험	독성물질을 실험동물에 반복투여하여 중,장기간 내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 평가하는 시험	정량: NOEL, NOAEL ,LOAEL, BMDL ₅ , TTC, MTD
생식발생독성시험		독성물질이 포유류의 생식,발생에 미치는 영향을 평가하는 시험을 말하며 수태능 및 초기배 발생시험, 출생 전,후 발생 및 모체기능시험, 배,태자 발생시험 등이 있음	정량: NOEL, NOAEL, LOAEL, BMDL ₅ , TTC, MTD
유전독성시험		독성물질이 유전자 또는 유전자의 담체인 염색체에 미치는 상해작용을 평가하는 시험	정성(음성 vs 양성)
항원성시험		독성물질이 생체의 항원으로 작용하여 나타나는 면역원성 유발 여부를 평가하는 시험	정성(음성 vs 양성)
면역독성시험		반복투여독성시험의 결과, 면역계에 이상이 있는 경우 독성물질의 이상면역반응을 평가하는 시험	정성
발암성시험		독성물질을 실험동물에 장기간 투여하여 암(종양)의 유발 여부를 질적, 양적으로 평가하는 시험	정성 및 정량: T ₂₅ , TD ₅₀ , BMDL ₁₀ , TTC
국소독성시험 (피부자극 및 안점막자극 시험)		독성물질이 피부 또는 점막에 국소적으로 나타내는 자극을 평가하는 시험으로서 피부자극시험 및 안점막자극시험	정성(음성 vs 양성)
국소내성시험 (의존성)		독성물질이 실험동물에서 주사부위에서 나타내는 임상,병리학적 반응을 평가하는 시험	정성
독물동태시험		독성시험 수행 시 독성물질의 전신노출을 평가하기 위하여 약물동태학적 자료를 산출하는 시험으로서 독성물질의 노출과 독성시험에서의 용량단계 및 시간 경과와의 상관성을 연구하는 것을 목적	정량: 생체이용률 T _{max} , C _{max} , AUC, T _{1/2}

3. 추정을 위해 응용된 AI-based toxicity prediction program

- ADMET: Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity
- Physicochemical Property + Pharmacokinetics(약물동태학) + Human & ecosystem Toxicity 등을 AI-based prediction

AI-based toxicity prediction programs and database	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	Interpretable-ADMET
Pro-Tox 3.0 prediction	OptADMET
Swissadme	vNN-ADMET
ADMETlab 3.0	ADMET-score
BioTransformer 3.0	ADMET-PrInt
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred
ADMETSAR 3.0	TOXNET
AI Drug Lab	T3DB
Vega-GUI-1.2.4	ToxRead
ADME/Tox Prediction - Profacgen	ChemoSAR
FP-ADMET	MolToxPred
ADMETlab	ToxMPNN
pkCSM	TCM
Deep-PK	KEGG Drug
pkCSM	
toxCSM	

4. 시험물질: 항암제 Methotrexate의 -OH제거한 analogue

- **Methotrexate**: CN(CC1=CN=C2C(=N1)C(=NC(=N2)N)N)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CC(=O)O)C(=O)O
- **경구RatLD₅₀ = 43 mg/kg**

13.1.12 Toxicity Data



ToxicityData

Man(iv): TD: 740 mg/kg

Archives of Internal Medicine,136,1321(1976)

▶ NCI Investigational Drugs

ToxicityData

Mouse(ip): LD50 mg/kg

Anatomical Record 178,465(1974)

▶ NCI Investigational Drugs

ToxicityData

Rat(po): LD50 135 mg/kg

Drugs in Japan. Ethical Drugs, 6th Ed.,(1982),p841

▶ NCI Investigational Drugs

ToxicityData

Rat(ip): LD50 6 mg/kg

Drugs in Japan. Ethical Drugs, 6th Ed.,(1982),p841

▶ NCI Investigational Drugs

LD50: 43 mg/kg (Oral, Rat) (A308)

A308: Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M: DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D901-6. Epub 2007 Nov 29. PMID:18048412

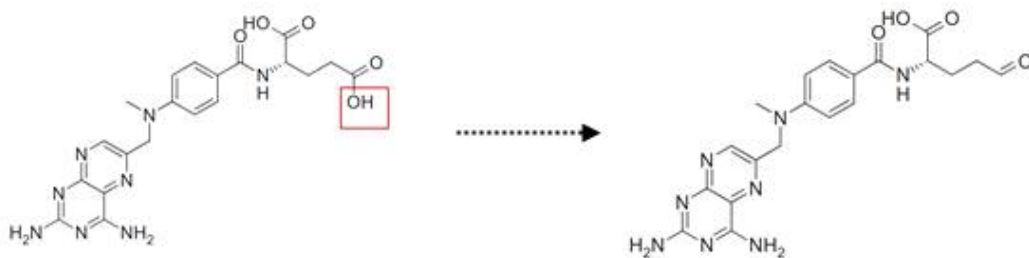
▶ Toxin and Toxin Target Database (T3DB)

- **Hydroxyl 제거한 시험물질**

CN(CC1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)C1=CC=C(C=C1)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O

5. AI-based Acute Oral Test (LD50) prediction

- **해석:** Methotrexate의 경구(Rat)LD₅₀(계체군의 50%치사량)은 43mg/kg으로 추정된 것과 비교하여 시험물질은 LD₅₀은 1.45mg/kg에서 3 mg/kg으로 평균 2.363mg/kg 추정됨. 이와 같이 LD₅₀의 감소는 -OH의 제거에 기인하는 것을 이해됨. -OH는 극성기로 제2상반응의 당 및 아미노산 포합반응에 배출되는 친수성대사체 전환이 가능한 기능기(functional group)



Acute Oral Test (LD50)prediction을 위해 이용된 Software	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	ADMET-AI: 2.24mg/kg
Pro-Tox 3.0 prediction: 3mg/kg	Interpretable-ADMET
Swissadme	OptADMET
ADMETlab 3.0	vNN-ADMET
BioTransformer 3.0	ADMET-score
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred
ADMETSAR 3.0	T3DB
AI Drug Lab: 1.45 mg/kg	ToxRead
Vega-GUI-1.2.4: Prediction is N/A	ChemoSAR
ADME/Tox Prediction - Profacgen	
FP-ADMET	
ADMETlab: 2.762 mg/kg	

6. AI-based LOAEL prediction

- **해석:** 시험물질의 LD₅₀과는 다르게 LOAEL(lowest observed adverse effect level, 최소독성 용량)이 추정 가능한 예측 software는 26개 중 단 하나로 1.8358mg/kg/day으로 추정됨. 독성을 유발하는 LOAEL이 사망을 초래하는 LD₅₀이 평균 2.363mg/kg보다 낮다는 것은 이론적으로 수용이 가능한 용량임. 다만 LD₅₀:LOAEL의 일반적인 ratio가 2-2.5이라는 고려할 때 LD₅₀과 LOAEL의 ratio는 1.28으로 낮다고 할 수 있음. 그러나 LD₅₀의 독성 강도에 따라 분류한 GHS에 따르면 시험물질은 가장 강한 독성분류인 Category 1에 해당됨. 이는 독성의 용양반응곡선이 대단히 steep하기 때문에 시험물질의 LD₅₀과 LOAEL의 ratio인 1.28은 acceptable.

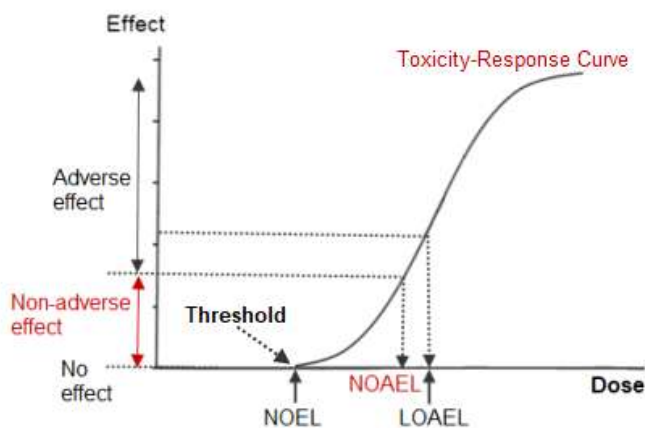
AI-based LOAEL prediction을 위해 응용된 software	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	ADMET-AI:
Pro-Tox 3.0 prediction:	Interpretable-ADMET
Swissadme	OptADMET
ADMETlab 3.0	vNN-ADMET
BioTransformer 3.0	ADMET-score
TOXSTAR	ADMET-PrInt
ADMET-AI	DL-AOT Prediction
OECD QSAR toolbox	ToxRefDB v2.0
ADMET SAR 3.0	eToxPred
AI Drug Lab:	T3DB
Vega-GUI-1.2.4: LOAEL 1.8358mg/kg/day	ToxRead
ADME/Tox Prediction - Profacgen	ChemoSAR
FP-ADMET	
ADMETlab:	

Category	LD ₅₀ range
1	LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg bw
2	50 < LD ₅₀ ≤ 200 mg/kg bw
3	200 < LD ₅₀ ≤ 1000 mg/kg bw
4	1000 < LD ₅₀ ≤ 2000 mg/kg bw

GHS = Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (United Nations, 2015).

6. AI-based LOAEL prediction

- 해석:** 시험물질의 LD₅₀과는 다르게 LOAEL(lowest observed adverse effect level, 최소독성 용량)이 추정 가능한 예측 software가 단 하나 이유는 LOAEL를 유도하는 반복투여독성시험에서 이를 유도하는 용량을 사용하지 않은 경우가 많기 때문임. 특히 우리나라는 독성이 나타나는 것 자체에 대한 의뢰인의 거부감이 심하여 LOAEL을 유도하는 용량을 시험에서 사용하지 않는 경우가 대부분. 이러한 경우에 그 독성시험 자체의 효용성과 오늘날 같이 AI을 위한 data로 사용이 어려움. 따라서 개발 물질의 안전성과 활용성을 넓히기 위해서는 NOAEL(No observed adverse effect level, 최대무독성용량)과 LOAEL을 유도하는 용량이 바람직함.



8. AI-based – Mutagenicity prediction

- **해석:** 2개의 예측 프로그램 중 6개의 program을 이용하여 시험물질의 돌연변이원성을 예측한 결과, ADMETSAR 3.0 프로그램의 Positive 확률인 56.2를 제외하고는 모두 negative로 추정되었음. 프로그램에 따라 양성률과 음성률에서 차이가 있지만 이는 이용한 data의 차이에 기인하는 것으로 추정됨. 물론 각각의 프로그램이 복귀돌연변이, 염색체 이상 시험 그리고 소핵 시험 등의 3가지 모두를 통해 mutagenicity를 결정된 것은 아님.

AI-based - Mutagenicity 예측을 위한 software	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램 Pro-Tox 3.0 prediction: Negative (0.93) Swissadme: ADMETlab 3.0 BioTransformer 3.0 TOXSTAR ADMET-AI: Positive (0.33) OECD QSAR toolbox ADMETSAR 3.0: Positive (0.562) AI Drug Lab: Positive (0.42) Vega-GUI-1.2.4: Non-mutagenic ADME/Tox Prediction - Profacgen FP-ADMET ADMETlab: Positive (0.086)	Interpretable-ADMET OptADMET: Negative vNN-ADMET: No ADMET-score ADMET-PrInt DL-AOT Prediction ToxRefDB v2.0 eToxPred T3DB ToxRead

9. AI-based Carcinogenicity prediction

- 해석: 예측 프로그램 5개에서 시험물질의 발암성이 음성으로 확인되었으며 앞서 돌연변이성 결과에서의 음성과 일치한다는 것을 알 수 있음.

AI-based Carcinogenicity예측을 위한 software	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램 Pro-Tox 3.0 prediction:Inactive (0.52) Swissadme: ADMETlab 3.0 BioTransformer 3.0 TOXSTAR ADMET-AI: 0.19 OECD QSAR toolbox ADMETSAR 3.0: AI Drug Lab: Vega-GUI-1.2.4:Non-carcinogen ADME/Tox Prediction - Profacgen FP-ADMET ADMETlab:	Interpretable-ADMET OptADMET: Negative vNN-ADMET: No ADMET-score ADMET-PrInt DL-AOT Prediction ToxRefDB v2.0 eToxPred T3DB ToxRead

10. AI-based - Reproductive & Developmental toxicity

- 해석: NOAEL, NOAEL 등과같이 예측 프로그램 중 가장 단 하나의 프로그램에서 생식발생독성에서Non-toxicant로 추정됨

AI-based - Reproductive & Developmental toxicity 예측을 위한 프로그램	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	Interpretable-ADMET
Pro-Tox 3.0 prediction:	OptADMET
Swissadme:	vNN-ADMET
ADMETlab 3.0	ADMET-score
BioTransformer 3.0	ADMET-PrInt
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI:	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred
ADMET SAR 3.0:	T3DB
AI Drug Lab:	ToxRead
Vega-GUI-1.2.4: NON-Toxicant	
ADME/Tox Prediction - Profacgen	
FP-ADMET	
ADMETlab:	

11. AI-based target organ- **hERG blocker & Cardiotoxicity**

- 해석: NOAEL, NOAEL 등과같이 예측 프로그램 중 여러 program에서 Negative판정및 inactive 63% 반면에 positive 32.2%에서 54.6%으로 추정되어 시험물질은 심장독성이 없는 것으로 판단됨.

AI-based safety pharmacology- hERG blocker & Cardiotoxicity을 위한 예측 software	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	Interpretable-ADMET
Pro-Tox 3.0 prediction: Inactive(0.63)	OptADMET: Negative
Swissadme	vNN-ADMET
ADMETlab 3.0:	ADMET-score
BioTransformer 3.0	ADMET-Print
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI: 0.39	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred
ADMETSAR 3.0:0.322	TOXNET
AI Drug Lab: 0.482	T3DB
Vega-GUI-1.2.4	ToxRead
ADME/Tox Prediction - Profacgen	ChemoSAR
FP-ADMET	
ADMETlab:Positive(0.546)	

12. AI-based target organ- Respiratory toxicity

- 해석: 3개의 프로그램에서 양성반응

AI-based target organ- Respiratory toxicity	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	Interpretable-ADMET
Pro-Tox 3.0 prediction: Active(0.93)	OptADMET: Positive
Swissadme	vNN-ADMET:
ADMETlab 3.0	ADMET-score
BioTransformer 3.0	ADMET-PrInt
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI:	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred
ADMETSAR 3.0L: 0.986	TOXNET
AI Drug Lab:	T3DB
Vega-GUI-1.2.4	ToxRead
ADME/Tox Prediction - Profacgen	ChemoSAR
FP-ADMET	
ADMETlab:	

13. AI-based target organ- **Neurotoxicity**

- 해석: 1개의 프로그램에서 양성반응

AI-based safety pharmacology- Neurotoxicity 예측software	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	Interpretable-ADMET
Pro-Tox 3.0 prediction: Active(0.84)	OptADMET
Swissadme	vNN-ADMET
ADMETlab 3.0	ADMET-score
BioTransformer 3.0	ADMET-PrInt
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI:	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred
ADMETSAR 3.0	TOXNET
AI Drug Lab:	T3DB
Vega-GUI-1.2.4	ToxRead
ADME/Tox Prediction - Profacgen	ChemoSAR
FP-ADMET	
ADMETlab:	

14. AI-based Target organ - DILI(drug-induced liver injury) & hepatotoxicity

- 해석: 8개의 프로그램에서 양성반응으로 추정됨

AI-based Target organ - DILI & hepatotoxicity 예측을위한 software	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	Interpretable-ADMET
Pro-Tox 3.0 prediction: Active (0.69)	OptADMET: Positive
Swissadme	vNN-ADMET: Yes
ADMETlab 3.0	ADMET-score
BioTransformer 3.0	ADMET-PrInt
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI:Positive(0.97)	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred
ADMETSAR 3.0: 0.88	TOXNET
AI Drug Lab: Positive(0.5505)	T3DB
Vega-GUI-1.2.4:Toxic	ToxRead
ADME/Tox Prediction - Profacgen	ChemoSAR
FP-ADMET	
ADMETlab:Positive(0.93)	

15. AI-based target organ- Immunotoxicity

- 해석: 1개의 프로그램에서 음성반응으로 추정됨

AI-based Target organ - Immunotoxicity	
Pubchem과 Marvin JS 프로그램	Interpretable-ADMET
Pro-Tox 3.0 prediction: Inctive(0.89)	OptADMET
Swissadme	vNN-ADMET
ADMETlab 3.0	ADMET-score
BioTransformer 3.0	ADMET-PrInt
TOXSTAR	DL-AOT Prediction
ADMET-AI:	ToxRefDB v2.0
OECD QSAR toolbox	eToxPred,
ADMETSAR 3.0	TOXNET
AI Drug Lab:	T3DB
Vega-GUI-1.2.4	ToxRead
ADME/Tox Prediction - Profacgen	ChemoSAR
FP-ADMET	
ADMETlab:	

16. MRSD 및 DNEL의산출 가능 근거

- 돌연변이원성과 발암성이 음성으로 확인되어 **NOAEL 이용가능**
- LD₅₀, LOAEL, NOAEL 등의 용량 수준이 Steep dose-response curve에 **fittablelevel**
- 간독성 이외의 표적기관독성은 여러 프로그램에 의한 일치성이 부족함.간독성은 NOAEL에 의해 예방이 가능할 것으로 추정되며 대부분의 항암제과 유사한 독성임.따라서 항암 치료제로 본 시험물질의 개발은 risk-benefit analysis 측면에서 **긍정적인** 측면임

17. MRSD 산출

1) 산출 공식

$$MRSD = \frac{HED}{SF(10)}$$

$$HED = NOAEL \times (\text{Animal Km} / \text{Human Km})$$

$$\text{Rat NOAEL} = 0.3633 \text{ mg/kg/day}$$

$$HED = 0.3633 \text{ mg/kg/day} \times (6/37)$$

$$MRSD = 0.059 \text{ mg/kg/day} (+) 10 = 5.9 \text{ } \mu\text{g/kg/day}$$

<표> 체표면적 기준으로 동물용량을 HED로 전환하는 Km 계수

종(species)	체중 (kg)	체표면적 (m ²)	Km 계수
성인	60	1.6	37
어린이	20	0.8	25
비비원숭이(baboon)	12	0.6	20
개	10	0.5	20
원숭이(monkey)	3	0.24	12
토끼	1.8	0.15	12
기니아 피그	0.4	0.05	8
랫드	0.15	0.025	6
햄스터	0.08	0.02	5
마우스	0.02	0.07	3

18. DNEL 산출

<표> DNEL 산출을 위한 4 Steps

단계	수행 방법	핵심내용
Step 1	POD(예: NOAEL, LOAEL, BMD, BMDL) 선택	- 독성의 중증도 차이에 반영
Step 2	필요시 최초 POD 용량 변경	- 동물과 사람의 노출 경로에 따른 생체이용률 차이 - 다른 노출 경로에 대한 외삽 - 일반인과 근로자의 노출에 따른 민감도 차이 - 동물과 사람의 호흡 특성의 차이
Step 3	불확실성에 대한 AF 적용	- 전신독성과 국소독성 구분 적용
Step 4	최종유해성-특이적 DNEL =	$\frac{NOAEL_{corr}}{AF_1 \times AF_2 \times AF_3 \dots AF_n} = \frac{NOAEL_{corr}}{\text{전체 AF}}$

19. 결론

- AI-based toxicity prediction 프로그램을 통해 IND 및 Riskassessment를 위한 AI-based 시뮬레이션을 MRSD 및 DNEL 추정하였음.
- AI-based toxicity prediction 프로그램은 여기서 이용된 것 외에도 수 많은 유료 및 무료 software이 존재.
- 본작업을 통해 유료이든 무료이든 단 하나의 AI-based toxicity prediction 프로그램으로 MRSD 및 DNEL 등의 추정은 불가능할 것으로 사료됨.
- **다양한 프로그램을 사용을 통해 자료의 독성학적 해석을 기반으로 통해 IND 및 Riskassessment가 가능할 것으로 결론**
- 프로그램 자체의 신뢰도 측정의 확인도 필요하지만 서로 다른 프로그램 비교를 통해 validation 필요성이 있음
- AI-based toxicity prediction 프로그램의 기반이 된 data가 약물 vs 환경물질의 source인가에 대한 사전 확인이 필요함.
- 좋은 AI-기반 독성 예측 프로그램 개발을 위해서는 독성시험을 통해 용량-반응관계의 응용 되도록 독성이 나타나는 용량을 투여의 필요성

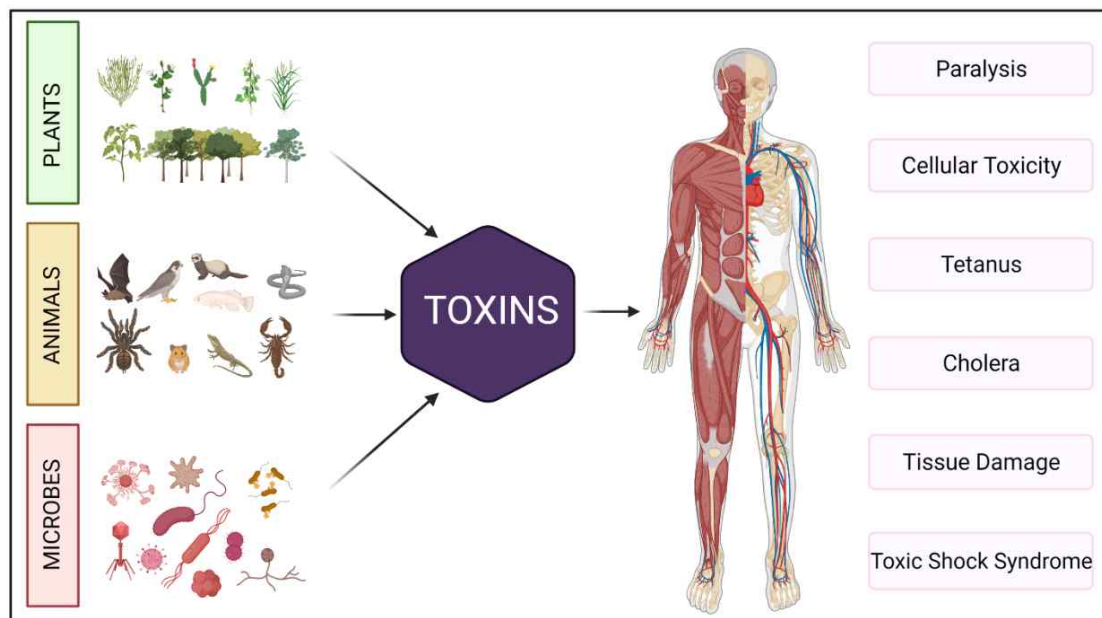
64. AI-based polypeptide & protein toxicity Prediction

1. Toxin의 개념

- 모든 독성물질은 생체내에서 합성되어 생리적 기능을 수행하는 내인성물질과 구별되는 외인성물질로 표현됨
- 독성물질에 대한 흔한 일반적인 용어로 독물(toxicant), 독소(toxin), 독(poison), 독성물질(toxic substance), 독성화학물질(toxic chemical) 등이 있으며 표-3에서처럼 몇 가지로 구별하여 요약할 수 있음.
- 여기서 독성을 예측하는 고분자물질은 **Polypeptide와 단백질(protein)로 구성된 Toxin**임. 이들은 생물체에서 유래하여 급성적으로 **신경독소 또는 면역독성기전**을 통해 인체 독성을 유발함.

2. AI을 이용한 polypeptide & protein독성예측의 알고리즘

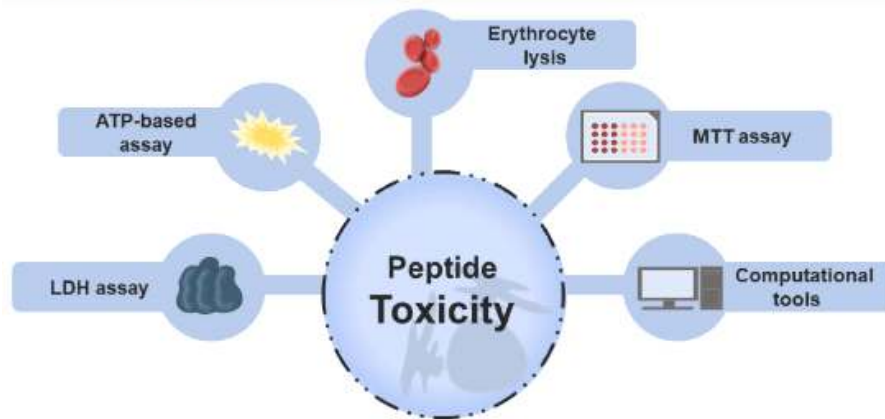
- 지금까지 알려진 인체 독성을 유발하는 Toxin은 <그림>과 같이식물,동물 그리고 미생물 등에서 1만여종이 있으며 독성을 유발하지 polypeptide도 10000여종 존재
- Polypeptide 및 단백질의 4차원 구조 각각에 대한 amino acid sequence 입력, 그리고 Extra tree (ET), deep learning neural network model 등과 같은 machine learning mode임.



3. AI를 이용한 polypeptide & protein 독성예측 프로그램

- Toxteller
- ToxinPredictor
- ToxNet
- NNTox
- MAI-TargetFisher
- ToxIBTL
- ToxinPred
- BloxyBetPrediction

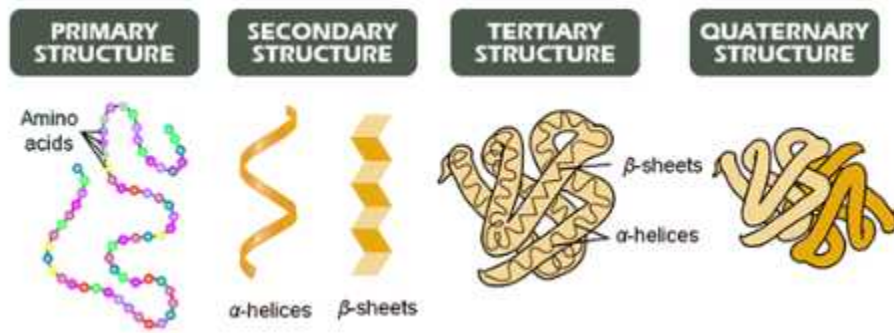
Figure 1. Main approaches employed to evaluate the toxicity of peptides. Traditional screening of non-toxic peptides is performed using different in vitro techniques, including MTT, LDH, erythrocyte lysis, and ATP-based assays. These methods are based on the measurement of intracellular markers released during cell death or lysis, such as hemoglobin (red blood assay), enzymes (LDH assay), or on the analysis of cell viability determined by enzymatic activity, measured, for example, by the MTT assay or by the amount of cell energy (ATP-based assay). Recently, computational models were reported to assist in peptide toxicity prediction.



(Alberto A. Robles-Loaiza 등, 2022)

4. AI를 이용한 polypeptide & protein 독성예측 프로그램

- Polypeptide은 경우에는 아미노산 sequence를 그대로 적용하며 단백질은 4차원구조로 각각의 아미노산 sequence를 확인하여 적용함.



4. AI를 이용한 Polypeptide & protein 독성예측 프로그램에서

- 다음과 같은 무작위로 secondarystructure의아미노산 서열을 설정 후 Toxin prediction 프로그램에 입력

Sequence 1:

SGHTKIKVAVDTCPSDWSNHEGHHCYRVFNEWMNWAD

Sequence 2:

MEALWRKKRVRREAVLKVRARSKGLLDPGGSVLKTFFGTLDSDNG

- Confidence in toxicity prediction: MERCI scores, hybrid scores (combining ML and MERCI), overall predictions (toxic/non-toxic), and PPV: Positive Predictive Value (PPV)

Subject	Sequence	ML Score	MERCI Score (+ve)	MERCI Score (-ve)	Hybrid Score	Prediction	PPV
Seq_1	SGHTKIKVAVDTCP...	0.485	0	-0.5	0.0	Non-Toxin	0.0
Seq_2	MEALWRKKRVRREA...	0.165	0	-0.5	0.0	Non-Toxin	0.0

Reference: Sharma N, Naorem LD, Jain S, Raghava GPS (2022) ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins. Brief Bioinform. doi: 10.1093/bib/bbac174.

6. 결론

- 대부분의 프로그램은 독성 및 비독성의 결과를 제시함
- 아미노산 서열의 어느 부분이 독성 서열과 비독성 서열을 구분하지 못함
- AITOX는 독성학적 이론과 다양한 프로그램의 응용을 통해 독성 서열 부분을 과학적근거로 제시합니다.

65. AI-based toxicity prediction 프로그램의 개발 방향성 - Biotransformation 측면

1. Small molecule와 Polypeptide의 AI-based 독성예측 프로그램에 대한 비교분석

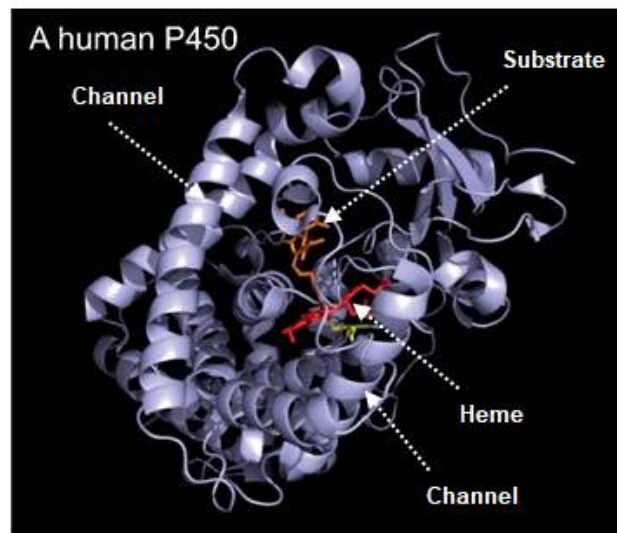
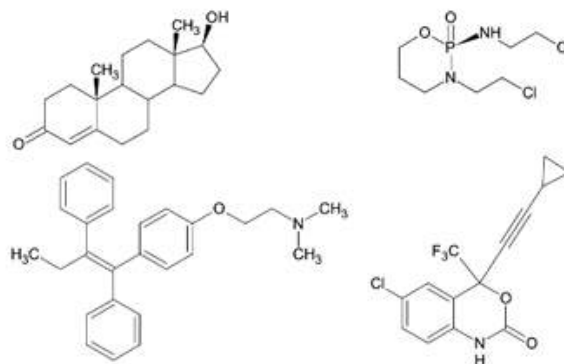
- 현재까지 인공지능(artificial intelligence, AI)을 기반으로 독성예측의 약물도달리타는 small molecule(분자량 1000 이하의 합성물질)과 50개 이상 아미노산이 연결된 단일 체인 polypeptide이라고함. 물론 단일 체인의 polypeptide도 단백질이라고 하지만 대부분은 단백질은 2차, 3차 및 4차 등 다수의 polypeptide로 구성됨.
- 두 약물 모달리티를 비교하면 현재의 AI-기반 약물의 독성예측 프로그램의 문제점과 미래의 프로그램의 개발 방향성을 고려할 수 있다고 사료됨.

<표-1>약물 모달리티에 따른 AI-based toxicity prediction을 위한 프로그래밍의 차이

	Small molecule	Polypeptide
구성	• 분자량 1000 이하의 유기물질	• 50-100 개 정도의 단일 체인의 아미노산
Input features encoding for	• 물리화학적 특성	• 물리화학적 특성과 독성과 관련된 특정 아미노산 서열
Model	• Regression & classification model	• Classification model
Learning approach	• Similarity-based approach	• Similarity/alignment(배열순서)-based approach
Database	• Drugbank, ToxCast, ChEMBL, T3BD, Toxnet 등	• Primary database: Swissprot, TrEMBL, PIR, NRDB, OWL
Platform	• In vivo & in vitro • Clinical trial	• 인체 비의도적 노출에 의한 독성을 유발한 Toxin의 아미노산 서열
Toxic endpoints	• 다양하며 돌연변이원성과 발암성 포함	• Clinical toxicity으로 통칭되며 돌연변이원성과 발암성 제외
CYP450 의한 Reactive metabolite로 전환	• CYP450의 기질이며 전환	• 기질이 아니며 전환되지 않음
예측 프로그램	<ul style="list-style-type: none"> • Pro-Tox 3.0 prediction • Swissadme • ADMETlab 3.0 • BioTransformer 3.0 • TOXSTAR • ADMET-AI • OECD QSAR toolbox • ADMETSAR 3.0 • AI Drug Lab • Vega-GUI-1.2.4 • ADME/Tox Prediction - Profacgen • FP-ADMET • ADMETlab • pkCSM • Deep-PK • pkCSM • toxCSM • Interpretable-ADMET • OptADMET • vNN-ADMET • ADMET-score • ADMET-Print • DL-AOT Prediction • ToxRefDB v2.0 • eToxPred • ToxRead • ChemoSAR • MolToxPred • ToxMPNN • TCM • KEGG Drug • xenosite • SMARTcyp 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxteller • ToxinPredictor • ToxNet • NNTox • MAI-TargetFisher • ToxIBTL • ToxinPred • BloxyBetPrediction • ATSE

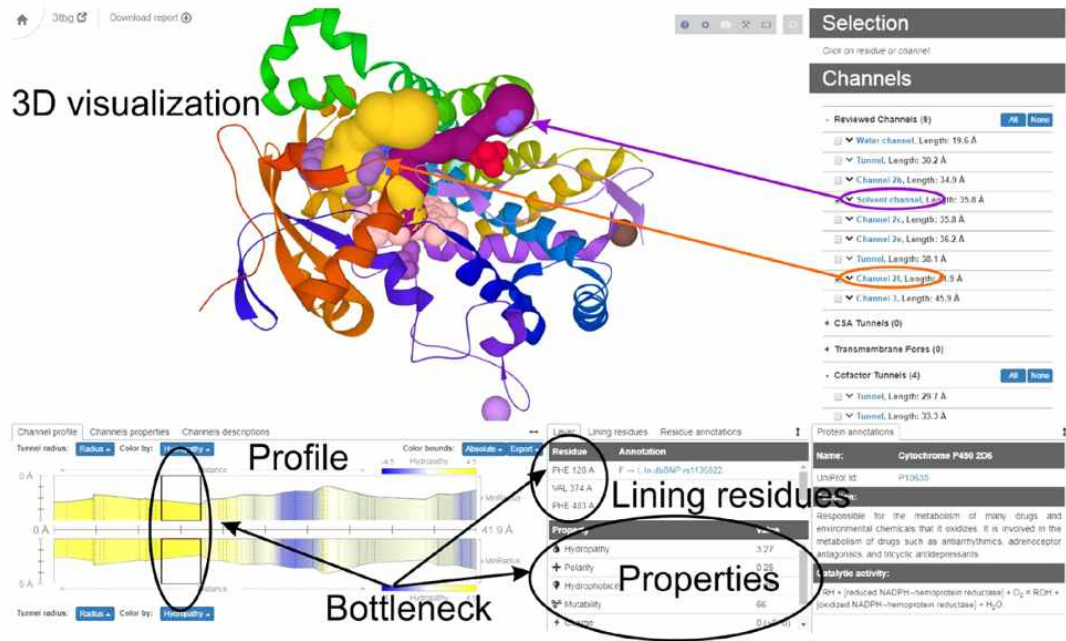
2. Cytochrome P450에 의한 Small molecule의 생화학적 전환과 기질 특이성

- <표-1>에서 small molecule과 polypeptide의 독성기전에 있어서 가장 중요한 차이는 cytochrome P450에 의한 reactive metabolite 전환 유무
- Reactive metabolite은 전자가 부족한 친전자성(electrophilic)으로 전자가 풍부한 (nucleophilic)의 DNA 염기와 공유결합하여 돌연변이원 및 발암원으로 작용.
- Cytochrome P450은 아래의 <그림-1>과 같이 여러 channel이 존재하며 이를 통해 통과가 가능한 small molecule이 선택되어 biotransformation이 이루어짐.



<그림-1> CYP2B의 여러 channel과 substrate (Urban 등, 2018)

- <그림-2>와 같이 ChannelsDB(<http://ncbr.muni.cz/ChannelsDB>)는 cytochrome P450을 포함하여 단백질 및 효소 등에 대한 기질 및 용질이 이동하는 channel에 대한 특성을 설명하는 database임. Channel의 특성은 길이와 반경 등의 기하학적 특징, 극성, 소수성, 물통로(hydropathy), 전하, 그리고 가변성(mutability) 등의 물리화학적 특성을 설명.



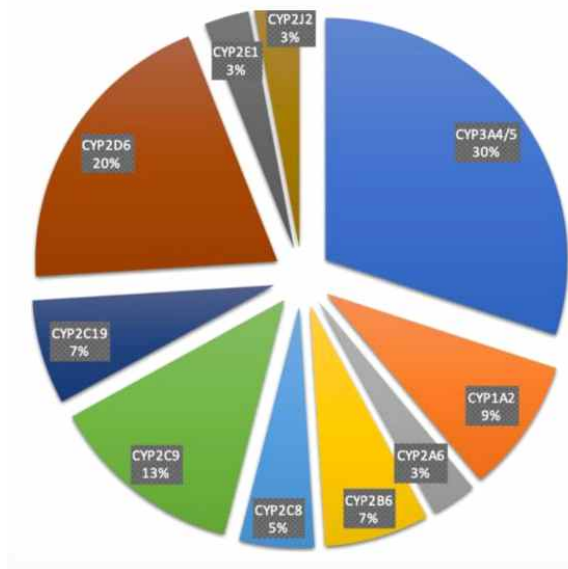
- 이와 같은 cytochrome P450의 channel 특성은 기질-특이성을 결정하고 또한 친수성으로 전환되는 극성의 무독성대사체뿐만 아니라 친전자성을 띤 reactive metabolite를 생성하게 됨. 유기화학물질의 돌연변이원성과 발암원성은 이들에 의한 유전자의 손상에 기인함. 특히 reactive metabolite에서 전자의 밀집도에 따라 DNA 또는 단백질의 친핵성 부위에 결합 site가 달라짐. 이와 같은 독성기전의 반영이 AI-based toxicity prediction의 미래임.

3. Cytochrome P450에 의한 Small molecule의 생화학적 전환과 기질 특이성

1) SMARTcyp 특성

- 인체의 CYP450의 아종은 Figure 4에서처럼 16종이 있으며 이중 CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2E1, 그리고 3A4 등 7아종이 전체 대사의 80% 이상 그리고 CYP3A4, CYP2D6과 CYP2C9 등의 3 아종이 60% 이상 약물 대사에 핵심적인 효소임(Zhao 등, 2021).

Figure 4. Fraction of specific CYP isoforms contribution to 248 drug metabolisms.



- SMARTCyp는 CYP3A4, CYP2D6과 CYP2C9 등의 3 아종과 small molecule의 **reactive metabolite**를 생성한 **reactivity site**을 확인함

2) SMARTcyp 프로그램 제작 원리

- Cytochrome P450의 촉매반응은 $-RH \rightarrow -ROH$ 산화반응을 유도. Figure 1에서처럼 Density Functional Theory (DFT)는 전자 밀도 관점에서 화학물질의 물리적 및 화학적 특성 중 atom의 에너지 그리고 구조적 접근성(accessibility) 등 2가지가 descriptor임. 이를 기반으로 분자 fragment의 산화반응의 우선적 부위에 대한 패턴 도출하는 **SMART rule**을 개발하는 것이 기본 원리임(Rydberg 등, 2010). 가장 낮은 에너지 atom과 분자의 중앙에서 atom이 떨어진 거리를 이용하여 SMART rule의 score 공식 개발. **Score = energy - 8*accessibility - 0.04*SASA**. 이는 CYP3A4 효소에 적용하는 공식이며 CYP2D6에 적용한 SMARTCyp 2D6 model과 CYP2C9에 적용하는 SMARTCyp 2C model은 각각의 효소의 복잡성으로 다소 차이가 있음. 2D6-score = energy + 6.7*(8 - N+dist + Span2End)으로 cutoff가 N+dist <8 및 Span2End <4임. 2C-score = energy + 5.9*(8 - COO-dist + Span2End) - 0.04*SASA으로 cutoff가 COO-dist <8, Span2End <4임. 이에 에너지가 낮고 분자의 중앙에서 거리가 멀수록 score가 낮으며 3개의 CYP3A4, CYP2D6과 CYP2C9의 score 중 가장 낮은 score를 가진 atom을 가진 cytochrome P450에서 산

화가 이루어짐.

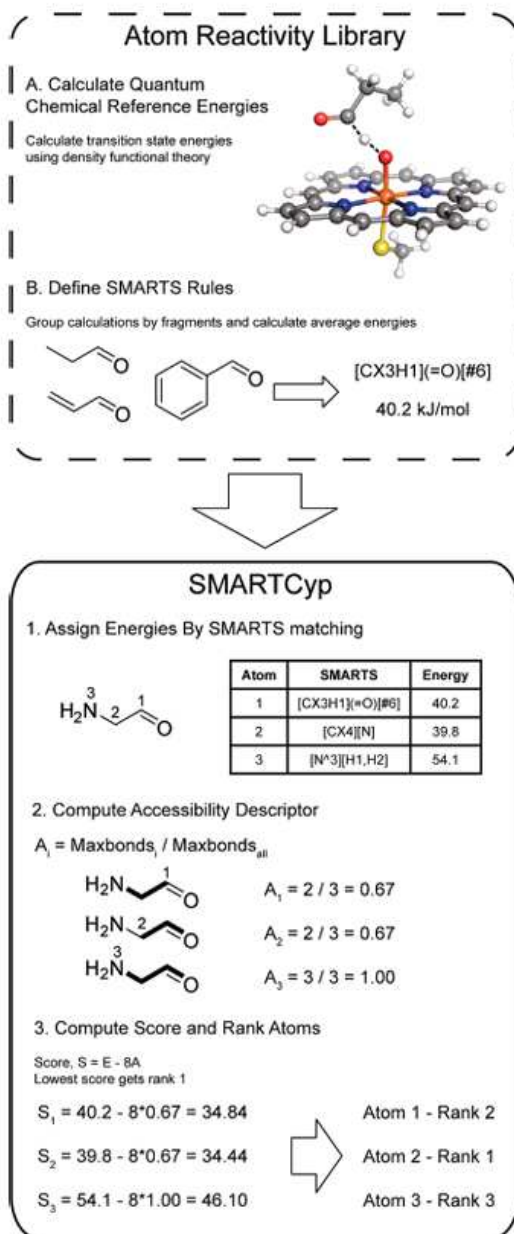


Figure 1. SMARTCyp algorithm and the generation of the atom reactivity library in the form of activation energies. The SMARTS rules in the figure are simplified.

- <표-1>에서 cytochrome P450과 관련하여 여러 프로그램이 있지만 cytochrome P450에 의한 구조적 activity를 기반한 공개용 독성예측 프로그램은 SMARTCyp(Olsen 등, 2019)뿐이며 이에 대한 예시를 소개.

4) SMARTcyp 프로그램의 응용예시

- **시험물질:** 항암제 Methotrexate의 -OH제거한 analogue

- Methotrexate smiles

CN(CC1=CN=C2C(=N1)C(=NC(=N2)N)N)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)O

- **Hydroxyl 제거한 시험물질 Smiles**

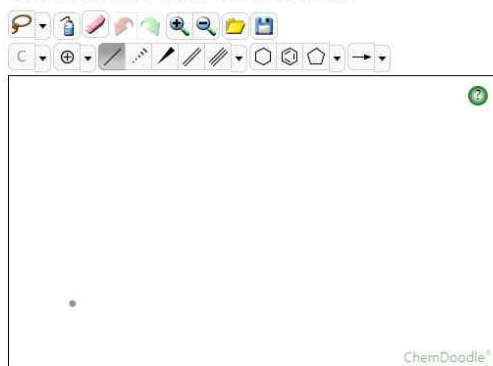
CN(CC1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)C1=CC=C(C=C1)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O

① 시험물질 Smiles 입력

SMARTCyp : Site of Metabolism prediction for Cytochrome P450s

SMARTCyp predicts the sites in molecules that are most liable to Cytochrome P450 mediated metabolism.

Get molecule from ChemDoodle



Enter Smiles String

Smiles String:

CN(CC1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)C1=CC=C(C=C1)C(=O)N[C@@H](CCC=O)C(O)=O

Start SMARTCyp

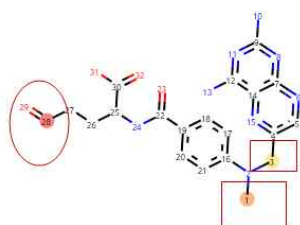
Upload file (in mol, sdf or smiles format)

파일 선택 선택된 파일 없음

Start SMARTCyp

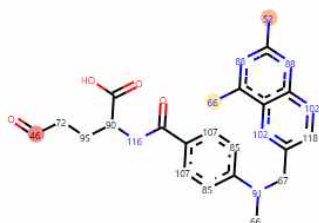
② CYP3A4, CYP2D6과 CYP2C9 등의 대사 예측 결과: SMARTCyp 프로그램을 Methotrexate analogue의 대사는 CYP3A4, CYP2D6과 CYP2C9 등 3개 효소 중 SMARTcyp score가 C28 31.3으로 가장 낮게 나타난 CYP3A4에 대사 되는 것으로 추정됨.

- CYP3A4 score: C28의 31.3



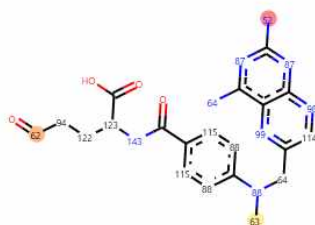
3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	Energy	2DSASA	Span2end	Relative Span	Similarity
1	C.28	31.3	40.2	33.3	1	0.9	0.7
2	C.1	34.1	41.1	49.6	7	0.6	0.7
3	C.3	35.2	41.1	21.0	7	0.6	0.4
4	N.10	44.1	54.1	50.2	0	1.0	0.7
5	N.13	45.1	54.1	44.9	2	0.9	0.7
6	C.27	51.6	59.9	27.5	2	0.9	0.4
7	C.17	54.3	59.5	24.4	9	0.5	0.7
8	C.25	57.3	63.9	7.5	4	0.8	0.4
9	N.2	59.2	63.9	2.2	8	0.6	0.4
10	N.8	67.8	75.6	17.0	2	0.9	0.3
11	N.11	67.8	75.6	16.8	2	0.9	0.3
12	C.26	68.4	75.9	19.8	3	0.8	0.4
13	N.6	68.6	75.6	17.3	4	0.8	0.7
14	N.15	69.2	75.6	11.6	5	0.7	0.3
15	C.18	75.2	80.8	25.0	8	0.6	0.7
16	N.24	83.5	89.6	4.7	5	0.7	0.3
17	C.5	85.0	92.0	28.8	5	0.7	0.3

- CYP2D6 score: C28의 45.6



2D6 Ranking	Atom	2D6 Score	Energy	2DSASA	Span2end	N+dist	Similarity
1	C.28	45.6	40.2	33.3	1	0	0.7
2	N.10	52.1	54.1	50.2	0	0	0.7
3	N.13	65.7	54.1	44.9	2	0	0.7
4	C.1	66.0	41.1	49.6	7	0	0.7

- CYP2C9 score: N10의 52.1



2C9 Ranking	Atom	2C9 Score	Energy	2DSASA	Span2end	COO-Dist	Similarity
1	N.10	52.1	54.1	50.2	0	17	0.7
2	C.28	62.5	40.2	33.3	1	5	0.7
3	C.1	62.8	41.1	49.6	7	10	0.7
4	C.3	63.9	41.1	21.0	7	10	0.4

4. 결론

- 본 프로그램을 통해 약물대사 측면에서 어느 cytochrome P450에 의해 Biotransformation되는지에 대한 이론적 설명이 가능하다는 측면에서 신약개발의 초기 스크린에 유용한 프로그램이라고 할 수 있음.
- 인체의 CYP450의 아종은 16종이 있으며 CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2E1, 그리고 3A4 등 7아종이 전체 대사의 80% 이상 그리고 CYP3A4, CYP2D6과 CYP2C9 등의 3 아종이 60% 이상 약물 대사에 핵심적인 효소임(Zhao 등, 2021). 현재 개발은 CYP3A4, CYP2D6과 CYP2C9 수준에 있으므로 나머지 4개를 안전평가연구소 등에서 개발한다면 적어도 약물대사 예측에서는 세계적 수준의 기관이 됨.
- 논문에서 reactivity라는 단어가 있어 SMARTcyp 프로그램을 통해 독성대사체인 Reactive metabolite 생성 유무도 확인이 가능할 것으로 예상했으나 여기서 reactivity는 산화작용을 의미하였음. 초반 small molecule과 polypeptide의 비교는 이러한 측면에서 독성기전의 차이를 설명하고자 하였음.
- 그래서 cytochrome P450에 의한 촉매반응이 Uncoupling 현상에 의해 reactive metabolite의 독성대사체가 생성된다는 측면을 고려하여 개발하면 small molecule의 toxicity prediction은 더 할 것이 없을 정도로 대단한 프로그램이 될 것으로 예상됨.

<참고문헌>

Olsen L, Montefiori M, Tran KP, Jørgensen FS. SMARTCyp 3.0: enhanced cytochrome P450 site-of-metabolism prediction server. Bioinformatics. 2019 Sep 1;35(17):3174-3175.

Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, Huai C, Shen L, Zhang N, He L, Qin S. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. Int J Mol Sci. 2021 Nov 26;22(23):12808.

Rydberg P, Gloriam DE, Zaretski J, Breneman C, Olsen L. SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. ACS Med Chem Lett. 2010 Mar 15;1(3):96-100.

66. 약물의 유연물질 위해성평가와 인공지능-기반 독성예측 가능한 경우

1. 우리나라의 비유전독성 및 비발암성 유연물질의 안전성관리 가이드라인

- 다음은 우리나라의 **비유전독성 및 비발암성** 유연물질(identified impurity)에 대한 안전성 관리 가이드라인 완제 및 원료의약품 유연물질 기준 가이드라인(식약처, 2018)을 전환기 독성시험 컨설팅(박영철, 2023) 발췌한 것임.

9-2. 의약품의 유연물질에 대한 안전성평가는?

▶ 유연물질은 원료의약품 및 완제의약품의 제조공정 또는 보관 중에 발생하는 의도하지 않게 도입되는 물질로 출발물질, 합성부산물, 중간체, 분해생성물, 시약, 리간드 등이 있다. 원료의약품 및 완제의약품의 규격 설정 시, 다음과 같이 유연물질을 특정한다(식약처, 2018).

- 구조가 확인된 특정유연물질(Each specified identified impurity)
- 구조가 확인되지 않은 특정유연물질(Each specified unidentified impurity)
- 설정기준이 화학구조 확인기준 이하인 미지유연물질(Any unspecified impurity)
- 총 유연물질(Total impurities)

유연물질(unidentified impurity)에 대한 안전성 확보는 원료의약품 및 완제의약품별, 그리고 유연물질의 함량에 따라 다소 차이가 있다. 이와 같은 원료의약품 및 완제의약품의 안전성 확보는 함량에 따라 3가지 측면인 보고 수준(reporting threshold), 화학구조확인 수준(identification threshold) 그리고 안전성입증 수준(qualification threshold) 등으로 구분되어 이루어진다. <표 9-3>은 원료의약품의 1일 최대투여량 및 유연물질의 함량에 따른 자료제출 수준을 나타낸 것이다(식약처, 2018). <표 9-4>는 완제의약품의 1일 최대투여량 및 유연물질의 함량에 따른 자료제출 수준을 나타낸 것이다(식약처, 2018).

<표 9-3> 원료의약품의 유연물질 자료제출 수준

1일 최대 투여량 ¹	1) 보고 수준 ^{2,3}	2) 구조확인 수준 ³	3) 안전성입증 수준 ³
2g/일 이하	0.05%	• 0.10 % 또는 1일총섭취량 1.0 mg 초과 (더 적은 값 적용)	• 0.15 % 또는 1일총섭취량 1.0 mg 초과(더 적은 값 적용)
2g/일 초과	0.03%	• 0.05%	• 0.05%
1. 1일 원료의약품 투여량 2. 보고수준을 더 높게 설정하는 경우, 과학적으로 타당성을 증명 3. 유연물질이 특별히 독성을 나타내는 경우, 입증 수준을 더 낮게 설정하는 것이 적절			

<표 9-4> 완제의약품의 유연물질 자료제출 수준

1) 보고 수준		2) 화학구조확인 수준		3) 안전성입증 수준	
1일 최대 복용량	보고 수준 (%)	1일 최대 복용량	화학구조확인 기준	1일 최대 복용량	안전성입증 기준
• ≤	• 0.1	• <1mg	• 1.0% 또는 1일 총 섭취량 5μg 중 낮은 수치	• <1mg	• 1.0% 또는 1일 총 섭취량 5μg 중 낮은 수치
		• 1-10mg	• 0.5% 또는 1일 총 섭취량 20μg 중 낮은 수치	• 1-10mg	• 0.5% 또는 1일 총 섭취량 200μg 중 낮은 수치
• >	• 0.05	• >10mg-2g	• 0.2% 또는 1일 총 섭취량 2mg 중 낮은 수치	• >10mg-2g	• 0.2% 또는 1일 총 섭취량 3mg 중 낮은 수치
		• >2g	• 0.10%	• >2g	• 0.15%

원료의약품 및 완제의약품의 유연물질(impurity) 기준에 대한 가이드라인(식약처, 2018)에 따르면 유연물질 함량 정도에 따라 자료제출 수준이 다르다. 인허가의 측면에서 약물개발자가 가장 관심이 있는 부분이 유연물질의 안전성입증 수준이다. 안전성입증을 위한 독성시험은 설치류 1종을 이용한 반복투여독성시험(1종, 14일~90일, 동일 투여경로)과 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 체외염색체이상시험) 등이다. 물론 유전독성시험에서 결과가 음성반응이면 회복군을 두지 않은 28일 또는 4주 반복투여독성시험을 통해 안전성입증이 이루어진다. 유전독성에서 양성반응 일 경우에 체외(in vitro)가 아닌 체내(in vivo) 유전독성시험의 결과를 통해 증거가중치(weigh of evidence) 접근이 필요하다. 그리고 반복투여독성시험을 통해 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대비(무)독성용량) 수치를 추정한다. 유전독성시험에서 음성 경우 NOAEL 수치를 이용하여 개별 유전물질 또는 총유전물질에 대한 1일 노출허용용량인 TDI(tolerable daily intake) 제시를 통해 안전성입증을 하게 된다. 즉, TDI가 원료의약품 및 완제의약품에 포함된 유연물질의 1일최대노출량 이상이 되어야 하며 예시는 다음과 같다.

<유연물질 예시> 원료의약품의 1일 최대 투여량이 2g 이하이고 유연물질 1일 섭취량이 1.3mg일 경우에 안전성입증을 수행하시오.

- 1일 총섭취량인 1.3 mg를 포함할 수 있는 TDI 산출 필요
- TDI는 (NOAEL/SF) x (animal Km/human Km)이며 여기서 SF(safety factor)는 개체 내(intraspecies) 차이에 대한 안전계수 10, 그리고 Km은 아래의 <표 9-5>에서처럼 중간 전환계수임

<표 9-5> 동물용량을 인체등가용량으로 전환하는 Km 계수

종(species)	체중 (kg)	체표면적 (m ²)	Km 계수
성인	60	1.6	37
랫드	0.15	0.025	6
마우스	0.02	0.07	3

- 랫드를 이용한 4주 반복투여독성시험 수행을 위한 동물용량 설정이 필요
- 체중 60kg 성인 경우에 랫드의 NOAEL은 $1.3 \text{ mg}/60\text{kg/day} = (\text{NOAEL}/10) \times (6/37)$ 이므로 NOAEL은 최소 $1.34 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$
- NOAEL이 최소 $1.34 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 이상이므로 저용량 1.5, 그리고 중용량과 고용량 각각 3과 6 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 용량으로 설정하여 독성시험 수행.
- 반복투여독성시험에서 NOAEL이 $3 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 에서 설정되었다면 원료의약품에 총유연물질에 대한 TDI는 $0.0486 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 이 됨.
- 이에 체중 60kg 성인이 총유연물질에 대한 1일 노출허용량은 $2.916 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 이므로 원료의약품의 1일 총섭취량인 1.3mg을 상회함으로 안전성 입증할 수 있음.

2. 유전독성 및 발암성 유연물질의 안전성관리 가이드라인에 대한 이해

1) 유전독성 유연물질 가이드라인

- ICH 및 우리나라는 DNA-반응성 및 유전독성 유연물질에 대한 가이드라인을 2023년 다음과 같이 제정하여 발표하였음.
- ① ICH M7(R2) Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk
- ② 의약품 불순물 유전독성 평가 가이드라인(식약처, 2023)

2) 핵심내용과 인공지능 응용

- ① 가이드라인의 내용: 낮은 농도에서 DNA에 직접 손상을 주어 돌연변이를 나타낼 가능성이 있고, 그 결과 암 유발 가능성이 있는 DNA 반응성 유연물질(DNA reactive or mutagenic impurities)의 안전성 관리에 초점을 둠
- ② 대상물질:
 - 합성불순물: 잠재적 불순물로는 출발물질, 시약, 출발물질부터 원료의약품까지 합성경로에서의 중간체
 - 분해산물: 완제의약품의 장기 보존 조건 하에 생성하는 산물

3) 유전독성 및 발암성 유연물질의 특성에 따른 분류와 관리 방법

- <표 1>과 같이 합성불순물과 분해산물의 돌연변이원성 및 발암 가능성에 따른 불순물 클래스 및 이에 따른 관리 방법을 제시한 것임(식약처, 2023)

<표 1> 변이원성 및 발암 가능성에 따른 불순물 클래스 및 이에 따른 관리 방법

Class	정의	관리를 위한 제안 조치 (7항 및 8항에 자세한 사항들이 있음)
1	변이원성과 발암성이 확인된 물질	화합물 - 특이적 허용 한계 수준 (compound-specific acceptable limit) 또는 그 이하로 관리
2	변이원성은 확인되고 발암성은 확인되지 않은 물질 (박테리아 변이원성 양성* 및 설치류 발암성 유발 데이터 없음)	허용 한계 수준 또는 그 이하로 관리 (일반적 혹은 조정된 TTC)
3	경고구조(structural alert)가 있으나, 원료의약품 구조와 관련 없는 것; 변이원성 데이터 없음	허용 한계 수준 또는 그 이하로 관리되거나 (일반적 혹은 조정된 TTC), 박테리아 변이원성 시험 시행; 만약, 비- 변이원성 = 클래스 5, 변이원성 = 클래스 2
4	경고구조(structural alert)가 있으나, 검사된 원료의약품 또는 원료의약품과 관련된 화합물(예, 공정 중간체)에 동일한 경고구조(structural alert)가 있고 비-변이원성임	비- 변이원성 불순물로서 관리
5	경고구조(structural alert) 없음 또는 변이원성이 없음을 증명하기에 충분한 데이터를 가진 경고구조(structural alert)	비- 변이원성 불순물로서 관리

* 또는 유전자 돌연 변이 유도과 관련된 DNA-반응성을 나타내는 다른 관련된 양성 돌연변이 데이터 (예, 생체 내(in vivo) 돌연변이 연구에서 양성)

4) <표 1>에 대한 위해성평가 방법

4-1) Class 1의 compound- specific acceptable limit

- 화합물-특이적 허용 한계 수준(compound- specific acceptable limit)은 화합물 특이적 섭취 허용량으로 산출되며 이는 ICH M7 가이드라인 원칙이 적용됨. ICH M7 가이드라인은 발암성 양성 데이터를 가진 변이원성 불순물의 섭취 허용량(AI, Acceptable Intakes) 또는 1일 노출 허용량(PDE, Permitted Daily Exposure)으로 산출됨.

① 섭취 허용량(AI, Acceptable Intakes) 산출 방법

- 변이원성 작용기전 가능성이 있는 발암성물질에 대한 섭취 허용량(AI) 산출 시 사용된 1차 방법은 ICH M7의 산출된 암발생 추정치인 TD₅₀으로부터 선형 외삽하는 “기본 방법

(default approach)"

- TD₅₀은 Tumor Dose 50의 약어로 개체군에서 50% 발암을 유도하는 용량(dose with 50 % tumor bearing animals)임.
- $AI = TD_{50} / (50,000)$
- 여기서 50,000은 정상인이 자연발생적으로 발암이 일어날 확률이 1/100,000인데 TD₅₀은 암위해도확률(cancer risk probability)의 1/2과 동일함. 따라서 100,000으로 나누어 주어야 하지만 위해도 측면에서 1/2인 50,000으로 나누어줌 **(참고문헌 ICH M7(R2))**

② 1일 노출 허용량(PDE, Permitted Daily Exposure)으로 산출 방법

- 일반적으로 돌연변이원이나 발암원에 대해서는 역치(threshold)가 없음. 그러나 최근에는 비유전독성물질인 DNA 이외의 표적과 상호 작용하는 화합물뿐만 아니라 DNA와 직접 반응하는 화합물에서도 역치가 존재하는 인식이 증가되고 있음. 이에 반복투여독성시험에서 확인된 NOAEL(no observed adverse effect level)과 ICH 가이드라인 (ICH Q3C(R5))에서 제시한 안전계수인 adjustment factor를 적용하여 산출됨.

$$PDE (mg/day) = \frac{\text{NOAEL or LOAEL (mg/kg/day)} \times \text{Body weight (kg)}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5}$$

Diagram labels:

- weight adjustment (points to Body weight (kg))
- no-observed-adverse-effect level (points to NOAEL or LOAEL (mg/kg/day))
- lowest-observed-adverse-effect level (points to NOAEL or LOAEL (mg/kg/day))
- adjustment factors (points to F1 x F2 x F3 x F4 x F5)

(예시) Acetaldehyde의 AI(Acceptable Intakes) 및 PDE(Permitted Daily Exposure)산출 방법

1. AI 산출

- **Carcinogenicity Potency Database (CPDB)에 따르면 Acetaldehyde의 TD₅₀은 185 mg/kg/day임.**
- **$AI = (185 \text{ mg/kg/day} / 50,000) \times 50 \text{ kg(성인체중)} = 185 \text{ } \mu\text{g/day}$**
- 즉, 합성의약품에 발암성 유연물질 **Acetaldehyde가 있을 경우, 1일** 섭취 허용량(AI, Acceptable Intakes)은 성인 체중 50 kg 기준 185 $\mu\text{g/day}$ 임. 이와 같은 아세트알데히드에 대한 AI는 약물의 모든 노출 경로에 대해 동일하게 적용됨.

2. PDE

- 경구로 노출되는 약물의 acetaldehyde에 대한 PDE는 Uebelacker 등(2011) 논문을 기반으로 체중 50kg 성인인 경우에 2 mg/day으로 산출

4-2) Claas 2 & 3의 TTC(Threshold of Toxicological Concern)

- **TTC의 개념:** 발암성-잠재적 우려 물질의 역치라고 해석되는 TTC(threshold of toxicological concern)는 무시할만한 발암성 용량 및 독성용량을 잠재적 노출이 예상되는 특정 화학물질-특이적 발암성 및 독성에 대한 자료가 없거나 부족한 화학물질에 사용되는 1일 노출한계용량을 나타내는 지표임(ICH M7(R2))
- 시험이 실시되지 않은 화학물질에 대하여, 발암성 또는 다른 독성을 나타내지 않는 섭취 허용량을 규정하기 위하여 독성학적 역치(**TTC: Threshold of Toxicological Concern**) 개념 (식약처, 2023)
- 따라서 TTC의 핵심 원리 및 목적은 화학구조적 유사성을 가진 기존의 화학물질에 대한 독성자료를 이용하여 안전성 문제에 대한 우려가 없는 인체노출안전수준을 설정하는 것임.
- **TTC에 대한 접근 및 방법:** 비록 TTC에서 화학적 구조에 대한 유사성이 산출의 핵심 도 구이지만 구조-활성 정량적 관계인 QSAR(quantitative structure-activity relationship)와 무관하고 평가 대상의 다양한 구조적 특징을 가진 화학물질의 독성 잠재성에 대한 분석이 산출에 중요함. 그러나 오늘날 **TTC 결정을 위해 QSAR 프로그램이 내장된 "Toxtree"가 응용되고 있음.**
- 돌연변이원성 및 발암성 유연물질에 대한 TTC: 발암성 물질 노출에 의해 건강상 무시할 수 있는 용량은 1/100,000의 발암을 유도하는 용량으로 변이원성 및 발암성의 **Class 2와 3의 경우에 TTC에 기반한 섭취 허용량 1.5 µg/50kg/day임.**

4-3) Claas 2 & 3의 LTL(Less-Than-Lifetime)

- 변이원성 및 발암성의 Class 2와 3의 경우에 TTC에 기반한 섭취 허용량 1.5 µg/50kg/day임. 이는 평생동안 약물에 오염된 돌연변이원성 및 발암성-우려 물질에 대한 위험성평가으로 추정된 용량임
- 일반적으로 약물을 평생동안 복용하는 약물도 있지만 대부분 일정 기간만 복용하는 약물도 존재함. 이와 같이 단기간 및 특정기간 동안 복용하는 약물을 고려하여 <표-2>와 같이 기간별 TTC_{rk} 제시되었으며 1-12달 사이 약물 복용기간의 TTC-기반 1일섭취량은 20 µg/50kg/day 이하임.

표 2 : 개별 불순물에 대한 섭취 허용량

투여 기간	≤ 1달	> 1 - 12달	> 1 - 10년	> 10년 - 평생
1일 섭취 [μg/ day]	120	20	10	1.5

4-4) Class 2의 2개 불순물과 Class 3의 3개 불순물에 대한 TTC

- 원료의약품의 규격에 규정된 Class 2 또는 Class 3 불순물이 3개 이상인 경우, 임상 개발 및 시판 제품에 대한 변이원성 불순물의 합계는 <표-3>에 따른 한도로 설정함.

표 3 : 복합 불순물에 대한 1일 총 섭취 허용량

투여 기간	≤ 1달	> 1 - 12달	> 1 - 10년	> 10년 ~ 평생
1일 섭취량 [μg/ day]	120	60	30	5

<참고논문>

- Uebelacker M, Lachenmeier DW. Quantitative determination of acetaldehyde in foods using automated digestion with simulated gastric fluid followed by headspace gas chromatography. J Autom Methods Manag Chem. 2011;2011:907317.
- ICH M7(R2) Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk
- 의약품 불순물 유전독성 평가 가이드라인(식약처, 2023)
- 박영철 (2023) 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7

67. AI-기반 독성예측 프로그램 개발의 우선적 요소에 대한 이해

1. AI-기반 독성예측을 위한 2가지 중요한 알고리즘

- 비의도적 노출에 의한 환경 합성화학물질과 의도적 노출인 합성의약품의 효능 및 독성을 포함한 생물학적 반응에 대한 인공지능-기반 예측은 접근방법론에서 차이가 있음.
- 새로운 환경 유기합성화학물질인 경우는 생물학적 반응에 대한 전체 확인이 가능한 접근이 필요하며 반면에 신약 개발을 위한 합성의약품인 경우에 약리작용의 부분적인 분자표적을 위해 생물학적 반응에 대한 우선적임.
- 그럼 신약의 독성학적 측면에서 생물학적 반응은 전체적인 것과 표적을 함께 고려하는 것이 필요할 것으로 사료되며 이에 대한 접근법이 제시됨(Mansouri 등, 2024)
- 선후가 어떠한 환경물질 및 합성의약품의 생물학적 반응은 화학적 유사성(chemical similarity)을 기반함. Mansouri 등(2024)은 AI-기반 독성예측을 위해서는 <표>와 같이 **화학적 유사성**과 관련하여 ① **Toxic endpoint-agnostic(비확인성) similarity**, ② **Toxic endpoint-specific(특이적) similarity**의 접근법을 제시함. 여기서 toxic endpoint는 정성지표인 신장독성, 간독성을 비롯하여 정량지표인 LD50 및 NOAEL 등을 의미함.

<표> Toxic endpoint-agnostic similarity, ② Toxic endpoint-specific similarity의 접근법 차이

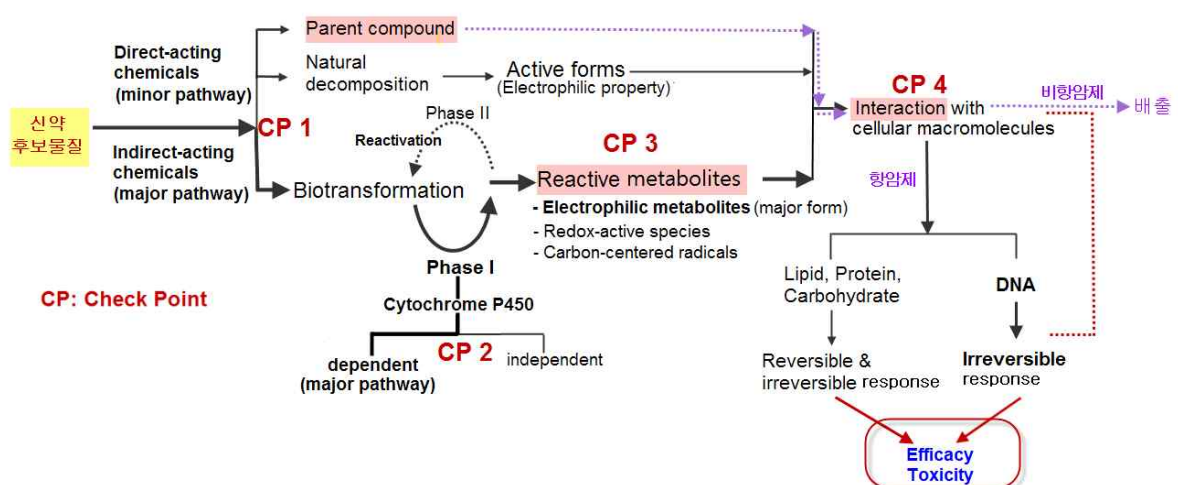
	• Toxic endpoint-agnostic(비확인성) similarity	• Toxic endpoint-specific(특이적) similarity
Label 값 부여(모델이 예측하려는 독성, 목표변수 또는 endpoint) Learning method(학습방법)	• Label이 없는 Unsupevised learning(비지도학습)	• Label이 있는 Supervised learning(지도학습)
Similarity	• 일반적 유사성: 분자량, 원자수, 결합개수 등의 일반적인 요소의 유사성	• 특정 유사성: 특정 또는 표적 독성과 관련된 alert structure 및 공유결합 등의 특정 결합을 가진 유사성
데이터의 분석방법	• Clustering(군집화): 데이터들 내에서 비슷한 특징이나 패턴을 가진 데이터들 끼리의 집합화 작업	• Classification(분류화): 주어진 데이터를 미리 정의된 label하여 구분화 작업하여 새로운 합성의약품에 대한 예측
분석방법 예시	• 알데하이드 또는 카르복실기 등의 특정 구조를 가진 유사 구조를 가진 화학물질의 그룹화	• 유전독성과 같은 Specific toxic endpoint와 가진 alert structure를 가진 합성의약품의 그룹화
장점	• 광범위하고 유연한 독성예측	• 표적 독성(target toxicity)에 대한 비교적 정확한 예측
단점	• 정확성 부족	<ul style="list-style-type: none"> • 예측이 특정 독성에 국한되어 더 중요한 다른 독성 평가에 적용이 어려움. • 데이터의 label에 대한 정확성을 높이기 위해 높은 품질의 데이터가 요구되며 지속적인 데이터의 upgrade가 요구됨.

● 결론:

- 환경물질은 의도적인 노출이 아니기 때문에 비교적 광범위한 **Toxic endpoint-agnostic (비확인성) similarity 접근법**이 바람직하고 이를 통해 **비발암물질 및 발암물질에 대한 1 일노출허용량 및 발암물질의 TTC(threshold of toxicological concern)**
- **지금까지의 AI-기반 독성예측 프로그램의 수준은 일부 양적인 독성지표를 제외하고는 그렇게 신뢰할 만한 프로그램이 제공되고 있다고 평가하기에는 어려움.**
- 합성의약품의 독성학적 활성(물론 이는 약리학적 활성으로 평가되기도 함)의 중간 차이는 반드시 화학물질의 유사성에 의해 발생하는 것은 아니고 생체 내 효소시스템의 차이에 의해 발생함. 현재 사용되고 있는 AI-기반 독성예측을 위한 프로그램이 동물에서 얻은 자료를 기반으로 특히 이와 같은 효소의 중간 차이를 반영하지 않고 있어 신뢰성을 갖기에는 한계임. 그러나 독성예측이 in vivo가 in silico보다 더 우수하다고 평가하기에는 둘 다 부족하여 과학적 자료를 제공하는 어려움.

2. Toxic endpoint 외 Biological activity의 의미

- Mansouri 등(2024)은 위해서 제시한 toxic endpoint 외에 AI-기반 독성예측을 프로그램 개발을 위해서 필요한 label 또는 class의 3가지는 ① Biological activity, ② Exposure route, ③ Toxicity mechanism 등을 제시함.
- 합성의약품이 전신혈관계를 통해 전신으로 분포된다면 ①Biological activity, ③Toxicity mechanism이며 독성기전이 화학물질의 활성에 의해 독성기전이 이루어진다면 ① Biological activity가 합성의약품이 가장 중요함.
- 합성의약품의 독성은 ① 과잉용량의 노출과 ② Reactive metabolite(활성대사체)이며 ① Biological activity은 Reactive metabolite가 생체를 구성하는 4대거대분자인 당, 단백질, 지질 그리고 DNA와 공유결합을 하는 것을 의미함.
- <그림>에서처럼 reactive metabolite는 cytochrome P450에 의해 발생하여 4대거대분자와 결합하여 독성도 유발하지만 한편으로는 암세포 등의 단백질 및 DNA와 공유결합하여 암세포 사멸을 유도하는 약리기전이기도함(박영철, 2011).



<그림> Biotransformation 유무에 따른 독성기전의 Central dogma

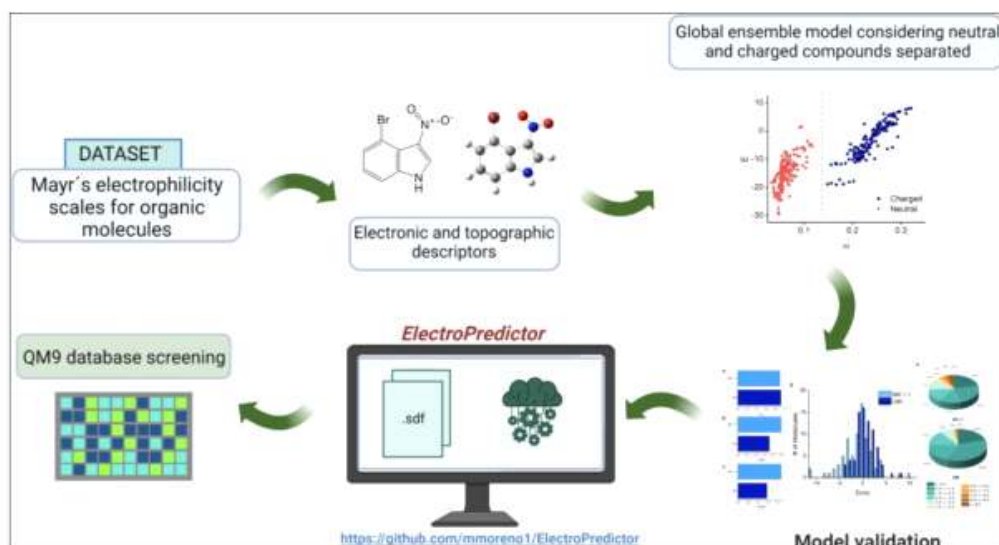
- 따라서 AI-기반 독성예측 프로그램의 자료에 대한 정확성과 신뢰도를 높이기 위해서는

유전독성 및 발암성 등의 toxic endpoint와 더불어 원물질의 Reactive metabolite의 전환 유무를 제시할 필요성이 있음. 이는 Mansouri 등(2024)은 위해서 제시한 Biological activity 유무를 추정하는 것과 같은

- <그림>에서처럼 Reactive metabolite는 3종류가 있으며 이들 모두는 **친전자성 (electrophilic)**으로 4대거대분자의 친핵성 부위와 공유결합을 통해 독성 및 약리작용을 하게 됨.
- 따라서 AI-기반 독성예측 프로그램 중에서 합성의약품 또는 유기성 화학물질의 잠재적 친전자성을 확인하는 프로그램의 개발 유무는 AI-기반 독성예측의 미래 응용을 위해 중요한 초석이 됨.

3. 신약개발을 위한 AI-기반 친전자성 예측 프로그램

- 다행히 Cuesta 등(2023) 논문을 통해 "Electrophilicity(친전자성) is one of the most important parameters to understand the reactivity of an organic molecule"을 강조하며 친전자성을 확인하는 **AI-기반 친전자성 예측 프로그램인 'ElectroPredictor'을 개발하였음.**
- 생체 내에서 합성의약품의 Electrophilicity(친전자성) 발생을 예측하면 AI-기반 독성예측은 AOP(adverse outcome pathway)와 같은 독성기전을 제시할 수 있어 기존의 AI-기반 독성예측 프로그램의 validation 및 신뢰도를 판정하는데 큰 기여를 할 것으로 사료 됨. 추가적인 보고서는 다음에 계속됩니다.



<그림> 화학물질의 친전자성을 예측하는 Machine learning model

<참고문헌>

- ElectroPredictor: An Application to Predict Mayr's Electrophilicity E through Implementation of an Ensemble Model Based on Machine Learning Algorithms
- Cuesta SA, Moreno M, López RA, Mora JR, Paz JL, Márquez EA. ElectroPredictor: An Application to Predict Mayr's Electrophilicity E through Implementation of an Ensemble Model Based on Machine Learning Algorithms. J Chem Inf Model. 2023 Jan 23;63(2):507-521.
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

<목적> 면역관문저해제인 항체항암제 개발과 화학요법과의 병용요법 개발이 주목받고 있음. 또한 화학 항암제는 ADC(antibody-drug conjugate)의 payload로 응용되고 있음. 이와 같은 신약 개발에 있어서 기존의 화학 항암제에 대한 독성학적 특성을 통해 병용요법에의 응용 및 ADC에의 응용을 위한 보다 바람직한 방향을 찾는 것이 목적임. 궁극적인 것은 화학요법 항암제의 단점인 암세포의 내성, 약물동태학적 제한, 전신분포에 의한 비표적 독성을 극복할 수 있는 방향임. 또한 고찰을 통해 새로운 적응증 응용의 가능성 및 신약 개발의 잠재성 확인.

<방법> AI 개발 목적은 결국 많은 자료의 패턴 분석을 기반으로 우리가 얻고자 하는 것을 얻는 것임. 여기서는 AI가 할 수 없는 독성학적 패턴 분석을 통해 면역관문저해제인 항체항암제와의 병용요법 및 ADC 응용을 위한 가장 적절한 화학 항암제 확인.

<차례>

1. 항암제와 병용요법에 대한 이해
2. Cyclophosphamide(CPA) + 항체항암제의 병용요법 가능성 고찰
3. Vinorelbine+항체항암제의 병용요법과 신 적응증 약물 개발 가능성에 대한 대사체 스크린
4. Gemcitabine + 항체항암제의 병용요법과 임상최대용량 설정의 특이성
5. Methotrexate+항체항암제의 병용요법과 antimetabolite 항암제로의 취약점
6. Oxaliplatin +항체항암제의 병용요법과 백금제제 기반-항암제의 최악 항암치료제에 대한 연구 결과
7. Doxorubicin + 항체항암제의 병용요법과 다양한 세포자멸사의 항암기전
8. 항체항암제 병용요법을 위한 Tyrosine kinase inhibitor - Crizotinib(크리조티닙)의 가능성
9. 병용항암제 개발을 위한 AI-기반 Small molecule 항암제의 알고리즘 개발을 약리·독성학적

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

1. 항암제와 병용요법에 대한 이해

1-1. 항암제의 시대별 분류

- 과거에는 시대적 흐름에 따라 다음의 <표-2>와 같이 구분하였지만 오늘날에는 개발되는 항암제 모두가 Targeted therapy.

<표-2> 시대별 항암제의 종류 및 특성

1세대 화학 항암제 Cytotoxic agent	2세대 표적 항암제 Targeted therapy	3세대 면역 항암제 Immue therapy
<ul style="list-style-type: none"> 이상 부위에 주사 투약 (정상세포와 암세포 비구분) 	<ul style="list-style-type: none"> 암세포에만 주사 투약 	<ul style="list-style-type: none"> 암세포와 정상세포의 연결로 암세포의 면역 기능 중단 ▪ (ex: immune checkpoint inhibitor)
<ul style="list-style-type: none"> 암세포 제거 효과 독성이 정상세포에 악영향 	<ul style="list-style-type: none"> 암세포 표적 또는 암세포의 세포주기와 관련된 신호전달 체계 단백질 표적 	<ul style="list-style-type: none"> 주사 통해 암세포와 정상 면역세포의 연결 제거 화학·표적 항암제 병용 투여

1-2. Targeted cancer therapy의 기본 원리

- 표적항암치료제(Targeted cancer therapy) 개발을 위해서는 ① 암세포에서 특정 부위이나 물질을 발견하고 발견할 수 있어야 하고, ② 성장을 멈추기 위하여 암세포 내부에 전달되는 신호를 발견하고 차단이 가능하여야 함 등의 조건이 요구됨. 더욱 중요한 것은 치료제가 정상세포에는 비가역적 영향을 주지 않거나 최소한 영향을 줄(American Cancer Society, 2024)

1) 항암제의 Target이 되는 암세포의 변화된 물질

- 표적이거나 표적이 되는 암세포의 물질은 다음과 같은 4가지

- ① 암세포에 특정 단백질의 과도한 발현
- ② 정상세포에 존재하지 않고 암세포에만 존재하는 단백질
- ③ 유전자의 변형으로 암세포에 변형된 단백질
- ④ 정상세포에 존재하지 않는 변형된 유전자

2) 표적치료제의 Mechanism of action

- 표적항암치료제는 다음과 같은 분자-세포 수준에서 약리작용 기전을 가짐

- ① 암세포의 성장과 분열과 관련된 화학적 신호 차단
- ② 암세포의 apoptosis를 유도하는 단백질에 대한 영향
- ③ 암세포와 연결되는 신생혈관생성(angiogenesis) 차단
- ④ 암세포의 파괴하는 면역기전을 유도

⑤ 정상세포가 아닌 암세포를 죽이는 독성물질 운반

- 아래의 <표>와 같이 표적항암치료제 개발을 위한 7가지 기전을 기반으로 다음과 같이 7가지 종류의 항암제 분류가 제안되기도 함: Signal transduction inhibitors, Hormone therapies, Apoptosis inducers, Angiogenesis inhibitors, Gene expression modulators, Immunotherapy, Monoclonal antibodies(ACTC, 2023)

01 | Blocks signals that help cancer cells grow

02 | Reduce the longevity of cancer cells

03 | Triggers the immune system to attack cancer cells

04 | Cuts off supply of hormones that contribute to cancer

05 | Delivers cell-killing substances to cancer cells

06 | Stops creation of blood vessels that lead to tumors

07 | Destroys cancer cells

1-3. 병용요법 개발을 위한 변이 유전자와 승인된 small molecule 항암제 고찰

1) 암세포의 최소 4개 이상의 유전자 변이

- Table 1은 대장암(colorectal cancer, CRC)에서처럼 형태가 4종류로 분류되고 또한 변이된 유전자도 다양함(Malki 등, 2020), 따라서 모든 돌연변이된 유전자 또는 그 산물에 대한 활성 저해를 통해 성장을 멈추고 암세포 죽음을 유도하는 암세포 내부 신호체계를 제어하는 small molecule을 제어하기에는 불가능함.

Table 1. Biological differences in the gene expression-based molecular subtypes of colorectal cancer (CRC).

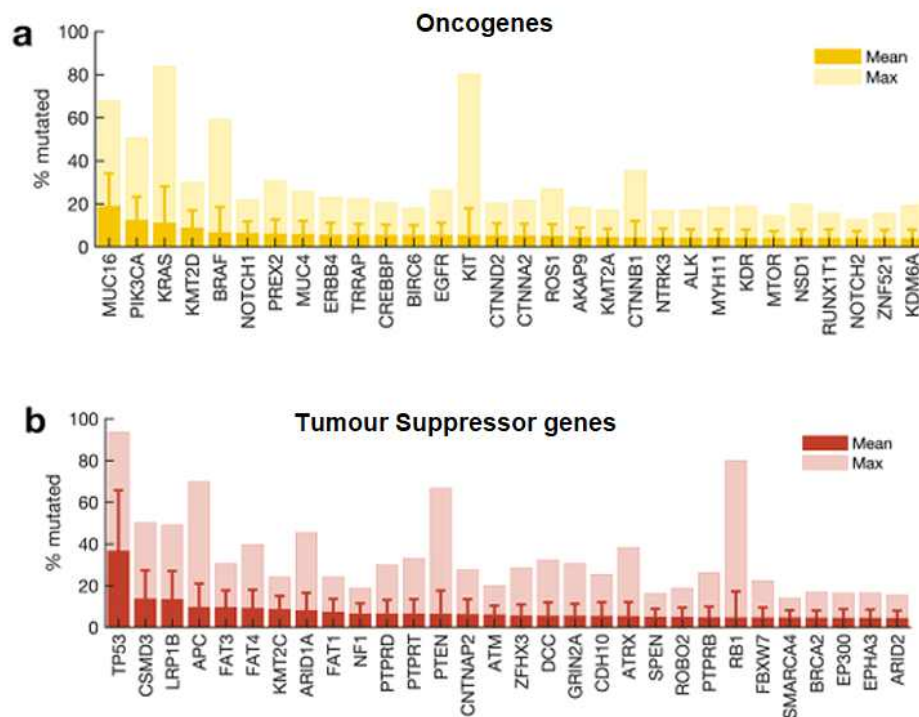
Subtype	Gene Expression	Prognosis
CMS1 (MSI immune)	<ul style="list-style-type: none"> Deregulated DNA mismatch repair, MSI and MLH1 silencing CIMP-high with common <i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf (BRAF)</i> mutations and low number of SCNAs Immune infiltration and activation 	Very poor survival rate after relapse
CMS2 (Canonical)	<ul style="list-style-type: none"> Express epithelial signatures with <i>Wingless (Wnt)</i> and <i>MYC</i> signaling activation Frequently exhibit loss of TSGs and overexpression of oncogenes <i>than the other subtypes</i> 	Better survival rate after relapse in comparison to other subtypes
CMS3 (Metabolic)	<ul style="list-style-type: none"> Fewer SCNAs as compared to CMS2 and CMS4 Epithelial signatures Metabolic dysregulation in a variety of pathways with frequent <i>KRAS</i> mutations Slightly higher presence of CIMP-low 	Better survival rate after relapse in comparison to other subtypes
CMS4 (Mesenchymal)	<ul style="list-style-type: none"> Activation of Transforming growth factor-β (TGF-β) Upregulated expression of EMT genes Enhanced expression of genes regulating inflammation, matrix remodeling, stromal invasion and angiogenesis 	Worse overall and relapse-free survival as compared to other subtypes

CIMP: CpG island methylator phenotype; EMT: epithelial-mesenchymal transition; MSI: microsatellite instability; SCNA: somatic copy number alterations.

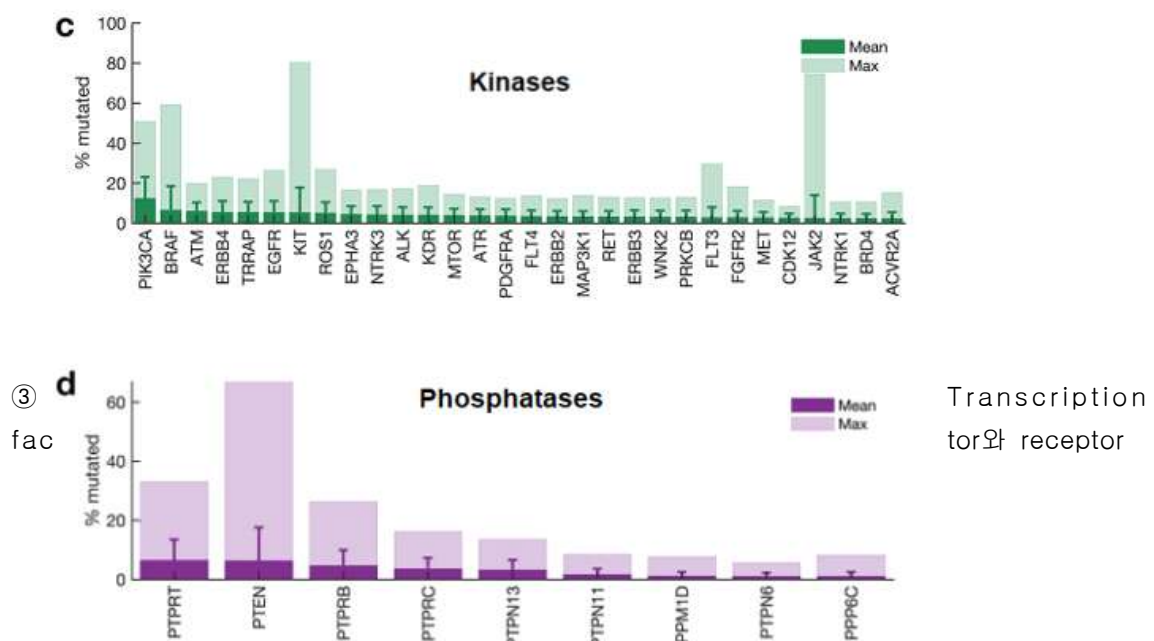
2) 암과 관련된 표적유전자와 돌연변이율

- 사람의 유전체는 유전자 20,500개 중 약 727-known cancer genes임 (Sinkala등, 2023). 이들 암은 727 개의 유전자 돌연변이로 발생하며 유전자의 비율로 측면에서 Tumour suppressor genes (94%), oncogenes (93%), transcription factors (72%), kinases (64%), cell surface receptors (63%), 그리고 phosphatases (22%)임. 다음은 발암과 관련된 주요 유전자임(Sinkala등, 2023)

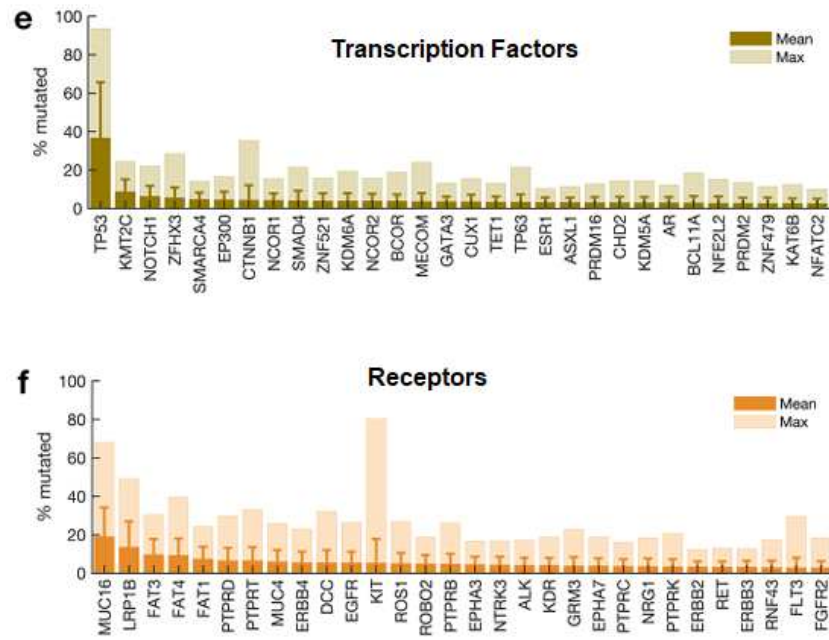
① Oncogenes & Tumour Suppressor genes



② Kinases & Phosphatases



Transcription
tor와 receptor



3) FDA-승인 targeted-anticancer small molecules

- Table 1은 2000년부터 2020년까지 미국 FDA 및 중국에서 승인된 small molecule 항암제 89종이며 receptor tyrosine kinases의 inhibitor 40종, non-receptor tyrosine kinases 저해제 11종, serine/threonine kinases 저해제 17종, epigenetic targets 저해제 8종, BCL-2, hedgehog pathway, proteasome, PARP 등의 저해제 11종 그리고 기타 2종 등으로 확인되었음. Cell cycle 및 세포분열과 관련된 kinase 저해제가 68종으로 전체의 76%로 가장 많았음.

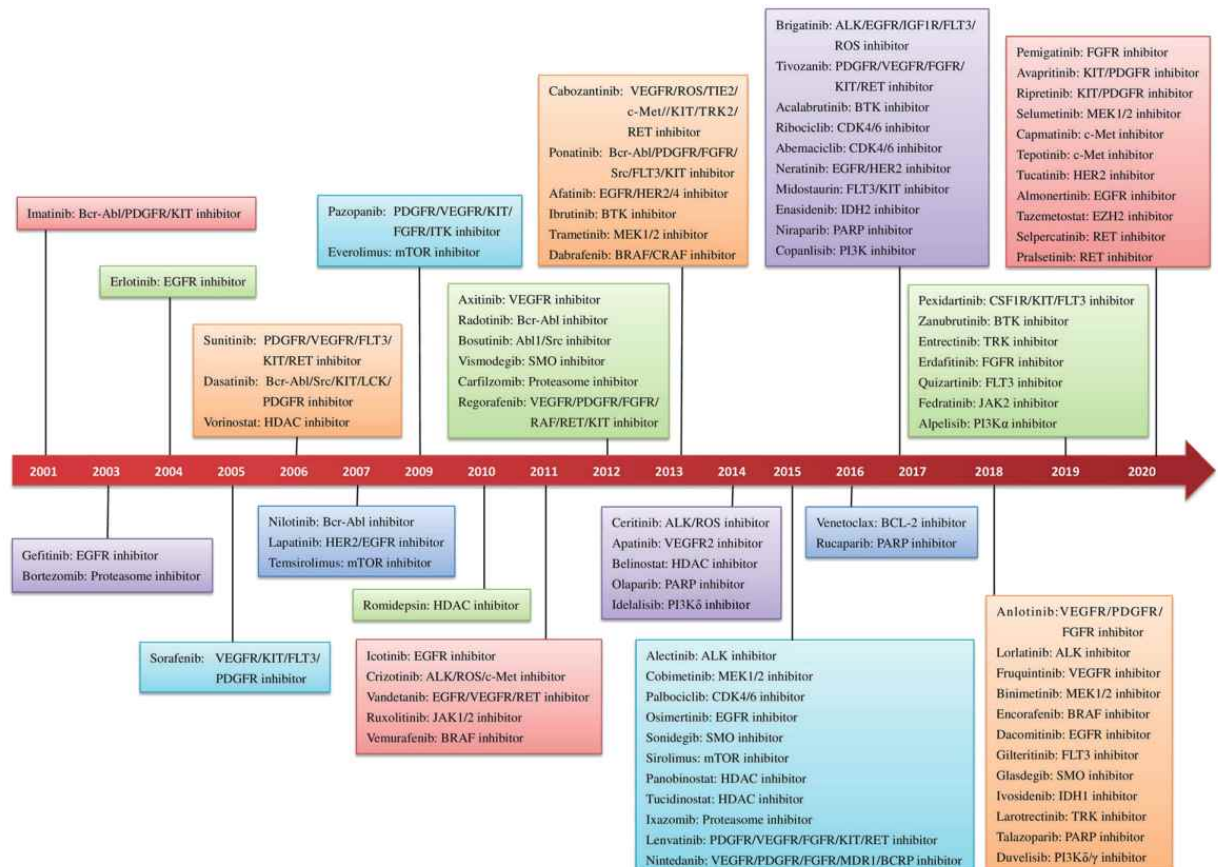


Fig. 1 Timeline for the approval of small-molecule targeted anti-cancer drugs

1-4. 병용요법의 가장 선호되는 조합 : 항체 + 화학요법

- 항체항암제 + 화학요법 및 ADC와 같은 항체 + 화학요법이 아래의 <표>와 같이 가장 상호 보완적인 측면에서 선호됨

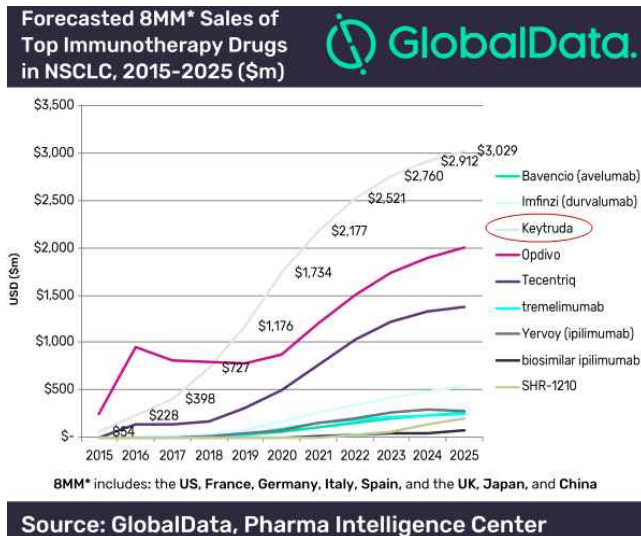
<표> 항체와 small molecule의 약물 모달리티에 따른 장단점

Small-molecule inhibitors	Monoclonal antibodies (mAbs)
<ul style="list-style-type: none"> • suitable for oral administration • less prone to the occurrence of serious immune-related adverse effects • good tissue permeability • low production cost compared with mAbs • potentially blood-brain barrier (BBB) penetrating drugs • faster body clearance to mAbs (need for multiple administrations) • variations in degradation system among patients • can act on intercellular targets, cell surface and secreted molecules • less specific than mAbs (ability to suppress multiple signalling pathways) • increased chance of toxicity due to diminished specificity 	<ul style="list-style-type: none"> • unsuitable for oral administration • more prone to the occurrence of serious immune-related adverse effects • poor tissue permeability, tumour retention and blood clearance • development of therapeutic mAbs is a difficult procedure that incurs substantial costs • no blood-brain barrier (BBB) penetration • mAb half-lives are much longer than those of small-molecule inhibitors • less variation in degradation system among patients compared with small-molecule inhibitors • can only act only on molecules present on the cell surface and secreted • more specific than small-molecule inhibitors • activate indirect auxiliary antitumor actions such antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC)

1) 항체항암제 및 ADC 항암제

① 면역관문 저해제(immune checkpoint inhibitor)

- Merck Sharp & Dohme (MSD)의 폐암과 흑색종 치료제 **Keytruda**(pembrolizumab)가 주요 9개의 면역항암제 중 가장 많이 이용되고 있음(Globaldata, 2018).



- 키트루다(Keytruda, 성분명 pembrolizumab):** 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)의 면역항암제. 암세포 표면의 PD-L1의 과발현은 면역 세포 표면의 programmed death ligand 1(PD-L1)의 과발현으로 T-cell의 programmed death 1(PD-1)과 결합하여 공격을 무력화. 펌브로리주맙(Pembrolizumab)은 PD-1과 결합하여 T-cell 활성화를 통해 항암효능 기전의 IgG4(단클론면역글로불린 G4 항체). <Figure 1>은 Pembrolizumab에 의한 PD-1의 저해를 통해 T-cell를 활성화를 유도하거나 다른 항체도 CTLA-4 등에 의한 TCR(T-cell receptor) signaling을 막는 단백질 불활성을 유도하는 항체임(Donisi 등, 2021)

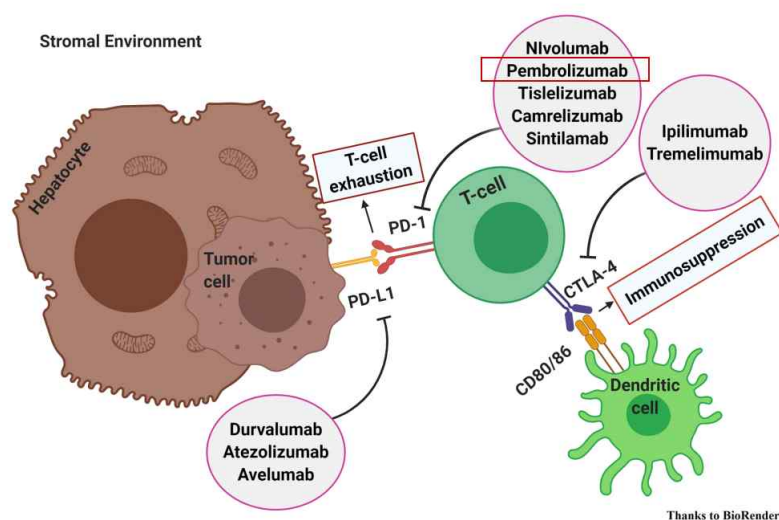


FIGURE 1 | Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. PD-1 binding its ligand PD-L1 prevents TCR signaling, blocks T cell proliferation, and induces the exhaustion of T cells. CTLA-4 binds CD80/CD86 and blocks activation of the T cells. The inhibition of immune checkpoints avoids immune exhaustion, reduces Treg activity, and leads to the reactivation of the anticancer immune response.

- 키트루다의 무상 공급을 통해 키트루다와의 병용요법 임상 연구만 전 **세계적으로 1,600여 건, 한국에선 약 120건의 임상연구**가 진행 중이며 4,100여 명이 참여중(바이오타임즈 2024.02.26)

② 항체-약물 복합체(antibody-drug conjugates)

- 아래의 <Figure 1.0>과 같이 ADC 역사의 항체를 이용한 항체항암제로 볼 수 있지만 항체가 cytotoxic drug를 암세포로의 유도 및 암세포 내부로의 유입 역할에서 **면역관문저해제형** 항체항암제 측면에서 차이가 있음

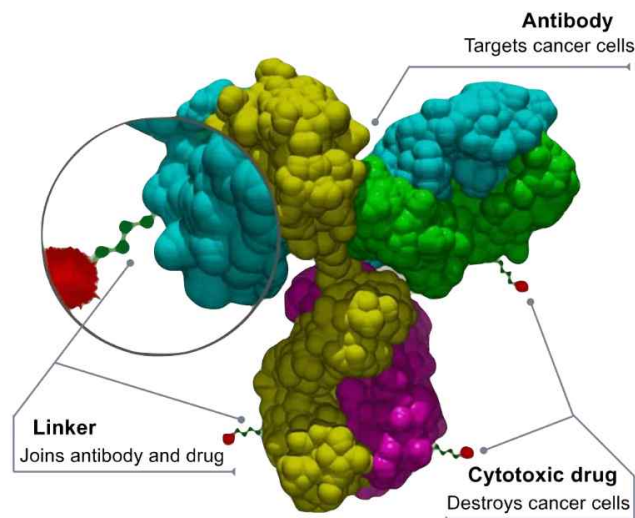


Figure 1.0: Structure of an antibody-drug conjugate
(Hofland, 2019)

1-5. 면역관문저해제(immune checkpoint inhibitor, ICI)와의 병용요법 개발을 위한 Small molecule 예시

- Table 1은 면역관문저해제 항체와의 병용요법 개발을 위해 사용된 small molecule 항암제의 비임상연구 모델을 요약한 것임(Vafaei 등, 2022)

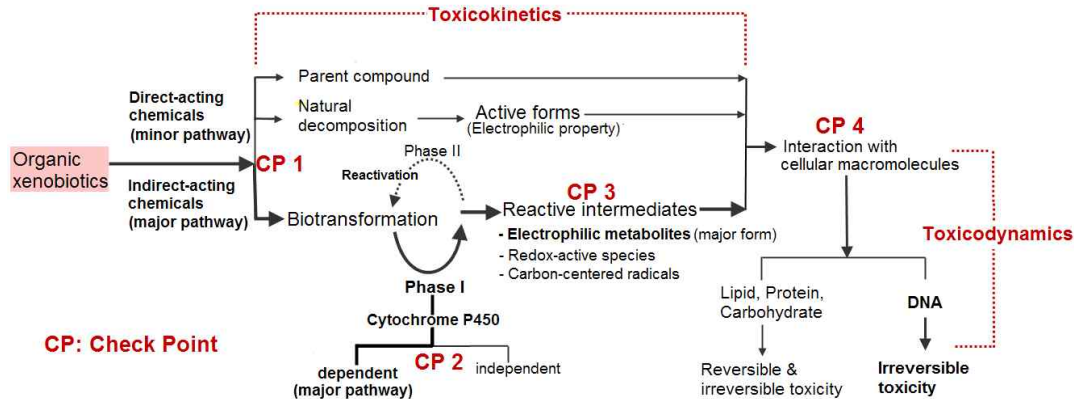
Table 1 ICI combination therapy with chemotherapy in preclinical models

Tumor	Target IC	Agent (s)	Result (s)	References
Triple-negative breast cancer	PD-1	Cyclophosphamide	Induction of the synergistic effect with ICI through induction of the antigen-presenting cells along with promoting intratumoral CD8 + T cells	[140]
B-cell lymphoma	PD-1	Vinorelbine	Induction of the synergistic effect	[141]
Breast cancer	PD-L1	Cyclophosphamide Fluorouracil		
Breast cancer	CTLA-4	Gemcitabine Cyclophosphamide	Stimulation of tumor regression, while some cases showed the development of spontaneous metastases	[142]
Colon cancer	PD-1	Methotrexate	Substantial robust anti-tumor response in vivo	[248]
Bladder cancer	PD-L1	Vinblastine Doxorubicin Cis-platin Cyclophosphamide		
Gastrointestinal cancer	PD-L1	Gemcitabine	Tumor growth inhibition, reducing MDSCs and M2 macrophages, and improved OS	[144]
Pancreatic ductal adenocarcinoma	PD-1	Gemcitabine	Inspiring the infiltration of Th1 lymphocytes and M1 macrophages along with extended OS	[249]
Small-cell lung carcinoma	PD-1 PD-L1	Gemcitabine	Improving the antitumorigenic CD8 + cytotoxic T cells, DCs, and M1 macrophage populations concurrently decrease in M2 macrophage and MDSCs, and finally enhancement in the expression of the type I interferon beta 1 gene, IFN β , and chemokines, CCL5 and CXCL10	[145]
Lewis lung carcinoma	PD-1	Gemcitabine	Robust anti-tumor impacts along with suppression of recurrence of LLC by rises in CD8 + and CD4 + T cells proportion	[146]
Mesothelioma	PD-1	Gemcitabine	Tumor regression and improved OS rate	[147]
Lewis lung carcinoma	PD-1	Oxaliplatin	Tumor regression by activation of APCs and TILs	[150]
Colon cancer	PD-1 PD-L1	Cisplatin Oxaliplatin	Promotion of the expression of T cell-attracting chemokines (CXCL9, CXCL10, and CCL5), and Provoking T cell activation and recruitment into TME	[151]
Triple-negative breast cancer	PD-1	Paclitaxel	Instigation of a synergistic effect with ICI through transforming the tumor immune microenvironment	[154]
Triple-negative breast cancer	PD-L1	Paclitaxel	Stimulating tumor regression, metastasis inhibition, and recurrence preventive	[155]
Colon cancer Cervical cancer Lung cancer Melanoma	PD-L1	Paclitaxel	Enhancing the infiltration and function of T cells and DCs within tumors	[156]
Colon cancer Bladder cancer	PD-1 PD-L1	Doxorubicin	Showing the anti-tumor impact of the combination of immunotherapy in the MC38 colon and MB49 bladder models, a lack of response in the 4T1 breast model, and suppression of ICIs potential in the MBT-2 bladder model	[248]
B cell lymphoma	PD-1	Doxorubicin	Verification of the therapeutic capacity of doxorubicin-loaded microbubbles (RDMs) with ICI	[250]
Ovarian cancer	PD-L1	Cisplatin	Prolonged OS of treated mice	[251]
Lung cancer	PD-L1	Cisplatin	Reducing tumor growth	[152]
B cell lymphoma	PD-1	Doxorubicin	Showing synergistic effects with ICI by up-regulation of IFN- γ	[252]
Fibrosarcoma	PD-1	Methotrexate	Notable anti-tumor effect in vivo	[253]

ICI immune checkpoint inhibitor, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed death-ligand 1, CTLA-4 cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4, IFN interferon, Tregs regulatory T cells, TME tumor microenvironment, TILs tumor-infiltrating lymphocytes, APC antigen-presenting cell, MDSC myeloid-derived suppressor cells, OS overall survival

1-6. 면역관문저해제와 병용요법의 Small molecule 개별 분석에 대한 가정

- 개별 분석을 위해 기본적인 가설은 모든 ICI는 동일한 효능을 나타내며 다음 <그림-1>에서처럼 유기물질의 독성기전에 대한 central dogma를 통해 설명됨.



<그림-1> 유기물질의 독성기전에 대한 Central dogma(박영철, 2010)

<참고문헌>

- ACTC (advanced cancer treatment center), All You Need to Know About Targeted Therapy for Cancer, January 04, 2023. <https://actchealth.com>
- American Cancer Society, Targeted Therapy. 2024. <https://cancer.org>.
- Courtney Misher. 2024. All About Targeted Therapy. Oncolink Trustees of The University of Pennsylvania. www.oncolink.org
- Sinkala M. Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers. Sci Rep. 2023 Aug 7;13(1):12742.
- Maliki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. Int J Mol Sci. 2020 Dec 24;22(1):130.
- Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, Yang W, Tian C, Miao Z, Wang T, Yang S. Small molecules in **targeted cancer therapy**: advances, challenges, and future perspectives. Signal Transduct Target Ther. 2021 May 31;6(1):201.
- Donisi C, Puzzoni M, Ziranu P, Lai E, Mariani S, Saba G, Impera V, Dubois M, Persano M, Migliari M, Pretta A, Liscia N, Astara G and Scartozzi M (2021) Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of HCC. Front. Oncol. 10:601240.
- Hofland, What are Antibody-drug Conjugates? ADC review. 2019.
- Vafaei S, Zekiy AO, Khanamir RA, Zaman BA, Ghayourvahdat A, Azimizonuzi H, Zamani M. Combination therapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs); a new frontier. Cancer Cell Int. 2022 Jan 3;22(1):2.
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN

978-89-268-1259-4.

- Mangó, K., Fekete, F., Kiss, Á.F. et al. Association between CYP2B6 genetic variability and cyclophosphamide therapy in pediatric patients with neuroblastoma. Sci Rep 13, 11770 (2023).
- Hughes E, Scurr M, Campbell E, Jones E, Godkin A, Gallimore A. T-cell modulation by cyclophosphamide for tumour therapy. Immunology. 2018 May;154(1):62-68.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

2. Cyclophosphamide(CPA) + 항체항암제의 병용요법 가능성 고찰

1) 일반적인 특성

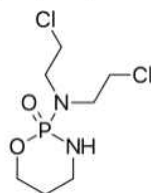
- Cyclophosphamide은 Table 1과 같이 면역관문 PD-1에 대한 저해 항체와의 병용요법으로 개발 중인 화학 항암제임(Vafaei 등, 2022).
- Nitrogen mustard계통의 세포독성 알킬화약물(alkylating agent)nitrogen mustard계통의 세포독성 알킬화약물(alkylating agent)
- 적응증은 호지킨병, 림프육종, 급성 림프구백혈병, 기관지암, 신경아세포종, Burkitt림프종, 유방암, 다발성 골수종, 만성 림프구 백혈병, 난소암, 자궁경부암 등이다. 또한 장기 이식 거부반응의 예방과 비정상적인 면역기능항진 때에도 사용<네이버 지식백과>

Table 1 ICI combination therapy with chemotherapy in preclinical models

Tumor	Target IC	Agent (s)	Result (s)	References
Triple-negative breast cancer	PD-1	Cyclophosphamide	Induction of the synergistic effect with ICI through induction of the antigen-presenting cells along with promoting intratumoral CD8+T cells	[140]

(Vafaei 등, 2022)

Cyclophosphamide

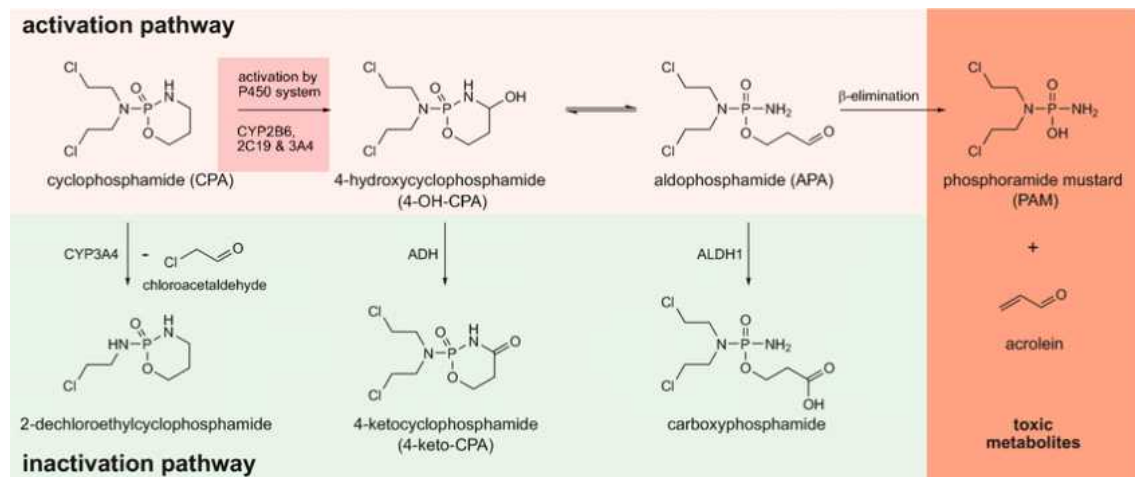


Legal status	
Legal status	US: R-only In general: R (Prescription only)
Pharmacokinetic data	
Bioavailability	>75% (by mouth)
Protein binding	>60%
Metabolism	Liver
Elimination half-life	3–12 hours
Excretion	Kidney
Identifiers	
IUPAC name	[show]
CAS Number	50-18-0 ↗
PubChem CID	2907 ↗
Chemical and physical data	
Formula	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P
Molar mass	261.08 g·mol ^{−1}

(Wikipedia, 2024)

2) CPA의 biotransformation(생화학적 전환)과 핵심 항암 약리작용의 대사체

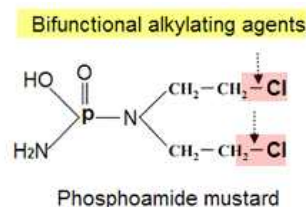
- <그림-1> 유기물질의 독성기전에 대한 Central dogma(박영철, 2010)의 CP2에서는 CYP2B6, CYP3A4, CYP2C9, 그리고 CYP2C19 등에 의해 CP3에서 electrophilic metabolite(친전자성 대사체)인 phosphoramidate mustard 생성으로 암세포 독성의 항암 기전(Ramirez 등, 2019; Steinbrecht 등, 2020). Aldehyde dehydrogenase(ALDH1, 알데히드탈수소효소)는 aldophosphamide를 carboxyphosphamide로 전환을 유도하여 항암효능을 지닌 친전자성대사체인 phosphoramidate mustard 생성을 감소시킴(Mangó 등, 2023). Phosphoramidate mustard는 DNA와 결합하는 hard electrophilic metabolite이며 또 다른 친전자성 대사체인 acrolein은 단백질과 결합하여 활성을 저해시키는 soft electrophilic metabolite임(박영철, 2010)



<그림> Cytochrome P450 및 Aldehyde dehydrogenase(ALDH1)에 의한 활성 및 비활성 경로: 암세포에 대한 항암기전은 활성경로(activation pathway)를 통해 이루어짐(Steinbrecht 등, 2020)

3) Phosphoramidate mustard의 암세포에 대한 MOA(mode of action)

- CPA는 Bifunctional alkylating agent(복수작용 알킬화 물질)로 아래의 <그림>에서처럼 2개의 친전자성 부위를 가져 DNA 2 나선의 염기에 각각 공유결합하여 나선간 교차결합(Inter-strand crosslink) 및 나선내 교차결합(Intra-strand crosslink)을 통해 염색체 수준의 유전독성을 유발함(박영철, 2010). 이와 같은 기전으로 지난 60년 동안 다발골수종(multiple myeloma) 치료를 위해 사용되었음(Swan 등, 2020).



<그림> phosphoramidate의 bifunctional alkylating agent

4) CPA의 면역계에 대한 영향

- 리툭시맙(rituximab)은 특정 자가면역질환이나 암을 치료하기 위해 쓰이는 단클론 항체 약물임. 아래의 Figure 3은 B세포의 표면 항원인 CD20을 표적하여 B-cell 활성을 저해하는 리툭시맙과 더불어 CPA도 역시 시너지 효과를 나타내는 면역활성 억제. 이와 같은 기전으로 CPA는 막성신증(membranous nepropathy) 치료에 보조 역할(Rojas-Rivera 등, 2012)

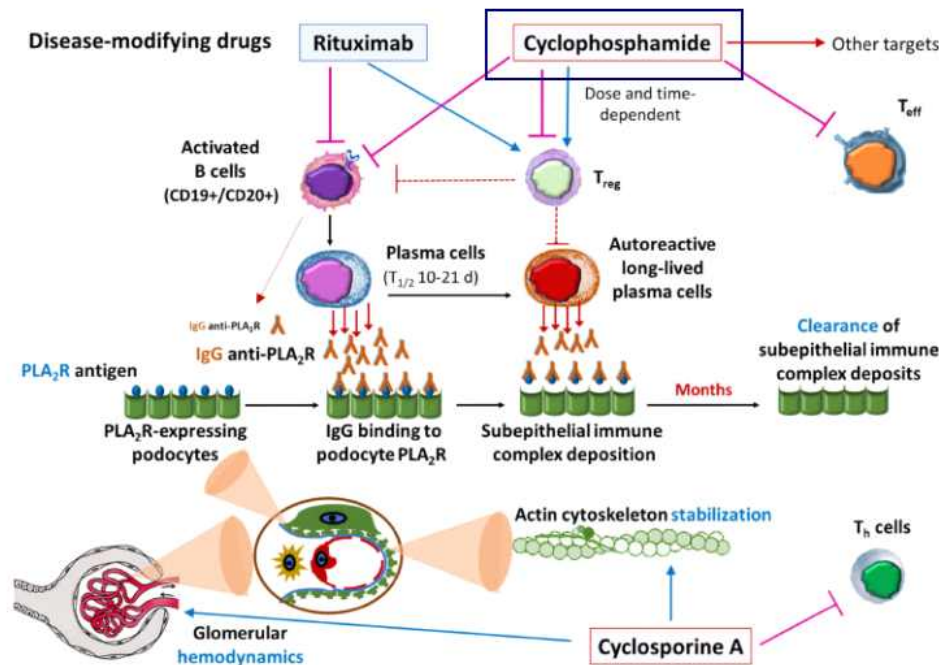


FIGURE 3: Pathogenesis of membranous nephropathy and mechanism of action of rituximab, CNIs and cyclophosphamide: working hypothesis to explain the timing of response and different clinical impact. Idiopathic membranous nephropathy is an autoimmune disease caused by autoantibodies that bind to the podocyte cell surface antigen PLA2R, leading to podocyte injury and sub-epithelial immune complex deposits that may take months to clear after total cessation of antibody production. B cells may already produce immunoglobulin G (IgG), but the bulk of it is produced by more mature plasma cells, which usually have a half-life of a few weeks to months. However, a few plasma cells are long-lived and continue to produce antigen-specific IgG. Regulatory T cells (Tregs) prevent the emergence of these long-lived plasma cells and suppress activated B cells [11]. Plasma cells are not rituximab targets. Rituximab binds to and kills CD20-expressing B cells. B-cell death may involve different molecular mechanisms but complement-mediated cell death appears to be important since cell culture studies have identified specific complement regulatory protein that confers resistance to rituximab-induced B-cell death [12]. Additionally, membranous nephropathy patients responding to rituximab display an upregulation of Tregs, which is not present in patients not responding or in controls [13]. Cyclophosphamide selectively targets T, B and other lymphocytes over other cell types, as they have the molecular machinery to activate cyclophosphamide through a β -elimination reaction [14]. However, it has off-target effects in multiple other cell types, and the impact of cyclophosphamide on Tregs is dose and time sensitive [15]. This variable impact of cyclophosphamide on Tregs, in which lower doses may actually inhibit Tregs [16], may underlie the relatively high relapse rate as opposed to rituximab. Finally, cyclosporine A is a T cell immunosuppressive drug that additionally has glomerular haemodynamic effects, decreasing GFR and proteinuria, as well as an actin cytoskeleton-stabilizing effect on podocytes that may also contribute to decrease proteinuria [17]. Frequent need for continuous administration of the drug to maintain remission points is an important contribution of direct impact on glomerular haemodynamics and podocytes, which require continuous presence of the drug. From this point of view, rituximab and cyclophosphamide may be considered disease-modifying drugs, but the use of this term for cyclosporine A may be disputed.

5) 항체항암제와 병용요법을 위한 CPA에 대한 독성학적 결론

- 항체항암제는 기본적으로 T-cell 활성을 통해 암세포 제거 기전인데 CPA는 B-Cell 및 T-cell 등의 면역세포 활성 억제를 통해 항체항암제의 암세포 제거에 역기능의 가능성이 있음.
- 항암 MOA(mode of action)의 대사체인 phosphoramidate mustard는 **염색체수준의 손상을 통해 암세포 제거하는 강력한 cytotoxicity를 유발하는 항암제임.**
- 로 ADC(antibody-drug conjugates)의 payload로의 사용은 부작용을 줄일 수 있음. 그러나 항체치료제와 함께는 정상세포의 우회 돌연변이 또는 2차 돌연변이 가능성이 있음.
- 또 다른 친전자성 대사체인 acrolein은 전신혈관계에 유입, 정상세포의 단백질과의 공유 결합 및 지질과의 반응을 통해 지질과산화 연쇄반응을 유도하여 심각한 부작용 유발할 수 있음.
- 다음과 같은 Cyclophosphamide 항암제의 특성 요약

항암제	Pharmacophore의 화학적 특성 (Prodrug vs Active drug)	Mode of action	Biotransformation (생화학적 전환)
Cyclophosphamide • MW: 261.08	<ul style="list-style-type: none"> 친전자성 대사체 Prodrug 	<ul style="list-style-type: none"> Biofunctional DNA alkylation 	<ul style="list-style-type: none"> CYP2B6, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19에 의한 Electrophilic metabolite: Phosphoramidate mustard & Acrolein ALDH 대사에 의한 inactive 대사체

<참고문헌>

- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Ramirez DA, Collins KP, Aradi AE, Conger KA, Gustafson DL. Kinetics of Cyclophosphamide Metabolism in Humans, Dogs, Cats, and Mice and Relationship to Cytotoxic Activity and Pharmacokinetics. Drug Metab Dispos. 2019 Mar;47(3):257-268.
- Steinbrecht S, Kiebitz J, König R, Thiessen M, Schmidtke KU, Kammerer S, Küpper JH, Scheibner K. Synthesis of cyclophosphamide metabolites by a peroxygenase from Marasmius rotula for toxicological studies on human cancer cells. AMB Express. 2020 Jul 18;10(1):128.
- Swan D, Gurney M, Krawczyk J, Ryan AE, O'Dwyer M. Beyond DNA Damage: Exploring the Immunomodulatory Effects of Cyclophosphamide in Multiple Myeloma. Hemasphere. 2020 Apr 3;4(2):e350.
- Rojas-Rivera, Jorge E et al. "Treatment of idiopathic membranous nephropathy in adults: KDIGO 2012, cyclophosphamide and cyclosporine A are out, rituximab is the new normal." Clinical Kidney Journal 12 (2019): 629 - 638.
- Vafaei S, Zekiy AO, Khanamir RA, Zaman BA, Ghayourvahdat A, Azimizonuzi H, Zamani M. Combination therapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs); a new

frontier. Cancer Cell Int. 2022 Jan 3;22(1):2.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

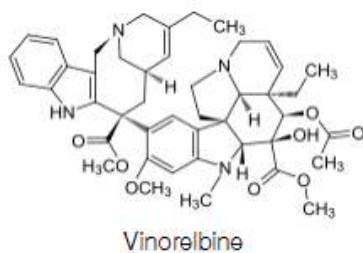
3. Vinorelbine + 항체항암제의 병용요법과 새로운 적응증 약물 개발 가능성에 대한 대사체 스크린

1) 일반적인 특성

- 비노렐빈(vinorelbine)도 cyclophosphamide와 같이 T-cell의 면역관문 PD-1에 대한 저해 항체와의 병용요법으로 개발 중인 화학 항암제임. 비소세포(non-small cell) 폐암, 유방암, 자궁암, 난소암. 호지킨 림프종, 카포시육종 등의 치료를 위해 주사 또는 경구로 투여되는 vinca alkaloid 계통의 항암제(Vafaei 등, 2022). 상품명으로 나벨빈(Navelbine)이라고 함.

Table 1 ICI combination therapy with chemotherapy in preclinical models

Tumor	Target IC	Agent (s)	Result (s)	References
Triple-negative breast cancer	PD-1	Cyclophosphamide	Induction of the synergistic effect with ICI through induction of the antigen-presenting cells along with promoting intratumoral CD8+T cells	[140]
B-cell lymphoma	PD-1	Vinorelbine	Induction of the synergistic effect	[141]



Legal status	
Legal status	US: WARNING ^[2] Rx-only
Chemical and physical data	
Formula	C ₄₅ H ₅₄ N ₄ O ₈
Molar mass	778.947 g·mol ⁻¹
3D model (JSmol)	Interactive image ^[2]
Pharmacokinetic data	
Bioavailability	43 ± 14% (oral) ^[3]
Protein binding	79 to 91%
Metabolism	liver (CYP3A4-mediated)
Elimination half-life	27.7 to 43.6 hours
Excretion	Fecal (46%) and kidney (18%)
Identifiers	
CAS Number	71486-22-1 ↗ ✓
PubChem CID	5311497 ↗

(Wikipedia, 2024)

- Vinca alkaloid:** 협죽도과에 속하는 식물, vinca 혹은 periwinkle에서 추출한 화합물, 혹은 이와 구조가 유사한 실험실에서 제조된 물질. 여러 종류의 암에서 많이 사용되고 있는 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine), 빈데신(vindesine) 등과 같은 항암제가 다 합성 제조된 물질. 모든 빈카 알칼로이드 제제는 전부 미세관에 결합하여 미세관 기능을 억제시켜 세포분열을 막음으로써 항암 작용. Vinca alkaloid는 주로 주사제이며 간에서 대사되어 배설됨. 부작용은 각각의 약물에 따라 조금씩 다르나 골수 기능저하, 신경독성, 탈모, 약물의 혈관 유출로 인한 조직 손상 등이 나타날 수 있음<네이버 지식백과>

2) 핵심 항암 약리작용의 원물질

① **Pharmacophore**: Vinorelbine은 Vincristine 및 Vinblastine 등의 vinca alkaloid는 대사체가 아니라 **원물질 자체**가 Figure 3에서처럼 4곳 active site를 가진 약리작용분자단(pharmacophore) 존재(Khan 등, 2016).

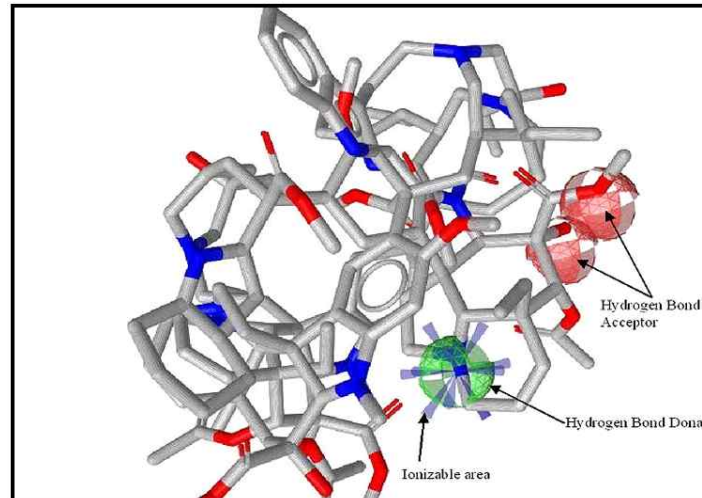


Figure 3: Shared Feature(입체 및 전자적 특징) Pharmacophore of Vinorelbine, Vincristine and Vinblastine showing four common features (one hydrogen bond Donar: green sphere, two hydrogen bonds Acceptor: Red sphere and one ionizable area: Blue asterisk).

② **Tubulin-binding site**: 세포골격(cytoskeleton)을 구성하는 미세소관(microtubule)을 구성하는 단위 단백질인 tubulin과의 상호작용을 통해 미세소관의 합성 및 분해를 저해함. 미세소관은 세포 골격 구성 외에도 세포분열, 세포 모양 형성, 세포 내 물질 이동 등에 관여함. 따라서 tubulin과의 상호작용을 통해 미세소관의 합성 및 분해의 저해는 세포의 죽음을 초래함, Tubulin은 α -tubulin과 β -tubulin 소단위로 구성되어 있는데 Vinorelbine은 β -tubulin에 결합하여 microtubule 합성을 저해함(Zhang 등, 2020; Steinmetz 등, 2018). 이어 1 같은 항암제를 microtubule-targeting agents라고 함.

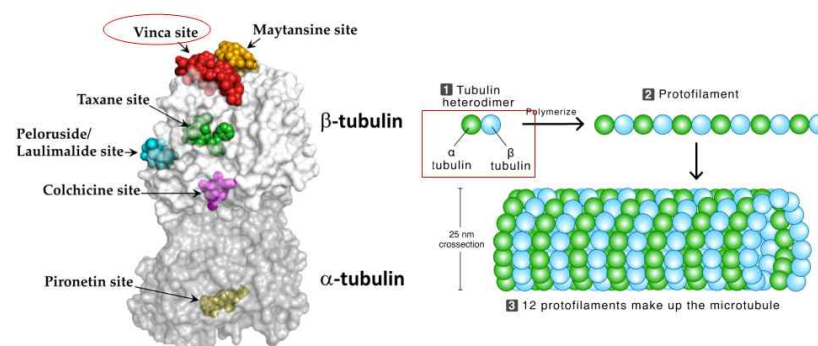


Figure 1. The known binding sites of microtubule-targeting agents on tubulin. The α -tubulin (dark grey) and β -tubulin (light grey) dimers with bound ligands are presented in semitransparent surface. The representative ligand structures for each site were superimposed onto their appropriate binding sites. The image is adapted from Steinmetz MO and Prota AE [14] by obtaining Copyright clearance from the publisher, Elsevier, and the permission from the authors.

- Table 2는 Vinorelbine 유사체인 vinblastine이 tubulin과의 pharmacophore의 화학적 특성을 나타낸 것임(Chagas 등, 2019).

Table 2. Residues That Are Majorly Involved in the Binding of VLB into the Tubulin Heterodimer^a

subunit	hydrogen bonds	hydrophobic interactions
α -tubulin	<u>Asn329</u> , Lys336	Leu248, Ile332 Thr349, Gly350, Phe351, Val353
β -tubulin	Lys176, <u>Val177</u>	Ser178, Asp179, Tyr210, Pro222

^aResidues underlined bind via H-bonds with the CT moiety of VLB, whereas those in italic interact with the vindoline moiety of VLB.

③ **항암기전 (MOA):** Vinorelbine 등의 vinca alkaloid는 미세소관(microtubule, MT)의 탈중합(depolymerization)을 촉진하여 항암작용. Vinorelbine의 고농도에서는 탈중합에 의한 항암작용이지만 저농도에서는 암세포 유사분열 시 형성되는 방추사(spindle fiber)에 방해 및 암세포자멸(apoptosis)을 유도함. 반면에 Figure 2에서처럼 paclitaxel(taxane), laulimalide, epothilone 등은 탈중합 억제제를 통한 미세소관의 안정화(stabilization)를 유도하여 유사분열 억제 및 세포자멸을 유도하는 항암효능을 나타냄(Pérez-Peña 등, 2023; Steinmetz 등, 2018; Calinescu 등, 2016).

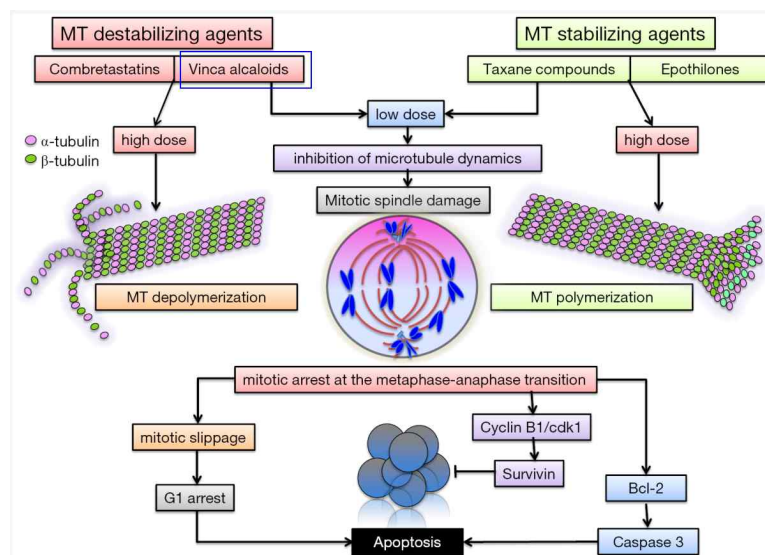
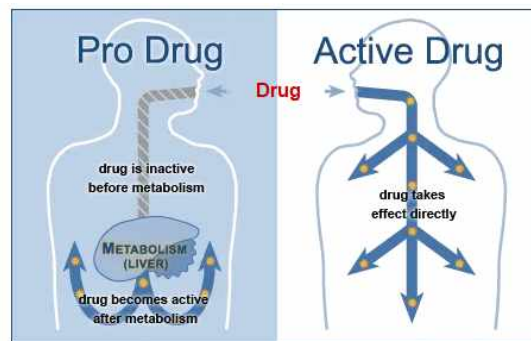


Figure 2 Schematic depicting proposed mechanism of action of the different classes of microtubule targeting agents. At high dose combretastatins and vinca alkaloids induce microtubule (MT) depolymerization, whereas taxols and epothilones promote microtubule polymerization; at low dose, all microtubule-binding agents inhibit microtubule dynamics, prevent the proper alignment of chromosomes at the metaphase plate and segregation of chromosomes in anaphase, leading to mitotic arrest and apoptosis.(Calinescu 등, 2016).

3) Vinorelbine의 biotransformation(생화학적 전환)과 독성학적 특성

① **Prodrug vs Active drug**: 약물은 효능측면에서 대사없이 원물질이 체내에서 약리작용하는 active drug과 대사 또는 biotransformation 후 대사체가 약리작용을 하는 prodrug으로 구분함(Oyon, 2015). Vinorelbine은 biotransformation 전 원물질 자체가 약리작용분자단을 가진 Active drug임



<그림> Prodrug vs Active drug의 차이점

② **Biotransformation(생화학적 전환)**: Table 1은 잘 연구가 된 vinblastine과 vinorelbine의 화학적 구조를 비교한 것임. 모두 catharantine과 vindoline moiety로 구성되어 있지만 vinorelbine에서는 catharantine moiety C20'에서 -OH기가 없는 것이 차이이며 전반적으로 대사 과정은 차이가 없음(Chagas 등, 2019).

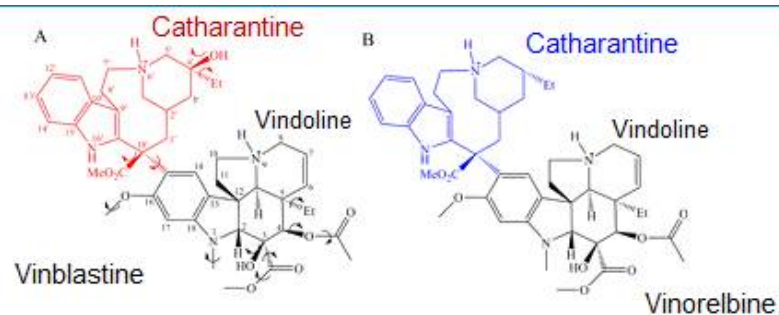


Figure 1. Chemical structures of (A) VLB and (B) vinorelbine.

- Vinblastine과 vinorelbine의 Cytochrome P450에 의한 전환: Vinblastine의 대사체는 Figure 2에서처럼 35개이며 주로 CYP3A4 및 CYP2D6에 의해 제1상반응에서 대사됨.

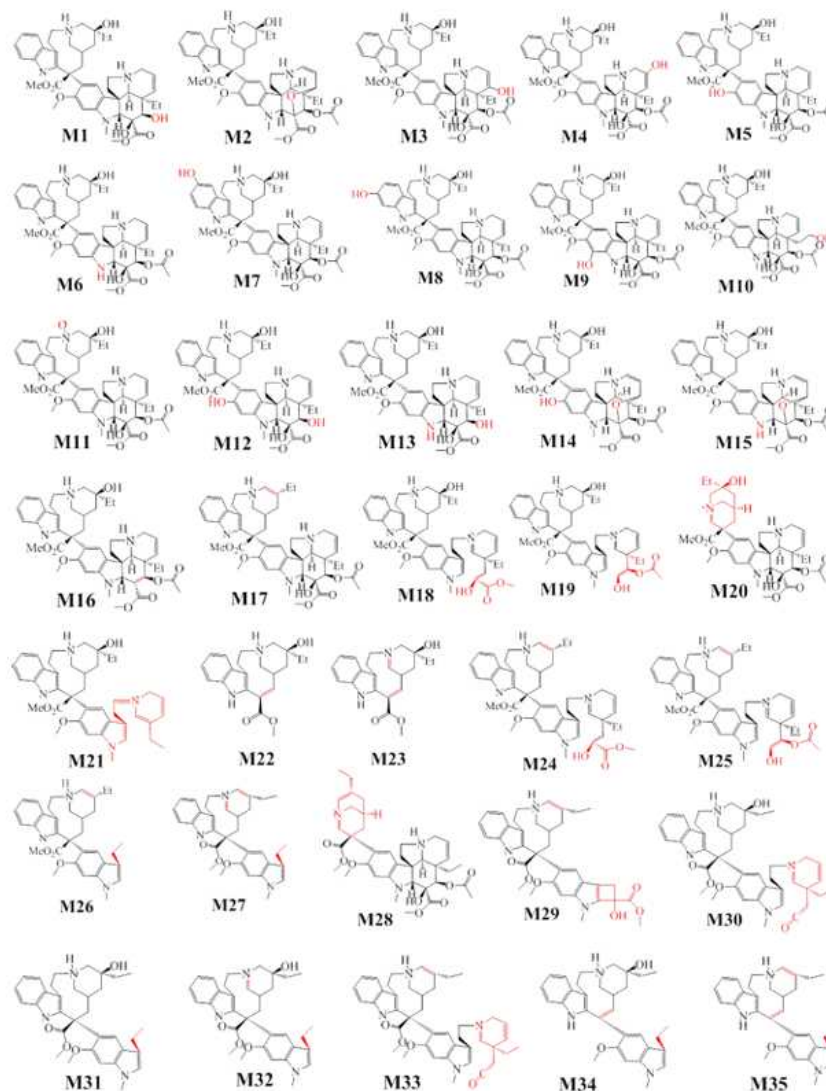


Figure 2. Thirty-five identified metabolites of vinblastine

- Vinblastine과 vinorelbine의 제2상반응: Table 2에서처럼 cytochrome P450에 의해 전환된 극성대사체 -OH 부분에 당으로 포함되어 친수성대사체로 전환하는 제2상반응인 glucuronidation(Chagas 등, 2019).

Table 7. Phase II of Metabolites of VLB with Isoenzymes UGT1A3, UGT1A8, and UGT2B7

qualitative model of glucuronidation by UGT1A3	qualitative model of glucuronidation by UGT1A8	qualitative model of glucuronidation by UGT2B7
MTB9 (45%)	MTB19	MTB22 (61%)
MTB26 (49%)		MTB23 (65%)
MTB27 (49%)		
MTB32 (47%)		

- Vinblastine과 vinorelbine의 biotransformation 특성: vinorelbine은 active drug으로 biotransformation을 통해 35개의 극성대사체로 전환되며 그리고 당 포함반응에 의한 친수성대사체를 전환됨.

④ 대사체의 독성학적 특성

- 화학요법의 대표적인 약물이상반응(adverse drug response, ADR)은 오심과 구토임.
- Vinblastine과 vinorelbine 그리고 수많은 대사체는 Nausea-Associated Receptors(구토-관련 수용체)로는 dopaminergic receptor, histaminic receptor, muscarinic receptor 그리고 serotonergic receptor 등이 있음. Vinblastine과 vinorelbine 그리고 수많은 대사체 등은 이들 수용체와 결합하여 구토를 유발함(Chagas 등, 2019). Figure 3은 Vinblastine과 대사체 34가 dopaminergic receptor과 결합을 나타낸 모식도(Chagas 등, 2019).

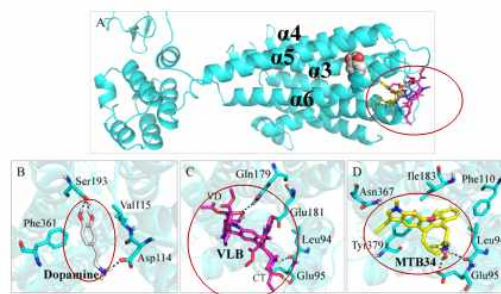


Figure 3. Main binding interactions at the dopaminergic receptor D₂. (A) Pose views of overlaid dopamine (spheres), VLB, and metabolite 34 docked into D₂R (sticks). Binding interactions of (B) dopamine; (C) VLB; and (D) metabolite 34. Hydrogen bonds are shown in dashed lines.

4) 항체항암제와 병용요법을 위한 비노렐빈(vinorelbine)에 대한 독성학적 결론

- Vinorelbine은 active drug으로 원물질 자체에 pharmacophore를 가진 항암제이며 β -tubulin에 결합 및 microtubule 합성 저해를 통해 암세포 사멸을 유도하는 항암기전
- Vinblastine 및 Vinorelbine은 CYP3A4 및 CYP2D6 등에 의해 대사됨. 대사체는 35개 정도이며 제2상반응인 glucuronidation conjugation에 의해 친수성 대사체로 배출됨.
- 화학용법 항암제 투여에 의해 가장 많이 발생하는 증상은 오심 및 구토 유발임. 오심-관련 수용체로는 dopaminergic receptor, histaminic receptor, muscarinic receptor 그리고 serotonergic receptor 등에 vinblastine 및 vinorelbine의 대사체
- 다음과 같이 비노렐빈(vinorelbine) 항암제의 대사적 특성 요약

항암제	<ul style="list-style-type: none"> • Prodrug vs Active drug • Pharmacophore의 화학적 특성 	Mode of action	<ul style="list-style-type: none"> • Biotransformation 과정 (생화학적 전환) • 특이사항
Vinorelbine (MW 778.9)	<ul style="list-style-type: none"> • Active drug • 수소결합 및 이온결합의 비공유결합 	Tubulin destabilization	<ul style="list-style-type: none"> • 주로 CYP3A4 및 CYP2D6에 의해 35개 대사체 유도 및 glucuronidation에 의한 배출 • 원물질 및 대사체에 의해 dopaminergic receptor, histaminic receptor, muscarinic receptor 그리고 serotonergic receptor 등과 비공유결합하여 오심 및 구토 등 유발. 이에 대사체에 대한 스크린을 통해 이들 수용체-특이적 저해를 기반으로 하는 적응증의 신약개발 가능

<참고문헌>

- Oyon B. Pharmacological Effects, Prodrugs (Definition, Examples) and Sources of Drug Information Updated: Sep 17, 2015. <https://discover.hubpages.com/>
- Calinescu AA, Castro MG. Microtubule targeting agents in glioma. *Transl Cancer Res.* 2016 Jun;5(Suppl 1):S54–S60.
- Chagas CM, Alisaraie L. Metabolites of Vinca Alkaloid Vinblastine: Tubulin Binding and Activation of Nausea-Associated Receptors. *ACS Omega.* 2019 Jun 4;4(6):9784–9799.
- Pérez-Peña H, Abel AC, Shevelev M, Prota AE, Pieraccini S, Horvath D. Computational Approaches to the Rational Design of Tubulin-Targeting Agents. *Biomolecules.* 2023 Feb 2;13(2):285.
- Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2018 Oct;28(10):776–792.
- Zhang D, Kanakanthara A. Beyond the Paclitaxel and Vinca Alkaloids: Next Generation of Plant-Derived Microtubule-Targeting Agents with Potential Anticancer Activity. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 29;12(7):1721.
- Khan AH, Prakash A, Kumar D, Rawat AK, Srivastava R, Srivastava S. Virtual screening and pharmacophore studies for ftase inhibitors using Indian plant anticancer compounds database. *Bioinformation.* 2010 Jul 6;5(2):62–6.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

4. Gemcitabine + 항체항암제의 병용요법과 임상최대용량 설정의 특이성

1) 젬시타빈(Gemcitabine)의 일반적인 사항

① Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4): CTLA-4는 T 세포의 표면에 발현되며 항원표지세포(antigen-presenting cell)의 B7과 결합하여 T세포의 활성화 신호를 차단함 (Donisi 등, 2021).

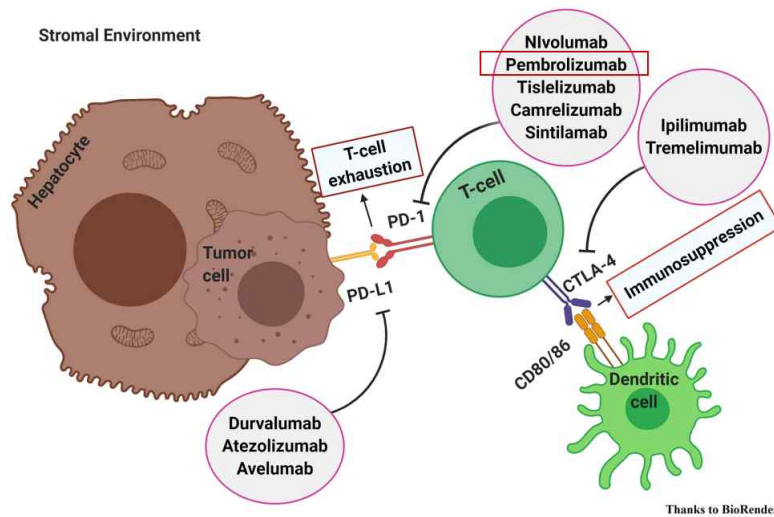


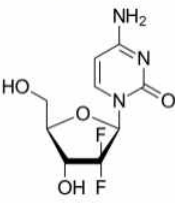
FIGURE 1 | Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. PD-1 binding its ligand PD-L1 prevents TCR signaling, blocks T cell proliferation, and induces the exhaustion of T cells. CTLA-4 binds CD80/CD86 and blocks activation of the T cells. The inhibition of immune checkpoints avoids immune exhaustion, reduces Treg activity, and leads to the reactivation of the anticancer immune response.

② 젬시타빈(Gemcitabine)과 항체항암제의 병용요법: 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)의 면역항암제인 Ipilimumab와 Tremelimumab 등은 CTLA-4와 결합하여 T-cell 활성화 및 암세포 제거를 유도하는 항체항암제임(Donisi 등, 2021). 젬시타빈(Gemcitabine)은 Table 1에서처럼 유방암 치료에 이들 항체항암제와 병용요법으로 임상시험 중에 있음 (Vafaei 등, 2022).

Table 1 ICI combination therapy with chemotherapy in preclinical models

Tumor	Target IC	Agent (s)	Result (s)	References
Triple-negative breast cancer	PD-1	Cyclophosphamide	Induction of the synergistic effect with ICI through induction of the antigen-presenting cells along with promoting intratumoral CD8 + T cells	[140]
B-cell lymphoma	PD-1	Vinorelbine	Induction of the synergistic effect	[141]
Breast cancer	PD-L1	Cyclophosphamide Fluorouracil		
Breast cancer	CTLA-4	Gemcitabine Cyclophosphamide	Stimulation of tumor regression, while some cases showed the development of spontaneous metastases	[142]

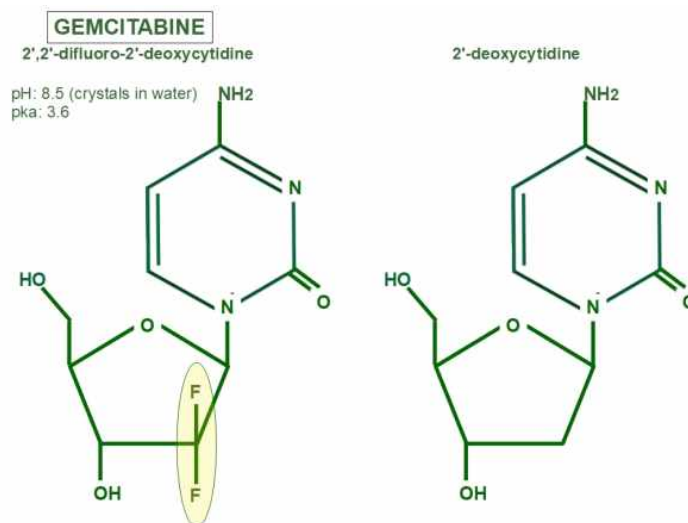
③ 젬시타빈(Gemcitabine)의 화학적 특성

Gemcitabine	
	
Legal status	
Legal status	US: R-only In general: R (Prescription only)
Pharmacokinetic data	
Protein binding	<10%
Elimination half-life	Short infusions: 32–94 minutes Long infusions: 245–638 minutes
Identifiers	
IUPAC name	[show]
CAS Number	95058-81-4 ✓
PubChem CID	60750
Chemical and physical data	
Formula	C ₉ H ₁₁ F ₂ N ₃ O ₄
Molar mass	263.201 g·mol ⁻¹

<Wikipedia, 2024>

2) 젬시타빈(Gemcitabine)의 항암 MOA(mode of action)

① Nucleoside 유사체: Gemcitabine은 DNA 4개의 염기 중 하나인 2-deoxycytidine(cytosine deoxyribonucleoside)의 유사체이며 Figure 2의 노란 부분에서 차이(Koltai 등, 2022).



(Koltai 등, 2022)

Figure 2. Gemcitabine chemical formula [222] on the left side. The right side shows 2-deoxycytidine (cytosine deoxyribonucleoside), the nucleoside which gemcitabine competes against. Cytosine deoxyribonucleoside is one of the four nucleosides that form part of DNA.

② **Gemcitabine biotransformation:** Nucleoside 유사체로 다음의 항암 기전에서처럼 인산화 및 cytidine deaminase에 탈아미노화를 통해 배출

③ 젬시타빈의 4 단계 항암 및 내성 MOA

1. **Drug access to the cell:** Nucleoside의 세포 내외부의 양방향 통행의 막운반단백질인 Human equilibrative nuclear transporters (hENT)와 내부 이동의 단일 방향 막 운반단백질인 Human nucleoside concentrative transporters (hCNTs)를 통해 세포 내부로 이동(koltai 등, 2022; Hawrytkiewicz 등, 2021).

2. **Intracellular activation:** Deoxycytidine kinase, nucleoside monophosphate kinase와 nucleoside diphosphate kinase에 의해 3 인산화를 통해 difluoro deoxycytidine monophosphate(dFdCMP), difluoro deoxycytidine diphosphate(dFdCDP), difluoro deoxycytidine triphosphate(dFdCTP)로 전환.

3. **Effects on DNA synthesis:** Difluoro deoxycytidine triphosphate(dFdCTP)가 DNA에서 삽입됨. 삽입된 dFdCTP는 irreparable error를 유도하여 향후 DNA 합성을 방해함. 즉, 암세포의 DNA 복제 과정 중에 대신 결합하여 암세포의 분열을 저해하는 세포독성 항암제 (cytotoxic anticancer).

4. **Intracellular inactivation:** Difluoro deoxycytidine diphosphate(dFdCDP)는 ribose nucleotide를 deoxyribose nucleotide로 전환을 유도하는 ribonucleotide reductase 효소를 저해하여 DAN 합성 방해. 그리고 cytidine deaminase는 젬시타빈(Gemcitabine)을 s gemcitabine into 2',2'-difluorodeoxyuridine의 전환을 유도하여 세포 배출 및 약물 내성 증가(Hrubá 등, 2023).

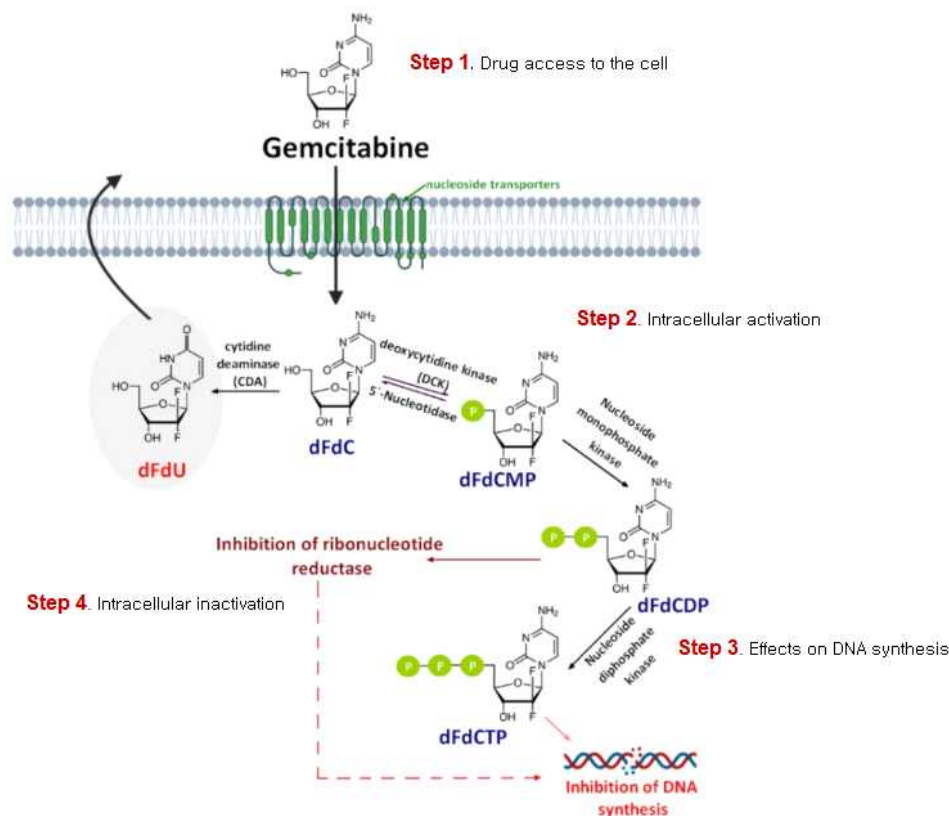


Figure 1. A schematic of gemcitabine (dFdC) cellular uptake, mechanism of action, and metabolism. dFdCMP: Gemcitabine monophosphate; dFdCDP: Gemcitabine diphosphate; dFdCTP: Gemcitabine triphosphate; and dFdU: 2',2'-difluoro-2'-deoxyuridine(koltai 등, 2022; Hawrytkiewicz 등, 2021).

3) 젬시타빈(Gemcitabine)의 임상최대초기권장용량 설정과 항암제 비임상 독성시험에 대한 이해

3-1) 일반적인 small molecule(저분자 합성물질) 약물의 MRSD

- Small molecule의 MRSD 산출방식은 HED(Human equivalent dose) 추정 방법에 따라 2가지 방법

① 전환계수(Km) 방식

- <표-1>과 <표 11-5>는 반복투여독성시험에서 추정된 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대비독성용량)을 이용하여 임상시험에서 1일 투여용량인 MRSD(maximum recommended starting dose, 임상최대초기권장용량)를 산출하는 공식을 나타낸 것임(박영철, 2023)

<표-1> MRSD 산출방법

- MRSD= HED / SF(10)
- HED(Human equivalent dose: 중간 차이에 대한 안전계수인 동물-인체등가용량) = NOAEL x (Animal Km/Human Km)
- SF(Safety Factor): 종내 감수성 차이에 대한 안전계수

<표 11-5> 체표면적 기준으로 동물용량을 HED로 전환하는 Km 계수

종(species)	표준 체중 (kg)	적용 체중 범위	체표면적 (m ²)	Km
성인	60	-	1.62	37
어린이	20	-	0.80	25
마우스	0.02	0.011-0.34	0.007	3
햄스터	0.08	0.047-0.157	0.016	5
랫드	0.15	0.08-0.270	0.025	6
담비	0.3	0.16-0.54	0.043	7
기니어피그	0.4	0.208-0.7	0.05	8
토끼	1.8	0.9-3.0	0.15	12
개	10	50-17	0.50	20
영장류				
• Monkeys	3	1.4-4.9	0.25	12
• Marmoset	0.35	0.14-0.72	0.06	6
• Squirrel monkey	0.6	0.29-0.97	0.09	7
• Baboon	12	7-23	0.60	20
마이크로 피그	20	10-33	0.74	27
미니 피그	40	25-64	1.14	35

Monkeys: cynomolgus, rhesus, stump-tail.

② 지수방식의 HED 산출

- 지수방식의 HED 산출방식 = NOAEL (Wh/Wa)⁽¹⁻⁰⁶⁷⁾
- MRSD = HED/SF(10)

3-2) Small molecule의 항암제 MRSD 산출방식

- 항암제는 그 자체가 유전독성을 유발하기 때문에 HED 산출은 독성이 없는 NOAEL을 이용하는 것이 아니라 HNSTD(highest non-severely toxic dose)를 이용하여 추정. 항암제에서의 반복투여독성시험에서 HNSTD는 유의성-동반 비중증 최고 독성용량을 의미함. 즉 독성이 나타나지만 toxicity-benefit 분석을 기반으로 HNSTD 설정하며 이를 이용한 HED는 **지수 0.67이 아니라 지수 0.75가 사용**되며 MRSD 추정은 다음과 같음(USFDA, 2005; Elmeliegy 등, 2021)

<표-2> 항암제의 MRSD 산출 방법

- $HED = HNSTD \times (\text{animal weight in kg} / \text{human weight in kg})^{(1-0.75)}$
- $MRSD = HED / SF(10)$
- SF(Safety Factor): 종내 감수성 차이에 대한 안전계수

- 따라서 항암제에 대한 반복투여독성시험을 할 경우에 NOAEL이 아니라 HNSTD를 위한 용량 설정을 위한 시험디자인의 필요성이 있음

3-3) 젬시타빈(Gemcitabine)의 MRSD 산출

- Gemcitabine은 nucleoside 유사체이기 때문에 cytochrome P450에 의해 대사되는 것이 아니라 모든 생물체에서 동일한 방법으로 대사됨. 따라서 종간 차이가 없기 때문에 HED가 사용되지 않고 다음과 같이 MRSD가 추정됨
- $MRSD = HNSTD / SF(10)$
- 우리나라에서는 Nucleotide 및 oligopeptide를 합성되었다고 종간 안전계수 10으로 나누어주어 MRSD 추정함. 이는 임상예정용량을 1/10로 감소시키는 결과를 가져오기 때문에 신약 개발을 어렵게 만드는 주요 요인이 됨. 특히 항암제 젬시타빈은 small molecule 항암제와 또 다르기 때문에 이러한 점의 이해에 있어서 다음은 중요한 예시가 됨.

4) 항체항암제와 병용요법을 위한 젬시타빈(Gemcitabine)에 대한 독성학적 결론

- 젬시타빈은 nucleoside 유사체로 DNA 합성 시 암세포 DNA로 합성되어 암세포 사멸을 유도함.
- 젬시타빈의 항암제로의 문제점은 비표적이면서 동시에 내부 nucleoside 합성과 분해와 경쟁적이기 때문에 내성의 문제
- 젬시타빈에 대한 반복투여독성시험에 있어서 HNSTD(highest non-severely toxic dose) 추정이 가능하도록 용량 설정의 필요성
- 다음과 같이 젬시타빈(Gemcitabine) 항암제의 대사적 특성 요약

항암제	<ul style="list-style-type: none"> Prodrug vs Active drug Pharmacophore의 화학적 특성 	Mode of action	<ul style="list-style-type: none"> Biotransformation 과정 (생화학적 전환) 특이사항
Gemcitabine (MW 263.2)	<ul style="list-style-type: none"> Nucleoside 유사 제로 Prodrug 척추동물의 DNA 합성 방법을 통해 DNA에 incorporation 	암세포 DNA 합성 저해를 통한 사멸	<ul style="list-style-type: none"> 척추동물의 DNA 대사와 동일 항암제의 MRSD (maximum recommended starting dose, 임상최대초기권장용량) 추정을 위해 NOAEL이 사용되지 않고 HNSTD(highest non-severely toxic dose)이 사용됨. 따라서 반복투여독성시험에서 용량설정 디자인에 유의할 필요성이 있음. 특히 젬시타빈은 nucleoside이기 때문에 중간 전환계수가 없이 MRSD = HNSTD/SF(10)을 추정하여야 함.

<참고문헌>

- Donisi C, Puzzoni M, Ziranu P, Lai E, Mariani S, Saba G, Impera V, Dubois M, Persano M, Migliari M, Pretta A, Liscia N, Astara G and Scartozzi M (2021) Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of HCC. Front. Oncol. 10:601240.
- Koltai T, Reshkin SJ, Carvalho TMA, Di Molfetta D, Greco MR, Alfarouk KO, Cardone RA. Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review. Cancers (Basel). 2022 May 18;14(10):2486.
- Hawrytkiewicz A, Ptaszyńska N. Gemcitabine Peptide-Based Conjugates and Their Application in Targeted Tumor Therapy. Molecules. 2021 Jan 12;26(2):364.
- Elmeliegy M, Udata C, Liao K, Yin D. Considerations on the Calculation of the Human Equivalent Dose from Toxicology Studies for Biologic Anticancer Agents. Clin Pharmacokinet. 2021;60(5):563–567.
- Hruba L, Das V, Hajduch M, Dzubak P. Nucleoside-based anticancer drugs: Mechanism of action and drug resistance. Biochemical Pharmacology. 2023 Sep;215:115741.
- USFDA. (2005). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacology and Toxicology.
- Vafaei S, Zekiy AO, Khanamir RA, Zaman BA, Ghayourvahdat A, Azimizonuzi H, Zamani M. Combination therapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs); a new frontier. Cancer Cell Int. 2022 Jan 3;22(1):2.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

5. Methotrexate+항체항암제의 병용요법과 antimetabolite 항암제로의 취약점

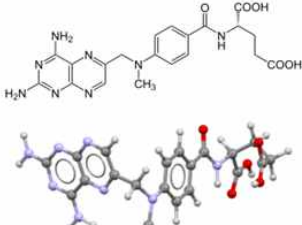
- Table 1에서처럼 대장암에 대한 병용요법 개발로 면역관문저해제의 항체항암제와 methotrexate의 병용요법으로 개발 중임.

Table 1 ICI combination therapy with chemotherapy in preclinical models (Vafaei 등, 2022)

Tumor	Target IC	Agent (s)	Result (s)	References
Triple-negative breast cancer	PD-1	Cyclophosphamide	Induction of the synergistic effect with ICI through induction of the antigen-presenting cells along with promoting intratumoral CD8 + T cells	[140]
B-cell lymphoma	PD-1	Vinorelbine	Induction of the synergistic effect	[141]
Breast cancer	PD-L1	Cyclophosphamide Fluorouracil		
Breast cancer	CTLA-4	Gemcitabine	Stimulation of tumor regression, while some cases showed the development of spontaneous metastases	[142]
		Cyclophosphamide		
Colon cancer	PD-1	Methotrexate	Substantial robust anti-tumor response in vivo	[248]

1) Methotrexate(메토트렉세이트, MTX)의 일반적인 특성

- 항암제 및 면역억제제:** 항종양제로서 급성 및 아급성 백혈병, 수막백혈병, 임신성 용모암, 용모막선종, 포도상기태, 림프육종진행기의 치료에 사용되며 또한 항건선제로도 사용됨. 경구투여 또는 근육주사하며 면역억제제로서 면역매개 질환에도 사용(이우주 의학사전, 2012)
- 엽산길항제:** 이수소엽산 환원효소(dihydrofolate reductase, DHFR)의 경쟁적 억제제로 아미노프테린(aminopterin)과 함께 엽산 유사체(folate analogue)로 분류
- Methotrexate의 약물동태학적 및 규제 사항은 다음과 같음(Wikipedia, 2024)

Methotrexate	
	
Clinical data	
Pronunciation	/ˌmeθəˈtrekˌseɪt, -ˌθoʊ-/   
Trade names	Trexall, Rheumatrex, Otrexup, others ^[4]
Other names	MTX, amethopterin
AHFS/Drugs.com	Monograph
MedlinePlus	a682019
License data	US DailyMed: Methotrexate
Pregnancy category	AU : D
Routes of administration	By mouth, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intrathecal
ATC code	L01BA01 (WHO) L04AX03 (WHO)
Legal status	
Legal status	AU : S4 (Prescription only) CA : R-only UK : POM (Prescription only) US : WARNING ^[5] Rx-only EU : Rx-only ^[6] In general: R (Prescription only)
Pharmacokinetic data	
Bioavailability	60% at lower doses, less at higher doses. ^[7]
Protein binding	35–50% (parent drug), ^[7] 91–93% (7-hydroxymethotrexate) ^[8]
Metabolism	Hepatic and intracellular ^[7]
Elimination half-life	3–10 hours (lower doses), 8–15 hours (higher doses) ^[7]
Excretion	Urine (80–100%), feces (small amounts) ^{[7][8]}
Identifiers	
IUPAC name	[show]
CAS Number	59-05-2 
PubChem CID	126941 
IUPHAR/BPS	4815 
DrugBank	DB00563 
ChemSpider	112728 
UNII	YL5FZ2YSU1 
KEGG	D00142 
ChEBI	CHEBI:44185 
ChEMBL	ChEMBL34259 
PDB ligand	MTX (PDB  , RCSB PDB )
CompTox Dashboard (EPA)	DTXSID4020822 
ECHA InfoCard	100.000.376 
Chemical and physical data	
Formula	C20H22N9O5
Molar mass	454.447 g·mol^{−1}
3D model (JSmol)	Interactive image 
SMILES	[show]
InChI	[show]
	(verify)

2) Methotrexate(메토트렉세이트, MTX)의 약리기전

① 항암기전

- MTX는 Figure. 1에서처럼 RFC1(reduced folate carrier1)을 통해 이수소엽산 환원효소(dihydrofolate reductase, DHFR) 활성을 저해하여 10-methylenetetrahydrofolate의 5-methyltetrahydrofolate 전환로의 방해. 이의 방해는 thymidylate synthase 활성을 저해하여 뉴클레오티드 dUMP(deoxyuridine monophosphate)를 dTMP(deoxythymidine monophosphate) 전환을 방해함. 결과적으로 pyrimidine 계열 DNA 합성저해에 의한 암 세포 증식이 억제됨(Shen 등, 2021). 또한 folypolyglutamate synthetase(FPGS)에 의해 glutamate가 여러 개가 결합된 Methotrex polyglutamate(MTXPG)도 MTX 자체와 유사한 약리기전을 유도함.

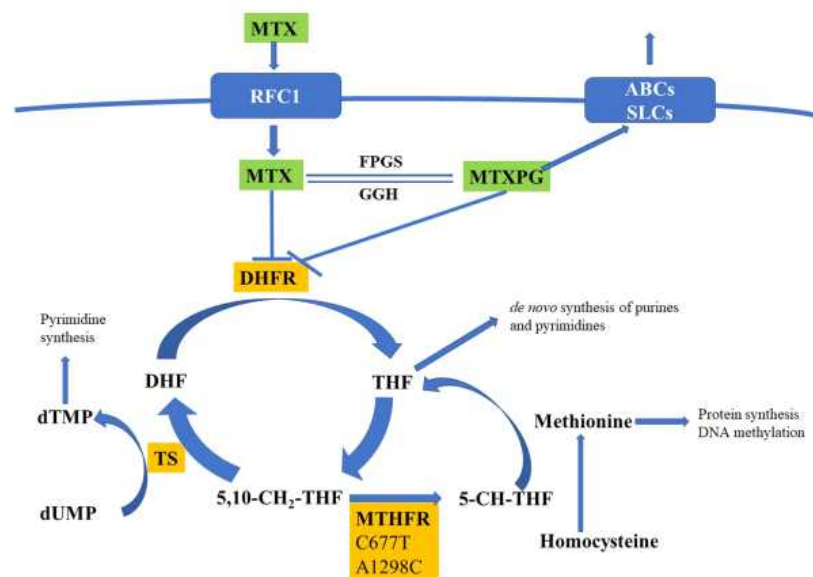


Figure 1: Simplified scheme of folate metabolism pathway targets of MTX. MTX competitively inhibits DHFR after entering cells through the RFC1. Abbreviations: MTX, methotrexate; MTXPG, methotrexate polyglutamated forms; RFC1, reduced folate carrier; ABCs, ABC family transporters; SLCs, SLC family transporters; DHF, dihydrofolate; THF, tetrahydrofolate; DHFR, dihydrofolate reductase; MTHFR, methylene-tetrahydrofolate reductase; dTMP, deoxythymidine monophosphate; dUMP, deoxyuridine monophosphate; TS, Thymidylate synthase; 5-CH-THF, 5-methyltetrahydrofolate; 5,10-CH₂-THF, 5,10-methylenetetrahydrofolate.

② 항면역기전

- HMGB1(High-mobility group box chromosomal protein 1)은 nonhistone chromatin-associated protein으로 대식세포 monocytes, dendritic cells 등의 면역세포 및 상해로 죽어 가는 세포로부터 분비됨. HMGB1은 immunoglobulin-type 및 transmembrane receptor인 glycation end-products(RAGE)와 상호작용함. RAGE는 neurons, astrocytes, microglia, mononuclear phagocytes, epithelial and endothelial cells (ECs) 등 다양한 신경세포 및 면역세포의 세포막표면에 있는 단백질의 immunoglobulin super family임. 이들의 상호작용은 RA(rheumatoid arthritis) 등을 유발하는 chronic autoimmune inflammatory response를 유도함. MTX는 HMGB1과 RAGE의 상호작용을 저해하여 항염증 기전을 유도함(Bedoui 등, 2019; Derk 등, 2018).

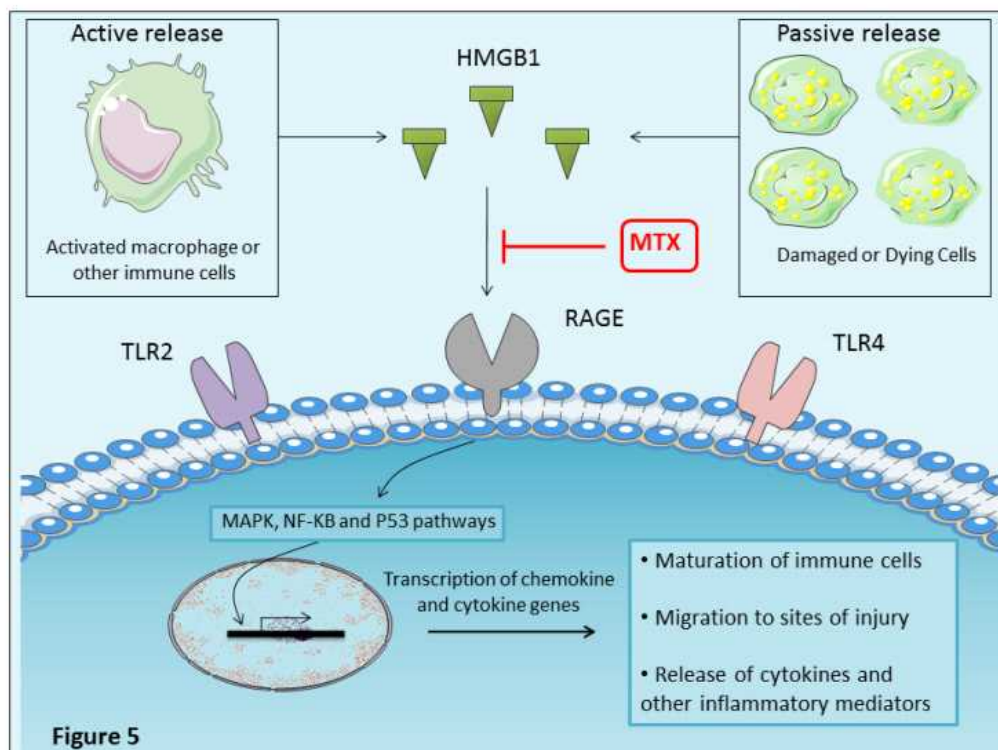
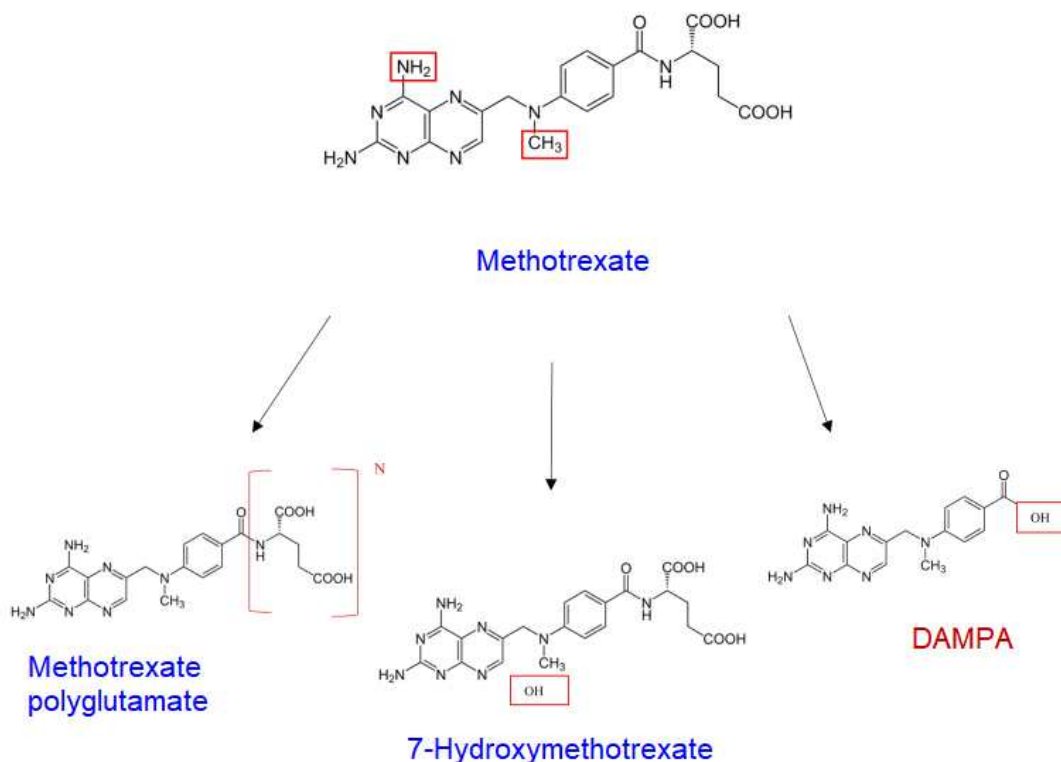


Figure 5. MTX inhibits HMGB1/RAGE interaction. HMGB1 released by activated immune cells (macrophages, monocytes, and dendritic cells) or by injured cells acts as an important mediator of inflammation or alarmin. HMGB-1 activates cells through the engagement of multiple surface receptors including TLR2, TLR4, and RAGE. Downstream signaling of HMGB1 is mediated by a number of adaptor proteins, which converge through pathways involving mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NFκB) and transcriptional regulator, p53 pathways (Weber et al. 2015). HMGB-1 signaling through RAGE promotes maturation of immune cells, chemotaxis and release of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1, IL-6, and IL-8). MTX can bind to the RAGE binding domains of HMGB1 and inhibits the interaction between HMGB1 and its receptor RAGE, thus inhibiting the development of inflammatory responses. Binding of MTX to part of the RAGE-binding region in HMGB1 may be significant for the anti-inflammatory effect of MTX.

3) Methotrexate(메토트렉세이트, MTX)의 biotransformation

- 이와 같은 Methotrexate(MTX)는 nucleotide 대사에 대한 항대사물질로 항암기전과 면역 세포에서 분비되는 HMGB1 활성을 억제하여 면역억제제 역할을 통해 자가면역질환에 도움이 되는 것으로 약리기전임
- MTX는 carboxypeptidase-G2(CPDG2) 또는 glucaridase에 의해 98% 이상으로 2,4-diamino-N10-methylpteroic acid(DAMPA)와 glutamate로 대사됨. DAMPA는 hydroxy-DAMPA, DAMPA-glucuronide, and hydroxy-DAMPA-glucuronide 등의 3개 새 대사체로 다시 전환됨. Glucuronide의 결합은 제2상반응의 가장 일반적인 반응인 glucuronidation에 의해 이루어짐(Brigitte 등, 2000; Widemann 등, 2000; Hamed 등, 2022; Sharma 등, 2023). 그러나 Methotrex polyglutamate는 folypolyglutamate synthetase(FPGS) 활성에 의해 생성되며 다시 γ -glutamyl hydrolase(GGH) 활성에 의해 MTX로 전환되는 가역성이 있음(Bedoui 등, 2019).



<그림-1> Methotrexate의 대사 과정

3) Methotrexate(메토트렉세이트, MTX)의 특성

- 일반적으로 small molecule의 독성은 cytochrome P450의 대사에 의해 생성된 독성대사체에 의해 발생한 것임. 그러나 MTX는 자체 또는 내인성물질의 대사와 관련된 folylpolyglutamate synthetase (FPGS)에 의해 생성된 Methotrex polyglutamate 생성에 의해 독성이 유도됨.
- Bedoui 등(2019)의 연구에 따르면 Table 1에서처럼 다양한 독성이 cytokine networks 불균형, reactive oxygen species 생성, HMGB1 활성의 저해 등에 유도됨. 또한 비록 저용량이라도 장기 복용에 의해 독성이 발생함.

Table 1. Major low dose MTX related adverse events.

Organ System	MTX Related Adverse Events	Toxic Mechanism of Action
Gastrointestinal	Nausea; Vomiting; Diarrhea; Mucositis and stomatitis	Gastrointestinal toxicities and bone marrow suppression seem to be directly related to folate antagonism, because these tissues have high cell turnover with a high requirement for purines, thymidine, and pyrimidine [57,143,144]. Supplementation of folic or folinic acid may diminish toxicity. Gastrointestinal symptoms of nausea and diarrhea may be more frequent with oral MTX [145]. Switching from oral to parental administration was shown to significantly decrease the frequency of adverse gastrointestinal events in patients with RA [146,147], suggesting that other mechanisms may account for MTX induced gastrointestinal toxicity. The pathogenic mechanism underlying gastrointestinal side effects may also be related to the change of plasma homocysteine [148].
Hematological	Anaemia; Leucopenia; Thrombopenia; Pancytopenia	Recently, MTX-induced thrombocytopenia was shown to be mediated by MTX-induced activation of platelet apoptosis via JNK and oxidative stress [149].
Hepatic	Elevated liver enzymes	Long-term MTX administration can cause accumulation of MTX polyglutamates in the liver and decreased folate levels. The depletion of hepatic folate stores by accumulated MTX poly glutamates is one possible toxic effect of MTX on the liver [150]. Folate supplementation has been associated with a reduced incidence of elevated transaminases induced by MTX treatment [15].
	Steatosis, fibrosis, cirrhosis	MTX-related hepatic fibrosis may be mediated through an adenosine pathway. MTX was shown to enhance adenosine release from cultured hepatoma (HepG2) cells. Adenosine A2A receptor occupancy stimulates collagen production by hepatic stellate cell lines [151,152]. Unlike wild-type mice, mice deficient for the adenosine A2A receptor or treated with an adenosine A2A receptor antagonist (ZM241385) were protected from developing liver fibrosis when challenged by hepatotoxin (carbon tetrachloride or thiocetamide) [151]. MTX-related liver fibrosis may also be mediated by its capacity to interfere with the generation of methionine from homocysteine. Excess of homocysteine induces endoplasmic reticulum stress promoting fat accumulation in the liver. Homocysteine can also activate hepatic stellate cells and proinflammatory cytokines, leading to liver fibrosis [153,154]. MTX-induced hepatic damage may be related to the generation of reactive oxygen species (ROS). MTX was shown to cause oxidative tissue damage by increasing lipid peroxidation in the liver tissue and decreasing the level of antioxidant enzymes in rats [155].
Pulmonary	Interstitial pneumonitis; <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia; Pulmonary fibrosis	Pulmonary toxicity has been shown to occur at both high- and low-dose MTX treatment, suggesting an idiosyncratic reaction not linked to folate antagonism [49]. Several mechanisms for the pathogenesis of MTX-induced pneumonitis have been suggested including hypersensitivity, direct drug toxicity to the lung tissue, immunosuppression or altered cytokine expression contributing to the pulmonary inflammatory response and tissue damage [156]. Typical bronchoalveolar lavage and histological findings support the concept that MTX-induced pneumonitis represents a hypersensitivity reaction [157-159]. MTX also induces injury to alveolar epithelial walls and pulmonary fibrosis, suggesting a direct drug toxicity route [160]. MTX pulmonary toxicity may be mediated by mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways activation and cytokine release [156]. MTX can compromise the immune response and increase the risk for opportunistic infections due to <i>Pneumocystis carinii</i> [161].
		In contrast to high-dose MTX, which can lead to direct tubulus toxicity and subsequent renal failure, renal toxicities induced by low-dose MTX are rare. Low dose MTX has been associated with decrease in glomerular filtration rate (GFR) [162-164]. MTX and its major metabolite 7-OH-MTX are relatively insoluble in acid urine and may act as a direct toxin on the tubular epithelium, or precipitate within the tubular lumen, which can lead to intratubular obstruction resulting in a decrease in GFR (particularly at high doses) [49,165]. Evidence for a direct toxic effect of MTX on renal tubular cells has been demonstrated [166]; Low doses MTX can induce cell swelling and necrosis in renal tubular cells, which may lead to permanent tubular damage [166].

Organ System	MTX Related Adverse Events	Toxic Mechanism of Action
Renal	A decrease in glomerular filtration rate; Renal insufficiency (only in pre-existing, severely impaired renal function)	MTX associated renal toxicity may be explained by an increase in plasma adenosine concentration in extracellular fluid and subsequent activation of A1 receptors in renal tissue, reducing renal blood flow and salt and water excretion [167]. Long duration of low dose MTX administration caused severe kidney injury and renal MTX accumulation in a rat model. 4-hydroxynonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA), which are reliable oxidative stress markers, were significantly increased in Long-MTX treated rats suggesting that MTX-induced kidney injury may be mediated through an increase in oxidative stress [168].
Dermatologic	Nodulosis (rare); Alopecia; Rash; Anaphylactic reactions	MTX-induced nodulosis may be mediated by adenosine through the adenosine A1 receptor [169]. MTX was shown to induce the generation of multinucleated giant cells, as does adenosine A1 receptor occupancy. This effect of MTX was reversed by a specific adenosine A1 receptor antagonist. Alopecia related to MTX treatment seems to be related to folate antagonism. In low dose MTX treatment, alopecia is rare and generally resolves several months after discontinuation [17,170].
Central nervous system (CNS)	Lethargy and fatigue; Headache, vertigo (less frequent)	Neurotoxicity of MTX may be related to MTX induced adenosine release and accumulation in the CNS. By acting at the A1 receptor on the perifornical lateral hypothalamus, adenosine may regulate wakefulness and somnolence and so potentially explaining asthenia and sleepiness experienced by some patients after MTX intake [171,172]. Other possible mechanisms of MTX-induced neurotoxicity are increased homocysteine levels and their excitatory amino acid neurotransmitter metabolites as homocysteic acid and cysteinesulfinic acid [173] and impairment of bipterin regenerating system in the brain, resulting in a reduced monoamine neurotransmitters availability [174].
Urogenital	Teratogenicity; oligospermia; gynecomastia (rare)	Use of MTX should be avoided before or during pregnancy because of its documented embryotoxicity and teratogenicity [175].
Musculoskeletal	Osteopathy; Osteoporosis	The effect of low dose MTX on bone was described in rats. Prolonged administration of low dose MTX in rats caused significant osteopenia with reduced osteoblast activity and increased osteoclast recruitment, which results in increased bone resorption [176]. However, no detrimental impact of MTX on the skeleton has been reported in patients treated with low dose MTX. MTX seems to have no clinically significant effect on bone mineral density (BMD) or on the osteoblast lineage [177,178].
Immunologic	Opportunistic infections	There is a belief amongst rheumatologists that MTX, as an immunosuppressant drug, is associated with the development of opportunistic infections. Weekly low-doses MTX can affect T cell activity [58], and cases of Pneumocystis pneumonia, nocardiosis, aspergillum, cryptococcosis, herpes zoster, herpes simplex and listeria-meningitis have been reported [170,179]. Despite some studies suggesting an increased risk of infection with MTX [180,181], several other studies have found that low-dose MTX does not appear to significantly increase the risk of infections in RA patients [182-185]. This risk appears to be associated with disease activity, comorbidities (diabetes, alcoholism) and the use of glucocorticoids, but not directly with MTX treatment [182]. It is well recognized that RA patients have significant increased risk of infection possibly due to chronic immune activation and inflammation which may impair immune function [185]. An increased risk of infection associated with MTX is possibly offset by the improvement of the immunological function secondary to the control of inflammation [185].
Others	Lymphoproliferative disorders	Lymphoproliferative disorders occur with increased frequency in RA patients compared to the general population, especially in the setting of high disease activity [170,184,186,187]. A relationship between MTX treatment and the occurrence of lymphoproliferative disorders in RA has been suggested. Long-term MTX therapy was associated with Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorders with spontaneous regression after MTX withdrawal [188]. Despite its association with Epstein-Barr-associated lymphomas, there is currently no clear evidence that MTX provides additional risk of lymphoproliferative disorders to that of RA itself [184,189].

4) Methotrexate 독성의 핵심 기전

- 일반적으로 small molecule의 독성은 cytochrome P450의 대사에 의해 생성된 독성대사체에 의해 발생한 것임. Methotrexate의 약리와 독성은 <Figure 2>에서처럼 folylpolyglutamate synthetase (FPGS)에 의해 glutamate가 여러 개가 결합된 Methotrex polyglutamate에 기인하는 것이 특이함.
- 그러나 장기간 복용을 통해 Methotrex polyglutamate는 간에서 축적되며 folate 농도는 감소됨. 간의 steatosis, fibrosis 그리고 cirrhosis 등은 MTX가 Adenosine A2A receptor에 결합, 간세포로부터 collagen 합성 증가와 이에 의한 간섬유화를 유도함. 또한 homocysteine으로부터 methionine으로의 전환을 방해, 이에 의한 homocysteine 증가 및 축적은 결과적으로 fat 축적과 더불어 cytokine 분비 그리고 염증에 의한 간섬유화가 촉진됨. 이외에도 이와 같은 MTX 및 Methotrex polyglutamate은 다양한 대사 경로를 방해하여 앞서 Table 1과 같이 다양한 질환을 유도함(Bedoui 등, 2019)

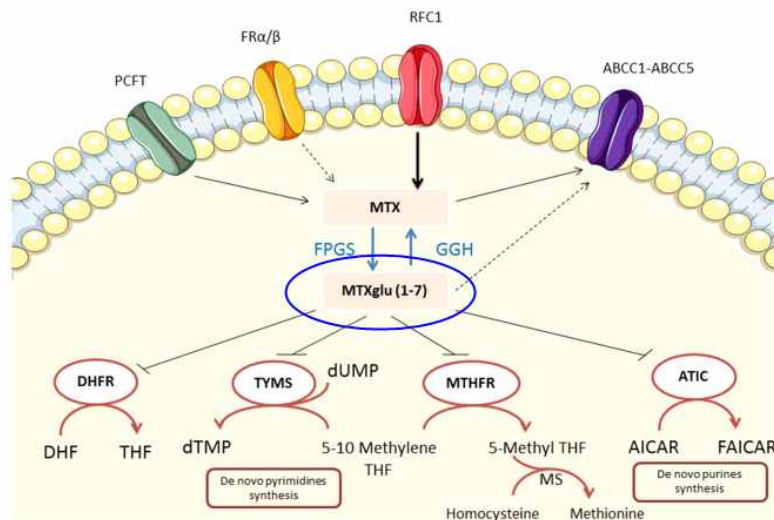


Figure 2. Methotrexate (MTX) transporters, metabolic pathways and intracellular enzyme targets. MTX transport across biological membranes is mediated by the reduced folate carrier (RFC1), the proton-coupled folate transporter (PCFT) (mainly expressed in the proximal part of the small intestine at the apical membrane of enterocytes) with limited contribution of folate receptors (FR). MTX is exported from the cell by the ATP-binding cassette (ABCC)-family transporters. Within the cell, MTX is converted to polyglutamate forms in a reversible reaction mediated by folylpolyglutamate synthetase (FPGS) and γ -glutamyl hydrolase (GGH). Polyglutamation reduces MTX efflux from the cell via ABCC transporters and therefore increases intracellular half-life of MTX. Intracellular formation of MTX polyglutamate also plays a critical role in MTX activity, increasing inhibition of dihydrofolate reductase (DHFR) and several folate dependent enzymes such as thymidylate synthase (TYMS), 5-amino-imidazole-4-carboxide ribonucleotide (AICAR) transformylase (ATIC), and methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) decreasing downstream folate pathway intermediates required for nucleotide synthesis. DHF, dihydrofolate; THF, tetrahydrofolate; FAICAR, formyl AICAR; MS, methionine synthetase; dTMP, deoxythymidine monophosphate.

• 병용요법을 위한 화학 항암제의 메토트렉세이트(Methotrexate, MTX) 대사적 특성 요약

항암제	<ul style="list-style-type: none"> - Prodrug vs Active drug - Pharmacophore의 화학적 특성 	<ul style="list-style-type: none"> - Mode of action 	<ul style="list-style-type: none"> - Biotransformation 과정 (생화학적 전환) - 특이사항
Methotrexate	<ul style="list-style-type: none"> - Active drug 또는 Prodrug - Antimetabolite이며 가역적 저해 	<ul style="list-style-type: none"> - 엽산 대사 경로 효소 저해 및 면역세포 활성 저해 - 항체항암제의 counteraction으로 병용요법으로의 가능성이 낮을 것으로 추정됨 	<ul style="list-style-type: none"> - 외인성물질이지만 cytochrome P450에 의한 비대사 - 간의 해독기능에 있어서 핵심 기전인 glutathione 합성 저해 가능성 높음 - 아는 항암제 독성에 대한 추가적으로 심각한 영향을 줄 수 있음
결론	<p>항체항암제의 counteraction과 glutathione 합성 저해 등에 의한 항암제 병용요법으로 적절하지 않을 것으로 추정됨. ADC(antibody-drug conjugate) 및 ApDC(aptamer-drug conjugate)로의 개발에서도 고용량이 요구되는 항암력이 낮을 것으로 추정됨.</p>		

<참고문헌>

- Shen Y, Wang Z, Zhou F, Jin R. The influence of MTHFR genetic polymorphisms on methotrexate therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Open Life Sci.* 2021 Nov 6;16(1):1203–1212.
- Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, Ralandison S, Gasque P. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 10;20(20):5023.
- Widemann BC, Sung E, Anderson L, Salzer WL, Balis FM, Monitjo KS, McCully C, Hawkins M, Adamson PC. Pharmacokinetics and metabolism of the methotrexate metabolite 2, 4-diamino-N(10)-methylpteroic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Sep;294(3):894–901.
- Hamed KM, Dighriri IM, Baomar AF, Alharthy BT, Alenazi FE, Alali GH, Alenazy RH, Alhumaidi NT, Alhulayfi DH, Alotaibi YB, Alhumaidan SS, Alhaddad ZA, Humadi AA, Alzahrani SA, Alobaid RH. Overview of Methotrexate Toxicity: A Comprehensive Literature Review. *Cureus.* 2022 Sep 23;14(9):e29518.
- Sharma A, Benoit P, Lansigan F, Nierenberg D. Case Report: Serum methotrexate monitoring by immunoassay: confusion by by-product, confusion by antidote. *Front Oncol.* 2023 Oct 24;13:1237178
- Derk J, MacLean M, Juranek J, Schmidt AM. The Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Mediation of Inflammatory Neurodegeneration. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2018;8(1):421.
- Ghodke-Puranik Y, Puranik AS, Shintre P, Joshi K, Patwardhan B, Lamba J, Niewold TB, Chopra A. Folate metabolic pathway single nucleotide polymorphisms: a predictive pharmacogenetic marker of methotrexate response in Indian (Asian) patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2015 Dec;16(18):2019–34.
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Grasselly C, Denis M, Bourguignon A, Talhi N, Mathe D, Tourette A, et al. The antitumor activity of combinations of cytotoxic chemotherapy and immune checkpoint inhibitors is model-dependent. *Front Immunol.* 2018;9:2100.
- Vafaei S, Zekiy AO, Khanamir RA, Zaman BA, Ghayourvahdat A, Azimizonuzi H, Zamani M. Combination therapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs); a new frontier. *Cancer Cell Int.* 2022 Jan 3;22(1):2.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

6. Oxaliplatin +항체항암제의 병용요법과 백금제제 기반-항암제의 최악 항암치료제에 대한 독성학적 최근 연구 결과

- Table 1에서처럼 류이스 폐암(Lewis lung carcinoma)에 대한 병용요법 개발로 면역관문 저해제의 항체항암제와 Oxaliplatin의 병용요법으로 개발 중임(Vafaei 등, 2022)

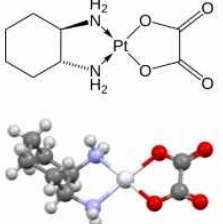
Table 1 ICI combination therapy with chemotherapy in preclinical models

Tumor	Target IC	Agent (s)	Result (s)	References
Lewis lung carcinoma	PD-1	Oxaliplatin	Tumor regression by activation of APCs and TILs	[150]

1) Oxaliplatin(옥살리플라틴)의 일반적인 특성

- 시스플라틴(Cisplatin), 시스플라틴의 유도체인 카보플라틴(Carboplatin) 등과 함께 백금제제 기반 화학요법(Platinum-based chemotherapy) 항암제. 주로 결장암과 직장암 치료에 사용됨.
- 화학적 및 동태학적 특성은 다음과 같음(Wikipedia, 2024)

Oxaliplatin



Clinical data	
Trade names	Eloxatin
AHFS/Drugs.com	Monograph
MedlinePlus	a607035
License data	US DailyMed: Oxaliplatin
Routes of administration	Intravenous
ATC code	L01XA03 (WHO)

Legal status	
Legal status	AU: S4 (Prescription only) ^[2] US: WARNING ^[1] Rx-only ^[3]

Pharmacokinetic data	
Bioavailability	Complete
Elimination half-life	~10 – 25 minutes ^[4]
Excretion	Kidney

Identifiers	
IUPAC name	[show]
CAS Number	61825-94-3
PubChem CID	77994
DrugBank	DB00526
ChemSpider	8062727
UNII	04ZR38536J
KEGG	D01790
ChEMBL	ChEMBL414804
PDB ligand	1PT (PDB), RCSB PDB
CompTox Dashboard (EPA)	DTXSID701125309, DTXSID0036760, DTXSID701125309
ECHA InfoCard	100.150.118

Chemical and physical data	
Formula	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₄ Pt
Molar mass	397.294 g·mol ⁻¹
3D model (JSmol)	Interactive image
SMILES	[show] <div style="display: flex; align-items: center;"> ✗ (what is this?) ✓ (verify) </div>

2) Oxaliplatin(옥살리플라틴)의 대사 과정

- Oxaliplatin을 포함한 대부분의 백금제제-항암제는 <그림>에서처럼 효소의 촉매작용이 없이 가수분해에 의해 링이 오픈되면서 2가의 $Pt(H_2O)_2DACH$ 또는 Pt 의 양성자 생성됨. 이들 전환체는 전자가 부족한 양이온으로 DNA 염기의 전자가 풍부한 친핵성 부위에 결합하여 암세포의 증식을 억제함(Obreshkova 등, 2022; Raymond 등, 1998). <Dach = 1,2-diaminocyclohexane>

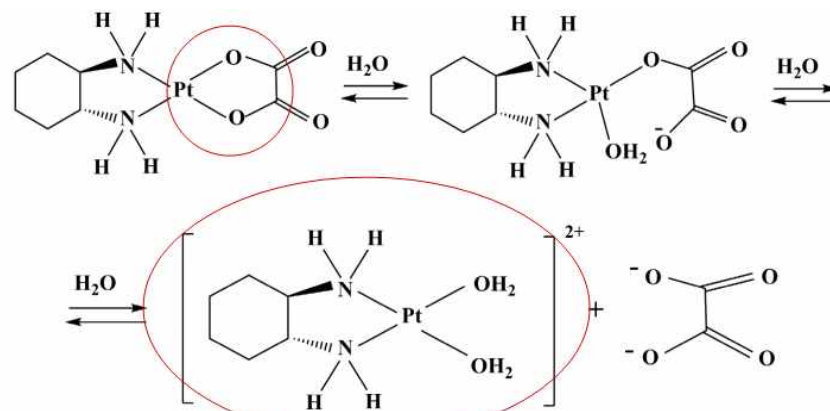
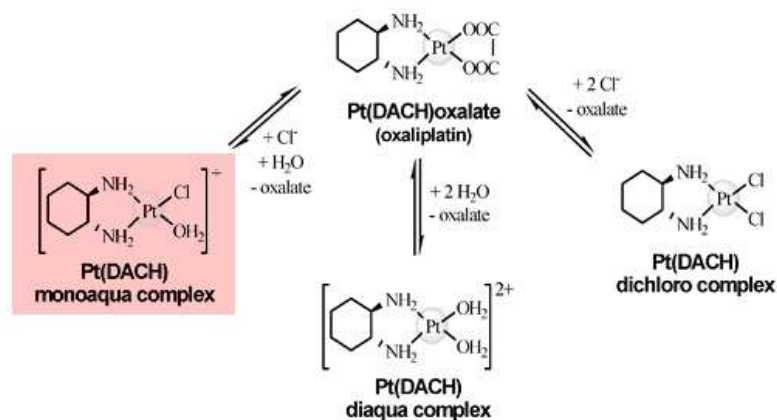


Figure 10. Hydrolysis mechanism of Oxaliplatin (Lucas et al. 2009).

- 또한 Oxaliplatin은 가수분해와 더불어 Cl^- (chlorine, 염소)이온과 반응하여 $Pt(DACH)$ mono-aqua complex로 전환, 친전자성 전환체 생성하여 세포 내의 단백질 및 DNA 친핵성부위와 결합함(Esteban-Fernández 등, 2010; Moraleja 등, 2016).



<그림> Oxaliplatin의 또 다른 친전자성 전환체 생성 과정

3) Oxaliplatin(옥살리플라틴)의 항암기전

- **Alkylation에 의한 항암기전 및 cytotoxicity:** 시스플라틴(Cisplatin), 시스플라틴의 유도체인 카보플라틴(Carboplatin) 등과 함께 백금제제 기반 화학요법(Platinum-based chemotherapy) 항암제의 항암기전은 아래의 <Figure 6>과 같이 친전자성 전환체가 DNA와 공유결합을 통한 alkylation으로 이루어짐(Obreshkova 등. 2022). 그러나 Oxaliplatin은 다른 백금제제 기반 화학요법(Platinum-based chemotherapy)보다 DNA alkylation은 약하지만 세포독성은 더 강하게 작용하여 항암기전으로 설명됨(Oxaliplatin may produce fewer DNA-adducts, but causes higher cytotoxicity than Cisplatin: Lucas et al. 2009).

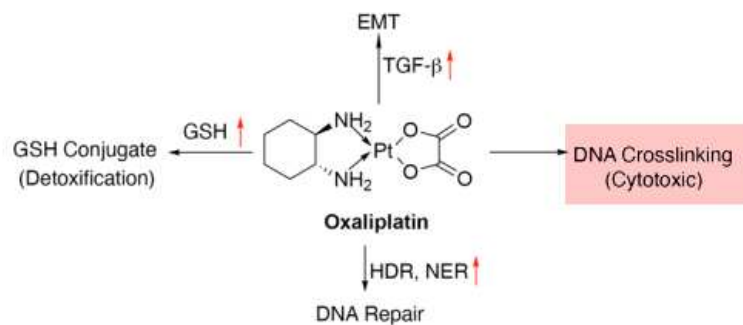
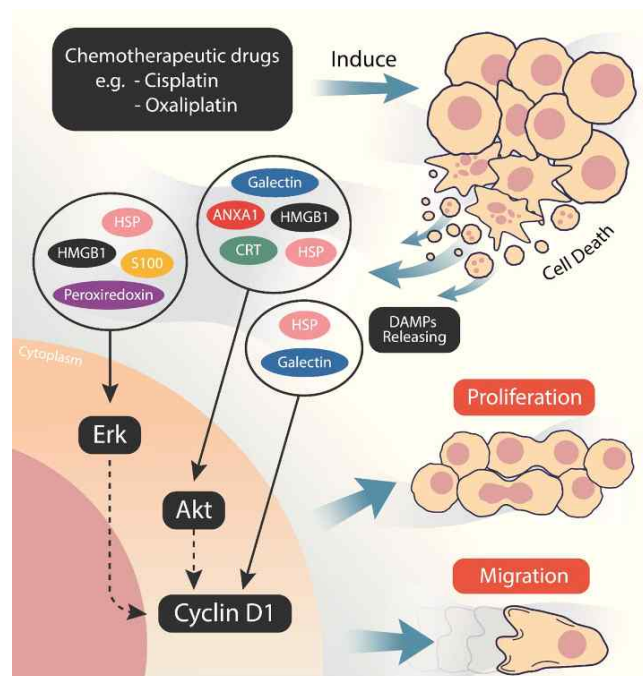


Figure 6: Schematics of oxaliplatin mode of action and resistance mechanisms. Red arrows indicate altered expression leading to resistance.

4) Oxaliplatin(옥살리플라틴)의 항암제로서의 가장 큰 문제점

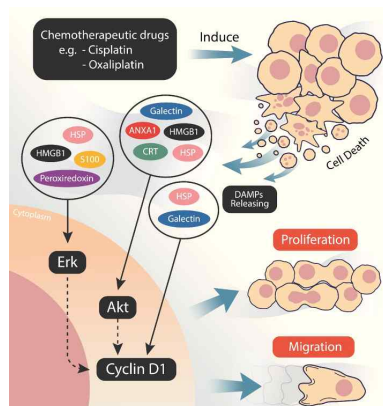
- Songjang 등(2022) 연구에 따르면 Cisplatin을 포함하여 oxaliplatin은 면역원성 세포사멸(immunogenic cell death, ICD; 세포가 죽어가는 과정에서 면역 반응을 유발하는 특정 신호를 방출하여 면역 체계를 활성화시키는 현상)에 의해 나타나는 분자들인 Damage-associated molecular patterns(DAMPs) 분비를 암세포로부터 유도함. 암세포로부터 분비된 DAMP로는 calreticulin(CALR), ATP, high-mobility group box 1(HMGB1), type1 IFN, 암세포 유래 핵산, annexin A1(ANXA1) 등이 있음. DAMP는 암세포에서 발현되는 TLR(Toll-Like Receptor) 활성을 유도하여 암세포 이동과 침윤 그리고 전이를 촉진시키며 또한 항암제의 내성을 유도함.



<그림> Cisplatin과 oxaliplatin 등이 백금-기반 화학요법(Platinum-based chemotherapy) 항암제에 의한 DAMP 분비와 암세포 전이 등의 촉진화 기전

6) 항체항암제와 병용요법의 Oxaliplatin(옥살리플라틴)에 대한 독성학적 결론

- Oxaliplatin은 시스플라틴(Cisplatin), 시스플라틴의 유도체인 카보플라틴(Carboplatin) 등과 함께 백금-기반 화학요법(Platinum-based chemotherapy) 항암제의 일종임
- 항암기전은 가수분해에 의해 생성된 친전자성 전환체가 친핵성의 DNA 염기에 결합하여 DNA alkylation을 유도하는 항암기전
- Oxaliplatin은 active drug으로 효소의 도움이 없이 가수분해에 의한 전환체에 의한 독성 기전임.
- 특히 가수분해의 특성은 Cl(chlorine)이 결합하여 Oxaliplatin 자체가 아니라 전혀 다른 전환 경로를 통해 전환체 생성에 의한 비예측적인 독성 유발의 가능성이 큼.
- Songjang 등(2022) 연구에 따르면 Cisplatin을 포함하여 oxaliplatin은 Damage-associated molecular patterns(DAMPs) 분비를 암세포로부터 유도 및 TLR (Toll-Like Receptor) 활성 증가로 암세포 이동과 침윤 그리고 전이를 촉진시키며 또한 항암제의 내성을 유도하는 제2차 암(secondary cancer)을 유도한 최악의 항암제로 추정됨.



<그림> Cisplatin과 oxaliplatin 등이 백금-기반 화학요법(Platinum-based chemotherapy) 항암제에 의한 DAMP 분비와 암세포 전이 등의 촉진화 기전

• 병용요법을 위한 화학 항암제의 대사적 특성 요약

항암제	- Prodrug vs Active drug - Pharmacophore의 화학적 특성	- Mode of action	- Biotransformation 과정 (생화학적 전환) - 특이사항
Oxaliplatin	- Active drug - 가수분해에 의한 친전자성	- DNA alkylation이지만 다른 백금-기반 항암제보다 약하지만 cytotoxicity에서는 더 높은 효능	- 외인성물질이지만 가수분해에 의한 전환체 생성 - Cl(염소)와 반응하여 친전자성 전환체 생성을 통해 정상적인 독성 예측을 어렵게 함
결론	TLR(Toll-Like Receptor) 활성 증가로 암세포 이동과 침윤 그리고 전이를 촉진시키며 또한 항암제의 내성을 유도하는 제2차 암(secondary cancer)을 유도한 최악의 항암제로 추정됨.		

<참고문헌>

- Vafaei S, Zekiy AO, Khanamir RA, Zaman BA, Ghayourvahdat A, Azimizonuzi H, Zamani M. Combination therapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs); a new frontier. *Cancer Cell Int.* 2022 Jan 3;22(1):2.
- Danka Obreshkova, Stefka Ivanova, Pavlina Yordanova-Laleva. Influence of chemical structure and mechanism of hydrolysis on pharmacological activity and toxicological profile of approved platinum drugs. *Pharmacia.* 2022; Pharmacia 69(3): 645–653.
- E. Raymond, S. G. Chaney, A. Taamma & E. Cvitkovic. Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology* 9: 1053–1071, 1998.
- Moraleja I, Esteban-Fernández D, Lázaro A, et al. Printing metal-spiked inks for LA-ICP-MS bioimaging internal standardization: comparison of the different nephrotoxic behavior of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2016 Mar;408(9):2309–2318.
- Lucas MF, Pavelka M, Alberto ME, Russo N. Neutral and acidic hydrolysis reactions of the third generation anticancer drug oxaliplatin. *J Phys Chem B.* 2009 Jan 22;113(3):831–8.
- Songjang W, Nensat C, Nernpermpisooth N, Seenak P, Pankhong P, Jumroon N, Kumphune S, Jiraviriyakul A. Tumor-Promoting Activity and Proteomic Profiling of Cisplatin/Oxaliplatin-Derived DAMPs in Cholangiocarcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 11;23(18):10540.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

7. Doxorubicin + 항체항암제의 병용요법과 다양한 세포자멸사의 항암기전

- Table 1에서처럼 방광암(bladder cancer)에 대한 병용요법 개발로 면역관문인 PD-L1 저해제의 항체항암제와 doxorubicin의 병용요법으로 개발 중임(Vafaei 등, 2022)

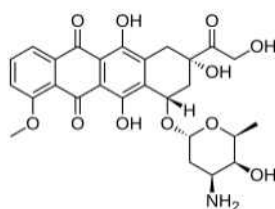
Table 1 ICI combination therapy with chemotherapy in preclinical models

Tumor	Target IC	Agent (s)	Result (s)	References
Triple-negative breast cancer	PD-1	Cyclophosphamide	Induction of the synergistic effect with ICI through induction of the antigen-presenting cells along with promoting intratumoral CD8+T cells	[140]
B-cell lymphoma	PD-1	Vinorelbine	Induction of the synergistic effect	[141]
Breast cancer	PD-L1	Cyclophosphamide Fluorouracil		
Breast cancer	CTLA-4	Gemcitabine Cyclophosphamide	Stimulation of tumor regression, while some cases showed the development of spontaneous metastases	[142]
Colon cancer	PD-1	Methotrexate	Substantial robust anti-tumor response in vivo	[248]
Bladder cancer	PD-L1	Vinblastine Doxorubicin Cis-platin Cyclophosphamide		

1) Doxorubicin의 일반적인 특징

- 상품명 아드리아마이신(Adramycin)을 현대 항암화학요법의 상징이자 대중적 이미지의 표본
- 안트라사이클린(Anthracycline)-기반 항암 치료 (anthracycline-based regimen): Anthracyclines are a class of drugs used in cancer chemotherapy that are extracted from Streptomyces peucetius bacterium(Wikipedia, 2024).
- 전이가 진행된 중증 환자들의 몸 전체를 공격해서 환자의 기대수명을 늘리기 위한 목적으로 사용되지만 부작용과 후유증이 엄청남
- 페길레이티드 리포좀 독소루비신(pegylated liposomal doxorubicin)
- 다음과 같이 화학적 구조 및 동태학적 특징이 확인되었음(Wikipedia, 2024)

Doxorubicin



Clinical data

Pronunciation	/ˌdɒksəˈruːbɪn/
Trade names	Adriamycin, Caelyx, ^[1] Myocet, ^[2] others
Biosimilars	Zolsketil pegylated liposomal, ^[3] Celdoxome pegylated liposomal ^[4]
AHFS/Drugs.com	Monograph
MedlinePlus	a682221
License data	EU EMA: by INN EU DailyMed : Doxorubicin US
Pregnancy category	AU : D
Routes of administration	intravenous, intravesical
ATC code	L01DB01 (WHO EU)

Legal status

Legal status	AU : S4 (Prescription only) CA : R-only ^{[5][6][7]} UK : POM (Prescription only) US : R-only EU : Rx-only ^{[1][2][3][4]} In general: R (Prescription only)
---------------------	---

Pharmacokinetic data

Bioavailability	5% (by mouth)
Protein binding	75% ^[8]
Metabolism	Liver
Elimination half-life	Triphasic; 12 minutes, 3.3 hours, 30 hours. Mean: 1–3 hours ^{[8][9]}
Excretion	Urine (5–12%), faeces (40–50%) ^[8]

Identifiers

IUPAC name	[show]
CAS Number	23214-92-8 ✓ as HCl: 25316-40-9 EU
PubChem CID	31703 EU as HCl: 443939 EU
IUPHAR/BPS	7069 EU
DrugBank	DB00997 EU ✓ as HCl: DBSALT000060 EU
ChemSpider	29400 EU ✓ as HCl: 391993 EU
UNII	80168379AG EU as HCl: 82F2G7BL4E EU
KEGG	D03899 EU ✓ as HCl: D01275 EU
ChEBI	CHEBI:28748 EU ✓ as HCl: CHEBI:31522 EU
ChEMBL	ChEMBL53463 EU ✗ as HCl: ChEMBL359744 EU
CompTox Dashboard (EPA)	DTXSID8021480 EU ✓
ECHA InfoCard	100.041.344 EU ✓

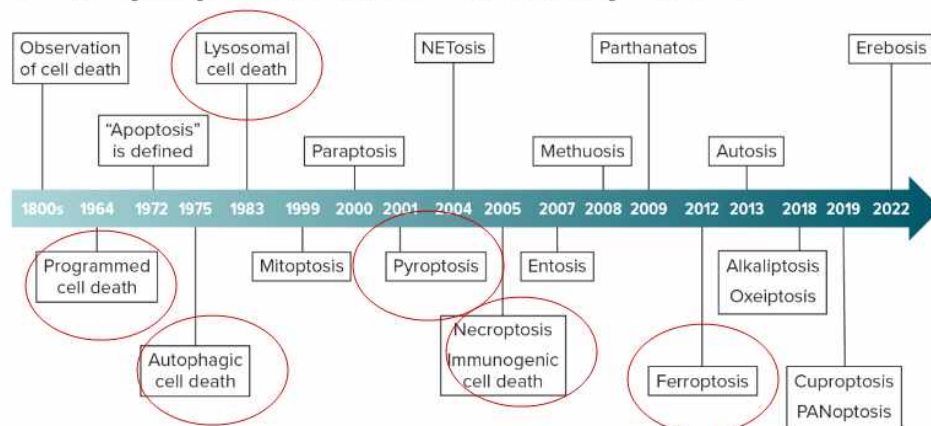
Chemical and physical data

Formula	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁
Molar mass	543.525 g·mol ⁻¹
3D model (JSmol)	Interactive image EU
SMILES	[show]
InChI	[show]
✗✓ (what is this?) (verify)	

2) Doxorubicin(DOX)의 항암기전(mode of action)

- DOX에 의한 항암기전은 암세포의 다양한 세포자멸사, 예를 들어 아래의 <표>에서 붉은 원과 같이 다양한 세포자멸사를 유도하는 DOX-semiquinone의 직접적인 DNA 손상과 ROS(reactive oxygen species, 유해활성산소)에 기인함. 이와 같이, 다양한 항암기전은 정상세포에도 큰 영향을 주어 화학항암제 중 가장 심각한 부작용을 유도하는 항암제 중 하나임

The many ways a cell can die — a discovery timeline



<<https://knowablemagazine.org/content/article/living-world/2024/apoptosis-necrosis-and-other-ways-cells-can-die>>

2-1) DAN 상해 유도

- DOX에 의한 DNA 상해는 아래의 Figure 1과 같이 3가지 기전으로 설명됨.
- Figure 1의 A)에서처럼 DOX의 guanine과 수소결합에 의한 DNA adduct & double-strand breaks, DNA 이중나선의 풀림에 의한 DOX의 DNA intercalation.
- Topoisomerase(국소이성질효소, DNA 회전효소)는 서로 꼬여있는 이중가닥 DNA를 과도하게 꼬이게 하거나 덜 꼬이게 하는데 작용하는 효소. Figure 1의 B)에서처럼 DOX는 Topoisomerase II 효소에 직접적으로 결합하거나 세포독성을 통해 Topoisomerase I 활성을 저해함. 활성 저해를 통해 single- 및 double-strand break(SSB or DSB)가 발생함.
- 이와 같은 DOX에 의한 DNA 손상은 이를 감지하는 대표적인 감지자(sensor)로 탈인산화 효소(kinase)인 ATM(ataxia-telangiectasia, mutated)과 ATR(ATM and Rad3-related) 등에 의해 DDR(DNA damage response)가 유도됨(Kciuk 등, 2023)
- DNA 손상에 의해 활성화된 ATM과 ATR의 신호를 통해 발암억제단백질인 p53 전달자가 활성화되어 세포주기의 정지를 비롯하여 아포토시스 등의 DDR이 수행된다. 먼저 ATM과 ATR은 p53의 인산화를 통한 직접적인 상호작용을 통하거나 ATM과 같이 다른 탈인산화

소 c-Abi 그리고 Chk2(cell cycle checkpoint kinase 2)를 통하여 p53 활성화를 유도한다. 또한 ATM은 p53 유전자의 음성조절자인 Mdm2(murine double minute 2)를 통해 p53 분해를 억제하며 또한 세포내 축적을 돕는다. 이러한 P53 활성화는 DNA 손상에 의한 DDR의 일종인 아포토시스(Apoptosis)를 유도하여 유전독성-스트레스에 의한 영향을 감소한다(Kciuk 등, 2023; 박영철, 2010).

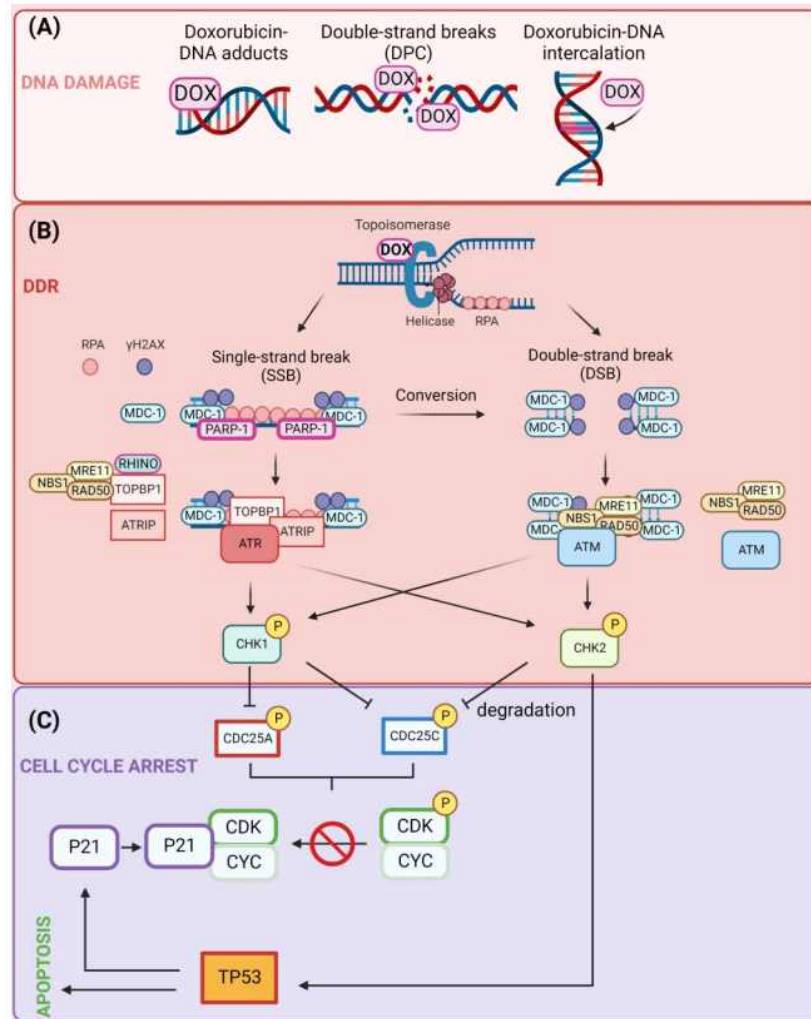


Figure 1. Induction of DNA damage following treatment of cells with doxorubicin

2-2) Apoptosis-ROS Interplay

- Figure 2의 붉은 원에서처럼 미토콘드리아의 막구조를 이루고 있는 인지질 성분인 카디올리핀(cardiolipin)과 DOX의 상호작용은 유해활성산소(reactive oxygen species, ROS)와 유해활성질소(reactive nitrogen species, RNS) 증가를 유도. 앞서 설명한 것처럼 DOX에 의해 초기에 발생한 DNA 손상은 이를 감지한 ATM(ataxia-telangiectasia, mutated)에 의한 DDR(DNA damage response)의 일종인 세포자멸사(apoptosis) 유도 신호에 의해 세포자멸사 초기에 형성되는 단백질 복합체인 apoptosome은 caspase 9 → caspase 3 → NF-κB 인터페론 조절단백질인 IRF-3 등과 mitochondrial antiviral signaling(MAVS) 등의 신호전달체계에 의해 DNA 분해효소인 nuclease 활성화되어 전형적인 apoptosis 지표인 DNA ladder이 형성됨(Kciuk 등, 2023)

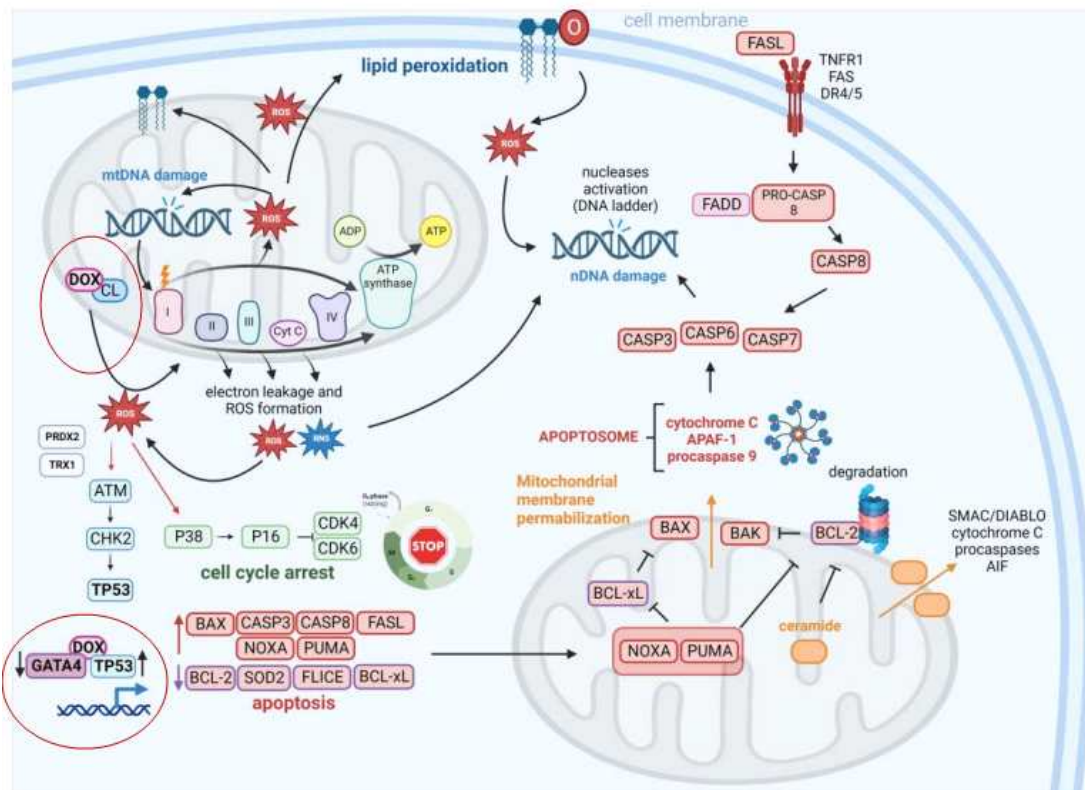


Figure 2. Contribution of DOX to ROS induction and apoptosis.

2-3) 세포 세네센스(senescence) 유도

- Doxorubicin이 세포의 비가역적 증식 중단을 의미하는 세포 세네센스(cellular senescence)을 유도하는 것으로 확인됨(Hu 등, 2019; Sun 등, 2022). 세포 세네센스 현상의 바이오마커는 β -galactosidase 발현임. 다음의 Figure 2에서처럼 대조군 사진-A와 비교하여 DOX 처리군에서 녹색의 β -galactosidase(SA- β -gal) 발현이 확인됨. DOX 용량 증가에 의해 증가되는 것이 아니고 처리된 중간 용량에서 세네센스가 가장 많이 발생. 이는 고용량은 세포의 세네센스를 유도하기에는 강한 독성에 기인하는 것으로 추정됨.

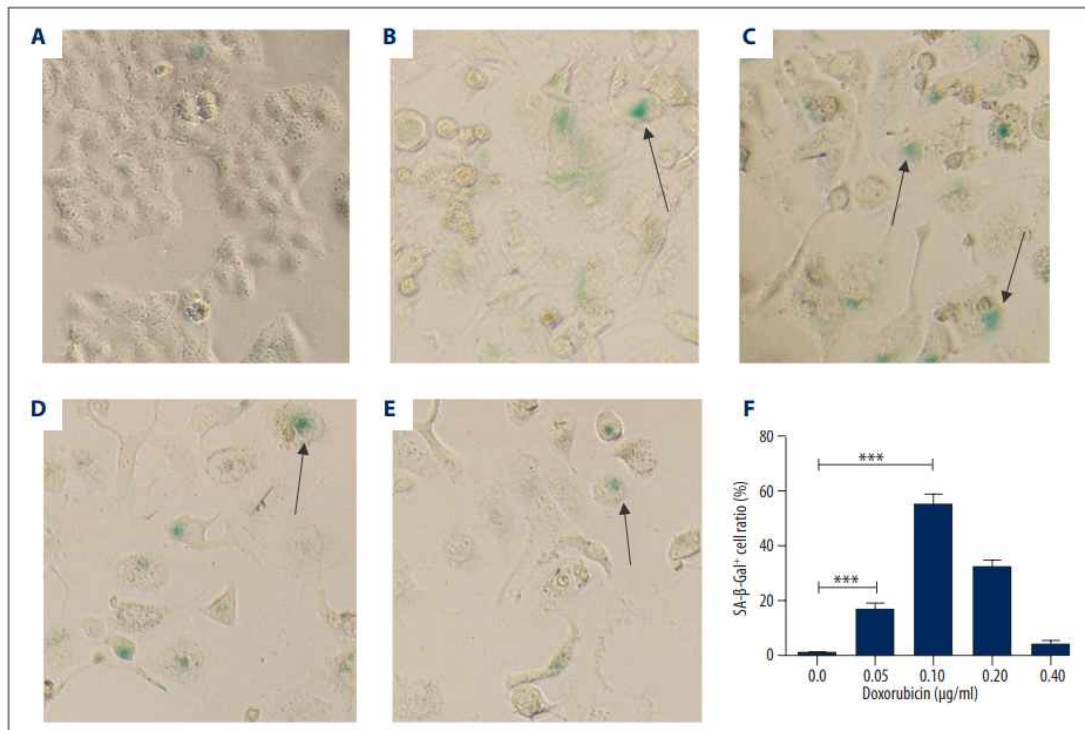


Figure 2. Time delay effect of doxorubicin-induced senescence in HeLa cells. (A-E) HeLa cells were treated by doxorubicin for 3 days at 0, 0.05, 0.1, 0.2, or 0.4 µg/ml, respectively, and cultured in drug-free medium for 6 days followed by SA- β -Gal staining. (F) SA- β -Gal-positive cell proportions corresponding to A-E. *** $p < 0.001$.

2-4) 기타 항암기전

① Doxorubicin-induced autophagy(DOX-유도 자가소화작용)

- 오토파지는 에너지가 부족하거나 극심한 스트레스를 받았을 때, 세포가 노화되거나 손상이 일어났을 때 발생함. 크게 인식과 격리(Initiation), 격리된 부위를 이중막으로 둘러싸서 생성된 오토파고솜(autophagosome) 형성, 오토파고솜과 리소좀(lysosome)의 합쳐 발생하는 분해와 활용(Degradation and Recycling)의 3 단계에 걸쳐 일어남. Autophagy는 세포 항상성 유지, 스트레스 반응, 질병 예방 등 다양한 생리학적 기능에 중요한 역할.

- Autophagy는 AMPK(AMP-activated protein kinase)와 mTOR(mammalian target of rapamycin, 파마이신 포유동물 표적) 등의 상위 신호전달체계 인자에서부터 ULK-1(unc-51-like autophagy activating kinase 1) kinase complex 활성화에 의해 조절됨.
- Autophagy에서 DOX의 역할은 활성화 또는 저해하는 양날의 칼(double-edged sword)임. Fig. 4에서처럼 DOX는 oxidative stress 유도를 통해 mTOR에 의한 ULK-1 인산화로 autophagy 활성화. 반면에 DOX는 ATP 고갈을 유도하여 AMPK 활성화에 의한 mTOR 억제로 autophagy 비활성화.
- 또한 DOX는 p62 활성화를 유도하여 LC3(light chain 3)II에 의한 phagosome 형성을 촉진함(Sangweni 등, 2022).

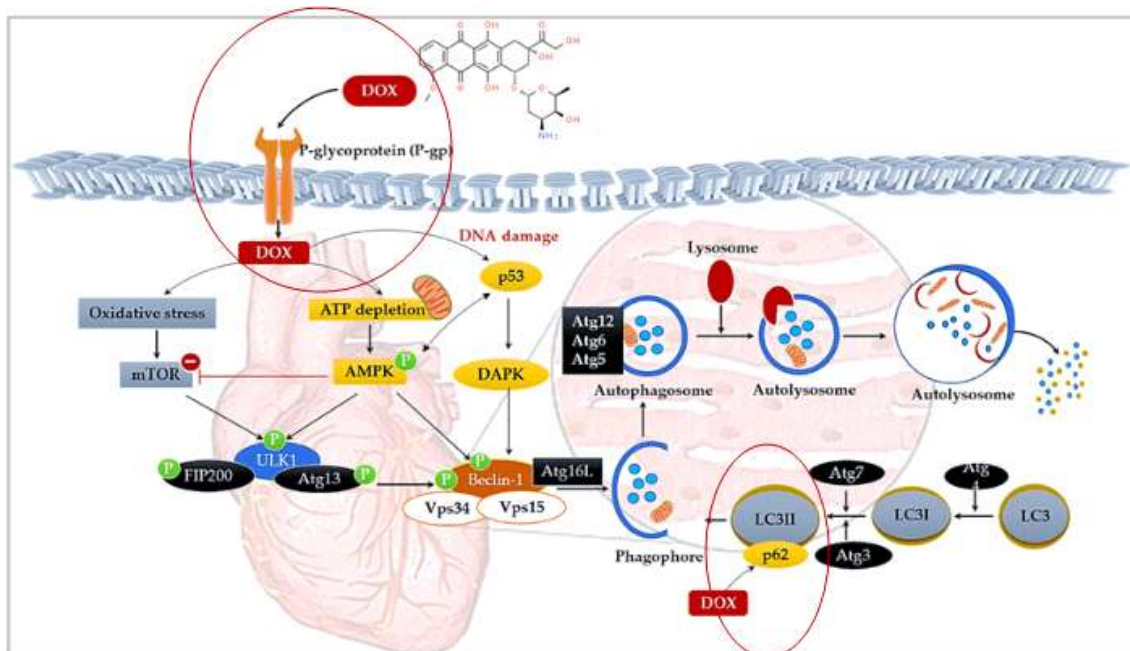


Fig. 4 Doxorubicin-induced autophagy(Sangweni 등, 2022).

② Doxorubicin-induced Ferroptosis

- 페로프토시스(Ferroptosis)는 철분 의존성 세포사멸 즉, 세포 내 철에 의존성 비세포사멸과 세포사멸의 한 형태, 약물유전체학에서 정밀의학적 분석에 일관성을 나타낼 때, 매우 중요한 세포사멸 과정임(위키백과, 2024).
- Iron(철)은 세포 내에 너무 많을 시 toxic, 반면에 세포 내에 어느 정도의 양은 있어야 하기에 iron 농도가 정교하게 조절되어야 함. 이와 관련된 단백질이 Fe의 흡수를 촉진하는 transferrin receptor(TfR)와 Fe 저장하는 ferritin임. Fig.2에서처럼 Doxorubicin은 TfR을 활성화하여 Fe의 세포내 유입을 촉진과 ferritin 활성을 억제하여 free-Fe 농도를 증가시킴(Christidi 등, 2021). 세포 내 증가된 free-Fe는 fenton pathway 등을 통해 oxidative stress를 증가시키며 ferroptosis를 유도함. 또한 DOX는 미토콘드리아에서

fenton pathway를 촉진 및 ROS 생성을 증가시키며 세포질 및 미토콘드리아에서 glutathione peroxidase 4(GPX4) 효소 활성을 억제하여 ROS를 증가 유도. 이와 같은 ROS 증가는 세포자멸사(apoptosis)를 유도 즉, ferroptosis를 유도함(Christidi 등, 2021).

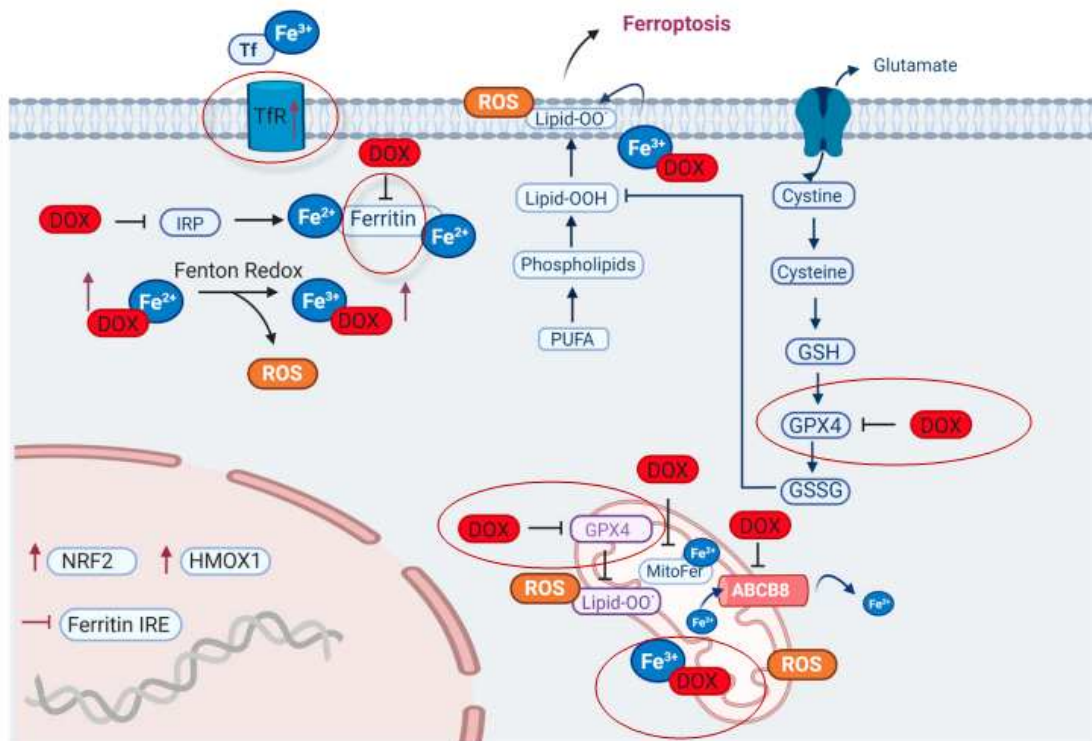


Fig. 2 Doxorubicin-induced ferroptosis.

③ Doxorubicin-induced Pyroptosis

- 염증성 세포사멸 과정을 파이로토시스(Pyroptosis). Fig 4에서처럼 DOX는 TINCR(terminal differentiation-induced NcRNA) 발현을 유도하여 cytokine 분비의 effector인 GMDSD-N을 통해 IL-1 β , IL-18 분비 및 이에 의한 파이로토시스를 유도함. 또한 DOX는 미토콘드리아의 BNIP3(BCL2 interacting protein 3) 활성을 통해 파이로토시스를 유도함(Christidi 등, 2021).

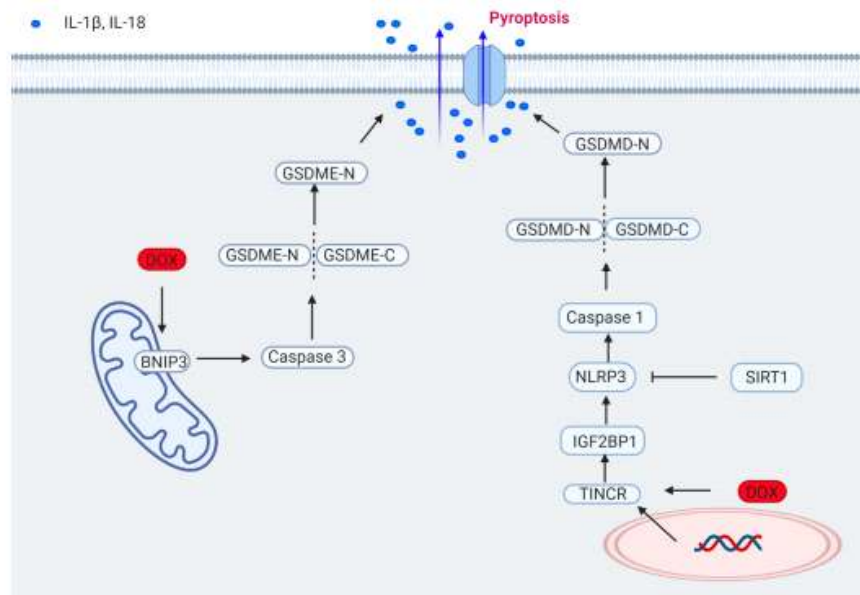


Fig. 4 Doxorubicin-induced pyroptosis. Schematic representation of doxorubicin-induced pyroptosis in the heart. Doxorubicin induces pyroptosis via the upregulation of TINCR, which recruits IGF2BP and increases the expression of NLRP3 leading to activation of caspase-1, the cleavage of GSDMD-N and the release of IL-1 β , IL-18. Pyroptosis is also induced via BNIP3 activation in the mitochondria, which activates caspase 3 and causes GSDME-dependent pyroptosis. Sirtuin 1 activation inhibits NLRP3 and protects cardiomyocytes from doxorubicin-induced pyroptosis. BNIP3 BCL2 interacting protein 3, GSDMD gasdermin D, GSDME gasdermin E, TINCR terminal differentiation-induced NcRNA, IGF2BP1 insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1, NLRP3 NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3, IL interleukin.

3) Doxorubicin(DOX)의 biotransformation

- DOX의 약리 및 독성작용은 reactive metabolite 3가지인 electrophilic metabolite, carbon-centered radical, 그리고 redox-active species 중 redox-active species(산화-환원 활성종, RAS)에 기인함(박영철, 2010).
- Doxorubicin은 Figure 4와 같이 SOD와 cytochrome P450 oxidoreductase의 2 효소에 의해 반복적으로 redox cycling이 이루어지면서 수많은 ROS(reactive oxygen species)를 생성하여 다양한 세포사멸사를 유도함(Lee 등, 2023). 또한 ROS 자체가 유전독성을 유발할 수 있지만 산화형인 친전자성 DOX semiquinone이 직접 DNA 염기 및 나선에 결합하여 유전독성을 유발할 수 있음.
- 이와 같이 DOX에 의한 다양한 세포사멸사는 DNA 손상에 의한 DNA damage response 및 ROS 생성에 기인하는 것으로 추정됨

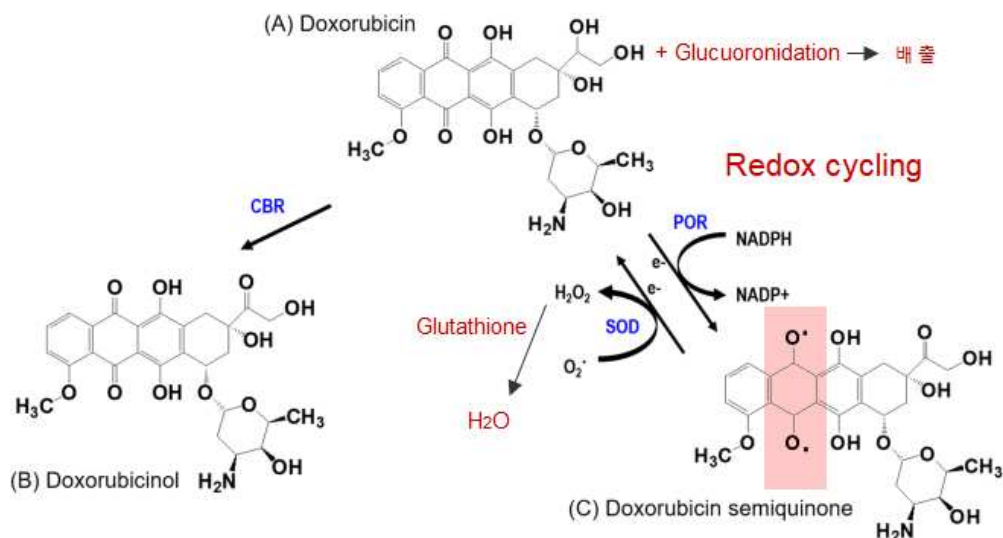


Figure 4. Metabolic pathway and related metabolic enzymes for the transformation of (A) DOX to (B) doxorubicinol and (C) doxorubicin semiquinone, major metabolites of DOX. CBR: carbonyl reductase; POR: cytochrome P450 oxidoreductase; SOD: superoxide dismutase. Arrows represent the metabolic conversion.

(Lee 등, 2023)

4) 항암제로의 Doxorubicin(DOX)에 대한 결론

- DOX의 약리 및 독성작용은 reactive metabolite 3가지인 electrophilic metabolite, carbon-centered radical, 그리고 redox-active species 중 redox cycling의 연쇄반응을 유도하는 redox-active species(산화-환원 활성종)임.
- 특히 DOX-semiquinone은 ROS(reactive oxygen speices, 유해활성산소종) 발생뿐만 아니라 그 자체가 DNA의 친핵성에 공유결합을 통해 DNA damage response을 활성화로 세포자멸사뿐만 아니라 암세포의 비가역적 세포주기 중지에 의한 항암기전
- 암세포의 다양한 자멸사뿐만 아니라 과도한 ROS 생성으로 정상세포에도 영향을 주어 강한 독성을 유발함.

• 병용요법을 위한 화학 항암제의 대사적 특성 요약

항암제	<ul style="list-style-type: none"> - Prodrug vs Active drug - Pharmacophore의 화학적 특성 	<ul style="list-style-type: none"> - Mode of action 	<ul style="list-style-type: none"> - Biotransformation 과정 (생화학적 전환) - 특이사항
Doxorubicin	<ul style="list-style-type: none"> - Prodrug - Redox-active species 	<ul style="list-style-type: none"> - ROS 및 DNA 손상을 통한 다양한 암세포 자멸사 	<ul style="list-style-type: none"> - 원물질 자체는 glucuronidation에 의해 친수성으로 전환됨 - Redox-active species 생성으로 강력한 산화적 스트레스로 Glutathione의 고갈이 빠르고 정상세포에 damage가 큼
결론	다양한 세포자멸사로 항암효능도 크지만 그만큼 정상세포에도 영향이 큼		

<참고문헌>

Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, Kontek R. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*. 2023 Feb 19;12(4):659.

Hu X, Zhang H. Doxorubicin-Induced Cancer Cell Senescence Shows a Time Delay Effect and Is Inhibited by Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). *Med Sci Monit*. 2019 May 16;25:3617–3623.

Sun T, Zhang L, Feng J, Bao L, Wang J, Song Z, Mao Z, Li J, Hu Z. Characterization of cellular senescence in doxorubicin-induced aging mice. *Exp Gerontol*. 2022 Jun 15;163:111800. doi: 10.1016/j.exger.2022.

Santagostino SF, Assenmacher C-A, Tarrant JC, Adedeji AO, Radaelli E. Mechanisms of Regulated Cell Death: Current Perspectives. *Veterinary Pathology*. 2021;58(4):596–623.

Sangweni NF, Gabuza K, Huisamen B, Mabasa L, van Vuuren D, Johnson R. Molecular insights into the pathophysiology of doxorubicin-induced cardiotoxicity: a graphical representation. *Arch Toxicol*. 2022 Jun;96(6):1541–1550.

Christidi, Effimia & Brunham, Liam. (2021). Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death & Disease*. 12. 339. 10.1038/s41419-021-03614-x

Lee, J.; Choi, M.-K.; Song, I.-S. Recent Advances in Doxorubicin Formulation to Enhance Pharmacokinetics and Tumor Targeting. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 8

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

8. 항체항암제 병용요법을 위한 Tyrosine kinase inhibitor – Crizotinib(크리조티닙)의 가능성

1. RTK의 특성과 기능

1) Tyrosine kinase의 특성

- 약 94개 단백질 tyrosine kinase(티로신 인산화효소) 도메인을 코딩하는 인간 유전자는 약 90개 존재
- 촉매작용에 의한 활성 도메인(catalytically active kinase domain)과 JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 등과 같이 촉매작용에 의한 활성이 없는 도메인인 위인산화 도메인(pseudokinase domain)을 모두 가진 4개 유전자 존재
- 이들 유전자 4개를 포함하여 촉매 활성의 tyrosine kinase 도메인을 포함하고 있는 82개 유전자.
- 두 종류의 tyrosine kinase인 세포막에서 인지하는 receptor tyrosine kinase(RTK)와 세포질 내에서 인산화 과정을 촉매하는 non-receptor tyrosine kinase(nRTK).

2) Receptor tyrosine kinase의 3D structure

- RTK 활성화는 ligand가 결합하여 세포질 domain 활성화에 의해 세포 내 신호전달경로를 조절하게 됨. Figure 1은 RTK의 세포질 영역에 존재하고 항암기전과 직접연관된 kinase insert domain (KID)과 C-terminal의 전체 길이 및 구조를 처음으로 규명한 것임(Inizan 등, 2020).

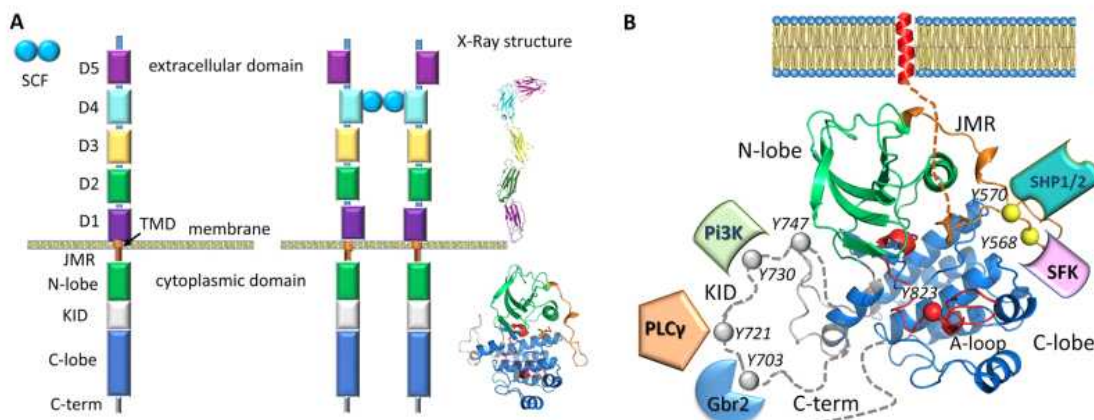


Figure 1. Structure of KIT, a member of the RTK class III. (A) Structural composition of KIT: an extracellular domain (ECD) with five Ig-like regions (D1–D5), a transmembrane domain (TMD) and a cytoplasmic domain (CD) comprising a juxtamembrane region (JMR), an ATP-binding region (N-lobe), the phosphotransferase domain (C-lobe) spliced by a kinase insert domain (KID) and a C-terminal. Stem Cell Factor (SCF) extracellular binding induces dimerization and activation of KIT. Column 'X-Ray structure' represent the crystallographic structures of ECD (PDB: 2CE8⁵²) and CD (PDB: 1T45²⁰) of KIT. (B) Structure of the KIT CD (PDB:1T45) with missing KID, JMR N-term and C-terminal fragment as pointed lines. The tyrosine residues (Y) and the proteins that specifically recognize the KIT phosphotyrosine sites are schematized.

<참고문헌>

Inizan, F., Hanna, M., Stolyarchuk, M. et al. The First 3D Model of the Full-Length KIT Cytoplasmic Domain Reveals a New Look for an Old Receptor. Sci Rep 10, 5401 (2020)

3) 인체 RTK와 ligand

① RTK 19 아종과 55개 receptors

- 아래의 <표>는 인체 RTK 19 아종(subfamily) (Wikipedia, 2024; Trenker 등. 2020;)

<표> 19 different RTK classes
RTK class I (EGF receptor family) (ErbB family)
RTK class II (Insulin receptor family)
RTK class III (PDGF receptor family)
RTK class IV (VEGF receptors family)
RTK class V (FGF receptor family)
RTK class VI (CCK receptor family)
RTK class VII (NGF receptor family)
RTK class VIII (HGF receptor family)
RTK class IX (Eph receptor family)
RTK class X (AXL receptor family)
RTK class XI (TIE receptor family)
RTK class XII (RYK receptor family)
RTK class XIII (DDR receptor family)
RTK class XIV (RET receptor family)
RTK class XV (ROS receptor family)
RTK class XVI (LTK receptor family)
RTK class XVII (ROR receptor family)
RTK class XVIII (MuSK receptor family)
RTK class XIX (LMR receptor)
RTK class XX (Undetermined)

- 아래의 <그림>은 55개의 single-span transmembrane receptor와 다양한 ligands(Trenker 등. 2020)

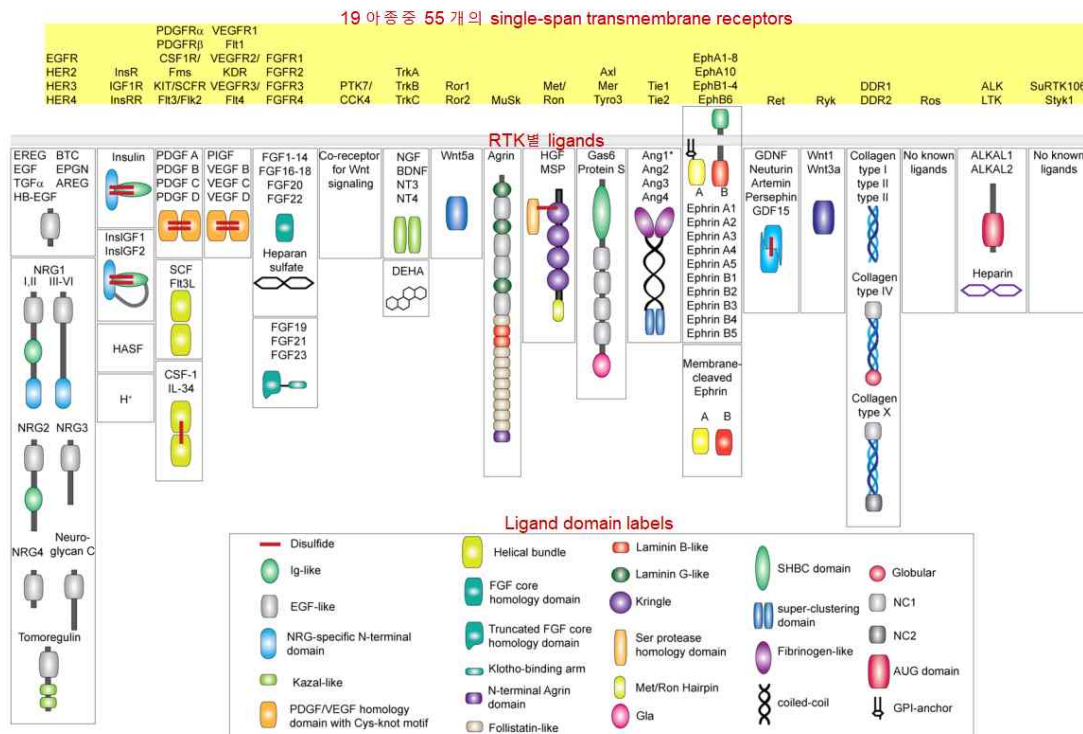


Figure 1: Diversity of the human RTK ligands.

<참고문헌>

Trenker R, Jura N. Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. Curr Opin Cell Biol. 2020 Apr;63:174–185.

4) RTK의 Dimerization과 Higher-order oligomerization

① Dimerization(이량중합화)

- RTK 활성화는 extracellular domain와의 ligand와의 결합 및 extracellular domain의 인산화에 이루어짐
- Figure 2는 Ligand가 RTK의 세포외 도메인(extracellular domain)에 결합하면 주변에 있는 다른 RTK와의 dimerization(이량중합) 및 dimer의 안정화. Dimer의 안정화는 단백질의 반감기를 증가시킴.
- 다음의 ligand인 Epidermal Growth Factor(EGF), Amphiregulin(AREG), Betacellulin(BTC)와 Heparin-Binding-EGF(HB-EGF), Epiregulin(EREG) 등은 **Strong active dimerization**을 형성, 반면에 Epiregulin(EREG)와 Epigen(EPGN) 등의 ligand는 **Weak active dimerization**을 형성
- Dimerization은 RTK의 세포질 도메인(cytoplasmic domain) 자체가 기질이 되며 영역의 tyrosine에 인산화(phosphorylation)
- RTK의 인산화는 다양하고 표적이 되는 세포질 내의 tyrosine 잔기(multiple specific intracellular tyrosine residues)에 자동 인산화(autophosphorylation)으로 신호전달이 이루어짐.

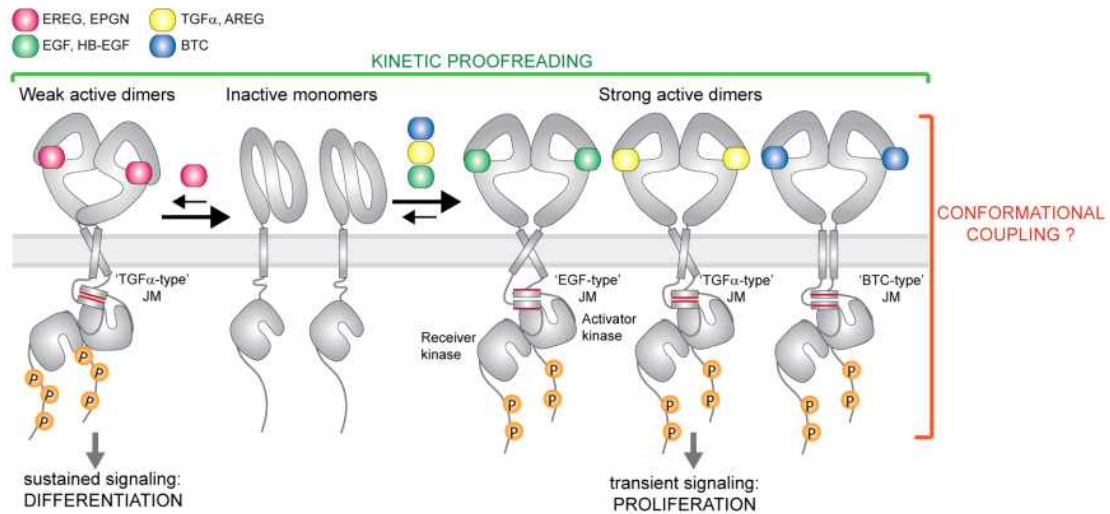


Figure 2: Ligand-specific signaling through EGFR homodimers.

(Trenker 등, 2020)

② Higher-order oligomerization(고차원 소량체화)

- Ligand의 RTK는 dimer뿐만 아니라 higher-order oligomerization를 유도하기도 함. Figure 3의 A에서처럼 EGF(Epidermal growth factor, 상피성장인자)는 시간과 더불어 dimer가 결합하여 oligomer(소량체)을 형성함. 또한 Figure 3의 B에서처럼 EGF-bound receptor가 dimer가 아니고 large cluster(집단화)로 downstream 신호체계로 활성화하기도 함. 특히 EGF를 비롯하여 NRG1β(Neuregulin 1β) 등의 성장인자(growth factor) 등은 homodimer뿐만 아니라 구조적으로 차이가 있는 EGFR 및 HER3(Human Epidermal Growth Factor Receptor 3) 등의 heterodimer 및 cluster를 형성하는 Higher-order oligomerization(고차원 소량체화)을 유도하기도 함(Trenker 등, 2020).
- 이들 dimer 및 cluster 등은 하위 신호체계의 활성화를 유도하지만 Figure 3의 A에서처럼 다가(multivalent) 성장인자는 상호 crosslink에 의한 구조적 twist로 하위 신호전달체계 활성화를 유도하지 못함.

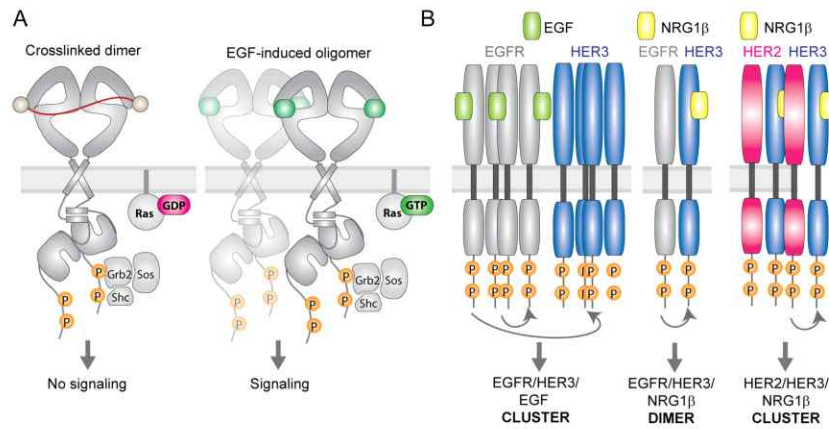


Figure 3: Ligands can diversify RTK signaling via promotion of higher-order receptor oligomers.

5) RTK의 co-receptor

- 수많은 RTK는 고유(cognate)의 ligand에 기본적으로 낮은 결합 친화력을 가지고 있음. 이와 같은 낮은 친화력을 극복하기 위해 ligand 결합과 활성화를 위해 비촉매적 (non-catalytic) co-receptor에 의존함
- 아래 Figure 4의 A)는 RET/co-receptor/ligand complex의 예시이며 B)는 초저온투과전 자현미경으로 관찰한 여러 receptor-ligand-(co-receptor)의 사이드 및 위에서 본 구조임(Trenker 등, 2020).

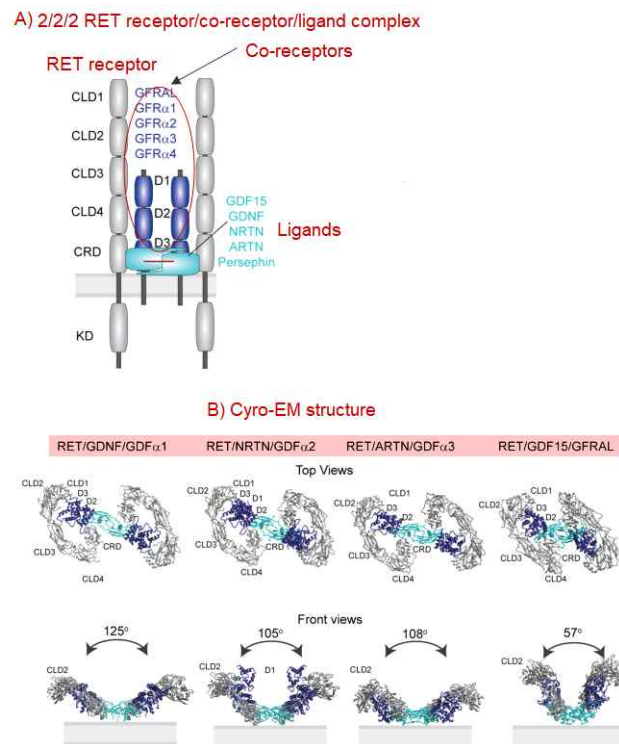


Figure 4: Co-receptors assure ligand specificity and control of downstream signaling in the FGF and RET signaling systems.

2. 개발된 Small molecule 항암제

1) 지난 23년 동안의 small molecule 항암제

- 지난 23년(2001년에서 2023년) 동안 small molecule 항암제는 FIGURE 1의 88개 그리고 <그림-2>에서처럼 13개 등 101개가 신약으로 등록되었음(Liu 등, 2022;

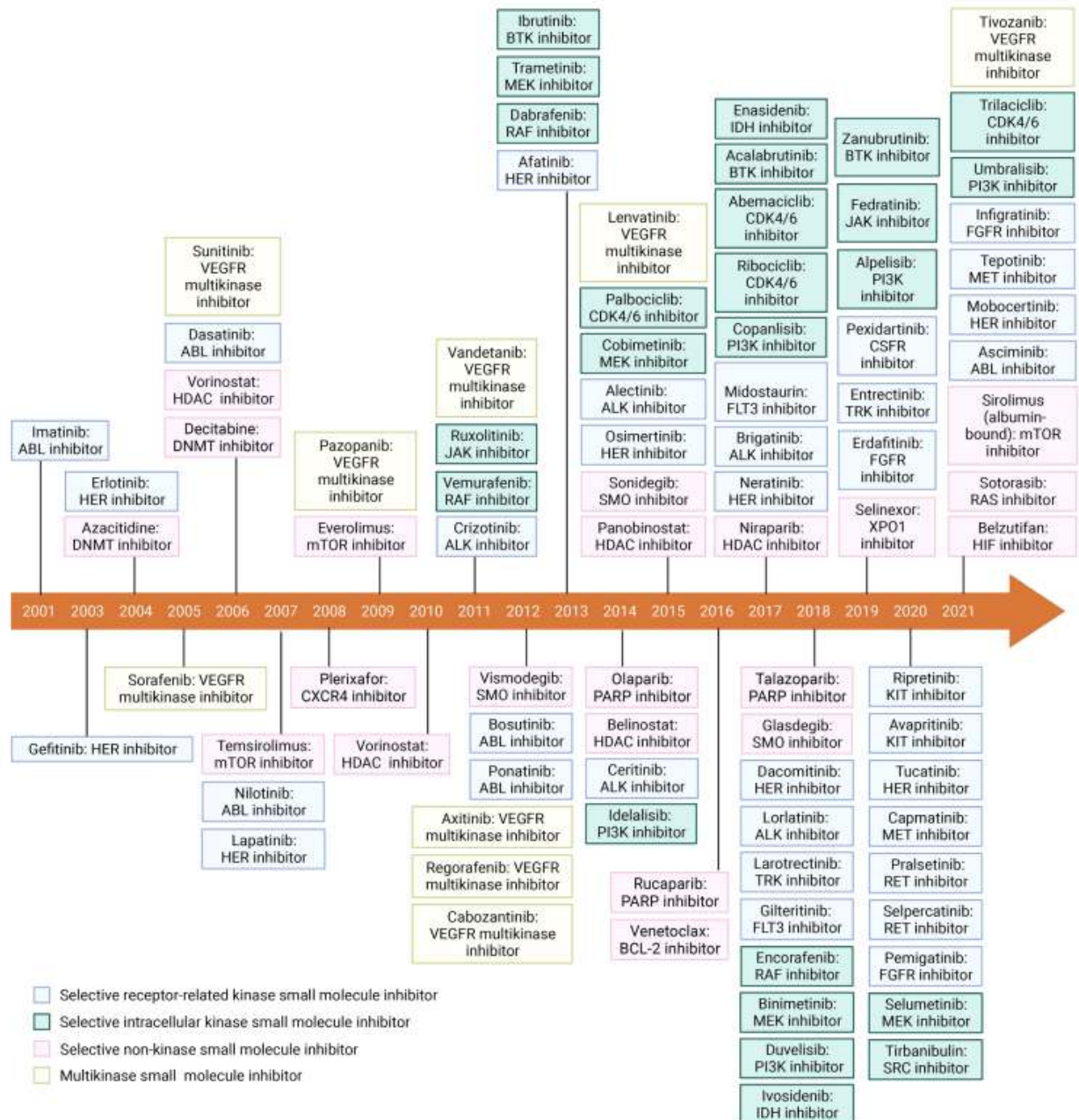
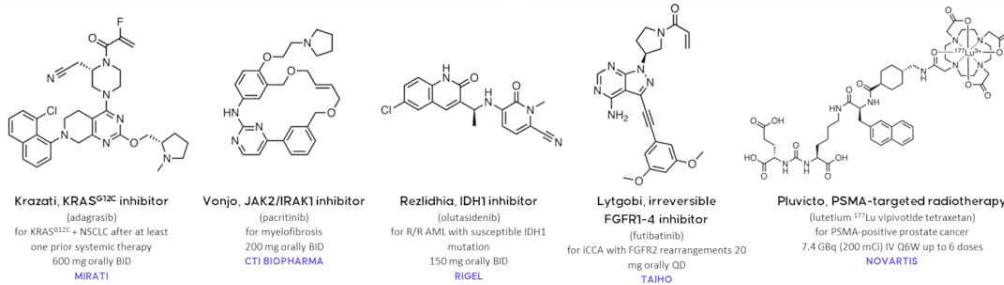


FIGURE 1 Timeline for the US FDA-approved small molecule inhibitors targeting the cancers. Figure created with BioRender.com

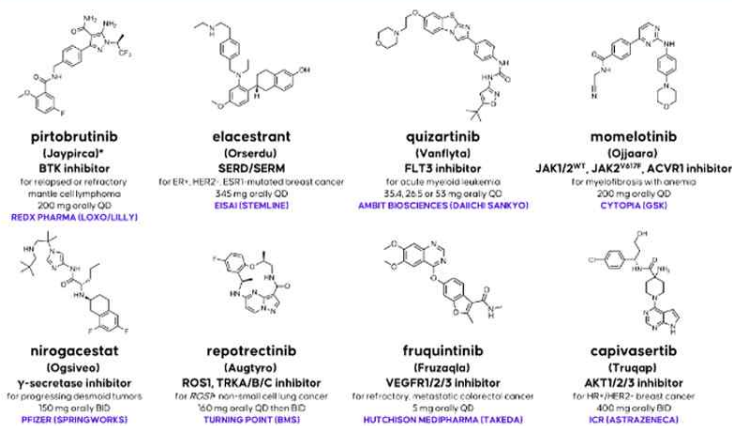
2022 Novel Small Molecule Drug Approvals

Oncology (5)



2023 Novel Small Molecule Drug Approvals

Oncology (8)



<그림-2> 2022년-2023년 FDA-등록 Small molecule 항암제
(<https://drughunter.com/category>)

2) Receptor Tyrosine Kinase의 small molecule inhibitor

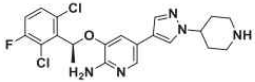
- 신약이 FDA에 등록. 이중 228종이 항암제이며 또한 이들 중 120종이 고형암에 대한 치료제임
- ADC 형태의 표적치료제가 monotherapy로써 증가되고 있지만 combined 항체치료제 + small molecule의 combined therapy도 증가되고 있음.
- 그러나 여전히 표적이 RTK(receptor tyrosine kinases)에 한정되어 있어 항암제 개발의 발전에 제한적 요소로 작용함.
- 여기서는 1고형암의 항암치료제 120종 immune checkpoint-based immunotherapies와 함께 병용요법으로 최선의 적용이 가능한 RTK-targeted small molecule inhibitor에 대한 독성학적 특성 파악.
- 또한 FDA에 의해 등록된 RTK-targeted small molecule inhibitor뿐만 아니라 중국이 등록한 저해제도 리뷰되었음.

3. RTK(receptor tyrosine kinase) inhibitor

3-1) Crizotinib(크리조티닙)

1) 적응암과 약리작용

- 아래의 <표>에서처럼 다른 장기에 전이되어 있고 역형성 림프종 키나아제(ALK) 유전자 혹은 ROS1 유전자에 돌연변이를 갖고 있는 NSCLC인 비소세포(non-small cell) 폐암 (lung cancer) 환자에서 사용되는 약제.
- **ALK 유전자나 ROS1 유전자의 돌연변이**에 의해 만들어진 단백질을 차단하여 암세포의 성장과 확산 그리고 혈관의 성장을 방해하는 티로신 키나아제 억제제이자 항혈관형성제인 MET tyrosine kinase inhibitor PF-02341066, PF-02341066, Xalkori라고도 함(국립 암센터 국가암정보센터, 암용어사전)

Table 1. Properties of approved small-molecule inhibitors of receptor tyrosine kinases				
Chemical structure	Name	Targets	Approved indications (year)	Corporation
	Crizotinib (Xalkori)	ALK/ROS/c-Met	NSCLC (2011)	Pfizer

2) 독성학적 고찰과 평가

① Biotransformation and bioactivation

- Crizotinib은 CYP3A에 의해 대사활성체가 되는 Pro-drug. 대사활성체는 FIGURE 2에서처럼 5개의 탄소 원자와 1개의 질소 원자가 6개의 원자로 이루어진 고리구조인 pyridine-quinone-imine(Paludetto, 2019).
- 또한 CYP3A에 의해 biotransformation이 이루어지면서 동시에 CYP3A 저해제임. 이와 같이 기질이 되는 효소를 대사 후 저해하는 현상을 autoinhibition이라고 하는데 이는 약물의 잔존시간을 증가시키는 원인이 됨(Tan 등, 2010).

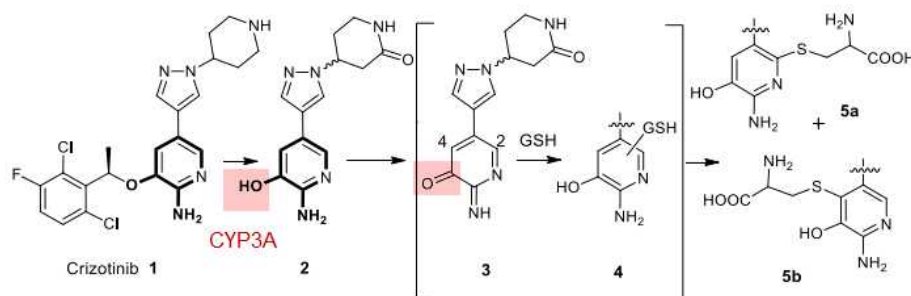
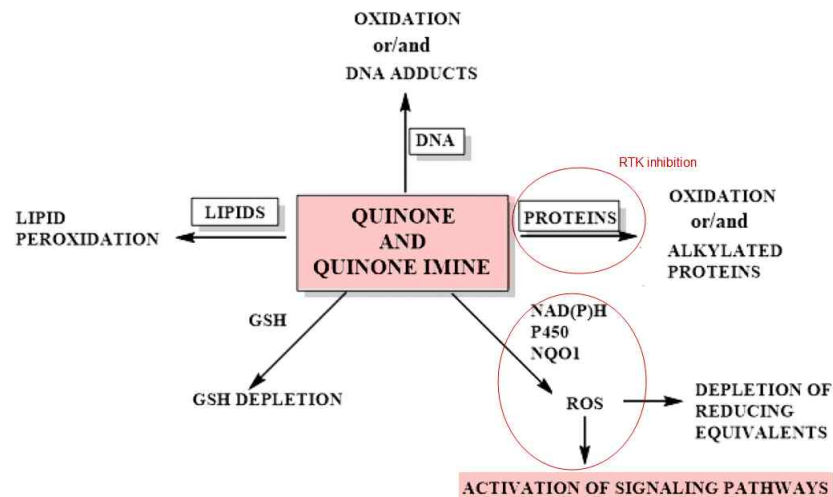


FIGURE 2: Proposed mechanism of crizotinib metabolic activation to an *o*-pyridine-quinone-imine derivative upon oxidation of the aminopyridine moiety.

② Crizotinib의 약리기전과 문제점

- Crizotinib의 항암 효능을 나타내는 대사체는 quinone-imine임.
- 대사에 생성되는 3가지 활성중간대사체(reactive metabolite) 3가지인 electrophilic metabolite, carbon-centered radical, 그리고 redox-active species 중 Crizotinib의 quinone-imine 대사체는 redox-active species임(박영철, 2010)
- Redox-active species(산화-환원 활성종, RAS)인 quinone-imine은 아래의 <도식>처럼 단백질 알킬화를 통해 RTK 활성을 저해하는 것을 추정됨.
- 그러나 대부분의 Redox-active species가 그러하듯 아래의 <도식>에서처럼 quinone-imine은 ligand-receptor가 아니라 DNA 손상 및 ROS 생성을 통해 정상세포 독성이 강할 것으로 추정됨
- 결론적으로 RTK에 특이성이 약하며 정상세포 RTK뿐만 아니라 세포독성 항암제로 분류될 만큼 부작용이 발생할 것으로 사료됨.



3) 병용요법을 위한 화학 항암제의 대사적 특성 요약

항암제	- Prodrug vs Active drug - Pharmacophore의 화학적 특성	- Mode of action	- Biotransformation 과정 (생화학적 전환) - 특이사항
• Crizotinib	- Prodrug - Redox-active species	- Receptor tyrosine kinase 저해 - ROS 및 DNA 손상을 통한 다양한 암세포 자멸사 가능성	- CYP3A의 autoinhibition으로 잔존시간 long time
결론	Receptor tyrosine kinase에 대한 비특이적 저해 로 항암제도의 RTK 저해제로 적절하지 않고 정상세포에 대한 독성이 강한 항암제로 항체성 immune checkpoint inhibitor와 병용요법으로 사용은 적절하지 않음		

<참고문헌>

- Tan W, Wilner KD, Bang Y, et al. Pharmacokinetics (PK) of PF-02341066, a dual ALK/MET inhibitor after multiple oral doses to advanced cancer patients. J Clin Oncol. 2010;28 Suppl 15: Abstr 2596.
- Ou SH. Crizotinib: a novel and first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and beyond. Drug Des Devel Ther. 2011;5:471-85.
- Marie-Noëlle Paludetto. Etude du métabolisme d'inhibiteurs de tyrosine kinases, caractérisation de nouveaux métabolites réactifs du pazopanib et du sunitinib par une approche de catalyse biomimétique et implication potentielle dans leurs effets indésirables. Pharmacologie. Université Paul Sabatier -Toulouse III, 2019. Français.
- Liu GH, Chen T, Zhang X, Ma XL, Shi HS. Small molecule inhibitors targeting the cancers. MedComm(2020). 2022 Oct 13;3(4):e181.
- Wu Q, Qian W, Sun X, Jiang S. Small-molecule inhibitors, immune checkpoint inhibitors, and more: FDA-approved novel therapeutic drugs for solid tumors from 1991 to 2021. J Hematol Oncol. 2022 Oct 8;15(1):143
- Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, Yang W, Tian C, Miao Z, Wang T, Yang S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Signal Transduct Target Ther. 2021 May 31;6(1):201.

68. 병용요법을 위한 화학 항암제의 독성학적 이해와 알고리즘 개발

9. 결론: 항체항암제의 병용요법 개발을 위한 small molecule 탐색의 알고리즘 개발과 약리독성학적 이론

- 컨설팅보고서 8편까지 기존 small molecule 항암제를 검토를 하면서 그 약리 기전이 독성학적 기본에서 벗어나지 않는다는 점을 확인. 이에 항암제 병용요법을 위한 small molecule 탐색을 위한 알고리즘 개발을 위한 INPUT 요소를 작성 시작의 필요성.
- 데이터 기반의 가상 탐색(Data-driven Virtual Screening, DDVS) 분야의 발전으로 분자 도킹, pharmacophore modeling, 분자의 비교분석에 적용을 위해 머신러닝 및 딥러닝 기반의 다양한 기술이 개발되어 신약후보물질 발굴에 작용되고 있음(정명희 등, 2021).
- 머신러닝 및 딥러닝 알고리즘을 통해 약물 효능 및 ADMET(Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination and Toxicity), ligand-target receptor, QSAR 등을 통한 약물 활성 등에 대한 예측이 이루어짐.
- 이와 같은 AI-기반 신약개발을 위해 컴퓨팅학, 화학, 생물학, 독성학, 약동학 등 전문지식의 연계 및 융합에 대한 필요성이 강조되고 있음.
- 그러나 신약의 실용성을 위해 임상효능과 안전성이 초기부터 반영되는 점을 강조하고 있으나 어떠한 요소가 반영되어야 하는가 하는 측면에서는 독성학의 전문지식이 적용되는 것은 거의 없다는 것이 오늘날 현실임.
- 신약개발 특히 **small molecule 항암제 개발**에서는 약리와 독성의 구분한 접근은 불가능하며 **약리가 곧 독성이고 독성이 곧 약리**라는 관점이 필요함.
- AI-기반에 대한 지식이 부족에 기인할 지는 모르지만 '약리가 곧 독성이고 독성이 곧 약리'라는 관점'이 반영된 합성 항암제의 탐색 알고리즘 개발은 어렵지 않을까 하는 생각이 듦. 독성학적 관점이 배제된 현재의 신약 개발을 위한 AI-기반 접근은 다른 적응증에서는 가능성이 높지만 암 치료제 분야에서는 분명한 한계가 존재함.
- 갈수록 더 많은 분야에서 그리고 더 디테일 방향으로 AI 기술이 발전하고 적용되는 현실에서 기존 개발된 AI-기반 신약개발 플랫폼으로는 신약 강국의 미래를 기대하기 어려움.
- 그래서 '약리가 곧 독성이고 독성이 곧 약리'라는 관점'이 반영된 **병용요법을 위한 합성 항암제의 탐색 알고리즘 개발을 위해서는 어떠한 'INPUT' 요소가 필요한지를 확인**이 필요함.

<차례>

Part I. 병용요법 개발을 위한 기본 monotherapy: 항체항암제

Part II. 병용요법 항암제 개발을 위한 Small molecule의 조건

9. 결론:

Part I. 병용요법 개발을 위한 기본 monotherapy: 항체항암제

- 병용요법의 대상 항체항암제(예: 면역관문저해 항체, 암세포의 막(membrane) 단백질-특이적 표적 항체)의 선택
- 암종, 암등급, 암세포의 개별 특이성 등에 따라 선택이 가능하지만 고가의 항체항암제에 대한 접근성도 고려해되어야 함. 예를 들어 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)인 키트루다(Keytruda, 성분명 pembrolizumab)는 아래 FIGURE 1처럼 전 세계에 무상 공급을 통해 병용요법 임상 연구만 전 세계적으로 1,600여 건, 한국에선 약 120건의 임상연구가 진행 중이며 4,100여 명이 참여 중(바이오타임즈 2024.02.26.; Donisi 등, 2021)

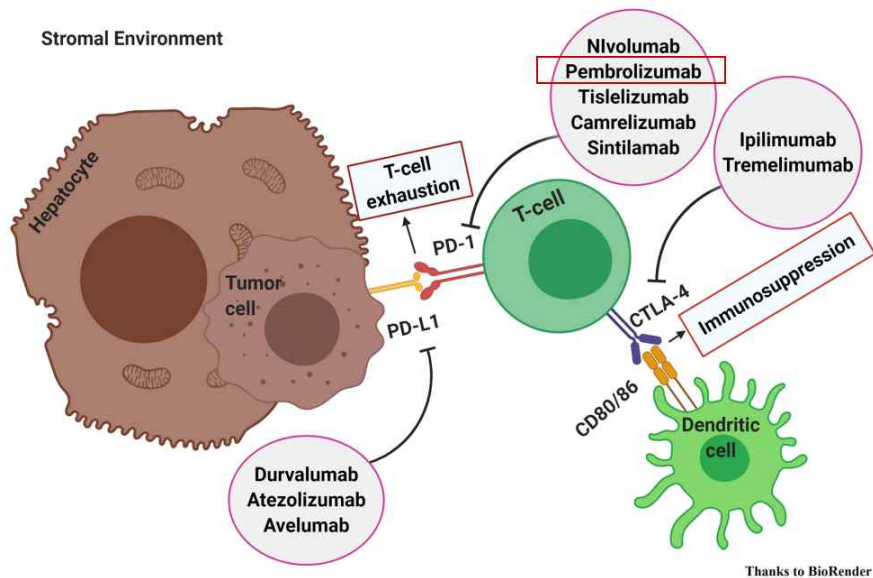


FIGURE 1 | Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. PD-1 binding its ligand PD-L1 prevents TCR signaling, blocks T cell proliferation, and induces the exhaustion of T cells. CTLA-4 binds CD80/CD86 and blocks activation of the T cells. The inhibition of immune checkpoints avoids immune exhaustion, reduces Treg activity, and leads to the reactivation of the anticancer immune response.

9. 결론:

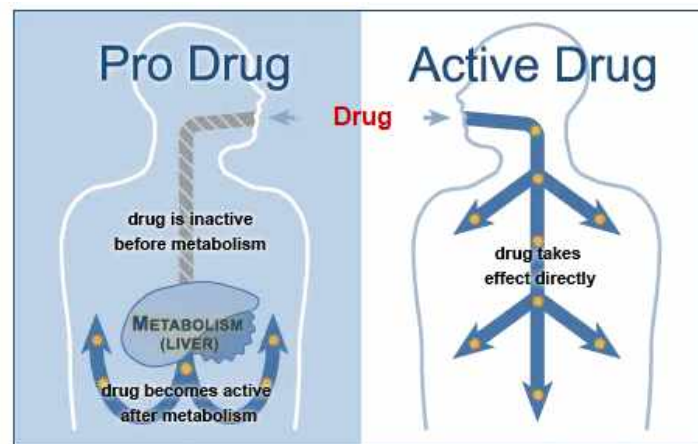
Part II. 병용용법 항암제 개발을 위한 Small molecule의 조건

- 신약의 개발은 크게 target에 대한 특이성(specificity)와 target까지의 전달(delivery)이라는 2 축으로 발전이 되었다고 생각되며 이를 기반으로 리뷰됨.

<Input 1> Active drug과 prodrug 중 prodrug clustering

① Prodrug vs Active drug의 개념

- 약물은 효능 측면에서 대사없이 원물질 자체가 약리작용 분자단이 체내에서 약리작용하는 active drug과 대사 또는 biotransformation 후 생긴 약리작용 분자단에 의해 약리작용을 하는 prodrug으로 구분됨(Oyon, 2015).



<그림> Prodrug vs Active drug의 차이점

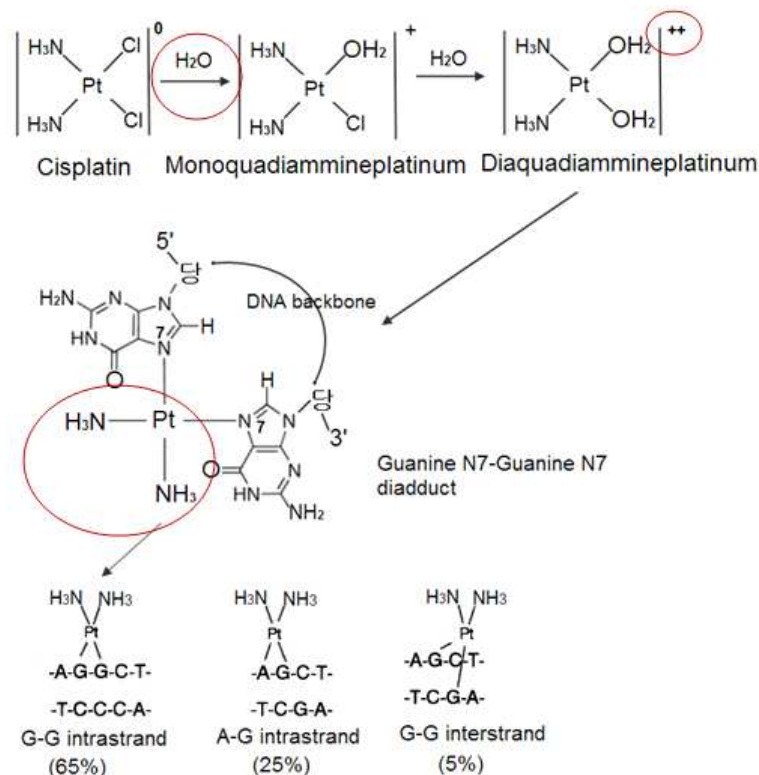
② Prodrug이 항체항암제와 병용요법으로 선택되어야 하는 이유

- 항체항암제(면역관문분자해제 또는 RTK 저해제) 등과의 병용요법은 일종의 ligand-receptor 형태로 약리작용. 이는 표적특이성(target specificity)을 의미함. Prodrug보다 Active drug은 체내에서 빠른 원물질의 활성형으로 전환에 기인하여 표적특이성이 요구되는 표적항암제으로서 역할을 기대하기 어려움.

③ Active drug이 제외되는 이유

- 세포의 강한 증식력 및 생존력에 대한 항암작용을 위해서 세포 내 거대분자와 비가역적 이면서 가장 강력한 결합하는 공유결합이 요구됨.
- 공유결합은 DNA 및 단백질의 친핵성 부위와 공유결합이 이루어짐으로 항암제는 친전자성의 화학적 특성을 가져야 함.

- 약물 원물질 자체는 친전자성을 갖지 않으며 체내에 유입된 후 효소에 의한 촉매작용이 없이 가수분해 또는 단백질과의 상호작용을 통해 친전자성 전환으로 약리작용을 함.
- 이와 같은 특성은 투여 경로와 관련이 없이 후 정확한 표적에 도달하기 이전에 약리작용이 아니라 전신혈관계를 통해 전신의 정상세포에 대한 영향으로 심각한 독성을 유도할 수 있음.
- 대표적인 active drug형 항암제는 cisplatin임. 원물질은 비이온성의 cisplatin은 H₂O와 가수분해를 통해 2개의 전자가 필요한 강력한 친전자성 물질이 됨(박영철, 2010). 특히 친전자성 부위가 2개를 가져 DNA 양쪽 2중 나선에 공유결합하여 염색체 수준의 다양한 inter- 및 intra-strand DNA damage를 유발함.



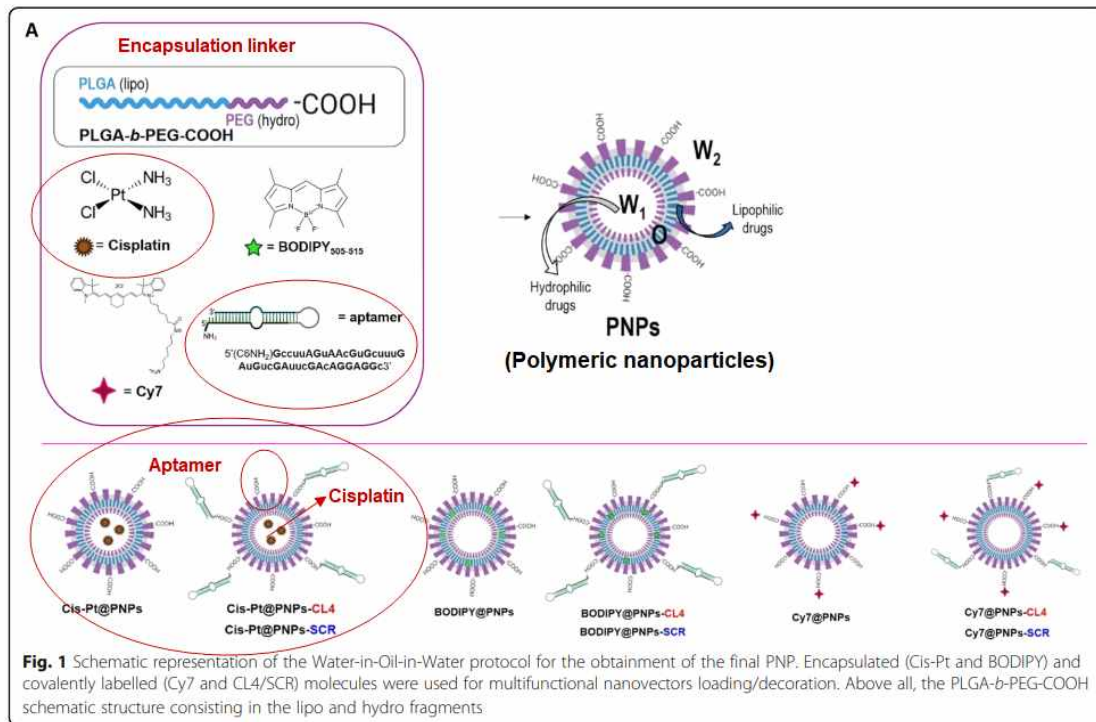
<그림> 가수분해에 의한 Cisplatin의 친전자성 전환 및 DNA 친핵성 부위와의 공유결합

③ Active drug의 ADC 및 ApDC에 응용성

- 이와 같이 active drug은 비특이성과 전신으로 이동 등에 의한 부작용이 심각할 수 있기 때문에 암세포 부위에 집중적으로 항암작용이 가능한 (항체 또는 tRNA)-Linker-항암제 형태인 항체약물접합체(antibody-drug conjugates, ADC) 또는 압타머약물복합체 (aptamer-drug conjugate, ApDC) 등의 표적항암제로 응용됨. Active drug이 항암제의

ADC나 ApD의 payload로 사용되는 이유는 대사가 없이 빠르게 세포독성을 유발하기 때문이다.

- **Cisplatin의 ApDC 예시:** <그림>은 친수성 cisplatin(Cis-Pt)을 PNP(polymeric nanoparticle)로 캡슐화와 linker에 암세포에서 발현되는 EGFR에 결합하는 CL4와 SCR aptamer를 연결하는 과정을 나타낸 것임(Agnello 등, 2021). 적응증은 triple-negative breast cancer임



<참고문헌>

- Agnello L, Tortorella S, d'Argenio A, Carbone C, Camorani S, Locatelli E, Auletta L, Sorrentino D, Fedele M, Zannetti A, Franchini MC, Cerchia L. Optimizing cisplatin delivery to triple-negative breast cancer through novel EGFR aptamer-conjugated polymeric nanovectors. J Exp Clin Cancer Res. 2021 Jul 22;40(1):239.
- Donisi C, Puzzoni M, Ziranu P, Lai E, Mariani S, Saba G, Impera V, Dubois M, Persano M, Migliari M, Pretta A, Liscia N, Astara G and Scartozzi M (2021) Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of HCC. Front. Oncol. 10:601240.
- Falvo E, Tremante E, Fraioli R, Leonetti C, Zamparelli C, Boffi A, Morea V, Ceci P, Giacomini P. Antibody-drug conjugates: targeting melanoma with cisplatin encapsulated in protein-cage nanoparticles based on human ferritin. Nanoscale. 2013 Dec 21;5(24):12278-85.
- Oyon B. Pharmacological Effects, Prodrugs (Definition, Examples) and Sources of Drug Information Updated: Sep 17, 2015. <https://discover.hubpages.com/>
- 정명희·권원현. 신약개발에서의 AI 기술 활용. 현황과 미래. 한국정보통신학회논문지 Vol. 25, No. 12: 1797-1808, Dec. 2021.

<Input 2> 병용요법 항암제 개발을 위한 알고리즘 개발: Prodrug에서 Redox state species의 sorting out

- 항체항암제와의 병용요법에 요구되는 화학항암제 조건과 알고리즘을 위한 INPUT 요소

<Input 1> Active drug과 prodrug 중 prodrug clustering

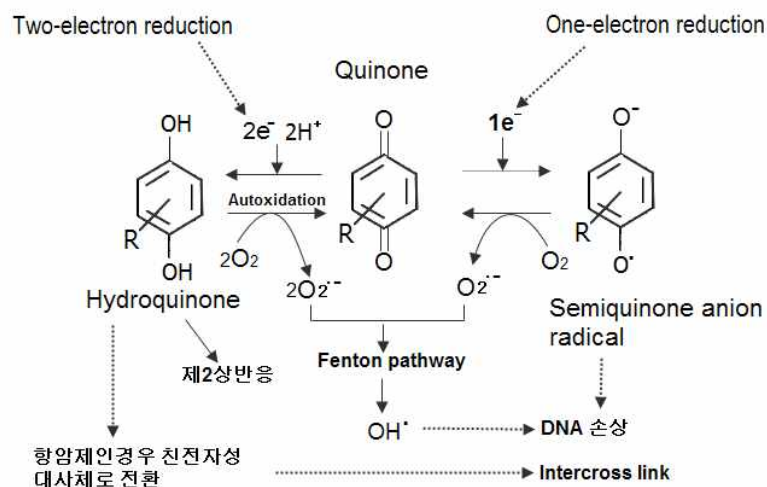


<Input 2> Prodrug에서 Carbon-centered radicals & Redox state species의 sorting out

- 대표적인 탄소중심라디칼(Carbon-centered radicals, CCR)은 cytochrome P450에 대사되어 CCR로 전환되는 CCl_4 이며 거의 살상제 수준임. 그러나 Redox state species는 1세대 화학항암제로 많이 사용되었음. 따라서 여기서 CCR를 생성하는 물질은 논하지 않음.

① Redox state species의 구조와 특성

- Redox-active species(RAS 산화-환원의 순환반응 물질 또는 대사체)의 가장 간단하면서 대표적인 대사체 또는 물질은 환구조에 2개의 dione($-\text{C}(=\text{O})$)을 가진 quinone 구조
- 이들 quinone 구조는 One-electron reduction(일전자-환원)의 cytochrome P450 reductase 등과 같은 효소의 촉매작용으로 semiquinone으로 전환됨. 또한 NQO1(NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1) 또는 DT-diaphorase 효소 등에 의한 이전자-환원(two-electron reduction)로 전환되어 hydroquinone은 자동산화(autooxidation)로 다시 quinone을 산화되는 redox cycle을 반복하며 ROS(reactive oxygen species)를 생성. 생성된 ROS는 철과 반응하는 fenton pathway를 통해 더욱 강력한 ROS인 hydroxyl radical 생성하여 세포독성을 유발함. 이는 RAS의 항암기전이기도 함(박영철, 2010)



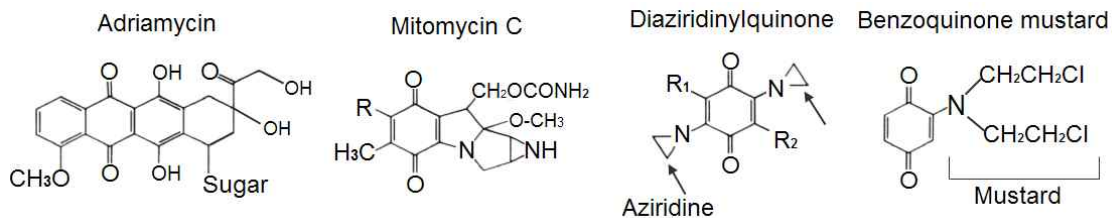
<그림> Quinone 화합물의 one-electron reduction과 two-electron reduction 과정과 ROS 생성

- 이와 같은 RAS 전구물질 또는 전구대사체와의 산화-환원의 순환반응이라는 전자전달 반응을 통해 라디칼대사체와 ROS 등을 반복 생성하는 물질임. 이에 의해 세포 내 Redox 환경을 변화시키는 것으로 다음과 같이 독성학적 기전으로 요약됨.

결합 종류	결합의 특성 및 독성기전
전자전달 반응 (Electron transfer reaction)	<ul style="list-style-type: none"> • Redox active species가 전자의 수용체 및 공여자로 역할 • ROS 생성 및 fenton pathway를 통해 라디칼 생성 • 세포의 산화-환원 비율 등 세포 내 환경변화

② Redox state species의 항암제 종류

- Prodrug은 cytochrome P450에 의한 대사체가 약리작용을 함으로 효소체계에 의한 quinone 구조로의 전환되는 항암제는 아래의 <그림>과 같음 adriamycin(=doxorubicin)과 mytomycin C는 CYP450 system에 부속된 1전자 환원효소인 cytochrome P-450 reductase에 의해 대사되어 RSA 대사체가 됨. diaziridinylquinone과 benzoquinone mustards는 2전자 환원효소인 NQO1(NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1) 또는 DT-diaphorase에 의해 RSA로 전환됨(Begleiter 등 2009; 박영철, 2010)



<그림> Quinone-containing 화합물의 주요 항암제

③ Redox state species 항암제의 비특이성 예시

<예시-1> Doxorubicin

- Figure 2는 cytochrome P450 reductase에 의한 1전자 환원으로 RSA 전환되어 다양한 경로를 통해 암세포를 사멸하는 기전을 나타낸 것임. 이와 같은 다양한 경로를 통한 cytotoxic anticancer는 표적항암제의 병용요법으로 개발이 어려움(Aniogo 등, 2017)

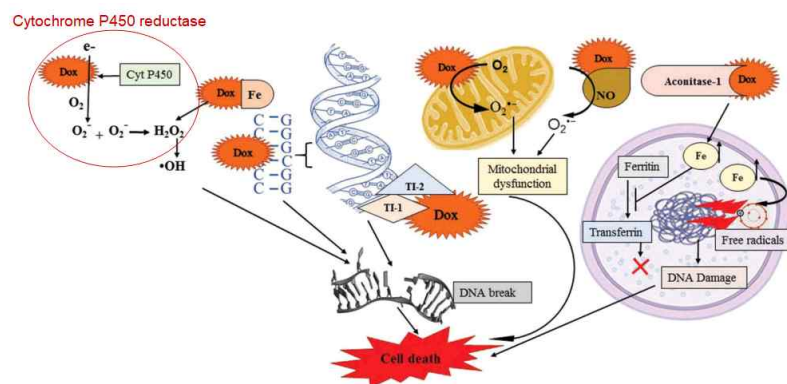


Figure 2. Mechanism of Doxorubicin (Dox) induced cell death. Dox undergoes electron reduction reaction catalyzed by cytochrome P450 reductase enzyme, interacts with nitric oxide synthase (NO) and reacts with iron (Fe) in the presence of oxygen molecule (O₂) to form a reactive oxygen species (ROS). Within the cell, Dox inhibits the action of topoisomerase enzymes (TI-1 and TI-2) which causes DNA disruption and cell death. Dox metabolite (doxorubicinol) can interfere with aconitase-1 protein to cause excessive influx of Fe and so prevents transferrin action. Excess Fe within the cell enhances radical production that causes oxidative stress, leading to eventual DNA damage and cell death.

<예시-2> Ochratoxin A(OTA)

- 정상세포에서 Nrf2(erythroid 2-like 2)는 세포의 산화적 반응에 대응하는 가장 중요한 조절 전사인자(master regulator)임. 이러한 역할 때문에 항산화 효능뿐만 아니라 항염증 효능과 항암 효능을 지님. 그러나 Nrf2는 유전자 돌연변이를 정상세포의 암세포로의 진행을 촉진시키는 dual role을 가진 것으로 확인됨(Rojo 등, 2018).

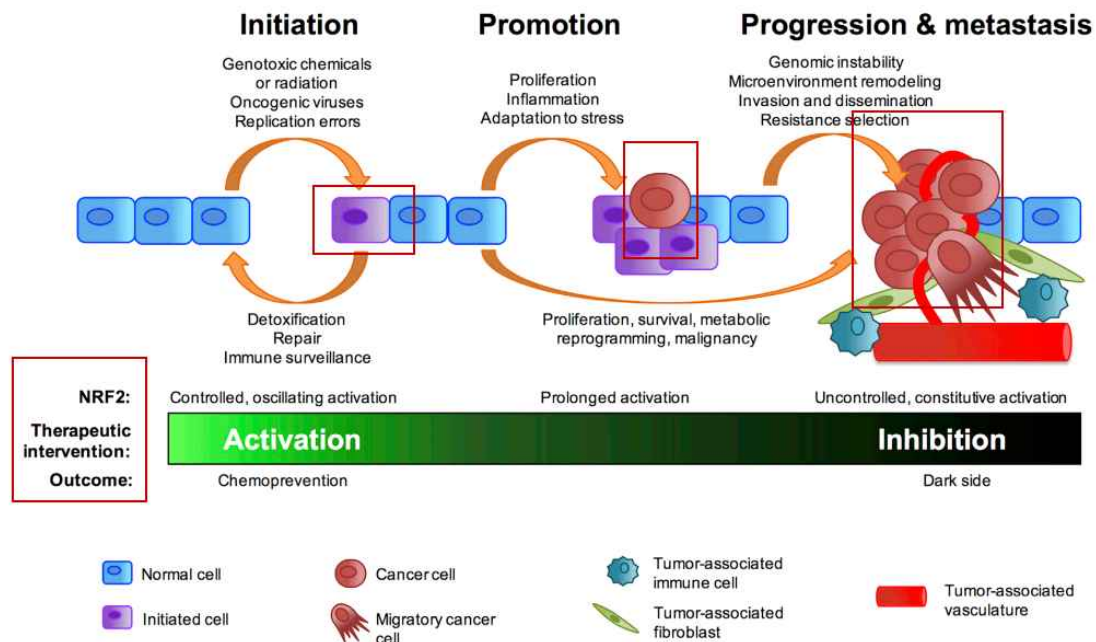
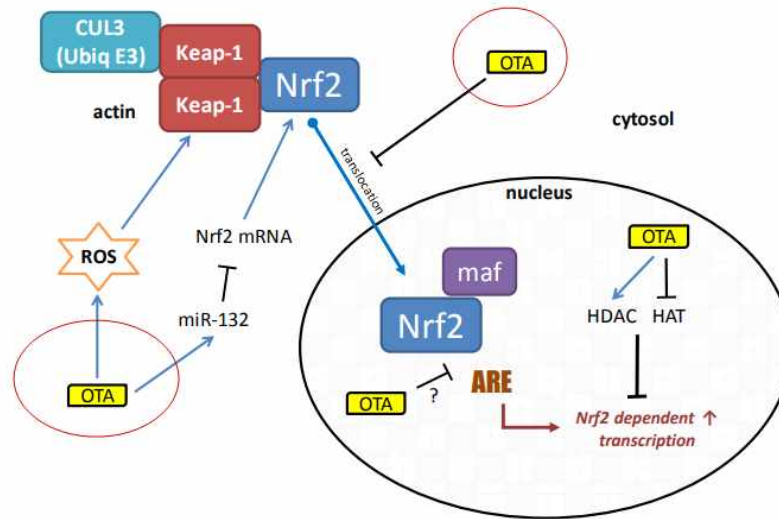


Figure 3. Dual Roles of NRF2 in Cancer

The modes of NRF2 regulation during the multistep development of cancer determine its functional outcome and influence the therapeutic intervention that could be used. Controlled activation of NRF2 in normal cells via the canonical mechanism prevents cancer initiation and is suitable for cancer chemoprevention strategies. Prolonged (non-canonical) or constitutive (loss of regulatory mechanisms) activation of NRF2 participates in cancer promotion, progression, and metastasis. This dark side can be antagonized by inhibition of NRF2.

- **항암기전:** 아래의 Figure 2는 Ochratoxin A(OTA)와 전사인자 Nrf2와 관련된 내용임. Figure 2에서처럼 암세포에서 Nrf2의 세포질에서 핵으로 이동을 저해하여 항암효능을 지닐 수도 있음. 또한 Cytochrome P450에 의한 Ochratoxin quinone로 전환에 의한 **Redox state species**는 fenton pathway를 통해 ROS 생성 및 연쇄반응으로 keap-1 활성화를 통해 Nrf2를 불활성으로 항암효능을 유도할 수 있음(Limonciel 등,2014).

Figure 2. Elucidated mechanisms of OTA induced Nrf2 inhibition.



- 그러나 장기적으로 Ochratoxin A의 과잉노출은 Fig.1의 네모 박스에서처럼 cytochrome P450에 의한 Ochratoxin quinone으로 전환된 **Redox state species**는 Nrf2 및 Keap-1에 돌연변이를 유발하여 암세포의 성장을 촉진시키는 것으로 확인됨(Hassan 등, 2022; Limonciel 등, 2014)

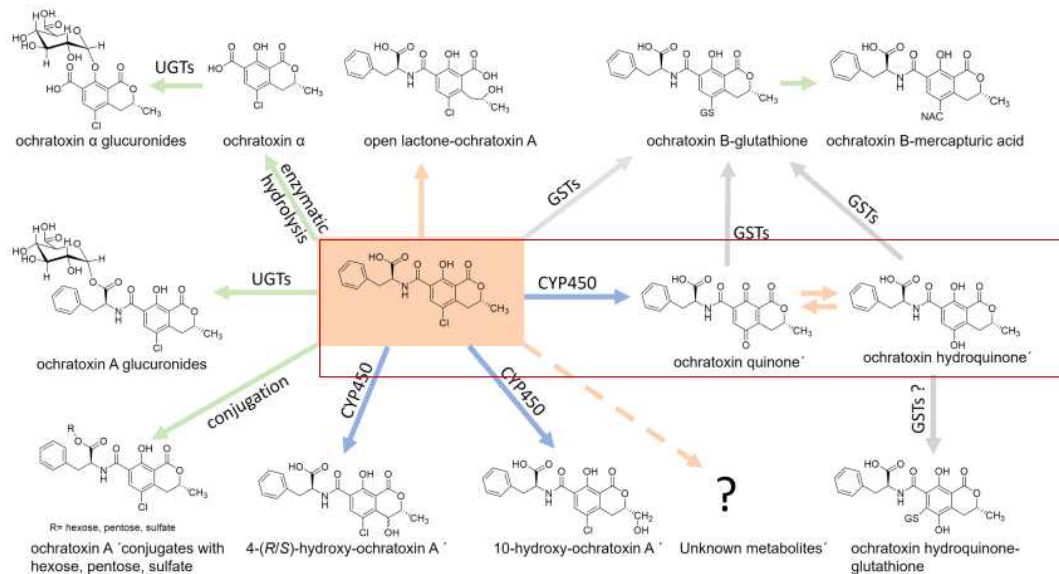


Fig.1 Biotransformation of ochratoxin A (OTA; central box) to metabolites identified *in vivo* and/or *in vitro* and proposed intermediates. Some pathways (green arrows) result in the formation of a product (OT-alpha) with relatively low toxicity and to conjugated metabolites which are more readily excreted than the parent mycotoxin. Formation of hydroxylated OTA metabolites by CYP450 enzymes (blue arrows) is also regarded as detoxication reaction. In contrast, CYP-mediated oxidation of OTA to quinone/hydroquinone intermediates (pink arrows) is considered as potential bioactivation reaction.

The quinone/hydroquinone couple may react with cellular macromolecules or undergo conjugation by GSTs (grey arrows) to glutathione conjugates, e.g., the OTB-GSH metabolite which is then transformed into a mercapturic acid. Opening of the lactone ring of OTA (pink arrow to the top) yields a product with increased toxicity. See text for further details and references on OTA metabolism. A pink arrow pointing to a question mark denotes hypothetical as yet unknown bioactivation reactions for OTA.

④ 결론

- 탄소중심라디칼(Carbon-centered radicals, CCR)은 cytochrome P450에 대사되어 CCR로 전환되는 CCl₄이며 거의 살상제 수준임. 항암제를 포함한 일반 약물 중에서도 CCR을 생성하는 pro-drug은 없음. 이와 같은 측면에서 초기 탐색 측면에서 반드시 제외되어야 함.
- Redox-active species(RAS 산화-환원의 순환반응 물질 또는 대사체)로 전환되는 Pro drug은 제1세대항암제인 adriamycin(=doxorubicin)과 mytomyacin C 등이 있음. 그러나 이들은 cytochrome P-450 reductase 및 NQO1(NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1) 등과 같은 효소에 의해 quinone 구조를 갖는 RAS로 전환됨. RAS는 semiquinone과의 산화-환원 반응 전자의 수용체 및 공여자로 역할. ROS 생성 및 fenton pathway를 통해 라디칼 생성 세포독성을 비롯하여 세포의 산화-환원 비율 등 세포 내 환경을 변화시킴.
- 이와 같이 RAS를 유발하는 항암제는 암세포와 정상세포 구별하 수 있는 특이성이 매우 약하며 비록 암세포와 특이성있다고 하더라도 산화-환원의 전자전달 방으로 상당한 산화적 스트레스로 정상세포의 손상이 불가피할 것으로 사료됨.
- 따라서 RAS를 생성하는 항암제는 cytotoxic anticancer drug으로 분류되며 대부분의 이들 항암제는 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물접합체) 또는 ApDC(aptamer-drug conjugate, 항체-아пта머 접합체) 등으로 개발됨. 앞서 소개한 doxorubicin도 ADC 개발에 가장 먼저 사용된 화학항암제임<Doxorubicin was also among the very first class of payloads used in ADC development, when conventional chemotherapeutic small molecules were first conjugated>(Tashima, 2022; Conilh 등, 2023).
- 따라서 표적 특이성 상당히 높은 항체항암제와 병용요법으로 RAS를 생성하는 항암제는 특이성이 낮고 강도높은 산화적 스트레스로 인하여 항체항암제의 효능도 약할 수 있어 적절하지 않는 것으로 판단됨.

<참고문헌>

- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Jul 9;34(1):21-43.
- Eric Chekwube Aniogo , Blassan Plackal Adimuriyil George & Heidi Abrahamse (2017): Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer, *Expert Review of Anticancer Therapy*, DOI: 10.1080/14737140.2017.1347505
- Begleiter A, El-Gabalawy N, Lange L, Leith MK, Guziec LJ, Guziec FS. A Model for NAD(P)H: Quinoneoxidoreductase 1 (NQO1) Targeted Individualized Cancer Chemotherapy. *Drug Target Insights*. 2009;4.
- Hassan R, González D, Hobloss Z, Brackhagen L, Myllys M, Friebel A, Seddek AL, Marchan R, Cramer B, Humpf HU, Hoehme S, Degen GH, Hengstler JG, Ghallab A. Inhibition of cytochrome P450 enhances the nephro- and hepatotoxicity of ochratoxin A. *Arch Toxicol*. 2022 Dec;96(12):3349-3361.
- Limonciel A, Jennings P. A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity. *Toxins (Basel)*. 2014 Jan 20;6(1):371-9.
- Conilh, L., Sadilkova, L., Viricel, W. et al. Payload diversification: a key step in the development of antibody–drug conjugates. *J Hematol Oncol* 16, 3 (2023).
- Tashima, T. Delivery of Drugs into Cancer Cells Using Antibody–Drug Conjugates Based on Receptor-Mediated Endocytosis and the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Antibodies* 2022, 11, 78.

<Input 3> 병용요법 항암제 개발을 위한 알고리즘 개발: Prodrug의 electrophilic metabolites 선택

- 항체항암제와의 병용요법에 요구되는 화학항암제 조건과 알고리즘을 위한 INPUT 요소

<Input 1> Active drug과 prodrug 중 prodrug clustering



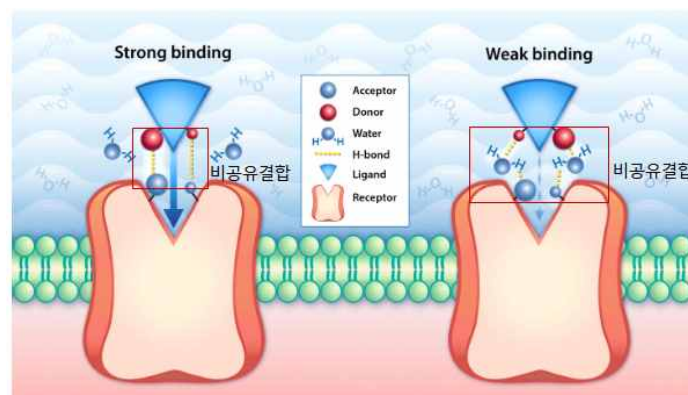
<Input 2> Prodrug에서 Carbon-centered radicals & Redox state species의 sorting out



<Input 3> Prodrug의 Eletrophilic metabolite 선택

1. 정상적인 세포에서 일반적인 ligand-receptor의 비공유결합 반응

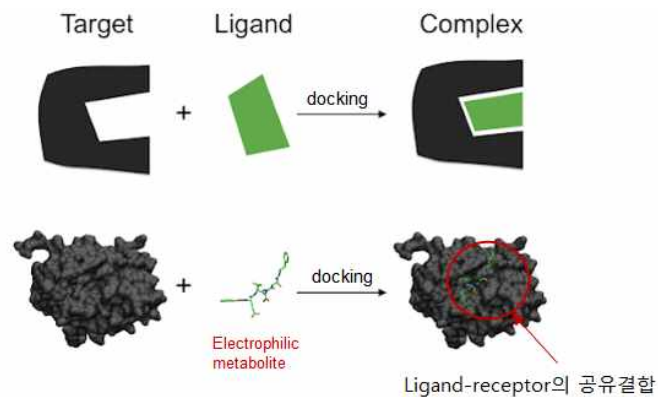
- 정상세포에서 ligand와 receptor는 가역적 반응이 유도되어야 하며 이를 위해서는 쉽게 결합하고 분리되는 비공유결합이 이루어짐
- Noncovalent interactions의 예시: electrostatic, hydrogen-bonding, π - π stacking, and van der Waals interactions 등이 있음.
- 아래의 <그림>은 ligand-receptor 간의 수소결합을 통해 결합 반응이 이루어지는데 반응 사이에 물분자 매개에 의한 결합의 강도가 차이가 있음. 만약 공유결합 경우에는 비가역적 결합으로 지속적인 생리적 반응에 의해 정상세포의 항상성이 무너지게 됨. 따라서 대부분의 정상세포에서 생리적 활성화와 관련된 결합은 가역적 비공유결합으로 이루어짐.



<그림> 정상세포에서 ligand와 receptor의 수소결합에 물분자 매개에 따른 결합의 강도 (Chen, 2016)

2. 암세포의 성장 및 전이를 저해할 수 있는 친전자성 대사체의 항암제 - 공유결합

- 암세포의 증식과 전이 등과 관련된 receptor에 항암제가 가역적인 비공유결합이 이루어진다면 항암제의 약리는 극히 일시적으로 항암효능에 있어서 제한적임.
- 따라서 대부분의 receptor는 아미노산의 -SH와 같이 전자가 풍부한 친핵성 (nucleophilic) 부위가 있으며 이들과 비가역적 공유결합을 위해서는 ligand는 친전자성 (electrophilic)이어야 함. 아래의 <그림>에서처럼 친핵성 binding site를 가진 표적단백질과 친전자성 대사체의 공유결합(covalent bonding)을 통한 molecular docking 모식도 (Scigenis, 2015)



<그림> Electrophilic metabolite의 표적 단백질과의 공유결합(covalent bonding) 모식도

3. 비가역적-표적특이적 공유결합의 항암제 개발역사의 예시

- Fig. 2는 암세포 성장의 성장과 분화, 증식에 관여하는 단백질인 표피성장인자(epidermal growth factor)가 결합하는 수용체(epidermal growth factor receptor)인 EGFR의 저해제(inhibitor) 항암제의 개발역사 과정을 나타낸 것임(Boike 등, 2022).
- 제1세대 EGFR 저해제는 비공유결합으로 가역적 반응이 유도되는 항암제, 제2세대 EGFR 저해제는 공유결합을 하는 비가역적 항암제, 그리고 제3세대 EGFR 저해제는 돌연변이 EGFR에 특이적 공유결합하는 항암제임.
- 제3세대 EGFR 저해제의 가장 중요한 장점은 정상세포의 EGFR에는 결합력이 없거나 약하면서 암세포의 EGFR에 대한 특이적이고 비가역적임. 이는 최대한 부작용을 줄이면서 항암효과를 높이는 가장 중요한 방법임.

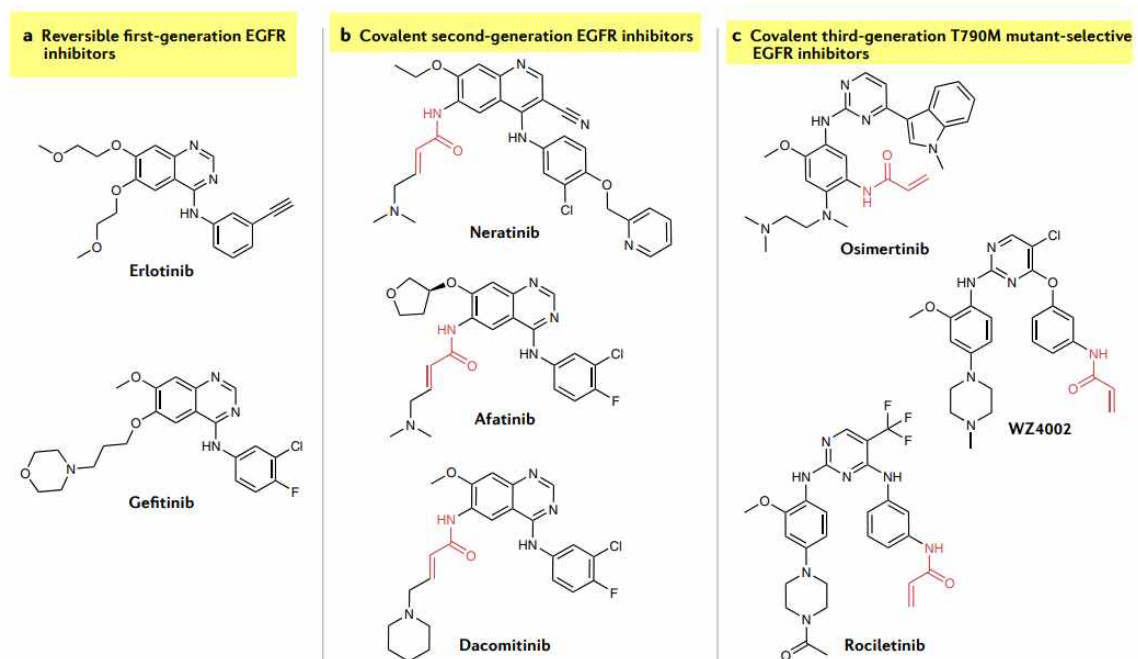


Fig. 2 | **Progression of EGFR inhibitor structures.** Progression from first-generation (part a) to second-generation (part b) epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors involved the addition of a reactive acrylamide electrophile (highlighted in red) to covalently bind a cysteine residue (Cys797) in EGFR. In the progression from second-generation to third-generation (part c) EGFR inhibitors, the quinazoline moiety is replaced with a pyrimidine unit to provide selectivity for the T790M mutant.

4. 결론

- 항암제 개발에 있어서 가장 중요한 특성은 암세포-특이적이면서 비가역적으로 암세포사멸을 지속적으로 유도할 수 있는 특성. 이를 위해서는 표적단백질에 결합력이 가장 강한 공유결합이 가능한 친전자성 대사체가 필수적임. 오늘날 small molecule 항암제의 개발 외에도 비가역적이고 표적특이적 신약 개발의 약물 디자인에 있어서 친전자성 대사체로 전환되는 prodrug 탐색이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있음. 참고문헌 'Advances in covalent drug discovery'를 읽어 보시길 권장합니다.

<참고문헌>

- Boike, L., Henning, N.J. & Nomura, D.K. Advances in covalent drug discovery. Nat Rev Drug Discov 21, 881–898 (2022).
- Scigenis. Schematic illustration of docking a small molecule ligand (green) to a protein target (black) forming a protein-ligand complex. 8 December 2015. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Docking_representation_2.png

<Input 4-5> 병용요법 항암제 개발을 위한 알고리즘 개발: Soft electrophilic metabolites vs Hard electrophilic metabolites

- 항체항암제와의 병용요법에 요구되는 화학항암제 조건과 알고리즘을 위한 INPUT 요소

<Input 1> Active drug과 prodrug 중 prodrug clustering



<Input 2> Prodrug에서 Carbon-centered radicals & Redox state species의 sorting out



<Input 3> Prodrug의 Electrophilic metabolite 선택



<Input 4> Soft electrophilic metabolite vs Hard electrophilic metabolite

1. Electrophilic metabolite의 2 종류

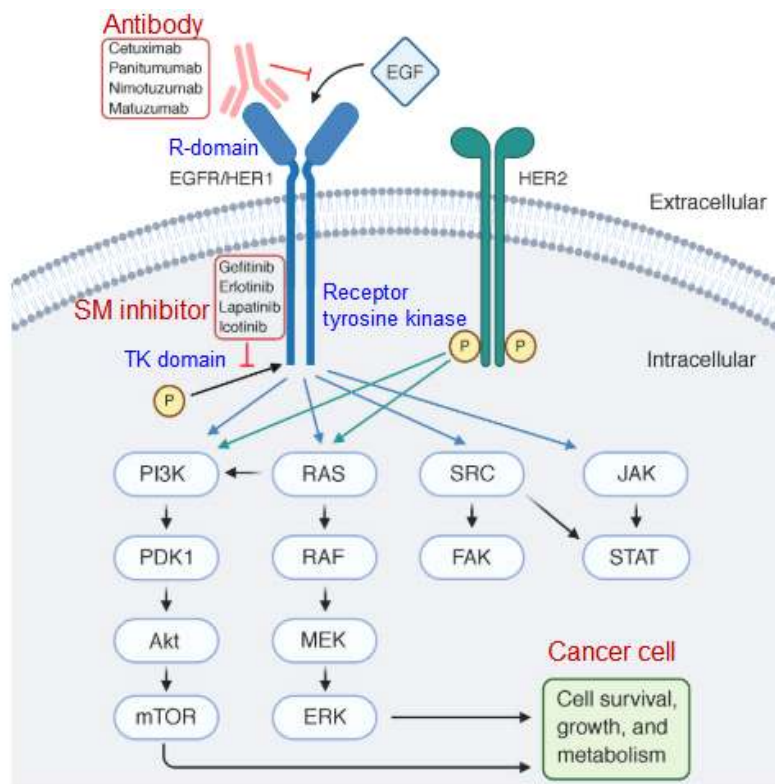
- 친전자성대사체 역시 마찬가지로 <표>와 같이 2종류의 친전자성대사체인 Hard electrophilic metabolite와 Soft electrophilic metabolite로 구분(LoPachin등,2005).
- 이와같은 구분은 전하밀도에 의해 결정되며 전하밀도가 높으면 Hard electrophilic metabolite, 반면에 Soft electrophilic metabolite는 전하밀도가 낮음.
- Hard electrophilic metabolite는 DNA의 친핵성(nucleophilic site)와 공유결합, 반면에 Soft electrophilic metabolite는 protein의 친핵성 결합을 함.
- 따라서 항암제의 Target이 DNA 또는 단백질 등의 어느 것을 선택에 따라 Hard electrophilic metabolite 또는 Soft electrophilic metabolite로 전환되는 prodrug을 선택하게 됨.

<표>Hard 및 Soft Electrophiles과 Hard 및 Soft Nucleophiles의 종류와 특성

Electrophiles
Hard:
Alkyl carbonium ions, Benzylic carbonium ions
Soft:
Acrylamide, Acrolein, Acrylonitrile, Quinone
Nucleophiles
Hard:
<ul style="list-style-type: none"> • Oxygen atoms of purine/pyrimidine bases in DNA • Endocyclic nitrogens of purine bases in DNA
Oxygen atoms of protein serine and threonine residues
Soft:
<ul style="list-style-type: none"> • Protein thiol groups • Sulfhydryl groups of glutathione • Primary/secondary amino groups of protein lysine and histidine residues
(LoPachin등,2005)

2. EGFR의 병용요법을 위한 저해제의 Soft electrophilic metabolite 예시

- EGFR(epidermic growth factor receptor)은 <그림>과 같이 2가지 domain인 세포밖의 수용체 도메인(R-domain)과 세포내의 RTK(receptor tyrosine kinase)인 TK-domain로 구분할 수 있음(Maron등, 2020).
- EGFR의 항체치료제는 R-domain에 개발하여 세포내의 신호전달체계를 통해 암세포의 증식을 억제, 반면에 small molecule의 RTK inhibitor는 TK-domain에서 인산화를 저해하여 암세포 증식을 억제함. 따라서 EGFR의 항체치료제와 small molecule의 RTK inhibitor는 병용요법은 암세포의 2 domain에 선택적 및 공유결합을 통한 이중 잠금장치의 기전이라고 할 수 있음. 이와 같은 측면에서 RTK inhibitor는 RTK 단백질의 친핵성 부위와 공유결합을 위해 soft electrophilic metabolite로 전환되는 small molecule이어야 함.



3-1) EGFR의 3세대 RTK 저해제에 대한 특성

- 아래의 Fig2는 EGFR의 RTK 저해제의 화학적 특성 변화를 기반으로 제1세대-제2세대-제3세대로 구분한 것임.
- 여기서 Astrazeneca가 개발한 **Osimertinib**와 **유한양행의 Lazertinib**에 주목할 점은 RTK의 TK-domain에서 돌연변이가 발생한 **T790M** 및 **T790M**에 각각 **선택적이면서 공유결합을 통한 비가역성**이라는 점(Sattler 등, 2023). 이는 3세대 EGFR inhibitor의 중요한 특성임

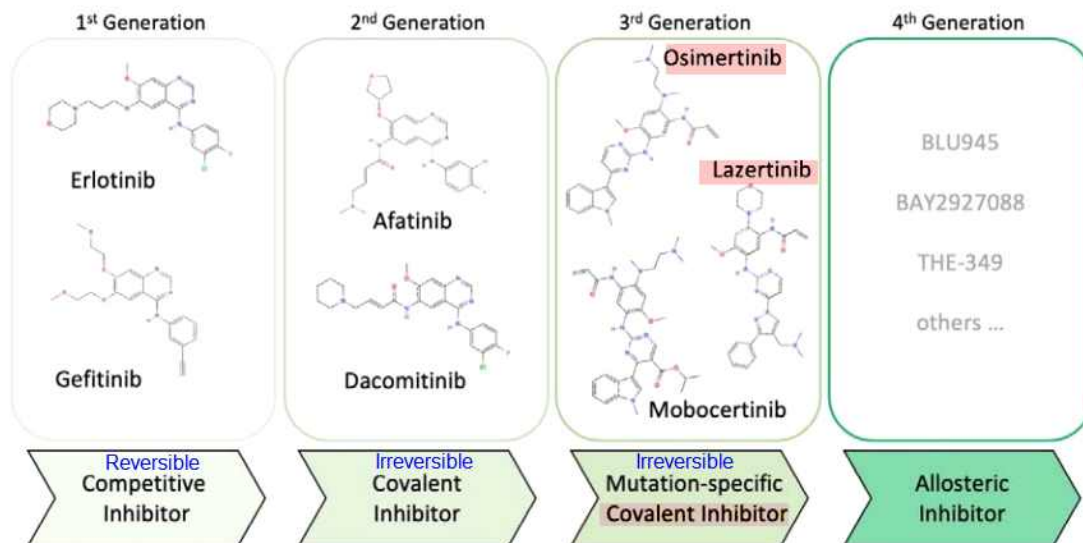


Figure 1. Evolution of EGFR tyrosine kinase inhibitors.

3-2) Osimertinib과 Lazertinib의 화학적 구조와 대사

- Figure 1과 같이 TK-domain 저해제로 먼저 개발되고 FDA에 등록된 osimertinib와 화학 구조적으로 다소 유사함.

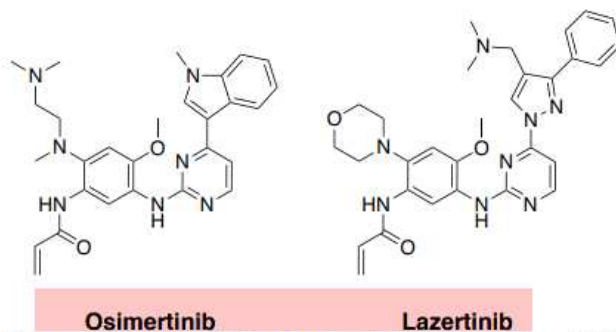


Figure 1. Chemical Structures of third-generation EGFR inhibitors osimertinib and lazertinib.

(Heppner 등, 2022)

3-3) Osimertinib의 대사와 soft electrophilic metabolite

- Table 4는 osimertinib의 대사체 분석을 한 것으로 M13 대사체처럼 cytochrome P450에 의한 일산화 후 glutathione과 결합하다 것은 electrophilic metabolite로 전환되는 **prodrug**으로 추정됨. Dickinson 등(2016)의 논문 제목에서처럼 '**Metabolic Disposition of Osimertinib in Rats, Dogs, and Humans: Insights into a Drug Designed to Bind Covalently to a Cysteine Residue of Epidermal Growth Factor Receptor**'에서도 확인이 가능함

TABLE 4

Semiquantification by ultraviolet (UV) spectroscopy of osimertinib metabolites in mouse, rat, dog, and human hepatocytes

Peak ID	Proposed Structure	Proportion (%) of UV Chromatogram (320–330 nm) ^a			
		Mouse	Rat	Dog	Human
M1	Oxidation (+O)	<1	<1	1–10	<1
M2	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N)	ND	<1	<1	<1
AZ7550	Demethylation (-CH ₃)	1–10	1–10	1–10	1–10
M4	Oxidation (+O)	1–10	1–10	1–10	1–10
M5	Oxidation (+O ₂)	<1	<1	<1	ND
AZ5104	Demethylation (-CH ₃)	<1	<1	<1	<1
M7	Oxidation (+O)	ND	ND	<1	ND
M8	Cysteine-glycine adduct	ND	<1	ND	<1
M9	Demethylation (-CH ₃) + oxidation (+O)	1–10	<1	<1	ND
M10	Glutathione adduct	1–10	>10	1–10	<1
M11	Acetylation or deamination + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M12	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N) + glutathione	1–10	ND	ND	ND
M13	Oxidation (+O) + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M14	Oxidation (+O) + sulfation	ND	ND	<1	ND
M15	Glutathione adduct	<1	<1	ND	ND
M16	Oxidation (+O) + glucuronidation	<1	<1	ND	ND

^a% represents percentage of parent (osimertinib) UV response
ND, not detectable by mass spectrometry.

- 이와 같은 cytochrome P450에 의한 친전자성대사체 생성 그리고 TK-domain의 cysteine에 결합한다는 여러 연구(MacLeod 등, 2018; Abourehab 등, 2021; Ishikawa 등, 2023) 측면에서 확인되어 **soft electrophilic metabolite**로 규정될 수 있음. 특히 최근에는 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer) 환자에서 CYP3A4에 의한 reactive metabolite(soft electrophilic metabolite로 추정)의 AZ5104가 확인되었음(Ishikawa 등, 2023).
- 다음의 <Fig1>에서처럼 Osimertinib의 **soft electrophilic metabolite**는 TK-domain의 Cys-797에 비가역적인 공유결합을 하는 것으로 확인됨(Butterworth 등, 2017).

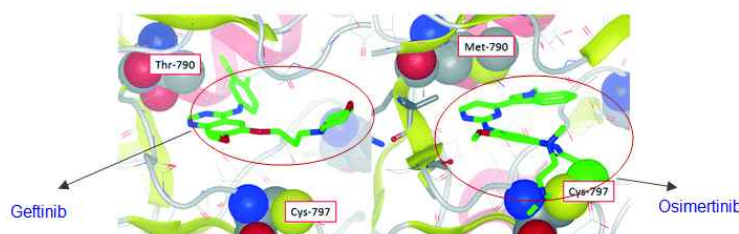


Fig. 1 X-ray crystal structure of gefitinib in wild-type EGFR showing close proximity of the compound with the threonine gatekeeper (left). Modelled structure of osimertinib in T790M mutant of EGFR showing close proximity with the methionine gatekeeper residue and also covalent bond to Cys-797 (right).

3-4) Lazertinib의 대사와 soft electrophilic metabolite

- 아래의 참고원문 Lee 등(2022)의 연구에 따르면 lazertinib도 TK-domain의 Cys797에 비가역 공유결합 및 선택성을 갖는 것으로 확인됨. TK-domain의 Cys797에 공유결합은 lazertinib이 단백질에 우선적으로 결합하는 **Soft electrophilic metabolite**로 추정됨.

<참고원문> Lee J, Hong MH, Cho BC. Lazertinib: on the Way to Its Throne. Yonsei Med J. 2022 Sep;63(9):799-805.

Abstract: Lazertinib is an oral, irreversible, **third-generation epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI)** that forms an irreversible covalent bond to the Cys797 residue in the ATP-binding site of the EGFR kinase domain and exhibits a high selectivity for sensitizing and T790M EGFR mutations. In January 2021, it was first approved for the treatment of advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with EGFR T790M who had previously received EGFR TKI therapy based on LASER201, a phase I/II trial. At a recommended dose of 240 mg, lazertinib achieved an encouraging anti-tumor activity in both extra- and intracranial lesions. With a high half-maximal inhibitory concentration for EGFR wildtype tumors, it is anticipated to pose a lower risk of skin and cardiac adverse events compared to osimertinib. Lazertinib is currently being investigated as a monotherapy in first-line treatment and in combination with amivantamab under various settings. In this review, we systematically summarize the preclinical and clinical data of lazertinib and discuss future perspectives on the treatment of EGFR-mutant NSCLC.

- 아래와 같은 사항을 고려할 때 Lazertinib은 CYP3A4에 의해 대사되어 **Soft electrophilic metabolite로 전환되는 것으로 추정됨. Lazertinib도** Osimertinib와 같이 TK-domain의 Cys-797에 비가역적인 공유결합을 하는 것으로 추정됨.

Drug interaction overview

- Lazertinib is a **CYP3A4 substrate, a weak CYP3A4 inhibitor**, and a BCRP inhibitor
- Coadministration with strong and moderate CYP3A4 inducers
 - ⊙ Avoid
 - ⊙ May decrease lazertinib exposure and reduce efficacy
 - ⊙ Consider alternant therapy that does not induce CYP3A4
- Coadministration with certain CYP3A4 substrates
 - ⊙ Lazertinib may increase concentrations of CYP3A4 substrates where minimal concentration changes may lead to serious adverse reactions
 - ⊙ Follow recommendations for CYP3A4 substrates that interact with weak 3A4 inhibitors
 - ⊙ Monitor CYP3A4 substrate for adverse reactions
- Coadministration with BCRP substrates
 - ⊙ Lazertinib may increase concentrations of BCRP substrates
 - ⊙ Follow recommendation for BCRP substrates
 - ⊙ Monitor BCRP substrate for adverse reactions

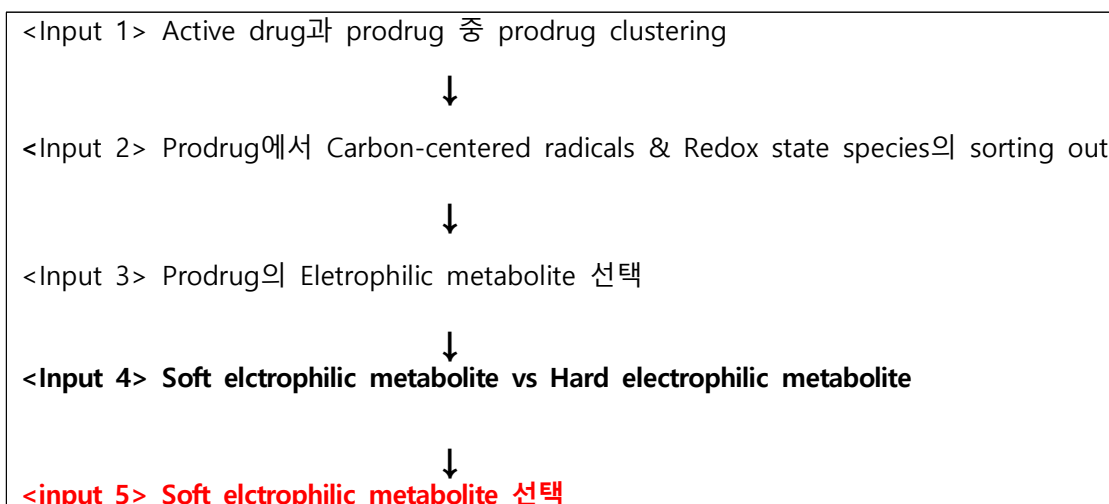
- <https://reference.medscape.com/drug/lazcluze-lazertinib-4000465#0>

4. 결론

EGFR의 TK-domain inhibitor인 Osimertinib와 Lazertinib의 특성은 다음과 같은 공통성을 가짐

	Osimertinib	Lazertinib
TK-domain의 돌연변이 특성	• T790M mutant	• T790M mutant
공유결합 부위	• C797S	• Cys797
Electrophilic metabolite	• Soft	• soft
Cytochrome P450	• CYP3A4	• CYP3A4
결론	표적이 단백질일 경우에는 Soft electrophilic metabolite로 전환되는 small molecule 선택	

- 결론적으로 병용요법 항암제 개발을 위한 알고리즘 개발을 위한 small molecule의 최종 도달지 Soft electrophilic metabolite로 전환되는 특성을 가진 물질을 clustering

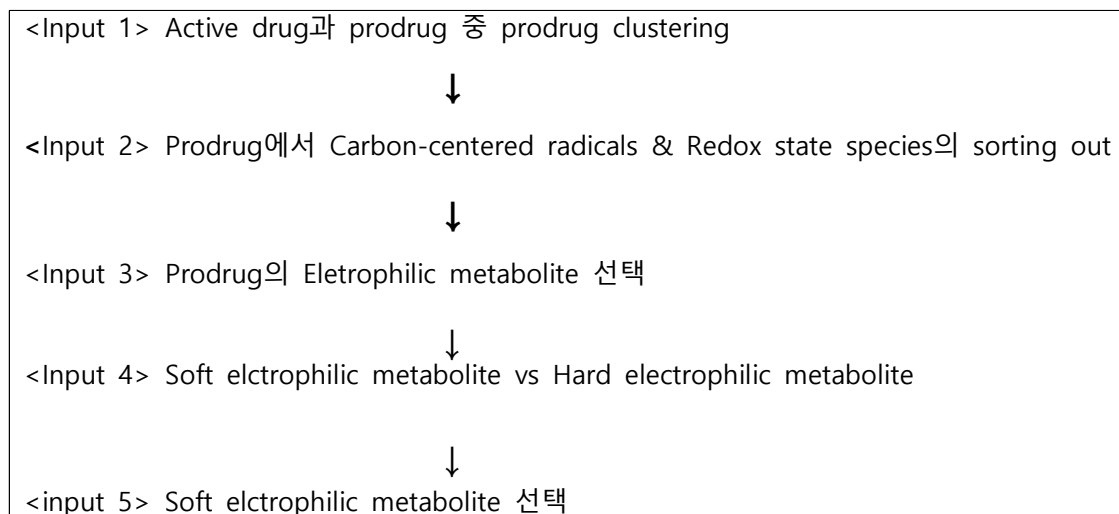


<참고문헌>

- Dickinson PA, Cantarini MV, Collier J, Frewer P, Martin S, Pickup K, Ballard P. Metabolic Disposition of Osimertinib in Rats, Dogs, and Humans: Insights into a Drug Designed to Bind Covalently to a Cysteine Residue of Epidermal Growth Factor Receptor. *Drug Metab Dispos.* 2016 Aug;44(8):1201-12.
- Heppner DE, Wittlinger F, Beyett TS, Shaurova T, Urul DA, Buckley B, Pham CD, Schaeffner IK, Yang B, Ogboo BC, May EW, Schaefer EM, Eck MJ, Laufer SA, Hershberger PA. Structural Basis for Inhibition of Mutant EGFR with Lazertinib (YH25448). *ACS Med Chem Lett.* 2022 Nov 10;13(12):1856-1863.
- Sattler M, Mambetsariev I, Fricke J, Tan T, Liu S, Vaidehi N, Pisick E, Mirzapioiazova T, Rock AG, Merla A, Sharma S, Salgia R. A Closer Look at EGFR Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer through the Lens of Precision Medicine. *J Clin Med.* 2023 Mar 1;12(5):1936
- Lee J, Hong MH, Cho BC. Lazertinib: on the Way to Its Throne. *Yonsei Med J.* 2022 Sep;63(9):799-805.
- Abourehab MAS, Alqahtani AM, Youssif BGM, Gouda AM (2021) Globally approved EGFR inhibitors : insights into their syntheses, target kinases, biological activities, receptor interactions, and metabolism. *Molecules* 26:6677.
- MacLeod AK, Lin D, Huang JT, McLaughlin LA, Henderson CJ, Wolf CR. Identification of Novel Pathways of Osimertinib Disposition and Potential Implications for the Outcome of Lung Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2018 May 1;24(9):2138-2147.
- Ishikawa E, Yokoyama Y, Chishima H, Kasai H, Kuniyoshi O, Kimura M, Hakamata J, Nakada H, Suehiro N, Nakaya N, Nakajima H, Ikemura S, Kawada I, Yasuda H, Terai H, Jibiki A, Kawazoe H, Soejima K, Muramatsu H, Suzuki S, Nakamura T. Population Pharmacokinetics, Pharmacogenomics, and Adverse Events of Osimertinib and its Two Active Metabolites, AZ5104 and AZ7550, in Japanese Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer: a Prospective Observational Study. *Invest New Drugs.* 2023 Feb;41(1):122-133.
- Grabe T, Lategahn J, Rauh D. C797S Resistance: The Undruggable EGFR Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer? *ACS Med Chem Lett.* 2018 Jul 23;9(8):779-782.
- Butterworth S, Cross DAE, Finlay MRV, Ward RA, Waring MJ. The structure-guided discovery of osimertinib: the first U.S. FDA approved mutant selective inhibitor of EGFR T790M. *Medchemcomm.* 2017 May 10;8(5):820-822.

<Input 6> 병용요법 항암제 개발을 위한 알고리즘 개발: 단 하나의 Soft electrophilic metabolite를 생성하는 prodrug

- 지난 번의 input 내용은 병용요법 항암제 개발을 위한 알고리즘 개발 단계에서 Soft electrophilic metabolite vs Hard electrophilic metabolite 중 표적 단백질에 결합하는 Soft electrophilic metabolite을 선택하는 것임



1. 화학 항암제가 불필요하게 독성이 강한 이유 - 3가지

- 제1세대 화학 항암제의 항암 원리는 세포독성에 의한 사멸으로 **정상세포에도 영향**
- 항암제의 세포독성에 대한 극대화를 위해 아래의 <그림>doxorubicin에서처럼 산화-환원 대사체와 같이 **연쇄반응으로 독성의 지속성**

<예시>Doxorubicin의 산화-환원대사체의 연쇄반응을 통한 지속적인 ROS(reactive oxygen species, 유해활성산소) 과정

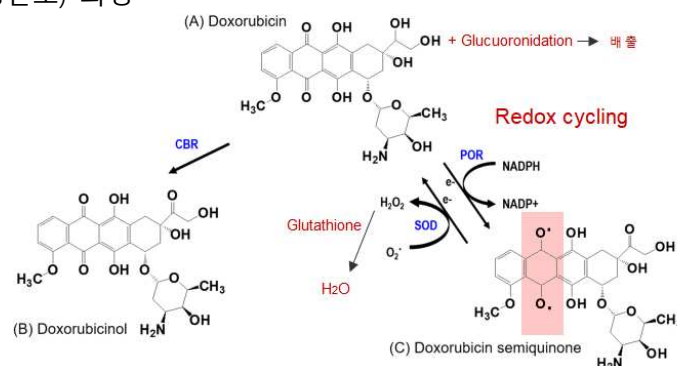
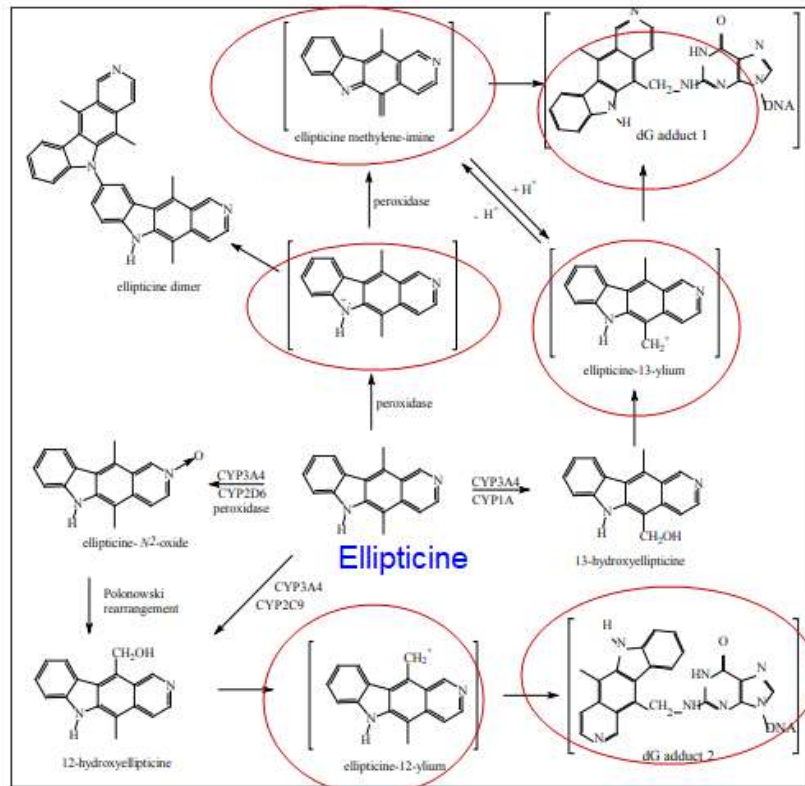


Figure 4. Metabolic pathway and related metabolic enzymes for the transformation of (A) DOX to (B) doxorubicinol and (C) doxorubicin semiquinone, major metabolites of DOX. CBR: carbonyl reductase; POR: cytochrome P450 oxidoreductase; SOD: superoxide dismutase. Arrows represent the metabolic conversion.

<Lee 등, 2022>

③ 공유결합이 가능한 **다양한 친전자대사체**의 생성. 아래의 <그림>은 topoisomerase II 저해하여 암세포 증식을 억제하는 엘립티신(Ellipticine)의 다양한 친전자성대사체 생성 과정. 이와 같이 다양한 친전자성대사체에 의한 **표적 특이성 감소**와 **다양한 비표적과의 공유결합**에 의한 **독성 증가**

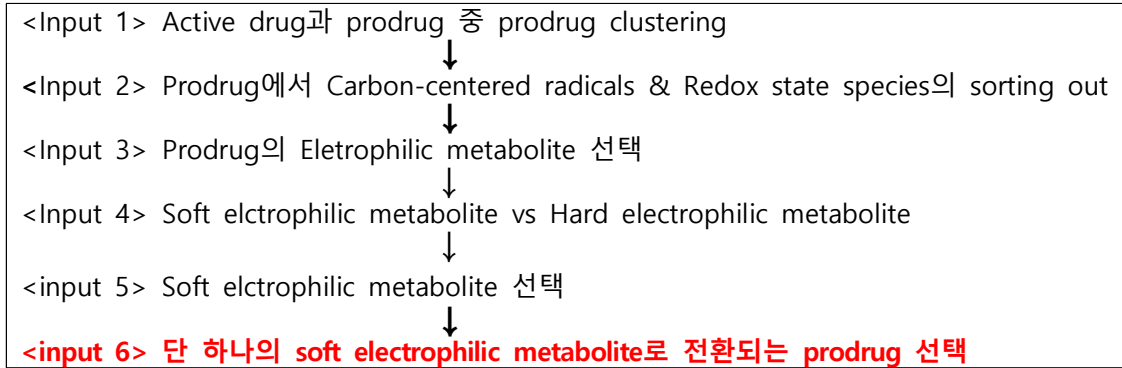
<예시> Ellipticine의 다양한 친전자성대사체 생성 과정



(Stiborová 등, 2012)

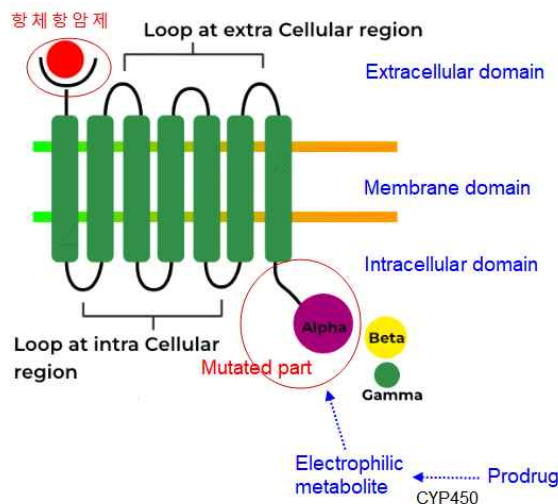
2. 결론

- 이와 같이 3가지 측면에서 화학항암제의 항암제는 강한 독성을 유발하는 원인됨. 결과적으로 이와 같은 3가지에 의한 독성을 극복하기 위해서는 **단 하나의 soft electrophilic metabolite로 전환되는 prodrug 탐색이 중요함**



3. 병용요법을 위한 화학항암제 개발의 응용

- Receptor tyrosine kinase와 같이 암세포의 세포증식과 관련된 세포막 수용체는 막관통 단백질.
- 아래의 <그림>에서처럼 암세포 특이적-막수용체 항원에 항체항암제가 결합하더라도 intracellular domain의 돌연변이로 신호전달체계의 활성화로 지속적인 암세포 증식.
- 막통과가 가능한 small molecule에 의한 저해제가 필요함. 저해제는 암세포 내에서 prodrug에서 electrophilic metabolite로 전환되며 돌연변이형 수용체의 intracellular domain에 공유결합하여 신호전달체계의 불활성화.



<그림> 암세포의 세포분열과 관련된 막수용체
(<https://www.geeksforgeeks.org/gpcr-pathway/>)

- 결국 돌연변이형 단백질의 구조 분석 능력과 이에 공유결합 가능한 **단 하나의 soft electrophilic metabolite**로 전환되는 **prodrug**의 발굴 능력이 정상세포에 대한 영향을 줄이면서 병용요법의 항암제 개발의 핵심
- 이와 같은 병용요법의 전제로 AI-기반 small molecule 탐색 프로그램 개발이 요구됨

<참고문헌>

- Lee J, Hong MH, Cho BC. Lazertinib: on the Way to Its Throne. Yonsei Med J. 2022 Sep;63(9):799-805.
- Stiborová, Marie & Poljakova, Jitka & Eckschlager, Tomáš & Kizek, Rene & Frei, Eva. (2012). Analysis of covalent ellipticine- and doxorubicin-derived adducts in DNA of neuroblastoma cells by the P-32-postlabeling technique. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia. 156. 115-21. 10.5507/bp.2012.043.

69. HLB-리보세라닙의 AI-based 약리기전에 대한 예측

- HLB는 면역관문단백질인 PD-1(Programmed cell death protein 1)의 중국 항서제약 단클론 항체인 캄렐리주맙(Camrelizumab)와 병용투여 항암제인 **리보세라닙(Rivoceranib=Apatinib, 아파티닙)**을 개발하여 FDA 승인을 앞두고 있음
- 적응증은 hepatocellular carcinoma (HCC)

1. 캄렐리주맙(Camrelizumab)의 항암기전

- 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)의 면역항암제. 암세포 표면의 PD-L1의 과발현은 T-cell 표면의 programmed death 1(PD-1)과 결합하여 면역세포 공격을 무력화. Figure 1에서처럼 캄렐리주맙(Camrelizumab)은 PD-1과 결합하여 T-cell 활성화를 통해 항암효능 기전을 유도하는 IgG4(단클론면역글로불린 G4 항체)(Donisi 등, 2021).

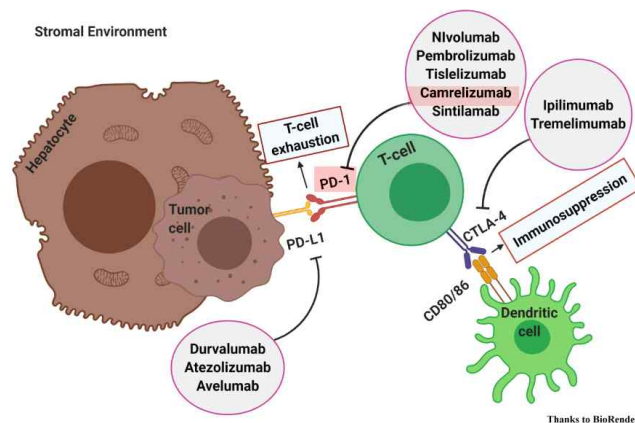


Figure 1. Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. PD-1 binding its ligand PD-L1 prevents TCR signaling, blocks T cell proliferation, and induces the exhaustion of T cells. CTLA-4 binds CD80/CD86 and blocks activation of the T cells. The inhibition of immune checkpoints avoids immune exhaustion, reduces Treg activity, and leads to the reactivation of the anticancer immune response.

2. 리보세라닙(Rivoceranib, 아파티닙)의 항암기전

1) 리보세라닙의 항암의 분자적 약리기전(MOA, mechanism of action)

- 리보세라닙은 신생혈관형성수용체-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2)의 억제제(inhibitor)임
- VEGFR2는 Figure 1과 같이 신생혈관형성수용체(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 결합하면 혈관내피세포의 증식(proliferation)과 이동(migration)을 유도하여 신생혈관형성 증식을 유도(Gál 등, 2020; Modi 등, 2021). 리보세라닙은 sunitinib 및 sorafenib 등과 같이 VEGFR2의 innercellular tyrosine kinase을 저해하여 암조직 내의 신생혈관형성을 억제하여 암세포 사멸을 유도함.

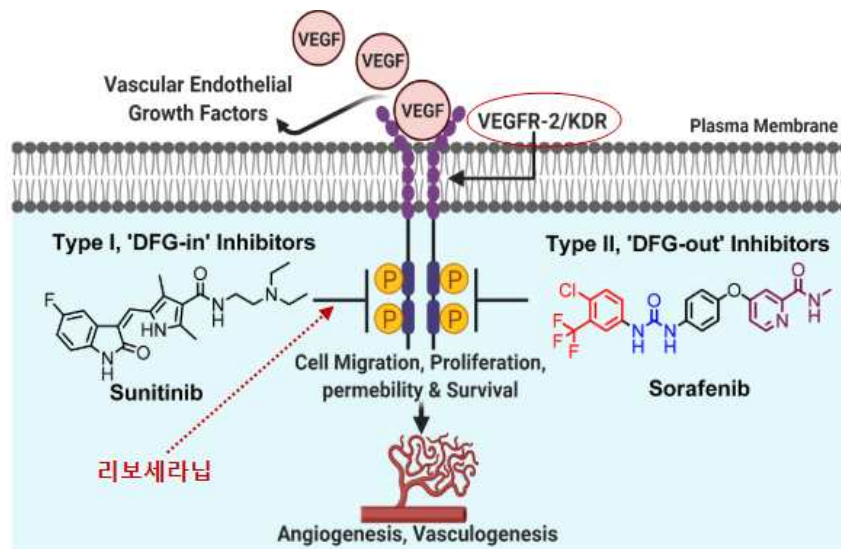


Figure 1. VEGFR2의 innercellular tyrosine kinase 저해와 신생혈관형성 저해 기전

3. 캄렐리주맵과 리보세라닙의 병용요법 항암기전

- 캄렐리주맵은 T-cell의 PD-1에 결합하여 암세포에 의한 T-cell 회피 기능을 억제하여 T-cell에 의한 암세포 공격을 유도
- 리보세라닙은 암조직에서의 신생혈관생성을 억제하여 암세포 증식을 억제하는 항암기전

4. 리보세라닙의 VEGFR2 tyrosine kinase inhibitor로써의 특성 분석

1) EGFR의 tyrosine kinase 저해제의 특징 - 친전자성(electrophilic)

- Figure 1은 암세포 성장의 성장과 분화, 증식에 관여하는 단백질인 표피성장인자(epidermal growth factor)가 결합하는 수용체(epidermal growth factor receptor)인 EGFR의 저해제(inhibitor) 항암제의 개발역사 과정을 나타낸 것임(Boike 등, 2022; Sattler 등, 2023).
- 제1세대 EGFR 저해제는 비공유결합으로 가역적 반응이 유도되는 항암제, 제2세대 EGFR 저해제는 공유결합을 하는 비가역적 항암제, 그리고 제3세대 EGFR 저해제는 돌연변이 EGFR에 특이적 공유결합하는 항암제임.
- 제3세대 EGFR 저해제의 가장 중요한 장점은 정상세포의 EGFR에는 결합력이 없거나 약하면서 암세포의 EGFR에 대한 특이적이고 공유결합(covalent bond)을 통한 비가역적임. 이는 최대한 부작용을 줄이면서 항암효과를 높이는 가장 중요한 방법임. 공유결합(covalent bond)을 통한 비가역적 특성을 가지기 위해서는 친전자성(electrophilic) 화학적 특성으로 전환되어야함.

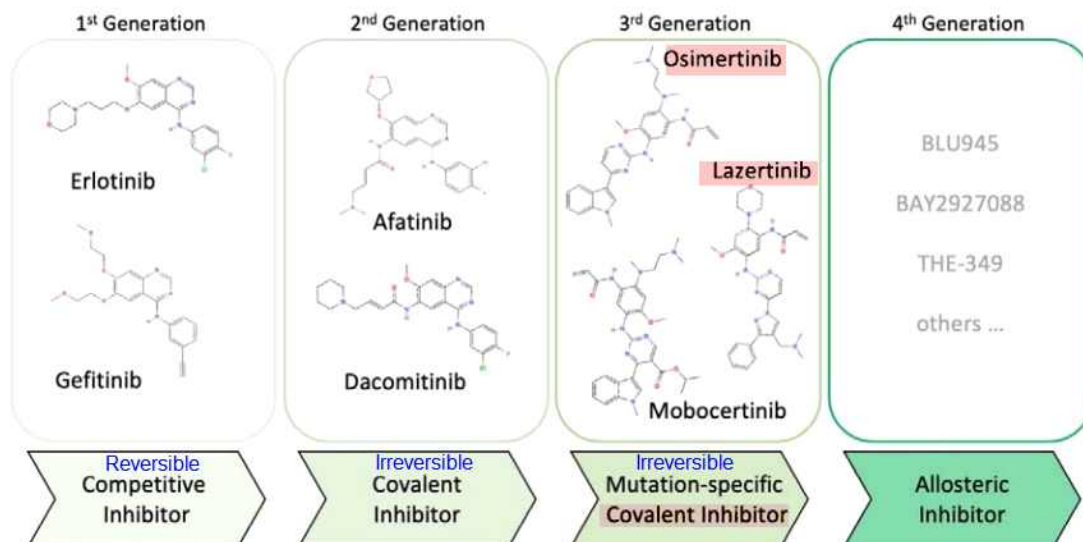


Figure 1. Evolution of EGFR tyrosine kinase inhibitors.

2) VEGFR2의 tyrosine kinase 저해제의 친전자성(electrophilic) 특성에 대한 AI-based 검증

2-1) Sunitinib과 Sorafenib의 친전자성 특성에 대한 확인

- 거의 모든 항암제는 친전자성(electrophilic)을 가져 DNA 및 수용체 단백질의 친핵성 부위와 공유결합을 통해 암세포 증식 억제 기전임.
- Table 1은 Sunitinib과 Sorafenib을 포함하여 모든 Tyrosine kinase inhibitors는 친전자성을 띠는 **reactive metabolites**로 전산화되는 것으로 확인됨(Jackson 등, 2018: Tyrosine kinase inhibitors were listed with the intensity and number of GSH, cyanide, and methoxylamine conjugates formed. Kenny et al., reported the formation of **reactive metabolites** from **sunitinib** in vitro based on detection of two GSH conjugates)

Table 1. Summary of Kinase Inhibitors Approved for Clinical Use.

Drug	FDA Approval Year ^c	Target(s)	Indication	Primary Metabolic Pathway [11,12]
Imatinib	2001	Bcr-Abl, PDGFR, c-KIT	Ph ⁺ CML, ALL, GIST, CEL	CYP3A4, CYP3A5
Gefitinib	2003	EGFR	NSCLC	CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6, (CYP1A1 minor)
Erlotinib	2004	EGFR	NSCLC	CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1
Sorafenib	2005	C-RAF, B-RAF, c-KIT, FLT3, VEGFR, PDGFR	HCC, RCC	CYP3A4, UGT1A9
Sunitinib ^a	2006	PDGFR, VEGFR, c-KIT, RET, CSF-1R, FLT3	RCC, GIST, pNET	CYP3A4 (major), CYP3A5, CYP1A1, CYP1A2
Dasatinib	2006	Bcr-Abl, SCR-family kinases, PDGFR, c-KIT, ephrin (EPH) receptor kinases	CML, ALL	CYP3A4 (major), FMO-3, UGT
Lapatinib ^a	2007	EGFR, HER-2	HER2+ breast cancer	CYP3A4, CYP3A5
Nilotinib	2007	Bcr-Abl	CML	CYP3A4, CYP2C8
Pazopanib ^a	2009	VEGFR, PDGFR, c-KIT	RCC	CYP3A4, (CYP1A2, CYP2C8 minor)
Vandetanib	2011	EGFR, VEGFR	MTC	CYP3A4, FMO-1 & -3
Crizotinib	2011	ALK	NSCLC	CYP3A4, CYP3A5
Vemurafenib	2011	BRAF	melanoma	CYP3A4
Ruxolitinib	2011	JAK	CIM, polycythemia vera, myelofibrosis	CYP3A4, CYP2C9
Ponatinib ^a	2012	ABL, KIT, RET	CML, ALL	CYP3A4, (CYP2C8, 2D6, 3A5 minor)
Regorafenib ^a	2012	RET, VEGFR, PDGFR, other	CRC, GIST	CYP3A4, UGT1A9
Axitinib	2012	VEGFR	RCC	CYP3A4, CYP3A5
Bosutinib	2012	Bcr-Abl	CML	CYP3A4
Cabozantinib	2012	MET, VEGFR	MTC	CYP3A4
Tofacitinib	2012	JAK	rheumatoid arthritis	CYP3A4, (CYP2C19 minor)
Ibrutinib	2013	BTk	mantle cell lymphoma, CLL	CYP3A, (CYP2D6 minor)
Afatinib ^b	2013	EGFR, HER2, HER4	NSCLC	negligible
Trametinib	2013	MEK	melanoma	carboxylesterases
Dabrafenib	2013	BRAF	melanoma	CYP2C8, CYP3A4
Ceritinib	2014	ALK	NSCLC	CYP3A
Nintedanib	2014	FGFR, PDGFR, VEGFR	pulmonary fibrosis	UGT1A1,7,8, (CYP3A4 minor)
Idelalisib ^a	2014	PI3K, B-cell R	CLL	CYP3A, AO, UGT1A4
Osimertinib ^b	2015	EGFR	NSCLC	CYP3A
Alectinib	2015	ALK	NSCLC	CYP3A4
Cobimetinib	2015	BRAF	advanced melanoma	CYP3A, UGT2B7
Lenvatinib	2015	VEGFR, PDGFR	thyroid cancer, RCC	CYP3A, AO
Palbociclib	2015	Cyclin-dependent kinase	HER2-, HR+ breast cancer	CYP3A, SULT2A1
Brigatinib	2017	ALK	NSCLC	CYP2C8, CYP3A4
Neratinib ^b	2017	EGFR, HER2, HER4	HER2+ breast cancer	CYP3A4, FMO
Ribociclib	2017	Cyclin-dependent kinase	EGFR-, HR+ breast cancer	CYP3A4

^a Kinase inhibitors whose product labels have a black-box warning for hepatotoxicity; ^b Kinase inhibitors in which covalent modification is involved in the pharmacologic mechanism of action; ^c Drug prescribing information was used to confirm FDA approval year, target(s), indication, and metabolic pathway(s).

2-2) 리보세라닙의 AI-기반 친전자성 확인

- Figure 1(Yamamoto 등, 2014)은 VEGFR2의 tyrosine kinase 저해제인 sorafenib와 sunitinib 등이 친전자성이 확인었는데 리보세라닙의 biotransformation을 통해 친전자성을 갖는 reactive metabolite 전환에 대한 AI-기반 예측으로 검증함

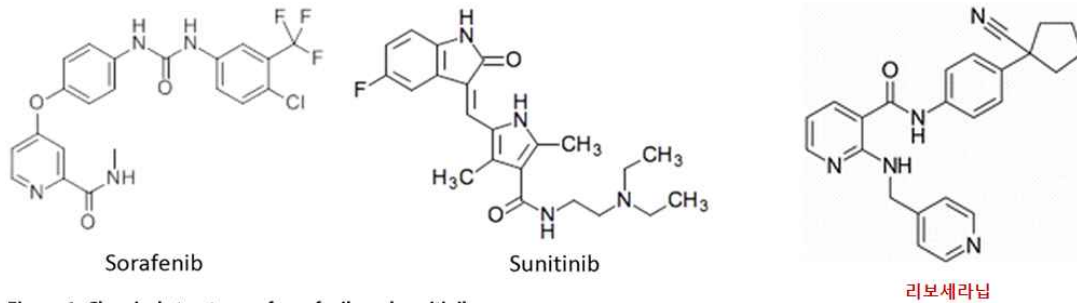
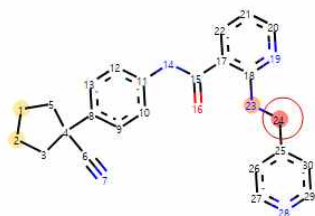


Figure 1. Chemical structures of sorafenib and sunitinib.

① Cytochrome P450에 의한 제1상반응 AI-based 대사 예측

- AI-기반 Biotransformation 예측 프로그램을 통해 리보세라닙의 C24 부위에서 **CYP3A4**에 의한 대사가 유도되는 것으로 예측됨(SMARTcyp). 이는 Ding 등(2013)의 논문에 따르면 Rivoceranib은 CYP3A4에 대부분 대사됨이 확인이 되어 예측프로그램과 일치(Ding 등 (2013)논문: **Rivoceranib is metabolized in the liver mostly by cytochrome P450 CYP3A4/5, with minor contributions from CYP2D6, CYP2C9, and CYP2E1**)



3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	Energy	2DSASA	Span2end	Relative Span	Similarity
1	C.24	34.1	41.1	24.6	4	0.8	0.4
2	N.23	48.2	54.1	10.8	5	0.7	0.3
3	C.1	66.5	75.9	36.2	0	1.0	0.7
4	N.28	66.5	75.6	27.9	0	1.0	1.0
5	C.3	67.2	75.9	29.9	1	0.9	0.3
6	N.19	69.4	75.6	18.0	5	0.7	0.7
7	C.26	78.1	86.3	30.7	2	0.9	0.7
8	C.9	79.4	86.3	22.0	4	0.8	0.7
9	C.21	79.5	86.3	33.2	5	0.7	0.7
10	C.10	79.8	86.3	25.4	5	0.7	0.7
11	C.22	80.3	86.3	25.9	6	0.6	0.7
12	C.27	83.0	92.0	36.8	1	0.9	0.7
13	C.20	84.6	92.0	36.0	4	0.8	0.7
14	N.14	84.7	89.6	10.5	7	0.6	0.3

② 제2상반응의 AI-based 대사 예측

- Ding 등(2013)의 논문에 따르면 **인체**에서 Rivoceranib은 Table 1에서처럼 대부분 극성대 사체의 포합반응의 일종인 당화(glucuronidation)에 의해 친수성대사체로 전환되어 배출 됨. 특히 이들의 논문에서 '**UGT2B7 was the main enzyme responsible for M9-2 formation. Both UGT1A4 and UGT2B7 were responsible for Z-3-hydroxy-apatinib-O-glucuronide (M9-1) formation**'에서처럼 당화효소인 UGT(UDP-Glucuronosyltransferase)에 의해 제2상반응이 유도되는 것으로 확인되었음

TABLE 1
Identification of apatinib metabolites in human plasma, urine, and feces after oral administration of 750 mg of apatinib mesylate tablets using ultraperformance liquid chromatography-UV/quadrupole time-of-flight mass spectrometry

Name	Metabolic Pathway	m/z [M + H] ⁺	Formula	Error (PPM)	Retention Time (min)	Relative Peak Area%				Fragment Ions
						Plasma		Urine 0-24h	Feces 24-48 h	
						4 h	8 h			
M0	Parent	398.197	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O	-3.7	11.4	41.4	27.8	n.d.	76.7	371.186, 212.075, 92.048
M1-1 ^a	E-3-hydroxylation	414.184	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	-22.4	8.1	19.2	17.8	14.6	7.43	387.190, 212.085, 184.091, 92.052
M1-2 ^a	Z-3-hydroxylation	414.190	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	-7.7	7.7	7.43	6.31	12.0	2.92	387.199, 212.088, 184.095, 92.054
M1-3	Mono-oxygenation	414.188	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	-13.0	8.5	1.61	1.41	1.71	0.47	212.085, 92.051
M1-4	Mono-oxygenation	414.194	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	3.0	8.6	0.13	n.d.	n.d.	n.d.	212.082
M1-5	Mono-oxygenation	414.195	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	5.4	10.1	0.10	n.d.	n.d.	0.87	228.079, 92.050
M1-6 ^a	25-N-oxidation	414.192	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	-1.6	10.9	1.70	2.28	2.35	0.12	397.191, 228.078, 108.044
M2	N-dealkylation	307.157	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O	3.1	10.0	2.67	3.55	n.d.	1.05	121.039
M3-1	Z-3-hydroxylation and N-dealkylation	323.157	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	20.6	6.2	1.51	2.85	2.26	n.d.	121.040
M3-2	E-3-hydroxylation and N-dealkylation	323.148	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	-9.9	6.6	1.65	1.73	0.52	n.d.	121.038
M3-3	Mono-oxygenation and N-dealkylation	323.157	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	19.0	7.1	0.40	0.74	0.17	n.d.	121.040
M3-4	Mono-oxygenation and N-dealkylation	323.157	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂	19.9	9.6	0.19	0.42	0.10	n.d.	137.035
M4-1	Dioxygenation and N-dealkylation	339.144	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	-5.0	4.5	n.d.	n.d.	0.19	n.d.	121.038
M4-2	Dioxygenation and N-dealkylation	339.144	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	-6.2	5.1	n.d.	n.d.	0.61	n.d.	121.039
M4-3	Dioxygenation and N-dealkylation	339.151	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	16.6	5.6	n.d.	n.d.	0.28	n.d.	121.041
M4-4	Dioxygenation and N-dealkylation	339.155	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	27.5	5.8	n.d.	n.d.	0.15	n.d.	121.044
M4-5	Dioxygenation and N-dealkylation	339.150	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	13.3	6.2	n.d.	n.d.	0.41	n.d.	137.036
M4-6	Dioxygenation and N-dealkylation	339.142	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	-9.7	6.6	n.d.	n.d.	0.54	n.d.	137.035
M4-7 ^a	Z-3-hydroxylation, 16-hydroxylation and N-dealkylation	339.141	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	-14.2	6.8	n.d.	n.d.	0.66	n.d.	137.031
M4-8 ^a	E-3-hydroxylation, 16-hydroxylation and N-dealkylation	339.148	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	5.9	7.2	n.d.	n.d.	0.41	n.d.	137.034
M4-9	Dioxygenation and N-dealkylation	339.153	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	21.6	7.7	n.d.	n.d.	0.17	n.d.	137.040
M5-1	Mono-oxygenation and dehydrogenation	412.180	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₂	5.8	7.1	n.d.	n.d.	0.65	n.d.	210.072, 121.040
M5-2	Mono-oxygenation and dehydrogenation	412.185	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₂	18.9	7.4	n.d.	n.d.	0.82	n.d.	210.068
M5-3	Mono-oxygenation and dehydrogenation	412.181	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₂	8.2	7.8	0.15	n.d.	0.19	n.d.	108.043
M5-4	Mono-oxygenation and dehydrogenation	412.177	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₂	0.2	8.6	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	212.085
M6-1	Dioxygenation	430.195	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	16.1	5.7	n.d.	n.d.	0.28	n.d.	212.088
M6-2	Dioxygenation	430.197	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	20.5	6.2	n.d.	n.d.	1.36	0.31	212.085
M6-3	Dioxygenation	430.185	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	-7.2	6.5	0.17	0.18	2.97	0.32	212.036
M6-4	Dioxygenation	430.178	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	-22.3	6.7	0.18	0.20	2.71	0.99	212.038
M6-5	Dioxygenation	430.195	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	15.4	6.8	n.d.	n.d.	n.d.	3.64	228.088, 92.053
M6-6	Dioxygenation	430.189	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	3.5	7.1	n.d.	n.d.	0.91	n.d.	212.083
M6-7	Dioxygenation	430.195	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	16.3	7.2	n.d.	n.d.	n.d.	4.42	228.089, 92.056
M6-8	Dioxygenation	430.202	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	33.1	7.6	n.d.	n.d.	n.d.	0.26	228.091, 92.058
M6-9 ^a	Z-3-hydroxylation and 25-N-oxidation	430.188	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	-0.2	7.8	0.17	0.22	2.97	n.d.	212.036, 108.020
M6-10 ^a	E-3-hydroxylation and 25-N-oxidation	430.180	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	-18.2	8.1	0.20	0.39	5.21	n.d.	212.027, 108.037
M6-11	Dioxygenation	430.185	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃	-6.5	8.5	n.d.	n.d.	0.67	n.d.	212.082, 108.043
M7-1	Mono-oxygenation and sulfation	494.151	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₅ S	2.2	7.0	n.d.	n.d.	0.21	0.15	212.081
M7-2	Mono-oxygenation and sulfation	494.150	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₅ S	1.0	7.3	0.08	n.d.	0.43	0.33	212.086
M8-1	Z-3-hydroxylation, N-dealkylation and O-glucuronidation	499.174	C ₂₄ H ₂₅ N ₅ O ₈	-17.8	5.1	n.d.	0.16	3.01	n.d.	323.151, 121.038
M8-2 ^a	E-3-hydroxylation, N-dealkylation and O-glucuronidation	499.181	C ₂₄ H ₂₅ N ₅ O ₈	-3.7	5.5	0.52	0.82	10.3	n.d.	323.151, 121.038
M9-1	Z-3-hydroxylation and O-glucuronidation	590.220	C ₃₀ H ₃₁ N ₅ O ₈	-9.1	6.5	0.69	0.53	1.07	n.d.	414.195, 212.082
M9-2 ^a	E-3-hydroxylation and O-glucuronidation	590.213	C ₃₀ H ₃₁ N ₅ O ₈	-20.3	6.8	19.6	32.2	27.9	n.d.	414.183, 212.079, 92.047
M10	Dioxygenation and glucuronidation	606.210	C ₃₀ H ₃₁ N ₅ O ₉	-16.0	6.9	0.20	0.44	1.30	n.d.	430.183, 108.042

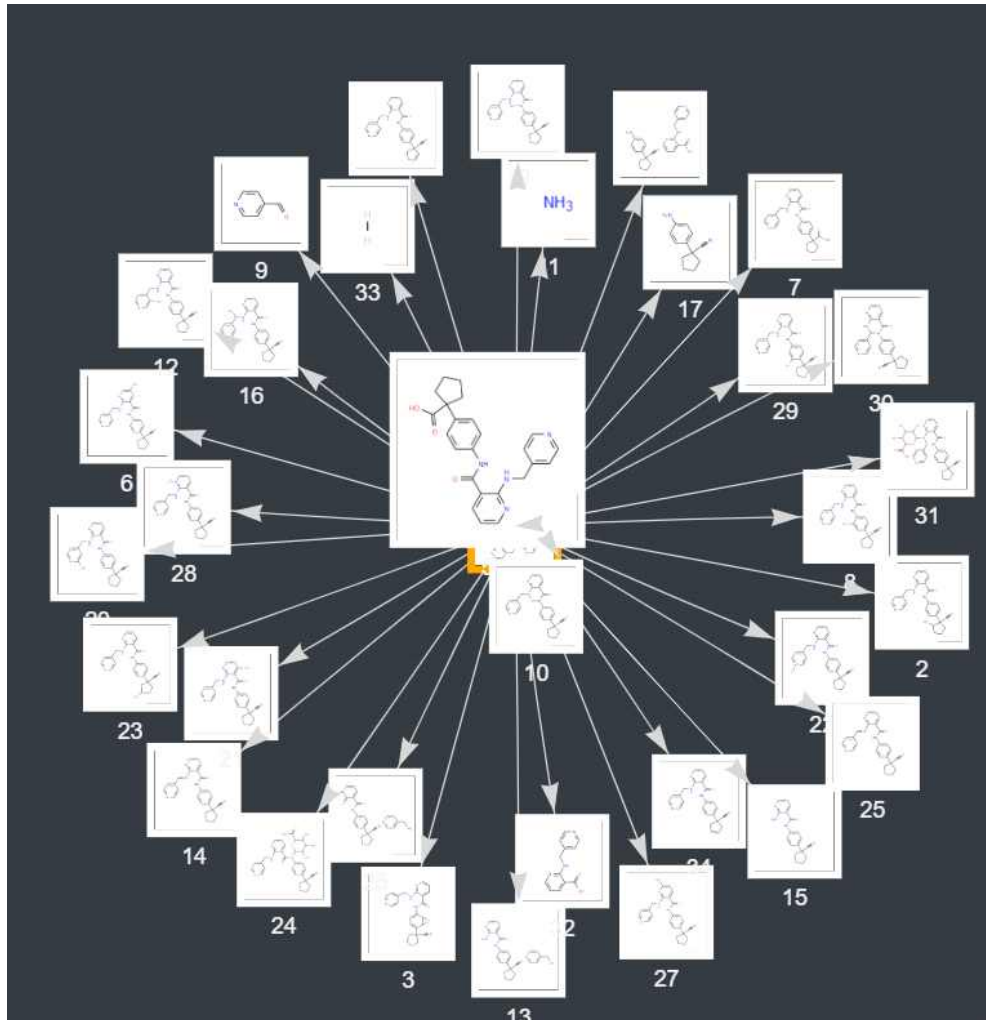
n.d., not detected; PPM, parts per million.

^aMetabolites that were confirmed by comparison with reference standards after chromatography, mass spectrometry, and NMR.

Metabolism and Pharmacokinetics of Apatinib in Humans

1199

- Ding 등(2013)의 논문과 거의 동일하게 <그림-1>과 <표-1>을 통해 제1상반응과 제2상반응이 확인되었음. 여기서 동일이라는 의미는 제1상반응을 통해 대부분대사체가 극성대사체이며 제2상반응도 UGT에 의한 당화반응이라는 점임.



<그림-1> Way2Drug 예측 프로그램을 통한 Rivoceranib의 제1상반응 및 제2상반응 대사체

<표-1> Biotransformer 3을 통한 Rivoceranib의 UGT에 의한 제2상반응 예측

Result ID	Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotope Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
1		<chem>C1CCC(C1)(C#N)C2=CC=C(C(=C2)NC(=O)C3=C([N+])(=CC=C3)C4OC(C(O)C(O)C4O)C(O)=O)NCC5=CC=NC=C5</chem>	[C39H32N5O7] ⁺	574.2301	N-Glucuronidation of 3-substituted pyridine	Enzyme: UDP-glucuronosyltransferase BioSystem: HUMAN	

5. 리보세라닙의 AI-based MOA(mechanism of mode) 예측

- SwissTargetPrediction 예측프로그램을 통해 Rivoceranib은 VEGFR2의 tyrosine kinase에 대한 높은 표적율이 확인되었음. Rivoceranib이 VEGFR2의 tyrosine kinase에 결합하여 암 조직에서 신생혈관형성을 저해할 수 있는 MOA를 가진 것으로 확인됨.

List of predicted targets

These targets have been predicted using the method described in:

Gfeller D., Michielin O. & Zoete V.
Shaping the interaction landscape of bioactive molecules, Bioinformatics (2013) 29:3073-3079.

Query Molecule



General Target Classes

Retrieve data:     

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Probability*	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
Vascular endothelial growth factor receptor 1 (by homology)	FLT1	P17948	CHEMBL1868	<div><div></div></div>	0 / 106	Tyr Kinase
Vascular endothelial growth factor receptor 3 (by homology)	FLT4	P35916	CHEMBL1955	<div><div></div></div>	0 / 106	Tyr Kinase
Vascular endothelial growth factor receptor 2	KDR	P35968	CHEMBL279	<div><div></div></div>	0 / 106	Tyr Kinase
Citron Rho-interacting kinase	CIT	O14578	CHEMBL5579	<div><div></div></div>	0 / 1	Ser_Thr Kinase
Aurora kinase A (by homology)	AURKA	O14965	CHEMBL4722	<div><div></div></div>	0 / 2	Ser_Thr Kinase
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	MAP3K7	O43318	CHEMBL5776	<div><div></div></div>	0 / 1	Ser_Thr Kinase
Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2	RIPK2	O43353	CHEMBL5014	<div><div></div></div>	0 / 1	Ser_Thr Kinase
Tyrosine-protein kinase JAK2 (by homology)	JAK2	O60674	CHEMBL2971	<div><div></div></div>	0 / 51	Tyr Kinase
Serine/threonine-protein kinase 10	STK10	O94804	CHEMBL3981	<div><div></div></div>	0 / 1	Ser_Thr Kinase
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP4K4	O95819	CHEMBL6166	<div><div></div></div>	0 / 2	Ser_Thr Kinase
Tyrosine-protein kinase ABL1	ABL1	P00519	CHEMBL1862	<div><div></div></div>	0 / 8	Tyr Kinase
Epidermal growth factor receptor	EGFR	P00533	CHEMBL203	<div><div></div></div>	0 / 4	Tyr Kinase
RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	RAF1	P04049	CHEMBL1906	<div><div></div></div>	0 / 12	Ser_Thr_Tyr Kinase
Tyrosine-protein kinase Lck	LCK	P06239	CHEMBL258	<div><div></div></div>	0 / 16	Tyr Kinase
Tyrosine-protein kinase Fyn	FYN	P06241	CHEMBL1841	<div><div></div></div>	0 / 7	Tyr Kinase

* Probabilities have been computed based on a cross-validation. They may therefore not represent the actual probability of success for any new molecule (see FAQ).

5. HLB-리보세라닙의 AI-based 약리기전에 대한 예측에 대한 결론

- 리보세라닙에 대한 항암의 약리기전에 대한 이해를 위해 AI-based 예측 프로그램을 통해 다음과 같이 확인하였음.
- ① 리보세라닙은 신생혈관형성수용체-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2)의 억제제(inhibitor)로 예측 프로그램을 통해 VEGFR2를 표적으로 하는 것으로 확인되었음. 이는 기존 논문과 동일함.
- ② 대부분의 합성의약품의 small molecule은 EGFR 및 VEGFR의 tyrosine kinase에 친전자성으로의 전환을 통한 공유결합으로 약리기전 즉 MOA가 확인됨. VEGFR2의 저해제인 sorafenib과 sunitinib도 친전자성을 나타냄.
- ③ 리보세라닙에 대한 biotransformation 예측 프로그램을 통해 제1상반응과 제2상반응이 CYP3A4에 의한 극성대사체, 그리고 제2상반응의 UGT 효소에 의한 당화 포합반응을 통해 배출되는 것으로 확인되었으며 이는 기존 논문과 일치함.
- ④ 따라서 tyrosine kinase 저해제로의 항암제에 대한 보편적인 특성인 친전자성(electrophilic)을 갖지 못함. 이는 암조직에서 신생혈관세포의 증식을 억제하는 tyrosine kinase 저해 기전이 공유결합에 의한 비가역적이지 않고 일시적 비공유결합의 가역적이기 때문에 **약리적 효능은 낮을 것으로 추정됨**. 그러나 부작용은 다른 항암제와 비교하여 다소 적을 것으로 사료됨.
- ⑤ 합성의약품의 항암제 특성은 친전자성을 가져야 약리효능이 높다는 것을 개발 이전에 필히 점검을 할 필요성이 있음. 개인적으로 항체의약품과의 병용요법과 ADC 등은 항암제 개발에 가장 빠른 방향이며 무궁하게 잠재적 유연성을 가진 개발 접근법으로 사료됨.

<참고문헌>

- Donisi C, Puzzoni M, Ziranu P, Lai E, Mariani S, Saba G, Impera V, Dubois M, Persano M, Migliari M, Pretta A, Liscia N, Astara G and Scartozzi M (2021) Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of HCC. Front. Oncol. 10:601240.
- Gál Z, Gézi A, Molnár V, Nagy A, Kiss A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Bálint BL, Pólska S, Szalai C. Investigation of the Possible Role of Tie2 Pathway and TEK Gene in Asthma and Allergic Conjunctivitis. Front Genet. 2020 Feb 27;11:128.
- Modi, S. J., & Kulkarni, V. M. (2021). Exploration of structural requirements for the inhibition of VEGFR-2 tyrosine kinase: Binding site analysis of type II, 'DFG-out' inhibitors. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 40(12), 5712–5727.
- Sattler M, Mambetsariev I, Fricke J, Tan T, Liu S, Vaidehi N, Pisick E, Mirzapioazova T, Rock AG, Merla A, Sharma S, Salgia R. A Closer Look at EGFR Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer through the Lens of Precision Medicine. J Clin Med. 2023 Mar 1;12(5):1936
- Boike L, Henning NJ, Nomura DK. Advances in covalent drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2022 Dec;21(12):881-898.
- Yamamoto K, Mizumoto A, Nishimura K, Uda A, Mukai A, Yamashita K, Kume M, Makimoto H, Bito T, Nishigori C, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M. Association of toxicity of sorafenib and sunitinib for human keratinocytes with inhibition of signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3). PLoS One. 2014 Jul 11;9(7):e102110.

- Camrelizumab (SHR-1210) (INN[1]) is an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor that is being investigated for hepatocellular carcinoma and Hodgkin lymphoma.[2] PD-1 is programmed cell death protein 1. The drug is being developed by Jiangsu HengRui Medicine Co., Ltd. As of 2019, camrelizumab is undergoing Phase II/III trials.
- Jackson KD, Durandis R, Vergne MJ. Role of Cytochrome P450 Enzymes in the Metabolic Activation of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2018 Aug 11;19(8):2367.
- Ding J, Chen X, Gao Z, Dai X, Li L, Xie C, Jiang H, Zhang L, Zhong D. Metabolism and pharmacokinetics of novel selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor apatinib in humans. *Drug Metab Dispos.* 2013 Jun;41(6):1195-210

70. Peptide 치료제의 유전독성시험과 국내외적 규제 현황

1. 약물 모달리티에 따른 유전독성에 대한 일반적인 규제

- 일반적으로 합성의약품인 small molecule은 유전독성시험, 반면에 biotherapeutics[생물의약품, 생물체에서 분리된 의약품 또는 생물학적 시스템으로부터 발체 또는 부분 합성적(semisynthesized) 의약품, wikipedia, 2024]은 **유전독성시험이 요구되지 않음**(참고문헌; ICH S6(R1) guideline)
- Peptide와 이들의 유도체는 biotherapeutics로 분류되어 ICH S6(R1) guideline(2011)인 **"Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals"**에 의해 비임상시험의 종류 및 수행이 결정됨.

2. Peptide Discovery Platform System(PDPS) 플랫폼 기술과 비정형 아미노산 응용

- 펩타이드 개발 플랫폼 시스템(Peptide Discovery Platform System, PDPS)은 Flexizyme 기술, translation/cyclization/peptid modifying 기술, 그리고 Peptide display 기술의 총 세 개의 핵심기술로 구성되어 있음. 이들 기술을 이용하여 peptide 치료제를 개발되고 있음.

1) Peptide-drug conjugate 개발

- 아래의 Fig 1은 인공 ribozyme(de novo ribozymes)인 Flexizyme 기술의 핵심기전인 tRNA를 이용하여 small molecule에 아미노산 결합의 peptide 형성 유도 및 Peptide-drug conjugate 합성(Lee 등, 2019).

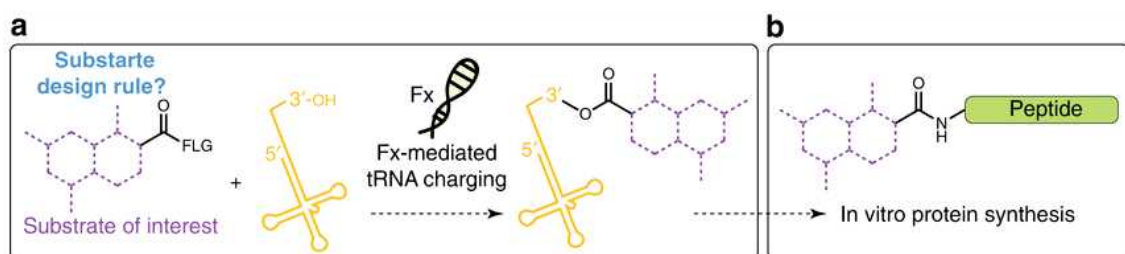


Fig. 1 Expanding the chemical substrate scope of flexizymes for genetic code reprogramming. a Flexizyme (Fx) recognizes the 3'-CCA sequence of tRNAs₆₄ and catalyzes the acylation of tRNA using acid substrates. We seek to develop substrate design rules for flexizyme-mediated acylation reactions that expand the scope of chemical substrates used in ribosome-directed polymerization. b An Escherichia coli cell-free protein synthesis system reconstituted from the purified wild-type translational machinery (PURExpress) is used to produce peptide containing noncanonical acid substrates. This approach for incorporating noncanonical monomers at the N-terminus of peptides is well established.(Lee 등, 2019)

2) (Canonical amino acid + Noncanonical amino acid)의 Peptide 치료제

- 그러나 Peptide-drug conjugate(펩타이드 약물-복합체)뿐만 아니라 20 여개의 정형아미노산(canonical amino acid)으로 약리작용이 기대하기 어려울 경우가 많음. 이에 따라 Figure 1과 같이 Flexizyme 기술을 이용하여 정형아미노산으로 구성된 peptide 내에도 비정형 아미노산(non-canonical amino acid)이 포함된 peptide 치료제가 개발되고 있음 (Zhou 등, 2024).
- 이러한 방식으로 생성된 다양한 펩타이드는 뛰어난 물리적, 화학적, 약리학적 특성 보유하게 됨. 예를 들어 non-canonical amino acid로 구성된 펩타이드의 고리화(cyclization)와 변형(modification) 기술로 기존의 선형 펩타이드와 비교해 더 단단한(rigid) 구조를 가져 결합력, 특이성, 체내 안정성이 우수성을 유도할 수 있음. 또한 Peptide display 기술을 통해 임상에서의 재현성을 높은 생물학적 특성을 가진 펩타이드를 효율적으로 발굴이 가능함.

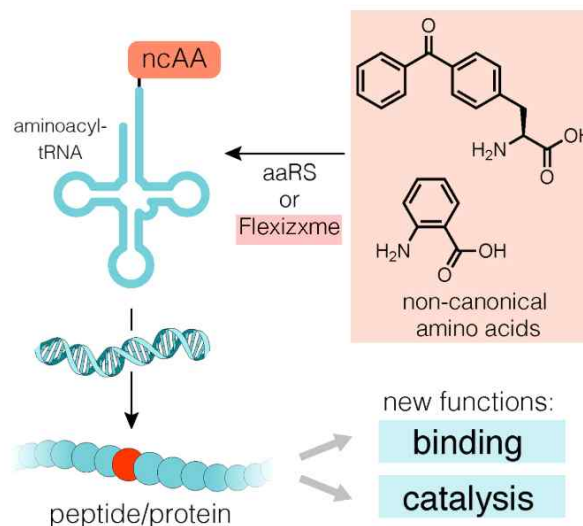


Figure 1. A) aaRS catalyzed aminoacylation of tRNA by Flexizyme

3. 비정형 아미노산의 잠재적 유전독성의 잠재성

- 이와 같이 Peptide Discovery Platform System을 통해 자연에 존재하지 않고 아미노산 골격에 잔기를 변화시켜 합성한 비정형 아미노산 (non-natural amino acids, **nnAA**) 등을 가능하다는 것임.
- 이와 같이 기존 canonical amino acid(정형 아미노산)의 20개의 단점을 보완하기 위해 약리학적 우수성을 위해 non-canonical amino acid residues(비정형 아미노산 잔기) 들이 합성 및 응용됨. 현재까지 400여개의 새로운 non-canonical amino acid 합성되어 **10¹³ ncAA-containing peptides 이상**의 독특한 구조를 갖는 펩타이드 라이브러리 제작이 가능함. 현재까지 Fig 1과 같이 3000 여개 이상의 비정형 아미노산이 재조합단백질에 유입되 된 것으로 확인되었음((Hou 등, 2025; Chen 등, 2022).

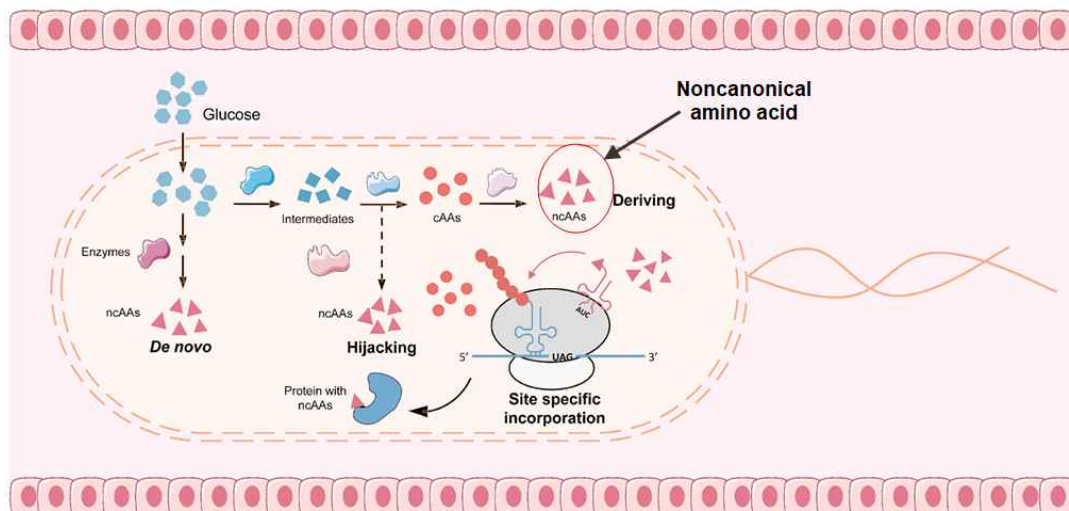


Fig. 1. In situ biosynthesis and site specific incorporation of non-canonical amino acids.

1) Non-canonical amino acid를 함유한 middle size peptide drug

- Middle size peptide(MSP)이란 noncanonical amino acid를 포함하고 있는 분자량 1000 이상의 peptide(Mishima 등, 2023).
- 특히 Fig 4에서처럼 noncanonical amino acid를 포함하고 있는 cyclic MSP는 생체 내 안정성(in vivo stability), 세포막 통과(membrane permeability), 그리고 표적분자와 상호작용을 위한 큰 표면(large surface area for interacting with target molecules) 등의 측면에서 약리학적으로 다양한 장점을 가지고 있음.

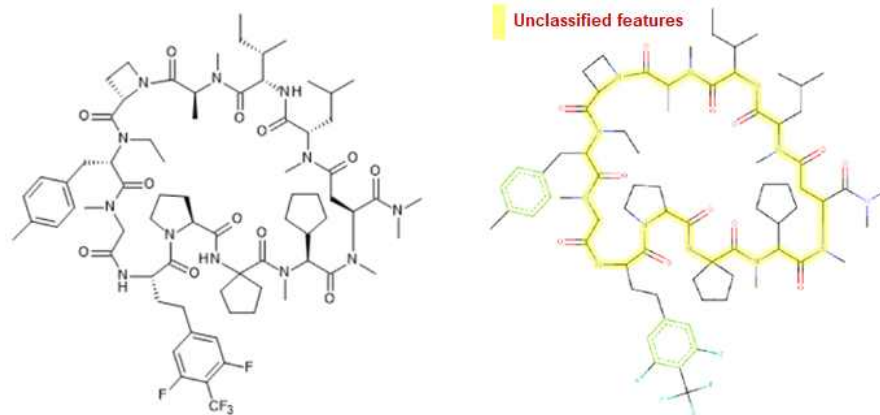


Fig. 4 A MPS example, LUNA18, containing features that were not found in the Lhasa Ames test reference set of Derek Nexus 6.0.1

- 아래의 <Fig. 5>는 Fig. 4의 MPS 예시인 LUNA18과 유사한 noncanonical amino acid를 포함한 펩타이드를 유사도와 AI-based Ames test 결과를 나타낸 것으로 모두 음성 반응 (Mishima 등, 2023)

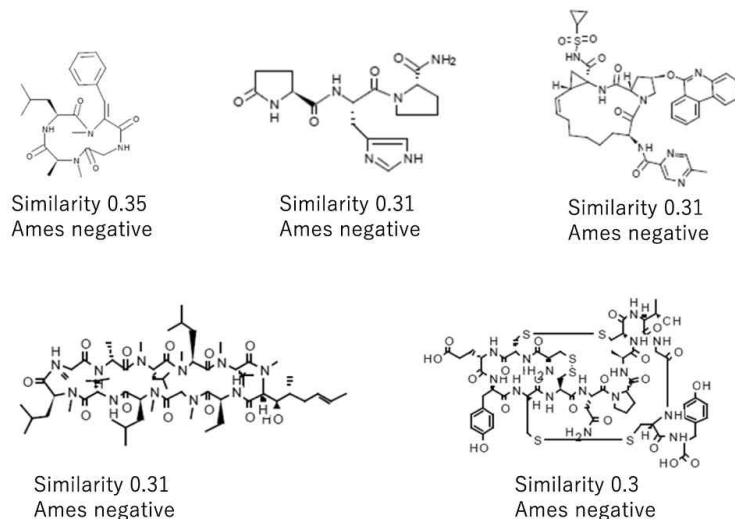


Fig. 5 Analog structures of LUNA-18 from training/reference set of Leadscape Model Applier v2.4.1-36

- Mishima 등, 2023 등은 유전독성시험에서 이용되는 *Salmonella typhimurium*, 등의 박테리아 세포막의 통과 가능성에 대한 문제점을 제시함. 아래의 <Fig 2>에서처럼 박테리아 외막의 구성물인 lipopolysaccharide (LPS) chain과 외부 이물질 유입에 강력한 장벽이며 porin(구멍단백) 통로는 peptide가 유입되기에는 크기에서 제한이 있음.
- 그러나 일부 MSP가 세포막을 통해 흡수되어 유전독성시험을 주장하기도 함. 예를 들어 면역억제제이면서 점안액인 Cyclosporine(CASRN 59865-13-3, MW = 1,203)은 11개의 정형 아미노산과 8개의 비정형 아미노산으로 구성된 대표적인 MSP. Cyclosporine은 경구로 흡수되어 혈액에서의 T-세포 내부의 cyclophilin에 결합하여 면역 억제를 유도함 Liu 등, 1991). 이는 MSP가 박테리아 세포막을 통과함으로 유전독성시험의 의미를 주장하는 것임.

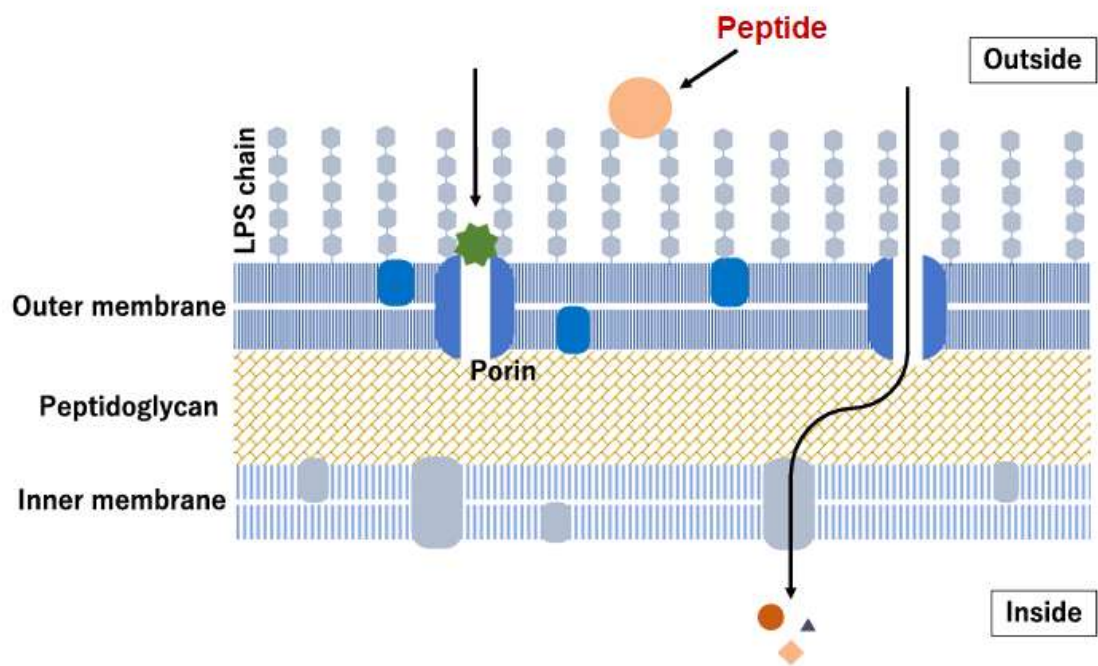


Fig. 2 Gram negative bacterial membrane

2) 비정형 아미노산의 tRNA에 결합 및 peptide의 nonsense suppression

- Fig 2는 non-canonical amino acids를 인위적으로 tRNA를 결합을 유도하여 단백질 합성의 조기종말(nonsense)을 유도한 기전임. 즉, non-canonical amino acids를 특정 단백질에 site-directed incorporation하여 생물학적 바람직한 방향으로 유도한 peptide 치료제 개발의 일종임.
- Fig 2에서처럼 ncAA(non-canonical amino acid, 비정형 아미노산)이 ester bond formation를 통해 ribose의 free hydroxyl group(3') 결합하여 pdCpA(dinucleotide phosphodesoxy-cytosine phospho-adenosine)-ncAA-PG 형성하여 tRNA에 결합 및 ribosome에 의해 nonsense peptide 형성 기전(Leisle 등, 2015)

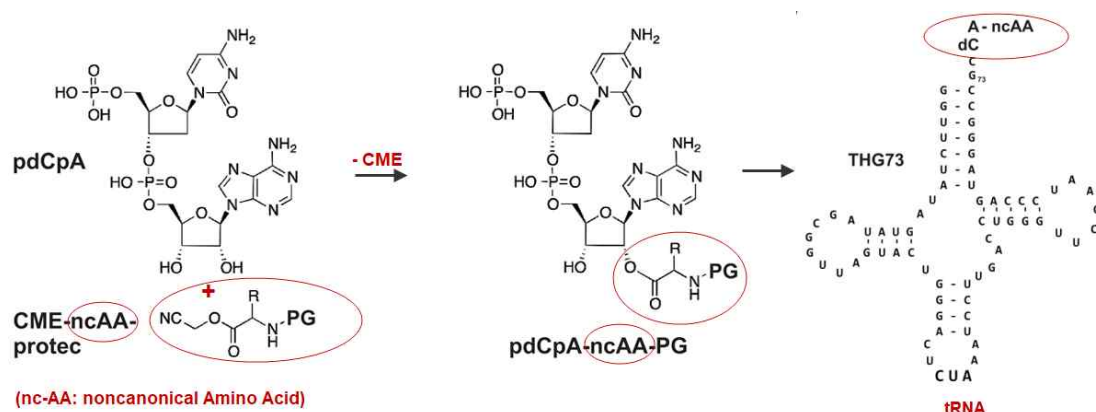


Fig. 2. In vivo nonsense suppression. a The non-canonical amino acid (ncAA) is chemically coupled to the dinucleotide phosphodesoxy-cytosine phospho-adenosine (pdCpA) via ester bond formation between the free hydroxyl group (3') of the ribose in the phospho-adenosine molecule and the carboxyl group of the ncAA. The starting product of the ncAA is a cyanomethyl ester (CME). A protecting group (PG) is shielding the alpha amino group from reactivity. b The ncAA-pdCpA conjugate is subsequently ligated to a refolded tRNA that lacks the 3' dinucleotide CA. Here, the final product of the ligation is shown: a misacylated(Leisle 등, 2015)

- 독성학적인 측면에서 단백질 분해를 통해 non-canonical amino acid가 ribosomedp 의해 다시 정상적인 단백질에 encoding 된다면 단백질의 비정상적인 영향을 유도할 수 있지 않을까 하는 추정을 해봄.

3) 유전독성시험을 통해 양성으로 판정된 Peptide와 protein

- <Table 3>은 현재까지 유전독성시험에 양성 반응을 보인 9개의 peptide 및 단백질이며 Group I과 Group II로 구분할 수 있음. Group 1은 nodularin, microcystin, bleomycin, α -amanitin와 melittin 등으로 in vitro 염색체 이상 및 in vivo 시험 등 in vitro 및 in vivo 등의 2 시스템 모두에서 양성으로 확인. 이들 모두는 세포 내로 유입이 가능하며 4개는 noncanonical amino acid를 포함되어 있음. 특히 Group I peptide는 염색체 수준 손상 및 유전독성물질이며 이들 자체는 natural toxin임
- Group II는 2 개의 peptide인 parathyroid hormone와 GLP-1/GIP 이중작용제, 그리고 2 개의 단백질인 β -amyloid $a\beta^{1-41}$, epoetin α 등임. 이들은 in vitro 유전독성시험에서는 음성이지만 in vivo 설치류 시험에서만 양성으로 확인됨. 그러나 후에 이들 4가지 peptide 및 단백질은 모두 위양성으로 확인됨. 그럼에도 불구하고 이들은 nongenotoxic carcinogen으로 ICH M3(R2)와 S6(R1) 가이드라인을 통해 발암성 및 종양원성 시험 수행되어야 한다고 제안됨(Zane 등, 2021)
- ◆ ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals - Scientific guideline
- ◆ ICH S6(R1) Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals

Table 3. Literature Results of Peptides and Proteins With Positive Genotoxicity Assay Results.

		Name	CAS #	# Amino acids (aa)	Nonnatural aa	Cell permeable	Secondary structure	In vitro cytogenetic test in mammalian cells	In vivo rodent assay
Group I (세포 독성 유발)	1	Nodularin	118399-22-7	5	Yes	Yes	Cyclic	Positive	Positive
	2	Microcystin-LR	101043-37-2	7	Yes	Yes	Cyclic	Positive	Positive
	3	Bleomycin	9041-93-4	9	Yes ^a	Yes	Linear	Positive	Positive
	4	α -amanitin	23109-05-9	8	Yes ^a	Yes	Cyclic	Positive	Positive
	5	Melittin	37231-28-0	26	No	Yes	Helical dimer	Positive	Positive
Group II (위양성 판정)	6	Parathyroid hormone (PTH1-34)	83139-29 120945-80-4	34	No	Receptor-mediated internalization	Helical peptide	Positive in osteoblasts (3 weeks)	Positive (10 weeks)
	7	GLP-1/GIP dual agonist		40	Yes	Receptor-mediated internalization likely	ND	Negative	Positive (13 weeks)
	8	β amyloid $a\beta$ (1-42)	107761-42-2	42	No	Internalized	Helical/beta-sheet	Likely negative (no positive result found)	Positive
	9	Epoetin α	11096-26-7	165	No	Receptor-mediated internalization	4 α helices	Negative	Non-GLP: Positive ^b (acute) GLP: Negative

Abbreviations: GLP-1, glucagon-like peptide-1; ND, not determined.

^aNonnatural amino acid in humans, but natural in bacteria and some archaea.

^bNot great dose-dependence. May be within historical controls (% MNPCE/PCE below 0.5%). Ten-fold below induction of positive control (mitomycin C) induction.

- 결론적으로 <Table 3>에서는 In vitro 및 in vivo 모두에서 유전독성시험에서 양성반응을 보였으며 이들의 특성은 nonclinical amino acid를 포함한 5-26개의 아미노산으로 구성된 펩타이드임. Bleomycin과 같이 함암제는 당연히 유전독성을 유발하여 암세포 사멸을 유도하며 melittin은 세포사멸을 유도하지 않고 산화성 DNA 손상을 유발하는 것으로 확인됨(Gajski 등, 2016)

4. 펩타이드 치료제의 유전독성시험 유무에 대한 결론

- Peptide와 이들의 유도체는 바이오의약품으로 분류되어 ICH S6(R1) guideline에 따라 **유전독성시험이 요구되지 않음**(참고문헌; ICH S6(R1) guideline)
- 자연에 존재하는 23종의 정형 아미노산(canonical amino acid)을 이용하여 개발된 Peptide 치료제에 아미노산 잔기를 변형하여 합성한 non-canonical amino acid 유입에 의한 약리적 효능 증대를 유도.
- 이와 같은 비정형 아미노산의 잔기는 고리화(cyclization)와 변형(modification) 기술로 독성학적 문제를 유전독성의 잠재성이 높아짐. 특히 non-canonical amino acid를 포함한 9개의 Bleomycin은 DNA 손상을 유발하는 대표적인 non-canonical amino acid-유래성 유전독성물질이라고 할 수 있음
- 이와 같이 Peptide 치료제에 대한 비임상독성시험은 다음과 같이 결론을 내릴 수 있음
 - ① Canonical amino acid로만 구성된 peptide 치료제는 유전독성시험의 필요성이 없고 바이오의약품과 같이 동일하게 비임상독성시험 수행
 - ② 단 합성을 통해 peptide가 생산되어 유연물질이 존재할 수 있으므로 이러한 한 경우에는 small molecule의 유연물질 가이드라인을 따르면 됨
 - ③ 또한 바이오의약품의 biodistribution을 통해 체내 잔존 및 이동 등을 확인하지만 Peptide의 동태학적 시험은 small molecule과 같은 방법으로 PK 시험수행의 필요성이 있음
- Non-canonical amino acid를 함유한 peptide 치료제인 경우에는 분자량이 1000-2000의 mid size peptide 세포막을 통과가 가능하다면 in vitro 염색체이상 유전독성시험이 가능. 그러나 대부분의 약 20개 이상의 Non-canonical amino acid와 canonical amino acid로 구성된 peptide 치료제는 in vitro 유전독성시험에서 세포의 막을 통과하지 않아 의미가 없음. 펩타이드 치료제의 경우에 히스티딘 및 tyrosine 등이 존재하기 때문에 복귀돌연변이 시험은 적절하지 않음.
- 우리나라의 경우에 합성 시험물질이라고 하여 **peptide 치료제에 대한 유전독성시험을 요구하고 있어 국제적 흐름을 참고할 필요성이 있음.**

<참고문헌>

Kelly Zhi Qi Zhou, Richard Obexer. Non-Canonical Amino Acids for Engineering Peptides and Proteins with new Functions. *Isr. J. Chem.* 2024, 64, e202400006 (1 of 18)

Lee, J., Schwieter, K.E., Watkins, A.M. et al. Expanding the limits of the second genetic code with ribozymes. *Nat Commun* 10, 5097 (2019).

Leisle L, Valiyaveetil F, Mehl RA, Ahern CA. Incorporation of Non-Canonical Amino Acids. *Adv Exp Med Biol.* 2015;869:119-51.

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991;66(4):807-15.

Y. Chen, et al., Unleashing the potential of noncanonical amino acid biosynthesis to create cells with precision tyrosine sulfation, *Nat. Commun.* 13 (2022) 5434, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33111-4>.

Zhen Hou, Junkai Tuo, Xiaoyan Ma, Yi-Xin Huo, Recent advances in biosynthesis of non-canonical amino acids and their potentials in strain engineering. *Results in Engineering* 25 (2025) 103641.

Zane D, Feldman PL, Sawyer T, Sobol Z, Hawes J. Development and Regulatory Challenges for Peptide Therapeutics. *Int J Toxicol.* 2021 Mar-Apr;40(2):108-124.

Gajski G, Domijan AM, Žegura B, Štern A, Gerić M, Novak Jovanović I, Vrhovac I, Madunić J, Breljak D, Filipič M, Garaj-Vrhovac V. Melittin induced cytogenetic damage, oxidative stress and changes in gene expression in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicon.* 2016 Feb;110:56-67.

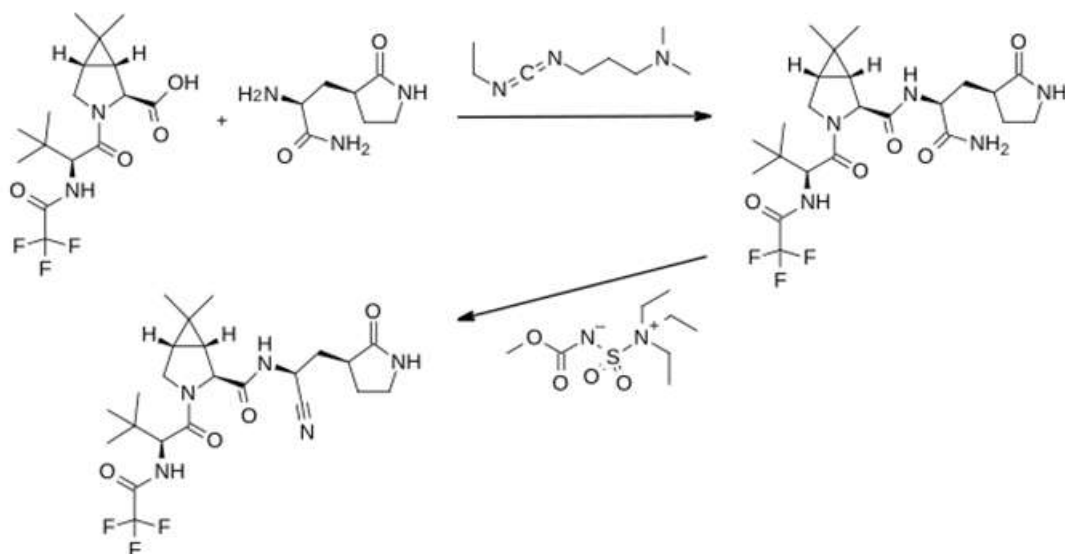
71. COVID-19 중증도 환자 치료제인 Paxlovid의 선택적 독성평가에 대한 고찰

1. 혼합체 치료제인 Paxlovid의 구성

- 미국 FDA는 2021년 12월 CYP3A4 억제제인 리토나비르(ritonavir)와 3CL 단백질분해효소 억제제(3C-like protease inhibitor)의 항바이러스제(antiviral drug)인 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 혼합제인 팩스로비드(Paxlovid) 치료제를 긴급사용승인(Emergency Use Authorization)을 받았음.

2. 리토나비르(ritonavir)와 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 항바이러스 약리기전

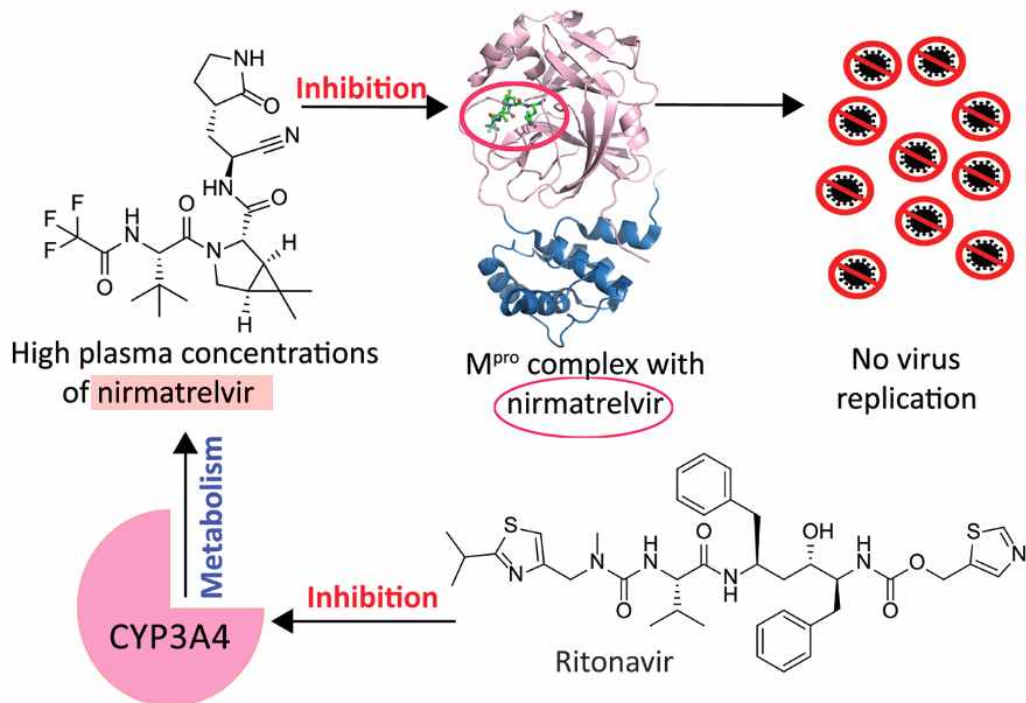
- 리토나비르(ritonavir)와 니르마트렐비르의 두 물질 모두는 small molecule로 팩스로비드의 혼합제를 구성하는 성분임.
- 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)은 아래의 <그림>에서처럼 non-canonical amino acid를 포함한 트리펩타이드 단백질 모방체로 새롭게 합성된 것임(Pavan 등, 2021; Owen 등, 2021). 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)은 3CL 단백질분해효소 억제제(3C-like protease inhibitor)은 HIV 단백질 분해효소에 의한 바이러스의 증식을 억제하는 억제제임.



<그림-1> 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 합성과정

- 리토나비르(ritonavir)은 CYP3A4 억제제로 COVID-19에 약리작용은 하지 않으며 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 생체이용률을 증가시키는 약물. 특히 이미 약물 시장에서 시판되고 있음.

- 경구로 투여되는 대부분의 항바이러스제가 소장에서 Cytochrome P450에 분해되어 생체이용률이 낮아짐. <그림-2>에서처럼 소장 및 간에서 리토나비르는 CYP3A4 활성을 저해함. 결과적으로 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)는 CYP3A4의 비활성으로 생체이용률이 증가되어 표적단백질인 SARS-CoV-2-Mpro를 저해함으로 COVID-19 바이러스의 증식을 억제함(Navitha 등, 2023).



<그림-2> 리토나비르(ritonavir)와 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 anti COVID-19에 대한 기전

3. 리토나비르(ritonavir)와 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 선택적 독성시험에 대한 근거

- 약리학적 및 독성학적 측면에서 본다면 리토나비르가 니르마트렐비르의 생체이용률에 영향을 주기 때문에 2 물질의 혼합제를 통해 독성시험이 이루어지는 것이 요구될 수 있음. 그러나 다음과 같이 4가지 이유로 니르마트렐비르의 단독 물질에 대한 독성시험이 수행되었음
- ① 리토나비르는 이미 약물시장에서 응용되었고 비임상 및 임상시험에서 그 특성이 잘 확인되어 니르마트렐비르와 상호작용에 의한 추가 및 중복적인 독성현상이 없을 것으로 추정됨. 이와 같은 경우에 ICH M3(R2) guidelines에서는 리토나비르에 대한 독성시험은 불필요.
- ② 니르마트렐비르의 생체이용률을 증가시키는 리토나비르는 CYP3A4에 대한 저해제로 그 효능을 나타내기 때문에 CYP3A4 효소를 가진 동물은 없음. 따라서 리토나비르에 대한 동물에서의 영향이 인체에 대한 영향으로 해석될 수 없음
- ③ 이미 비임상시험에 니르마트렐비르의 고농도에 대한 영향이 확인되었기 때문에 리토나비르의 booster 효과에 의한 영향은 미미할 것으로 예상됨.
- ④ 임상시험에서 니르마트렐비르의 투여기간은 10일 이하이기 때문에 투여기간에 의한 약물 누적 독성은 없을 것으로 추정됨.

4. 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 수행된 독성시험

- 이와 같은 4가지 이유로 니르마트렐비르의 단독 물질에 대해 수행된 독성시험은 다음과 같음
- ① 안전성약리시험(반복투여독성시험 중 심장에 대한 안전성약리시험이 이루어짐)
- ② 설치류 랫드에 대한 4주 반복시험 + 2주 회복시험
- ③ 비설치류 영장류 cynomolgus monkeys에 대한 4주 반복시험 및 2주 회복시험

5. 결론

- COVID-19 중증도 환자 치료제이며 리토나비르(ritonavir)와 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 혼합제인 Paxlovid의 비임상안전성에 대한 고찰을 통해 다음과 같이 결론과 생각이 듦.
- ① 긴급사용승인(Emergency Use Authorization) 시 우리나라 규제기관은 small molecule에 대해 단순히 안전성약리시험과 반복투여독성시험 등 2가지 독성시험으로 임상시험을 승인할 수 있을까?
- ② 만약 승인한다면 보고서의 **3. 리토나비르(ritonavir)와 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 선택적 독성시험에 대한 근거** 중 4가지를 인정할 정도로 규제기관에서 독성학적 지식을 가지고 있을까?
- ③ 신약개발자는 니르마트렐비르(Nirmatrelvir)의 생체이용률을 증가시키는 목적으로 **CYP3A4 저해제인 리토나비르를 사용할 수 있는 독성학적 지식**을 가지고 있을까?
- 우리나라에서 천재가 다 모이는 곳이 의대, 약대, 수의대이지만 아직 글로벌 신약 하나 없는 것은 왜 그럴까? 혹시 약리기전만 이해한다고 신약개발이 되지 않을까하는 생각이 대부분이지 않을까? 독성학에서 독성기전은 곧 약리기전이라는 것을 이해할 때 비로서 신약개발자와 규제기관의 능력이 글로벌 수준에 도달하지는 않을까?

<참고문헌>

Pavan M, Bolcato G, Bassani D, Sturlese M, Moro S (December 2021). "Supervised Molecular Dynamics (SuMD) Insights into the mechanism of action of SARS-CoV-2 main protease inhibitor PF-07321332". 《J Enzyme Inhib Med Chem》 36 (1): 1646-1650.

Owen DR, Allerton CM, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, 외. (November 2021). "An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19". 《Science》: eabl4784.

Navitha Reddy G, Jogvanshi A, Naikwadi S, Sonti R. Nirmatrelvir and ritonavir combination: an antiviral therapy for COVID-19. Expert Rev Anti Infect Ther. 2023 Jul-Dec;21(9):943-955.

72. 독성시험에서 동물실험 감소를 위한 FDA Roadmap에 대한 고찰

- 미국 FDA에 의해 4월 10일 FDA's Roadmap to Reducing Preclinical Animal Safety를 발표(FDA, 2025)
- 미국 FDA는 Animal replacement methodology(동물대체법)으로 설명할 수도 있지만 새로운 동물-비사용 전임상 독성시험법으로 New approach methodologies(NAM)이라는 용어 사용
- NAM은 임상시험의 안전성을 확보하기 위하여 과학적 정당성과 모델 적절성의 입증(validation)을 통해 국제적 규제기관에서 사용가 수용의 필요성. 여기서 NAM의 과학적 정당성은 종간 연관성의 약리-독성학적 한계(pharmacological & toxicological limitations of species relevance)의 명확한 설명이 중요
- 미국 FDA에 의해 4월 10일 발표된 FDA's Roadmap to Reducing Preclinical Animal Safety에 대한 분석을 통해 **6가지 key point를 확인**할 수 있으며 다음과 설명할 수 있음.

1) FDA Modernization Act 2.0(FDAMA 2.0)의 가속화

- 미국 FDA에 의해 4월 10일 발표된 FDA's Roadmap to Reducing Preclinical Animal Safety는 2022년 개정된 FDA Modernization Act 2.0(FDAMA 2.0) 즉, FDA 현대화법 2.0을 따르는 부차적인 수행이라고 할 수 있음(Pub, 2022). FDAMA 2.0은 동물실험을 거친 약물의 90-95%가 인간을 대상으로 하는 임상시험에서 실패한다는 통계를 기본으로 동물실험을 감소하는 법안임.
- 그러나 준비가 되었음에도 불구하고 합성의약품 및 바이오의약품의 승인을 위한 규제 과정을 FDA가 시행하지 않고 미적거린다는 비난을 받음(Sen. Cory Booker, Press Release, 2023). 이에 FDAMA 2.0을 가속화하기 위해 FDA 현대화법 3.0(FDA Modernization Act 3.0)이 2024년 9월에 미국 하원에 제출되어 FDA 현대화법 2.0의 시행 강제 목적으로 2025년 1월 상원에 재상정됨.
- 특히 상원의원 Cory Booker와 Rand Pau는 2025년에 FDAMA 2.0 시행에 소극적인 FDA에 대해 강력한 항의에 대응하여 FDA's Roadmap to Reducing Preclinical Animal Safety를 제시함

2) 윤리, 비용 대비 임상 예측이 고도화

- 새로운 roadmap에서 FDA는 신약 개발에 있어서 더욱 효율적 비용과 더욱 강화된 윤리적 측면, 동물연구에 의한 임상시험에서의 예측보다 더 높은 예측이 가능하다는 측면을 강조.

- 동물시험을 통한 임상 예측에 있어서 어려운 질환은 인체와 동물 사이의 생리학적 측면에서 큰 차이가 확인되는 암을 포함한 알츠하이머 질환 및 염증성질환 등이 있음.

3) IND를 위해 NAM-기반 자료 제출 촉진 및 임상시험 승인을 위해 검토를 권장

- 동물을 이용한 비임상 독성시험이 실제 임상시험 승인을 위해 사용되는 비율은 5-10%에 불과하여 보다 실제적으로 인체와 생리적으로 유사한 모델을 사용과 NAM-기반 자료 생산의 필요성
- NAM-기반 자료는 인체 “오가노이드/온-어-칩” 시스템, in silico 및 AI-독성 예측 모델, 초고속 대량-세포 기반 분석을 포함한 In vitro 독성모델 등(21 U.S.C. § 355)
- 또한 **NAM-기반 자료는 자원자에 대한 microdosing** 및 imaging 자료를 포함
- **향후 3년 동안 신약 개발을 위한 전통적인 독성시험 자료와 더불어 NAM-기반 독성시험 자료를 함께 심사하는 계획**
- 국제적 접근성을 강화하기 위해 공개 자료 저장소(open-access repository) 설립

4) 최초 NAM 적용 신약 모달리티 – 단클론항체의약품

- FDA는 NAM-기반 독성, 동태 그리고 안전성약리 등에 대한 자료를 적용은 최초의 약물 모달리티는 단클론항체의약품 설정
- Cytokine release syndrome이란 사이토카인 폭풍 또는 사이토카인 방출 증후군으로 동물 시험에서는 확인 불가능하기 때문에 이에 대한 NAM-기반 자료 수용
- 일반적으로 단클론항체에 대한 영장류 동물실험은 6개월 기간이 의무이지만 1 개월 이내에 안전성에 문제가 되는 정보나 신호가 없거나 NAM-기반 자료가 주어진다면 3개월로 단축함

5) 진행 중인 FDA의 작업

- NAM 기술 개발에 대한 필요성에 대한 인식과 의지는 있지만 더 중요한 것은 NAM-기반 자료가 동물자료를 대신할 수 있는 지점을 결정할 수 있는 핵심 독성과 핵심 유효성에 대한 의문점을 해결하기 위한 계획 중임.
- 특히 NAM-기술 개발의 표적 결정을 위한 지원, NAM의 질적 평가 방법에 대한 방안, 산업체 및 자체 인력에 대한 교육 프로그램의 가이드라인 제정 등의 필요성도 FDA는 인식하여 계획 중임

6) FDA Roadmap 수행의 장애물

- ① 이와 같은 roadmap을 실행하기 위해서는 인력과 재원이 필요한데 트럼프 정부의 FDA 내 심각한 인력 감축 및 재정 감축은 큰 장애로 대두될 것(FDA's User Fee Programs at a Crossroads. 2025)
- ② Booker 및 Paul 등의 상원의원은 FDA 규정이 여전히 IND 및 NDA를 이해 동물실험을 요구하고 있으며 이를 수정을 위한 공식적인 규정 개정 절차(Notice and Comment Rulemaking Process)를 지연시키고 있다고 주장할 정도로 FDA의 의지 문제를 지적. 이에 Paul 상원의원은 동물실험을 대체할 조속한 실현을 위해 2025년 FDA Modernization Act 3.0 ("FDAMA 3.0") 안을 국회에 제출함(S. 355 119th Cong. ,2025).

<참고문헌>

- FDA, 2025 Roadmap to Reducing Animal Testing in Preclinical Safety Studies, available at <https://www.fda.gov/media/186092/download?attachment>; see also FDA News Release, "FDA Announces Plan to Phase Out Animal Testing Requirement for Monoclonal Antibodies and Other Drugs" (Apr. 10, 2025).
- Pub. L. No. 117-328, 136 Stat. 5807, § 3209(a)(1) (Dec. 29, 2022) (amending 21 U.S.C. § 355(i)(1)(A) and (i)(2)(B)).
- U.S.C. § 355, "Nonclinical tests," in turn, were defined to include tests "conducted in vitro, in silico, or in chemico, or a nonhuman in vivo test . . . include[ing] the following: (1) Cell-based assays[;] (2) Organ chips and microphysiological systems[;] (3) Computer modeling[;] (4) Other nonhuman or human biology-based test methods, such as bioprinting[; and] (5) Animal tests." Id. § 3209(a)(2) (enacting 21 U.S.C. § 355(z))
- Sen. Cory Booker, Press Release, "Booker Urges FDA to Prioritize Non-Animal Testing Methods for Sunscreen Safety" (Dec. 16, 2024); "Rand Paul: Why Is the FDA Still Requiring Human or Animal Testing For New Drugs?," Reason (Nov. 20, 2023) & "The US Just Greenlit High-Tech Alternatives to Animal Testing," Wired (Jan. 11, 2023).
- "FDA's User Fee Programs at a Crossroads: User Fee Deadlines and Funding at Risk," Gibson Dunn Biotech Briefings (Apr. 7, 2025); "FDA in Flux: What Life Science Companies Should Expect as the Agency Undergoes Staffing Changes," Gibson Dunn Biotech Briefings (Mar. 4, 2025).

- S. 355 (119th Cong.) (2025).

73. FDA의 Roadmap에서 독성시험 대체할 최초 NAM 적용의 단클론항체 선택의 이유와 향후 약물 모달리티 적용의 순서 예측

1. FDA Roadmap의 NAM 개념과 적용

1) FDA Roadmap의 원본

- 미국 FDA에 의해 4월 10일 FDA's Roadmap to Reducing Preclinical Animal Safety를 발표. 다음을 클릭하시면 아래의 제목 원본을 확인 [<download>](#)



2) FDA Roadmap의 핵심 - NAM

- 핵심접근방법: 과학적으로 검증된 NAM(New Approach Methodologies·인체 기반 대체법)으로 FDA 로드맵은 동물 없는 신약 개발로 **인체-기반 데이터와 디지털 예측의 결합으로 전임상 평가 체계를 재구성하려는 청사진**
- 이와 같이 비임상연구에서 동물실험을 대체할 수 있도록 구체적으로 ① **실험-현실 데이터**와 ② **전신적 규모의 예측이 가능한 NAM이 요구됨**
- 필요한 NAM:** 인체-유래 세포 실험을 포함한 인체-오가노이드 및 장기-칩, AI-기반 in silico modeling, , 임상 및 데이터 활용, 인체 생리학적 과정을 반영한 생리학 기반 약동학PBPK(Physiologically Based Pharmacokinetic) 모델과 정량적 시스템 약리학(QSP, Quantitative systems pharmacology) 등으로 인체에 대한 자료를 과거의 임상자료 및 오가노이드를 통해 직접적으로 얻거나 AI-기반 자료라고 할 수 있음.
- NAM의 적용은 단기적으로 향후 3년 동안 전통적인 독성시험 자료와 더불어 NAM-기반 독성시험 자료를 함께 심사하는 계획이며 3-5년 후에는 동물시험을 제외하고 NAM 자료로만 비임상 독성시험을 대체하는 것으로 계획하고 있음**

2. FDA Roadmap의 NAM 적용을 위한 최초 약물 모달리티 – 단클론항체 선택의 이유

- NAM 적용의 모달리티는 단클론항체임. 백혈병치료제인 단클론항체인 TGN1412은 2006년 영국에서 백혈병 치료제인 임상시험에서 건강한 피시험자에서 암 및 사망을 유발에 의한 비극에 기인함(Attarwala 등 2010).
- TGN1412 임상사고를 통해 백혈구 표면의 면역계 단백질의 중간 차이 및 유무와 관련하여 동물에서 사이토카인 폭풍을 동물에서 확인이 불가능하기 때문에 이를 NAM 적용의 최초 약물 모달리티라고 사료됨
- 즉 단클론항체의 중간 receptor 차이로 동물을 이용한 독성시험이 의미가 없기 때문임.** 또한 하나의 용량-반응곡선에서 유효성 및 독성에 대한 예측이 가능하고 독성이나 약효 상관없이 어떠한 영향이라도 주어지게 되는 가장 생물학적 최저 효과용량(minimum anticipated biological effect level, MABEL)로 안전성확보가 가능하기 때문임.
- 단클론항체** 신약 1종 개발에 전임상에서 Non-human primate(비인간영장류) 150-200 마리 소요되며 1 마리 당 가격은 6천만원에 달함

3. 단클론항체의 NAM 적용의 비교분석

독성시험	변경 내용
기존 독성시험 규정	<ul style="list-style-type: none"> GLP-기반 1~6 개월 반복독성시험 PK 및 안전성약리 필수.
NAM-기반 독성시험	<ul style="list-style-type: none"> 반복투여독성시험 6개월에서 3개월 단축 미세 생리학적 시스템(Micro Physiological System, MPS)와 PBPK와 같은 NAM 충족 시 1개월 단축 시험 가능

4. 단클론항체 이후의 NAM-적용 약물 모달리티

- NAM의 안전성, 신뢰성 및 품질 등을 확보하기 위한 “Verification”과 “Validation” 프레임 을 추구하고 **단클론항체 → 바이오의약품 → Small molecule** 순으로 확대될 것으로 사료 됨.
- 향후 3년 동안 신약 개발을 위한 전통적인 독성시험 자료와 더불어 NAM-기반 독성시험 자료를 함께 심사하는 계획**
- 이 기간 동안 단기적으로는 독성을 중심으로 부분 대체, 중-장기적으로 질환 모델과 임상 설계로 범위 확대가 단계적으로 이뤄질 것으로 예상
- 2027년부터는 전통적인 독성시험을 제외하고 IND를 이해 NAM을 전면적인 실행할 거로 예상됨

<참고논문>

- FDA 2025. Roadmap to Reducing Animal Testing in Preclinical Safety Studies
- Muller PY, Milton M, Lloyd P, Sims J, Brennan FR. The minimum anticipated biological effect level (MABEL) for selection of first human dose in clinical trials with monoclonal antibodies. Curr Opin Biotechnol. 2009;20(6):722-9.

74. 바이오의약품의 비경구적 주사에 의한 독성학적 해석 오류와 대책

1. 합성의약품과 바이오의약품의 투여 차이

- 여러 가지 차이가 있지만 바이오의약품은 세포막을 통과하지 못하고 또한 소화되기 때문에 <표>에서처럼 주사로 투여가 이루어 짐(박영철 2023).

	합성의약품 (small molecules)	바이오의약품 (biologics)
원천	• 대부분 유기물질로의 합성	• 세포 또는 생물체로부터 또는 생명 공학적 기술에 의해 생성
분자량	• 1000 달톤 이하의 저분자	• 5000에서 500000 달톤 이상의 고분자를 비롯하여 세포수준
세포막 투과성과 투여 방법	• 통과-경구투여-전신혈관계-Offtarget(비표적)약물	• 통과 못함-주사투여-국소 한정-On target-specificity
독성학적 특성	• 항원성이없지만Off-target 독성	• 항원성 높지만 Off-target 독성 우려 없음
Half-life	• 수시간-수일. 매일경구	• 1회/매주 & 매달-특정 기간마다 주사
Test guideline for non-clinical development	• Standard plans	• Case-by-case approach

2. 비경구적 주사를 통한 약물투여에 대한 독성과 중요성

- 오늘날 신약개발은 전통적인 약물 모달리티인 small molecule를 넘어 지난 20여 년 약 17개의 약물 모달리티가 개발되었음. 새롭게 개발된 모달리티는 바이오로직스를 기반으로 유전-세포치료제이며 이들의 공통적인 특징은 비경구적 주사로 투약된다는 점.
- 일반적으로 경구투여에 의한 독성은 대부분 전신독성(systemic toxicity)이 대부분이지만 주사에 의한 독성은 전신독성뿐만 아니라 국소독성(local toxicity)이 함께 나타남.
- 주사에 의한 국소독성은 **Injection site reaction(주사부위 반응)**으로 홍반(redness), 가려움(itching), 통증(pain), 부종(swelling), 따갑고 화끈거리는 느낌(burning sensation), 타박상(bruising), 소량의 출혈(small amount of bleeding) 등이 있음 (Zhi 등, 2025).
- 물론 이러한 ISR 증상들이 동물과 동일하게 나타나지는 않지만, 주사 방법의 정확성 및 정교함의 차이로 동물실험에서 더 심각한 **ISR**이 발생할 수 있으며 이는 독성시험의 기본적인 목적인 임상시험에서의 예측에 큰 영향을 줄 수 있음

- 따라서 **ISR**은 동물실험에서 주사 및 외과적 수술을 통한 주입의 미숙으로 발생할 수도 있어 동물을 이용한 독성시험 및 유효성시험에서 바이오의약품의 주입은 치료에 영향을 미치는 아주 중요한 기술적 요인임

3. 비시험물질-유래 ISR을 줄이기 위한 대책

- 미국의 FDA는 Cellular, Tissue, Gene Therapies 등의 바이오의약품 주사에 있어서 비시험물질-유래 ISR을 줄이기 위해서는 정확하게 해부학적 부위에 대한 접근 능력, 특히 비 설치류 대형 동물에 대한 접근 능력에 대한 중요성을 강조(USFDA, 2025, ability to access the anatomic site for product administration)
- 또한 아래의 <표>에서처럼 다양한 주사 부위와 더불어 물질적인 상해로 연결될 수 있는 주사바늘 자상(needlestick injury) 등이 발생하여 표적독성으로 분류하는 오류를 범할 수 있음(Homage, 2025). 이에 주사형태(type of injection)에 따라 정확한 주사 부위에 대한 가장 적절한 주사 방법을 위한 지속적인 훈련이 요구됨. 특히 동물의 비-마취 주사인 경우에 고정의 실패로 주사바늘 자상이 흔히 발생할 수 있음.

<표> 주사형태와 주사에 의한 합병증

Types of Injection	Potential Complications
<ul style="list-style-type: none"> • Subcutaneous Injection (SC) Delivers medication into the layer of fat just under the skin • Intramuscular Injection (IM) Delivers medication into a muscle • Intravenous Injection (IV) Delivers medication directly into a vein • Intraosseous Injection (IO) Delivers medication into bone marrow • Intradermal Injection Delivers medication in between the layers of the skin 	<ul style="list-style-type: none"> • Infection* • Reaction • Pain • Administration Error • Needlestick Injuries <p>*Minimize risk with proper cleaning and the use of aseptic, no-touch techniques</p>

- 또한 바이오의약품의 주사에 대한 비시험물질-유래 ISR이 다빈도로 발생하여 아래의 <그림>과 같이 바이오의약품 주사에 의한 위험 요소를 줄이기 위해 주사주입강도(needle penetration force), 주사기술(injection technique), 주사부위(injection site), 주사부피(injection volume), 주사도구(injection device) 등이 제시되었음(Zhi 등, 2025).



<그림> Injection site reaction를 줄이기 위한 전략

4. 바이오의약품의 비-시험물질 유래 ISR을 구별하기 위한 대책

1) 주사에 의한 알레르기 반응과 Injection Site Reactions의 차이에 대한 이해

- 대부분의 바이오의약품은 큰 분자량으로 인하여 잠재적으로 알레르기 과민성 반응(allergic hypersensitivity reactions)을 유도할 수 있음. 아래의 <표>는 바이오의약품 주사에 의한 알레르기 반응과 Injection Site Reactions의 차이(UWHealth, 2025)을 나타낸 것임. 이는 시험물질-유래 ISR을 알레르기 반응과 명확한 차이를 통해 비-시험물질 유래 ISR 이해에 도움이 됨.

<표> The Difference Between Allergic and Injection Site Reactions

Allergic Reactions: <ul style="list-style-type: none"> • Cause: Triggered by the immune system's response to allergens (e.g., proteins in vaccines). • Symptoms: Can include hives, swelling, difficulty breathing, or anaphylaxis. • Timing: Symptoms may appear minutes to hours after exposure. • Severity: Can range from mild to life-threatening.
Injection Site Reactions: <ul style="list-style-type: none"> • Cause: Localized response to the injection itself, often due to irritation or inflammation. • Symptoms: Common symptoms include redness, swelling, pain, or warmth at the injection site. • Timing: Typically occurs within a few hours to a day after the injection. • Severity: Generally mild and resolves on its own.

2) 주사에 의한 바이오의약품과 합성의약품의 면역학적 차이

- 주사에 의한 (biologics)과 합성의약품(xenobiotics)의 면역학적 측면에서 차이점을 제시한 것임. 이에 대한 이해는 바이오의약품과 합성의약품의 주사에 의한 시험물질-유래 면역학적 차이 기반으로 시험물질-유래 ISR 확인에 대한 도움이 됨(박영철 2023).

<표> 바이오횰크스와 합성의약품의 면역학적 비교

바이오횰크스(biologics)	합성의약품(xenobiotics)
단백질, 항원성 물질	합텐화 기능을 지진 합성물질
소화분해, 가공과정, 비대사성물질, 덩어리 형성	생화학적 대사, 독성대사체 생성(reactive metabolites), 자연분해에 의한 독성전환체 생성
비경구적 투여	경구 및 피부도포 등
선천성 면역활성	면역억제제를 제외한 비선천성 면역
IgG와 IgE의 항체에 대한 압도적 유도에 의한 과민성 반응	항체 유도가 아닌 T-cell 활성화

4) GLP-기반 독성시험 기관의 선택

- 오늘날 GLP 기관은 지난 20 여년 동안 상당히 많이 설립되었음. 오래된 기관과 최근에 설립된 기관, 아니면 환경물질 중심-GLP기관과 약물-중심 GLP기관 등이 사이에서 가장

중요한 차이는 **바이오로직스의 독성시험의 수행 실적**이라고 할 수 있음.

- 환경물질-GLP 기관이나 바이오의약품에 대한 독성시험의 경험이 GLP-기관에서는 바이오 의약품 주사에 의한 물리적 변화와 바이오의약품 자체에 의한 변화에 대한 판단에 있어서 상당히 차이가 있음. 때로는 주사에 의한 물리적 변화를 표적독성이라고 판단하는 경우도 허다함. 결과적으로 임상시험을 위한 용량설정에 심각한 영향을 주는 사례도 목격할 수 있음.
- 이와 같이 바이오의약품의 시험물질인 경우에는 반드시 이에 대한 수행 실적과 주사부위의 반응에 대한 독성학적 판단 능력을 갖추었는지 사전에 점검할 필요성이 있음. 점검 요소는 ISR에 대한 historical data를 가지고 있거나 국내외적 논문을 통해 해석을 능력을 갖추었는가에 대한 확인임.

<참고논문>

- Zhi, L., Liu, D. & Shameem, M. Injection site reactions of biologics and mitigation strategies. AAPS Open 11, 5 (2025)
- USFDA. www.fda.gov files > vaccines, blood & biologics. Preclinical Considerations for Products Regulated in OCTGT(FDA - The Office of Cellular, Tissue, and Gene Therapies). Food and Drug Administration (.gov). 2025
- Homages. www.homage.sg/health/injection
- UWHealth, HF 7942 The Difference Between Allergic and Injection Site Reactions
- 박영철, (2023) 박영철 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7

75. 재조합 단백질의 비글견 독성시험에서 정맥주사 ISR과 NOEL 결정 방법

1. 바이오의약품에 의한 정맥주사에 의한 실제 예시

- 다음은 비글견의 대조군 용량군 그리고 회복군 등에 2주 3회 정맥주사 후 대조군 및 대조군 회복군의 결과를 나타낸 것임.
- 암수 모두에서 비록 1-2레로 다양한 변화가 확인되었는데 군당 암수 3마리의 비글견으로 구성되었다는 측면에서 모든 변화가 의미가 있음.
- 주사부위의 피하에서 출혈, 단핵 및 다형핵백혈구 침윤 그리고 다소 의외 폐의 폐포상피세포 증식 등이 대조군을 비롯하여 100, 200, 400 mg/kg/(3회/2주) 등의 용량군에서 용량-비의존성으로 발생

<표-1> 대조군에서 확인된 변화와 동일한 용량군에서의 변화 등에 대한 리스트

수컷		암컷	
측정지표	투여용량군 (mg/kg - 2주동안 3회 투여)	측정지표	투여용량군 (mg/kg - 2주동안 3회 투여)
주사부위의 피하에서 다소성의 출혈 2레	대조군	주사부위의 피하에서 다소성의 출혈 3레	대조군
주사부위 진피에 다소성 다형핵백혈구 침윤 1레	대조군	주사부위의 다소성 다형핵백혈구 침윤 1레	대조군
주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 2레	대조군의 회복분	진피에 다소성의 단핵백혈구 침윤 1레	대조군
폐의 다소성의 폐포상피세포의 증식 2레	대조군의 회복군	주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 1레	회복군의 대조군
주사부위 피부의 피하에 다소성의 단핵백혈구 침윤 1레	400 회복군의 대조군	폐의 다소성의 폐포상피세포의 증식 1레	회복군의 대조군
주사부위의 피하에 다소성의 출혈 2레	100	폐의 다소성의 폐포상피세포의 증식 2레	100
주사부위 피부의 피하에 다소성 출혈 1레	200	주사부위 피부의 피하에 다소성 출혈 3레	200
주사부위 진피에 다소성의 단핵백혈구와 진피 다형핵백혈구 침윤 각 1레	200	주사부위의 피하에 다형핵백혈구 침윤 2레	100
폐의 폐포상피세포의 다소성 증식 1레	400		
주사부위 피하에 다소성의 출혈 1레	400	폐의 다소성 폐포상피세포의 증식 2레	400
주사부위 피하 다형핵백혈구 침윤 1레	400	주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 2레	400
주사부위 진피에 다소성의 단핵백혈구 침윤 1레	400	주사부위 피부의 다형핵백혈구 침윤 1레	400
주사부위 진피에 다형핵백혈구 침윤 2레	400		

2. NOAEL 결정 방법

- ① 대조군 및 회복대조군에서 발생한 모든 변화는 **비시험물질-유래 변화**로 분류함
- ② 100, 200, 400 mg/kg/(3회/2주) 등의 용량군에서 대조군 및 회복대조군에서 발생한 변화와 동일한 변화를 **비시험물질-유래 변화**로 분류함

③ 비시험물질-유래 변화에 대하여 근거-중심(evidence-based) 설명

주요 비시험물질-유래 변화	설명	근거
• 주사부위 피하 출혈	<ul style="list-style-type: none"> 투여 부위가 정맥이기 때문에 주사바늘의 물리적 접촉에 의한 자연발생적인 현상으로 할 수 있음. 이와 같은 정맥주사에 의한 출혈을 국소적 혈관주변부 출혈(local perivascular hemorrhage)이라고 하며 비글검뿐만 아니라 대부분의 실험동물에서 확인되는 증상임 	<ul style="list-style-type: none"> (Cheng 등, 2013; Turner 등, 2011; Morton 등, 2011)
• 주사부위의 다형 핵백혈구 침윤	<ul style="list-style-type: none"> 출혈 외에도 정맥주사에 의하여 다형핵백혈구 침윤이 확인됨. 비만세포를 제외하고 세포질에 존재하는 과립들의 염색을 기준으로 구분되는 과립구(granulocyte)들은 공통적으로 다엽 핵을 가지고 있어 다형핵 백혈구이라고 불림 정맥주사에 의한 손상된 혈관 내피세포는 부착분자(adhesion molecules)의 발현을 통해 다형핵백혈구의 응집과 침윤 정맥주사에 의하여 다형핵백혈구 침윤은 면역반응에 의해 기인하는 것으로 추정됨. 주사에 의한 급성 염증반응이 혈관 손상과 더불어 출혈에 의한 다형핵 백혈구 침윤이 발생하는 것으로 알려졌다 	<ul style="list-style-type: none"> (BiologyInsights. 2025). (Sprague 등, 2009; Saini, 2024). (Issekutz 1982; Reagan 등, 2020)
• 폐포상피세포의 다소성 증식	<ul style="list-style-type: none"> 정맥주사에 의한 혈관 손상은 다형핵백혈구 침윤과 같이 국소 염증반응을 유도할 뿐만 아니라 전신혈관계를 통해 폐포상피세포의 증식도 유도하는 것으로 추정됨. 정맥주사에 의한 손상된 혈관 내피세포는 부착분자(adhesion molecules)의 발현을 통해 다형핵백혈구의 응집과 침윤을 통한 염증반응을 유도뿐만 아니라 성장인자(growth factors)와 사이토카인(cytokine)을 유도함 실제로 비글견의 정맥 투여에 의해서도 백혈구 증가가 되는 것이 확인됨. 비글견의 25건 단위투여 정맥주사와 구강 투여에 의한 백혈구와 피브리노겐(fibrinogen) 혈액에서의 농도보다 정맥 투여에 의하여 훨씬 더 증가하였으며 심지어 정맥 투여 전보다 투여 후 약 50% 정도 증가하였음. 이와 같이 단위 정맥 투여에 의해 발생하는 백혈구 증가(leukocytosis)와 피브리노겐 증가를 급성기반응(acute phase response)이라고 함(Reagan 등, 2020). 이와 같이 시험물질의 정맥 투여에 의하여 전신혈관계 내에서 급속하게 백혈구가 증가되는 것이 확인됨. 따라서 대조군 및 시험물질 투여군의 모두에서 발생한 다소성 폐포상피세포 증식은 주사부위의 혈관내피세포 손상에 기인한 염증반응으로 분비된 성장인자와 사이토카인 등의 폐로의 이동으로 발생한 비시험물질-유래 반응으로 추정됨. 	<ul style="list-style-type: none"> (Sprague 등, 2009; Saini, 2024). (Hoshiya 등, 2001; Reagan 등, 2020)

- ④ 주요 비시험물질-유래인 주사부위 피하 출혈 주사부위의 다형핵백혈구 침윤 폐포상피세포의 다소성 증식 외에 100, 200, 400 mg/kg/(3회/2주) 용량군에서 간의 굴모양혈관, 비장의 백색 및 적색 속질, 장간막림프절의 수질, 폐포상피세포, 그리고 턱밑림프절의 수질 등의 **여러 장기에서 다형핵백혈구 침윤과 증식이 확인됨.**

⑤ 이와 같이 대조군에서 확인된 침윤이나 증식이 **다른 장기에서 더 많이 발생한 것은 시험 물질에 의한 영향이라는 곳 할 수 있음**. 그러나 이는 대조군에서도 발생하였고 다른 장기에서 다소 확장된 이기 때문에 심각한 변화가 아니라 **시험물질에 의한 경미한 변화**라고 할 수 있음.

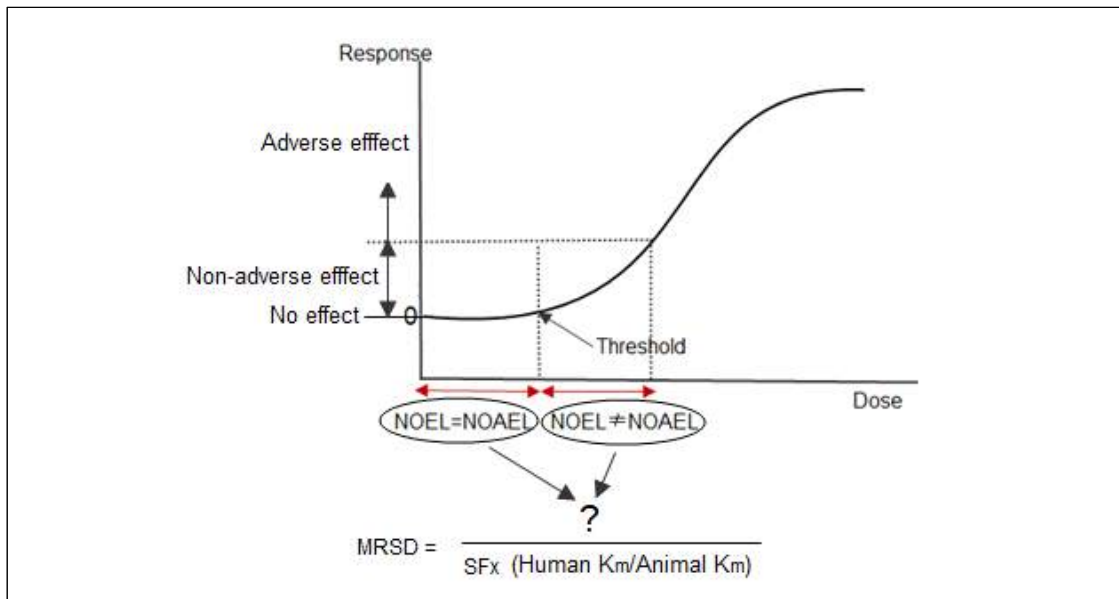
⑥ 시험물질에 의한 경미한 변화가 NOAEL(No observed adverse effect level, 최대무독성용량)이 되는 이유는 용량-반응곡선에 존재하여야 더 높은 용량에서 발생하는 독성을 예측이 가능하기 때문임. 독성시험 자체가 시험물질에 의해 나타나는 변화를 인체에서 예측하는 기 능이며 변화가 나타나는 최저점 용량을 safety factor를 나누어 주어 더 높은 용량에 대한 예측과 안전성을 확보하게 됨.

⑦ 이와 같은 기본지식을 기반으로 아래와 같이 3가지 분류로 하지 않는다면 NOAEL 설정 하는 것이 바람직함.

- 미국 FDA의 임상시험을 위한 MRSD(maximum recommended starting dose, 임상시험최대권장초기용량) 설정을 위한 가이드라인(USFDA, 2005)의 일부인 <참고자료-1>에서처럼 NOAEL 개념은 safety concern을 유발하지 않는 시험물질에 의한 변화이며 기본적으로 그 변화가 reversibility를 가지는 변화라고 할 수 있음. 이와 같이 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대무독성용량)은 변화가 전혀 없는 NOEL(no observed effect level, 최대무영향용량)과 동일하지 않은 NOEL ≠ NOAEL로 정의하고 있음.

<참고자료-1> USFDA. (2005). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacology and Toxicology.

The NOAEL is not the same as the no observed effect level (NOEL), which refers to any effect, not just an adverse one, although in some cases the two might be identical. The definition of the NOAEL, in contrast to that of the NOEL, reflects the view that ② **some effects observed in the animal may be acceptable pharmacodynamic actions of the therapeutic and ③ may not raise a safety concern.** The NOAEL should also not be confused with lowest observed adverse effect level (LOAEL) or maximum tolerated dose (MTD). Both of the latter concepts are based on findings of adverse effects and are not generally used as benchmarks for establishing safe starting doses in adult healthy volunteers. (The term level refers to dose or dosage, generally expressed as mg/kg or mg/kg/day.)



- <참고자료-1>의 가이드라인을 기반으로 <표-1>가 같이 비시험물질-유래 변화, 시험물질-유래 경미한 변화(NOEL 판단기준), 시험물질-유래 중요한 변화(LOEL 판단기준) 등으로 분류

<표-1> 반복투여독성시험에서 시험물질에 의한 변화의 3가지 분류

변화에 분류	기준	비고
<ul style="list-style-type: none"> • 비시험물질-유래 변화 	<ul style="list-style-type: none"> • 대조군에서 발생한 변화에서 동일하거나 유사한 용량군에서의 변화 	<ul style="list-style-type: none"> • NOEL 등의 POD(point of departure) 설정에 제외
<ul style="list-style-type: none"> • 시험물질-유래 경미한 변화 	<ul style="list-style-type: none"> • 대조군과의 유의성이 있지만 시험물질을 제거했을 때 회복군을 통해 가역적인 변화 • 약리학적 작용에 기인하는 것으로 추정되는 변화 • Safety concern을 유발하지 않을 정도의 가역적인 조직학적 변화 	<ul style="list-style-type: none"> • NOEL 판단기준
<ul style="list-style-type: none"> • 시험물질-유래 중요한 변화 	<ul style="list-style-type: none"> • 대조군과 유의한 차이가 있으며 시험물질을 제거하여도 존재하는 비가역적이면서 심각한 조직병리학적 변화 • 생명에 치명적이거나 안전성 우려(safety concern)가 있는 변화 	<ul style="list-style-type: none"> • LOEL 판단기준

3. 결론

- 재조합 단백질을 포함한 바이오의약품의 주사에 의하여 비시험물질-유래 ISR(injection site reaction)이 다빈도로 발생하며 이는 결과적으로 독성시험에 의해 나타나는 변화를 해석하기 어렵게 하고 신약개발자에게 개발의 부담을 주는 요소로 작용함
- 이와 같이 요소에 대한 위험을 줄이기 위해서는 주사주입강도(needle penetration force), 주사기술(injection technique), 주사부위(injection site), 주사부피(injection volume), 주사 도구(injection device) 등이 제시되었음(Zhi 등, 2025).
- 그러나 아무리 주사에 주의깊게하더라도 정맥주사를 통한 출혈 및 염증반응은 시험물질에 의한 영향과 혼돈스럽고 판단에 어려움을 줄 수 밖에 없음.
- 따라서 비시험물질-유래 변화를 대조군, 용량군, 회복군에서 비교 검토 후 근거-중심(evidence-based)를 기반으로 설명이 필요함. 이와 같은 설명을 통해 대조군과 용량군별 변화에 대한 차이를 비시험물질-유래 변화, NOAEL을 결정하는 시험물질-유래 경미한 변화 그리고 LOAEL를 결정하는 시험물질-유래 심각한 변화를 구별할 필요성이 있음.
- 우리나라 GLP기관이 세계적 수준을 따라가지 못하는 이유는 이와 같은 근거-중심(evidence-based)으로 해석에 있어서 부족함에 기인하고 이는 글로벌 경쟁에서 뒤쳐지는 원인이 됨. 결과적으로 독성시험의 약 50%가 해외 GLP기관에 의뢰하게되며 국내에서는 그야말로 가격 경쟁으로 이익 극대화와 운영에 어려움이 있는 것임.

<참고논문>

- BiologyInsights. 2025, biologyinsights.com/polymorphonuclear-leukocytes-types-functions-and-clinical-impact/
- Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L (October 2013). "What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited". *Journal of Leukocyte Biology*. 94 (4): 595–601.
- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, et al. (July 2010). "In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days". *Blood*. 116 (4): 625–627.
- Issekutz AC, Movat HZ. The effect of vasodilator prostaglandins on polymorphonuclear leukocyte infiltration and vascular injury. *Am J Pathol*. 1982 Jun;107(3):300-9
- Reagan WJ, Shoieb AM, Schomaker SJ, Markiewicz VR, Clarke DW, Sellers RS. Evaluation of Rat Acute Phase Proteins as Inflammatory Biomarkers for Vaccine Nonclinical Safety Studies. *Toxicol Pathol*. 2020 Oct;48(7):845-856.
- Cheng Jian-ming et al., Toxicity of Danshen Injection in Beagle's Dogs by Repeated iv Injection. *Chinese Herbal Medicines*, 2013, 5(3): 189-198.
- Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011 Sep;50(5):600-13.
- Saini, S., Kakati, P., Singh, K. (2024). Role of Inflammation in Tissue Regeneration and Repair. In: Tripathi, A., Dwivedi, A., Gupta, S., Poojan, S. (eds) *Inflammation Resolution and Chronic Diseases*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0157-5_
- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009 Sep 15;78(6):539-52.
- Cheng Jian-ming et al., Toxicity of Danshen Injection in Beagle's Dogs by Repeated iv Injection. *Chinese Herbal Medicines*, 2013, 5(3): 189-198
- Hoshiya T, Watanabe D, Akagi K, Mizoguchi Y, Kamiya K, Mizuguchi H, Kumahara M, Toya H, Nagashima Y, Okaniwa A. **Acute phase response** in toxicity studies. I. Survey of beagle dogs subjected to single-dose toxicity studies. *J Toxicol Sci*. 2001 May;26(2):95-102.

76. 임상시험으로부터의 독성시험을 위한 동물등가용량 추정에 대한 고찰

1. 필요성

- 이미 특정 적응증(indication)에 특화된 기존 약물 또는 임상시험에서 실패한 후보약물을 다른 적응증에 적용 및 개발할 경우 등에 동물을 이용한 독성시험이 규제기관 및 라이선스-out 주체 등으로부터 요청되는 경우가 있음.
- 이러한 경우 독성시험에 대한 자료가 없고 단순히 임상시험에 대한 자료가 있을 경우에 임상용량으로부터 동물등가용량을 추정할 필요성이 있음

2. 제1상 임상시험에서의 MTD

- 제 1상 임상시험에서 주목표는 부작용이 발생하지 않고 피험자가 견딜 수 있는 한도 내에서 최대 용량인 최대허용용량(Maximum Tolerated Dose; MTD)을 결정하는 것임.
- 임상시험에서 MTD는 독성반응이 무엇인지에 대해 설정하고 이에 대한 독성반응율이 일반적으로 25-33%임(Storer, 1989; Pillai, 2015). 즉, 정상인 3-4명 중에 1명 정도에서 독성반응이 나타나는 수준이라고 할 수 있음.

3. 독성시험의 동물에서 MTD

- 독성시험에서는 3단계 즉, 저용량, 중용량, 고용량으로 설정하여 용량-반응 관계를 확인하여 고용량 설정 방법은 ① Maximum tolerated dose(MTD, 최대내성용량), ② Limit dose(한계용량, 1000 mg/kg/day) ③ Maximum feasible dose(MFD, 최대투여가능용량), ④ Dose providing a 50-fold margin of exposure(임상용량의 50배 MOE 제공하는 용량), ⑤ Exposure saturation(노출포화용량) 등의 5가지가 있음
- 독성시험에서 사용되는 MTD에 대한 정의는 <표 2-2>에서처럼 MTD에 대한 다양한 정의와 개념이 다양함(박영철, 2019)

<표 2-2> MTD에 대한 다양한 정의와 개념

참고문헌	MTD 정의
Sontag (1976)	• 발암화 외의 다른 영향으로부터 동물의 수명에 영향을 주지 않는 최고용량
ILSI (1984)	• 90일 반복투여독성시험에서 독성 영향을 유도하는 용량을 넘지 않는 고용량이며 고용량에 의해 명확한 독성징후가 유도되어야 함
NTP (1984)	• MTD는 독성시험의 해석에 있어서 장애를 유발할 정도로 독성의 심각한 형태적 증거를 유도하지 않아야 함
Haseman (1985)	• MTD는 때로는 수용할 수 없는 독성을 유도하도록 과용량으로 설정되기도 함
Cutler (1997)	• 개체의 유의한 비율로 치사에 가까운 경미한 영향에서 치사에 가까운 중간 정도의 영향을 유도하는 용량
Apostolou (1993)	• MTD는 아치사량의 최고용량
Huff (1994)	• 개체의 정상적인 생존과 수명에 영향을 주는 adverse effect를 유발하지 않는 최소독성용량(minimally toxic exposure). MTD는 단어 자체는 '최대' 개념의 의미가 있어 오해를 유도하는 단어
Mehendale (1995)	• 심각한 조직 파괴와 사망을 유도하는 조직 치유 역치를 넘는 용량
Morrow (1996)	• 동물의 생존이 겨우 유지할 정도의 과용량
Stevens (1997)	• 생리적 현상으로 변화와 수명의 단축이 없이 아치사의 독성을 유도할 수 있을 정도의 용량
Doe (2006)	• MTD 중 용어 'maximum'이라는 용어는 자연스럽게 화학물질의 과잉(excess)이라는 의미를 포함되어 용어에 어울리는 영향으로 유도하기 위해 이용됨. 이와 같은 의미로 독성학적으로 훈련이 되지 않은 시험자에게 인식되고 있음.

4. 임상시험에서 MTD를 이용하여 in vivo 독성시험에서 최고용량으로 설정하는 예시

- <임상시험 논문-1>에서 1일 2400 mg이 MTD로 설정되었음. 이를 체중으로 전환할 경우에 성인 평균체중을 60Kg으로 가정했을 때 40 mg/kg/day임.
- 아래의 공식(Nair 등, 2016)에서 Human dose를 MTD로 전환과 사용하는 동물(랫드)에 대한 Km과 사람 Km을 Table 2에서 적용하면

$$AED (mg / kg) = Human dose (mg / kg) \times K_m \text{ ratio}$$

- 동물등가용량인 AED(animal equivalent dose)= 40 mg/kg/day x (37/6) = **246.7 mg/kg/day**가 됨. 여기서 주의할 것은 임상초기최대권장용량인 MRSD = HED/SF에서 HED = animal dose(mg/kg/day) x Km ratio를 다시 종내 차이인 **safety factor(안전계수)인 10을 AED 산출에서는 적용할 필요가 없다는 것임.** 이유는 사람집단에서는 약물에 대한 종내(intraspecies) 차이가 있지만 동물은 in breeding(동계교배)으로 종내 차이가 없어

SF 10으로 나누어 MTD를 추정할 필요가 없다는 것임.

<임상시험 논문-1> Pourgholami, Mohammad & Szwajcer, Michael & Chin, Melvin & Liauw, Winston & Seef, Jonathan & Galettis, Peter & Morris, David & Links, Matthew. (2009). Phase I clinical trial to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advanced cancer. Cancer chemotherapy and pharmacology. 65. 597-605

ABSTRACT: Albendazole is a potential anticancer agent that is currently under development for the treatment of cancer. We carried out a dose-finding phase I study of oral albendazole in patients with advanced malignancies. Thirty-six patients with refractory solid tumors were enrolled. Albendazole was given orally on a day 1-14 of a 3 weekly cycle, starting at 400 mg BD with dose escalation until 1,200 mg BD. Serial blood samples were collected up to 96 h and also on day 8 of cycles 1 and 4. **The maximum tolerated dose was 2,400 mg per day (1,200 BD).** Myelosuppression was the main dose limiting toxicity. Fatigue and mild gastrointestinal upset were the other major adverse effects. 4 out of 24 assessable patients (16%) had a tumor marker response with a fall of at least 50% from baseline values and another patient had a prolonged period of stable marker response. A decline in plasma vascular endothelial growth factor levels was observed. Albendazole was well tolerated on the schedule tested in this trial. The results of this study suggest that the recommended dose for further study is 1,200 mg twice daily for 14 days in a 21-day cycle.

Table 2: Animal equivalent dose calculation based on body surface area*

Species	Reference body weight (kg)	To convert dose in mg/kg to dose in mg/m ² , divide by K _m	To convert human dose in mg/kg to AED in mg/kg, either	
			Multiply human dose by	Divide human dose by
Human	60	37		
Mouse	0.02	3	12.3	0.081
Hamster	0.08	5	7.4	0.135
Rat	0.15	6	6.2	0.162
Ferret	0.30	7	5.3	0.189
Guinea pig	0.40	8	4.6	0.216
Rabbit	1.8	12	3.1	0.324
Dog	10	20	1.8	0.541
Monkeys (rhesus)	3	12	3.1	0.324
Marmoset	0.35	6	6.2	0.162
Squirrel monkey	0.60	7	5.3	0.189
Baboon	12	20	1.8	0.541
Micro pig	12	27	1.4	0.730
Mini pig	40	35	1.1	0.946

*Data adapted and modified from FDA draft guidelines.^[7] FDA: Food and Drug Administration, AED: Animal equivalent dose

<참고논문>

- Storer BE (1989). Design and analysis of phase clinical trials, Biometrics, 45, 925-937
- 박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7
- Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J Basic Clin Pharm. 2016 Mar;7(2):27-31.
- Anup Pillai, Establish the Maximum Tolerated Dose in Phase-I Trials using 3+3 Method. PhUSE 2015, Paper SP04. Cytel, Pune, India.

77. FDA의 비임상시험 새 기준 제시에 대한 분석과 국내의 방향성

1. 어느 미국 FDA 비임상연구에 대한 리뷰어의 강의 내용

- 다음은 기사는 지난 5월에 개최된 2025 BIO Regulatory Innovation Conference(바이오 규제 혁신 컨퍼런스) 미국 FDA IND를 위한 Pharmacology/Toxicology reviewer **신양미 박사님**의 발표에 대한 핵심 내용임
- 이에 대한 소개를 통해 국내 수준에 대한 이해와 향후 비임상 연구의 방향을 모색에 있어서 중요한 동기가 될 것으로 사료됨. 다음과 같은 FDA의 IND 사례에 대한 이해를 통해 국내 규제기관의 IND 통과가 가능할까를 가늠해 보면 미래의 IND를 위한 비임상자료 작성 및 규제의 방향성이 추정이 가능함.

사례-1) ADC 치료제는 페이로드의 유전독성 결과를 근거로 발암성 및 생식독성 시험을 생략했다. 임상 라벨에는 피임 권고, 경고문, 생식기 조직 변화 등 내용을 포함시켰다.

사례-2) 어느 혈우병 예방용 이중항체 치료제는 원숭이를 이용한 반복투여 독성시험과 ADME, 면역복합체 분석 등을 통해 EFD/PPND 및 발암성 시험이 생략됐다.

사례-3) 한 전립선암 대상 방사성 리간드 치료제는 방사성 특성에 따라 제한된 범위 독성시험만 시행하고, 임상 라벨에 돌연변이 유발 및 기형 유발 가능성을 명시하는 방식으로 대응했다.

사례-4) 유전자 조작 T세포 치료제는 적절한 동물모델이 없고 비임상 결과가 임상 연계성이 낮다는 이유로, PK/ADME 및 독성시험이 생략됐다. 대신 이론적으로 알려진 위험 요소는 임상 라벨링과 시판 후 약물감시를 통해 보완

사례-5) 700편에 달하는 논문을 종합해 IND를 위한 WoE 평가를 제출한 기업도 있었다"고 밝혔다. 이어 "FDA도 단일 시험 결과보다는 다양한 데이터를 통합한 접근을 선호하고 있다"고 덧붙였다.

2. <참고기사 원문> 약업신문

<참고기사 원문> 약업신문 권혁진 기자<hjkwon@yakup.com> 입력 2025-05-29 06:00

<핵심내용>

- FDA의 비임상시험 새 기준 제시 - WoE 중심 규제 패러다임 전환
- Weight-of-Evidence(WoE), 새로운 규제 언어
- 첨단 기술 기반 대체시험법 도입에 따른 비임상 생략 및 축소 진행 중
- 가이드스 수용 넘어, 과학적 설득력과 전략적 데이터로 글로벌 규제 대응 필요
- "이제는 단순히 동물실험 데이터를 제출하는 시대가 아닙니다. 다양한 과학적 증거와 기술을 통합한 'Weight-of-Evidence(WoE)' 접근이 규제기관에서도 표준으로 자리 잡

아가고 있습니다.”

- 미국 규제 전문가 신양미 박사의 말이다. 신 박사는 최근 성황리에 개최된 '2025 BIO Regulatory Innovation Conference(바이오 규제 혁신 컨퍼런스)'에서 연사로 나서, 'Current Nonclinical Testing Paradigm for Drug Development: A Regulatory Perspective(신약개발을 위한 최신 비임상시험 패러다임: 규제기관의 시각)'을 주제로 FDA의 최신 비임상시험 수용 현황과 허가 전략을 공유했다.
- WoE는 과학 기반 규제 분야에서 의사결정을 내릴 때, 단일 정보나 증거에 의존하지 않고 여러 출처의 다양한 과학적 데이터를 종합적으로 고려해 결론을 도출하는 접근 방식을 말한다.
- 신 박사는 "신약개발 초기 단계에서 비임상 데이터는 단순한 독성자료에 그치지 않고, 임상시험 설계, 환자 선정, 바이오마커 확정 등 전 과정에 영향을 미친다"고 강조했다.
- 약리작용 이해부터 작용기전, 약물동태학(PK/ADME), 용량제한 독성(DLT), 인간 대상 안전성 예측, 안전성 모니터링 전략 수립, 임상시험 포함 및 제외 기준 설정까지 그 역할이 광범위하다는 것이다.
- FDA는 현재 약물 유형, 적응증, 환자군, 치료 기간, 기존 데이터 보유 여부에 따라 비임상시험 설계를 유연하게 허용하고 있다.
- 신 박사는 "생명을 위협하는 질환(life-threatening)과 비교적 경미한 질환(non-serious), 기존 치료법이 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우 등에 따라 요구되는 비임상자료 유형과 범위가 달라진다"고 설명했다. 특히 '생명을 위협하는 질환', '기존 치료법 부재', '소아' 및 '고령' 환자군을 대상으로 하는 경우에는 더 큰 융통성이 제공된다고 덧붙였다.
- FDA가 비임상시험 패러다임이 빠르게 바뀌고 있다. 2024년 발의된 'FDA Modernization Act 3.0'은 대체시험법 활용을 장려하는 새로운 비임상시험 기준을 공식화했다. 셀 기반 분석, 장기 유사 칩(Organ-on-a-Chip), MPS(Microphysiological System), 인공지능 기반 예측모델, 인실리코(in silico) 시뮬레이션 등 다양한 첨단 과학기술이 포함됐다.
- 이에 앞서 2022년 미국 의회에 통과된 'FDA Modernization Act 2.0'은 바이오시밀러 허가 절차에서 동물실험이 필수 요건이 아님을 명시하며, 동물실험 생략에 대한 법적 기반을 마련했다.
- FDA는 의약품 및 생물약품 평가센터(CDER/CBER) 산하 'Drug Development Tool Qualification Program(의약품 개발 도구 자격 인증 프로그램)'과 혁신 과학기술을 시험법에 적용하기 위한 'ISTAND(Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs)' 파일럿 프로그램을 운영 중이다. 현재까지 총 17개 대체시험법이 공식 자격을 획득했다.

- 신 박사는 이번 강연에서 FDA가 WoE 접근을 실제로 어떻게 평가하고 적용하는지에 대해 구체적인 사례와 함께 설명했다.
- 그는 "발암성, 유전독성, 생식독성 등 전통적으로 장기간 동물실험을 요구하던 영역에서도 타깃 생물학, 작용기전, 유전정보, 반복투여 독성 소견, 면역 조절 영향, 호르몬 변화 등 다층적 정보를 통합해 시험을 생략하거나 축소할 수 있다"고 밝혔다.
- 특히 ICH S1B(R1) 가이드라인에서 제시한 WoE 요소들과 FDA의 최근 발암성 평가 생략 수용 사례는 국내 제약바이오 기업에도 중요한 전략적 가이드라인이 될 수 있다고 강조했다.
- 신약 모달리티에 따라 맞춤형 비임상 전략이 요구되는 점도 주목된다. 세포치료제, 항체약물접합체(ADC), 방사성 리간드 치료제 등은 기존 전통적 시험 방식보다 유연하고 목적 지향적인 전략이 적용되고 있다.
- 신 박사에 따르면, 한 유전자 조작 T세포 치료제는 적절한 동물모델이 없고 비임상 결과가 임상 연계성이 낮다는 이유로, PK/ADME 및 독성시험이 생략됐다. 대신 이론적으로 알려진 위험 요소는 임상 라벨링과 시판 후 약물감시를 통해 보완했다.
- 한 ADC 치료제는 페이로드의 유전독성 결과를 근거로 발암성 및 생식독성 시험을 생략했다. 임상 라벨에는 피임 권고, 경고문, 생식기 조직 변화 등 내용을 포함시켰다. 또한 어느 혈우병 예방용 이종항체 치료제는 원숭이를 이용한 반복투여 독성시험과 ADME, 면역복합체 분석 등을 통해 EFD/PPND 및 발암성 시험이 생략됐다.
- 한 전립선암 대상 방사성 리간드 치료제는 방사성 특성에 따라 제한된 범위 독성시험만 시행하고, 임상 라벨에 돌연변이 유발 및 기형 유발 가능성을 명시하는 방식으로 대응했다.
- 신 박사는 "이러한 유연성은 FDA가 데이터 기반(data-driven) 접근을 가장 신뢰하고, 규제 판단에서 가장 효율적인 전략으로 간주하고 있다는 점을 보여준다"면서 "실제 700편에 달하는 논문을 종합해 WoE 평가를 제출한 기업도 있었다"고 밝혔다. 이어 그는 "FDA도 단일 시험 결과보다는 다양한 데이터를 통합한 접근을 선호하고 있다"고 덧붙였다.
- 또한 신 박사는 "국내 제약바이오 업계도 단순히 규제 가이드언스를 따르는 수준을 넘어서, 과학적 설득력과 전략적 데이터 구축 역량을 갖추는 것이 중요하다"라며 "FDA 변화는 규제를 넘어 신약개발 효율성과 과학성을 높이는 중대한 기회가 될 것"이라고 전했다.
- 2025 BIO Regulatory Innovation Conference 현장.©약업신문

3. 무료 특강 안내

- 이와 같이 글로벌 IND 상황은 가이드스 넘어 심의가 이루어지며 이는 단순히 실험동물 사용제한 때문이 아니라 오늘날 너무나 다양한 약물 모달리티 출현에 기인하여 기존의 독성시험 등을 통한 안전성 확보는 한계에 도달하였기 때문임. 이에 이러한 점을 고려하여 다음과 같은 무료 특강을 zoom으로 수행되니 많은 참여 바랍니다.
- 제목: 독성시험의 현실과 FDA 사례를 고려한 성공적인 IND를 위한 약물 모달리티별 이해

2025년 9월 8일 09:30(강의시간 10:00 – 12:00 AM) 오전 서울

회의 ID 446 006 9770

보안 1111

초대 링크

<https://us06web.zoom.us/j/4460069770?pwd=lg26x1brpqRn0oPmHOEaeT5ek0sSaY.1&omn=84224573788>

78. Trump의 주장: 임신부의 타이레놀 복용은 자폐증의 원인?

1. 트럼프, 임신초기 타이레놀 복용 시 자폐증(Autism) 유발 주장. 전문가의 의견은?

Trump Claims Tylenol Causes Autism When Taken Early in Pregnancy. Here's What Experts Say

The administration is focusing on an unproven link that prenatal exposure to acetaminophen leads to autism

Cara Lynn Shultz

Tue, September 23, 2025 at 9:31 AM GMT+9

6 min read



Luke Hales/Getty;Roy Rochlin/Getty;Daniel Acker/Bloomberg/Getty
(From Left) Donald Trump, Robert F. Kennedy Jr., Tylenol

<출처 CBS 뉴스>

1) 트럼프의 발표

- FDA가 임신 중 아세트아미노펜 사용이 자폐증(autism) 또는 자폐 스펙트럼 장애 (ASD, autism spectrum disorder) 위험과 관련 있다고 경고할 예정이라고 발표.
- 타이레놀 사용을 가능한 한 피하라고 권고.
- 백신도 소량으로, 장기간에 걸쳐 접종해야 한다고 주장했으나 의학적 근거는 제시하지 않음.

2) FDA와 NIH의 입장

- 일부 연구에서 연관성이 제시되었지만, **인과관계는 입증되지 않음.**
- NIH는 자폐증 원인에 대한 대규모 연구를 진행 중이며 결과는 1년 후 발표될 가능성 있음.

3) 타이레놀 제조사(Kenvue)의 반응

- “아세트아미노펜이 자폐증을 유발한다는 신뢰할 만한 증거는 없다”고 반박.
- 임신 중 가장 안전한 진통제이며, 대체 약물은 더 위험할 수 있다고 주장.

4) 의료 전문가들의 의견

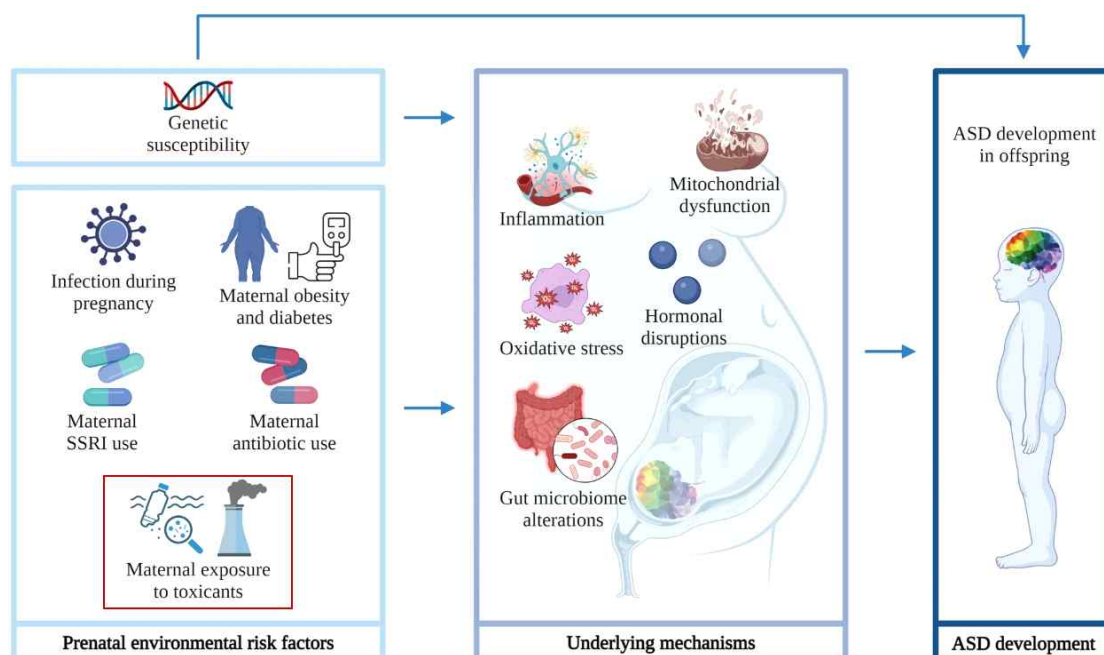
- **아세트아미노펜은 임신 중 고열 등 위험한 증상을 완화하는 데 필요하며, 임신 중 가장 안전한 선택지로 평가됨.**
- 일부 연구는 소규모였고, 대규모 연구에서는 자폐증과의 연관성이 발견되지 않음.

5) 루코보린(Leucovorin) 승인

- FDA가 자폐증 치료제로 루코보린을 공식 승인.
- 일부 자폐 아동에게 효과가 있을 수 있으나, **모든 경우에 해당되지는 않음.**

2. 임신 약물 복용과 Autism 발생과 관계

- **원인:** 왼쪽 패널부터 오른쪽으로, 자폐증(autism) 또는 자폐 스펙트럼 장애(ASD, autism spectrum disorder)의 원인으로 유전적 취약성과 임신 중 감염, 모체 비만, 당뇨병, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI) 및 항생제 사용, **독성 물질 노출** 등의 태아기 환경적 위험 요인을 제시됨. 즉 약물이 태아에게 독성물질로 작용하면 ASD 원인.
- **기전:** 중앙 패널은 이러한 위험 요인의 근본적 메커니즘을 상세히 설명하며, 염증, 미토콘드리아 기능 장애, 호르몬 장애, 산화 스트레스, 장내 미생물군 변화 등이 포함됨. 이는 우측 패널에 자손의 ASD 발병과 연관된다는 것을 설명됨(Love 등, 2024).

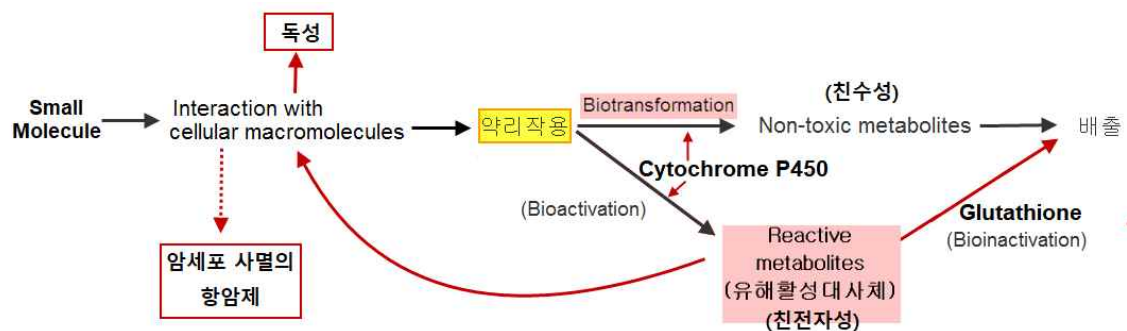


<그림> 자폐 스펙트럼 장애(ASD)의 태아기 환경적 위험 요인과 그 잠재적 기전을 요약한 도식도 (Love 등, 2024)

3. Tyrenol은 태아에게 독성물질이며 또한 자폐 스펙트럼 장애의 원인인가?

1) 독성물질의 화학적 특성

- 원물질(parent compound)의 친전자성(electrophilic)으로 전환되어 세포의 **단백질 및 DNA와의 비가역적 공유결합**
- 아래의 <그림>과 같이 약물의 약리작용은 대체적으로 원물질 자체에 의해 이루어지며 cytochrome P450에 의해 극성대사체와 친수성대사체로 전환되어 배출됨. 반면에 **독성물질**은 cytochrome P450에 의해 대사되어 전자가 부족한 **친전자성대사체로** 전환되어 전자가 풍부한 단백질 및 DNA에 **비가역적 공유결합이 이루어짐**.
- 대부분의 1세대 항암제는 <그림>에서처럼 암세포를 직접 사멸을 유도하기 위해 DNA와의 공유결합함. 이와같이 표적기관에 대한 약리작용은 적응증에 따라 비공유결합 및 공유결합의 화학적 특성을 선택하여 이루어짐. 그러나 **모든 독성물질은 원물질의 친전자성으로 화학적 전환이 이루어짐**.



<그림> 약물의 독성물질로 전환과정과 DNA 및 단백질과의 공유결합 과정

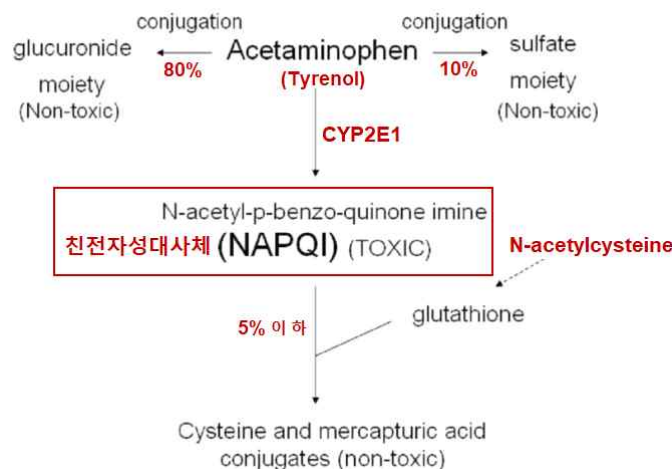
2) 일반인에서의 tyrenol(=acetaminophen)의 특이적 대사기전과 독성기전

2-1) 특이적 대사기전

- 우리 몸에서 Tyrenol의 대사는 특이함. 일반적으로 화학물질은 cytochrome P450에 의한 제1상반응과 친수성대사체로 전환되는 제1상반응으로 이루어짐.
- 그러나 Tyrenol은 제1상반응보다 제2상반응의 glucuronide(당화물질)와 sulfate(황화물질) 먼저 발생하여 친수성 대사체로 전환되어 배출됨

2-2) 독성기전

- 지나친 과잉용량에 의해 제2상반응이 full 상태이면 tyrenol은 <그림>에서처럼 에탄올 대사의 핵심 cytochrome P450인 CYP2E1에 의해 친전자성 대사체인 NAPQI 생성. NAPQI는 간의 다양한 효소 결합 및 지질에 대한 영향을 통해 간 독성의 원인이 됨. 따라서 tyrenol 용량이 제1상반응 대사의 기질이 되지 않도록 지속적으로 복용량이 감소되었음. 그럼에도 불구하고 빠른 해열을 위해 과잉복용을 하거나 음주 후 두통을 제거하기 위해 과잉용량으로 미국에서는 매년 50,000여명의 응급실 입원과 약 500명이 사망함. 이는 과용량에 의한 친전자성대사체 생성에 의한 독성에 기인함. 유럽에서는 약효가 느린 서방정에 의해 과잉복용에 의한 부작용을 없애기 위해 서방정 제제 금지됨.



<그림> Tyrenol(acetaminophen)의 2가지 경로: 무독성대사체 vs 독성대사체 생성

3) 임신 중 태아에서 CYP2E1과 tyrenol(=acetaminophen) 대사

3-1) 태아에서의 CYP2E1 발현

- 친전자성대사체는 반응성이 높기 때문에 모체에서 발생하여 태아에게 전달되기는 어려움. 따라서 태아에서 CYP2E1 유무가 Tyrenol의 독성을 추정하는 중요한 요소가 됨.
- <그림>은 인간 임신 초기 태아 및 성인 간에서의 상대적 CYP 발현량(로그 2 척도)
- <그림-A>은 태아의 성인 간에서 CYP 발현량. <그림-B>는 인간 만삭 태반과 성인 간에서의 상대적 CYP 발현량.
- 굵은 글씨로 표시된 CYP 유전자들은 두 기관군 간 차등 발현이 확인된 것들이임($p < 0.05$; 절대 발현 변화율(FC) > 1 , log2).
- <그림-A와 그림-B>에서 CYP2E1이 성인과 태아의 간 및 태반에서 가장 많이 발현 차이가 확인됨. 즉, 태아의 cytochrome P450 발현에서 CYP2E1은 가장 낮은 발현으로 확인됨(파란 네모).

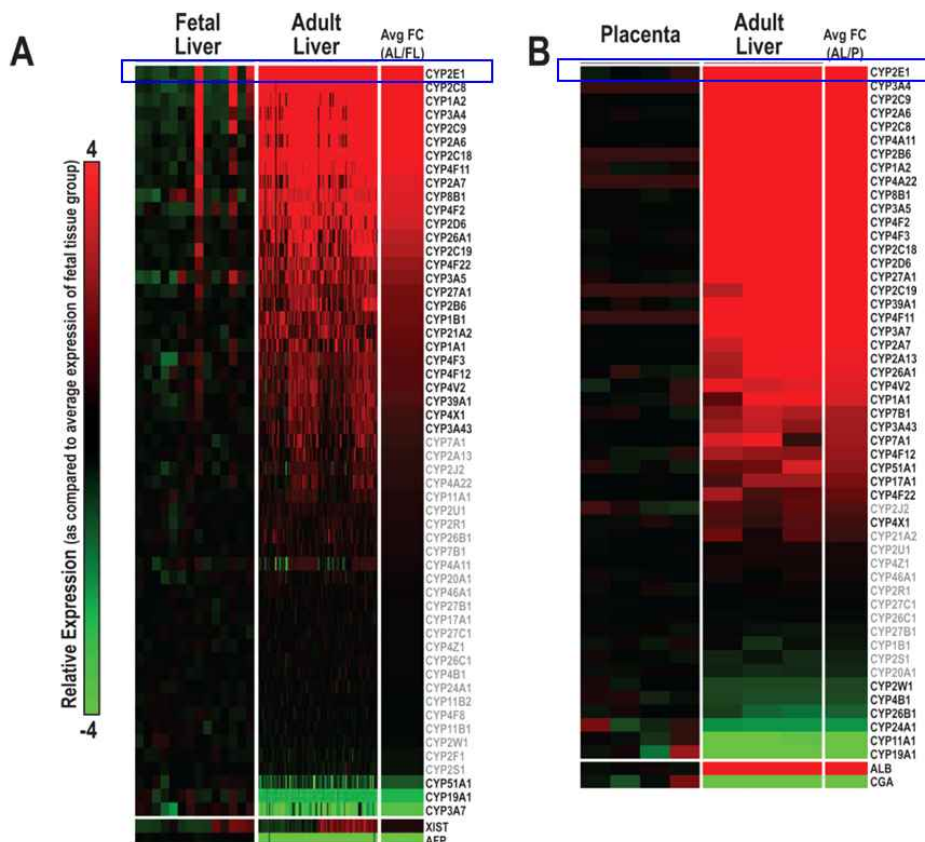


Figure 2: Global CYP expression profiles in human adult and fetal tissues.

4. 트럼프, 임신초기 타이레놀 복용 시 자폐증(Autism) 유발에 대한 독성학적 결론

- Tyrenol은 과잉용량 복용에 의하여 CYP2E1-기반 대사에 의해 친전자성대사체인 NAPQI 독성으로 미국에서는 매년 50,000 여명의 응급실 입원과 약 500명이 사망함.
- 그러나 태아의 간 및 태반에서 친전자성대사체인 NAPQI를 생성하는 CYP2E1은 거의 발현되지 않음. 따라서 트럼프의 임신초기 타이레놀 복용 시 자폐증(Autism) 유발에 대한 독성학적 근거는 없음
- 그러나 CYP2E1 발현은 개체간 차이 있을 수 있기 때문에 드물게 태아에서도 친전자성 대사체 생성에 의한 독성에 기인하여 tyrenol에 의한 자폐증(Autism) 유발은 아주 낮은 가능성이 있을 수도 있음.

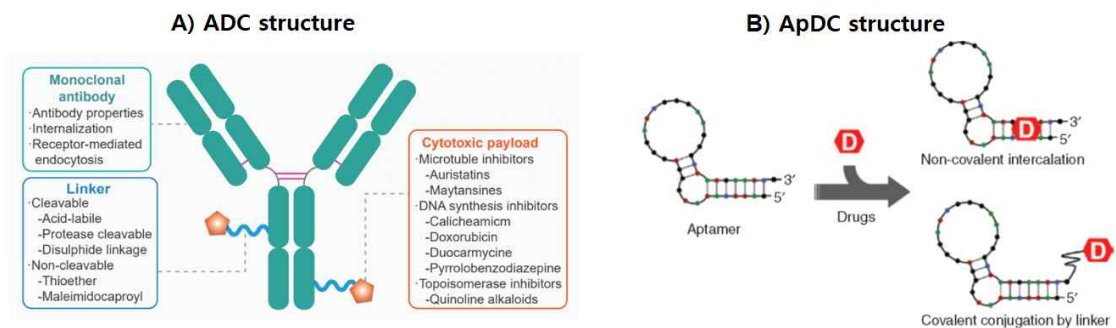
<참고문헌>

- Love, C., Sominsky, L., O'Hely, M. et al. Prenatal environmental risk factors for autism spectrum disorder and their potential mechanisms. BMC Med 22, 393 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12916-024-03617-3>
- Robinson JF, Hamilton EG, Lam J, Chen H, Woodruff TJ. Differences in cytochrome p450 enzyme expression and activity in fetal and adult tissues. Placenta. 2020 Oct;100:35-44.

79. ADC와 ApDC 개발을 위한 독성학적 응용과 새로운 Payload 플랫폼

1. ADC와 ApDC의 개발 중요성과 기본적인 구성

- 약물의 역사는 약물 전달의 역사와 다름이 없이 약물 특이성을 높이는 중요한 약물 개발 방법임
- 이러한 측면에서 오늘날 대부분의 신약은 off-target effect를 줄이고 정확한 표적으로의 정밀한 homing을 위한 신약 개발의 특징
- 이와 같은 정밀한 표적으로 homing을 통해 전신독성을 감소하며 높은 치료효과를 위해 <그림>과 같이 구성된 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물복합체)와 항체 대신에 RNA 서열의 Aptamer를 이용한 ApDC(Aptamer-drug conjugate, 앱타머-약물 복합체) 개발이 활발함.
- 기본적인 구성은 antibody or aptamer + linker + Payload이지만 여기서 논하는 payload는 small molecule의 항암제를 의미함



<그림> ADC(1)와 ApDC(2)의 구조: antibody or aptamer + linker + Payload(CD creative diagnostics, 2025; Sun 등, 2014)

2. ADC와 ApDC의 장단점

- Payload 특성을 비롯한 ADC와 ApDC 개발을 위해서는 아래의 <Table 1>과 같이 antibody와 aptamer의 분자의 크기와 안정성 등이 중요한 요소임(He 등, 2023)

Table 1 Comparison of aptamer and antibody.

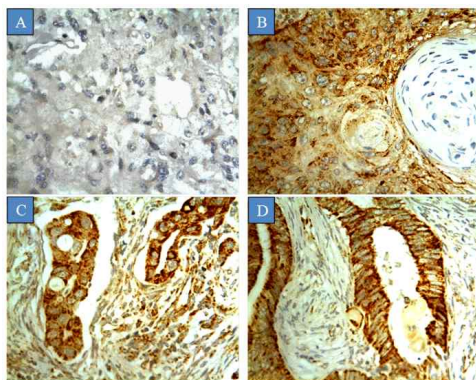
Character	Aptamer	Antibody
Molecular weight	6–30 kDa	150–180 kDa
Size	~2 nm	~15 nm
Affinity	High	High
Specificity	High	High
Stability	Very stable	Sensitive to temperature
Targets	Wide range of targets	Immunogenic molecules
Generation discovery time	Few hours to months	Several months
<i>In vivo</i> half-life	Short (~20 min)	Long (~one months)
Cost	Lower	Higher
Nuclease degradation	Sensitive	Resistant
Chemical modifications	Various modifications	Limited modifications
Secondary structure	Hairpin, stem, loop, G-quadruplex	A-helix and β -fold

3. 암세포의 종류 및 진행 등급에 따른 cytochrome P450의 발현의 특이성

1) Cancer cell의 cytochrome P450의 expression

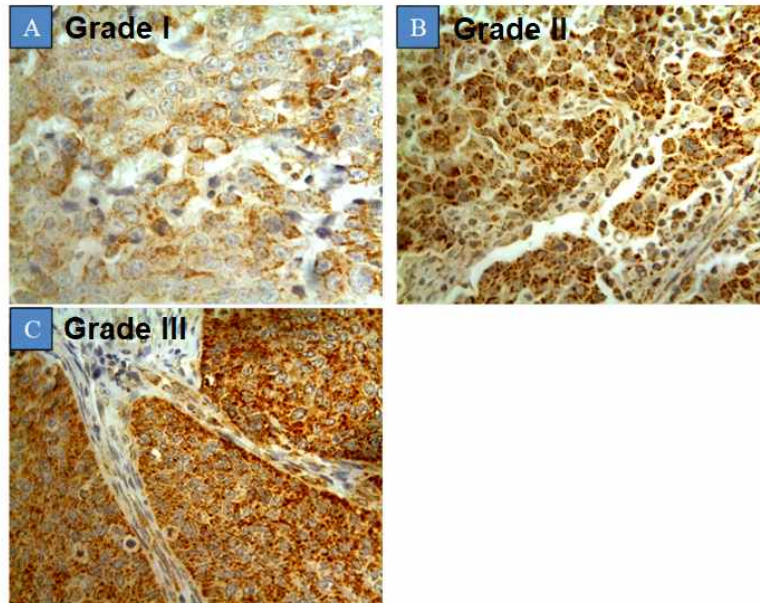
- 대부분의 cancer cell의 약물에 대한 생존을 극복하기 항암제에 대한 내성 전략을 가지며 중요한 내성기전의 약물대사의 핵심 효소인 cytochrome P450임

예시-1> 자궁경부암<cervical cancer> 유형별 cytochrome P450 중 **CYP1B1**의 발현: 자궁경부암의 다양한 유형에서 CYP1B1 발현. 종양은 조직학적 하위 유형에 따라 분류 (A) 정상 자궁경부 조직과 비교하여 CYP1B1 효소에 염색된 (B) 편평세포암, (C) 선암, (D) 자궁내막양 선암(Alshammari 등, 2021)



Cytochrome P450 1B1 expression in different types of cervical cancer. Tumors were classified on the basis of the histological subtype. (A) Normal cervix tissue, (B) squamous cell carcinoma, (C) adenocarcinoma, and (D) endometrioid adenocarcinoma.

<예시-2> 자궁경부암<cervical cancer>의 다양한 등급에서 CYP1B1 발현. 종양은 조직학적 등급에 따라 분류되었으며 (A) 1등급, (B) 2등급, (C) 3등급. 등급이 높아질수록 CYP1B1의 발현이 비례적으로 높아짐(Alshammari 등, 2021)



Cytochrome P450 1B1 expression in different grades of cervical cancer. Tumors were classified on the basis of histological grades. (A) Grade I, (B) grade II, and (C) grade III.

<예시-3> <Figure-2>에서처럼 저등급 및 고등급 유방 종양(breast tumors)에서의 세포질 CYP2U1 발현 분석. (A) 저등급(Grade I-II) 및 고등급(Grade III) 유방 종양에서의 CYP2U1 단백질 발현량의 비교. (B) 유방암의 등급이 높을수록 CYP2U1 발현이 비례적으로 증가(Luo 등, 2022)

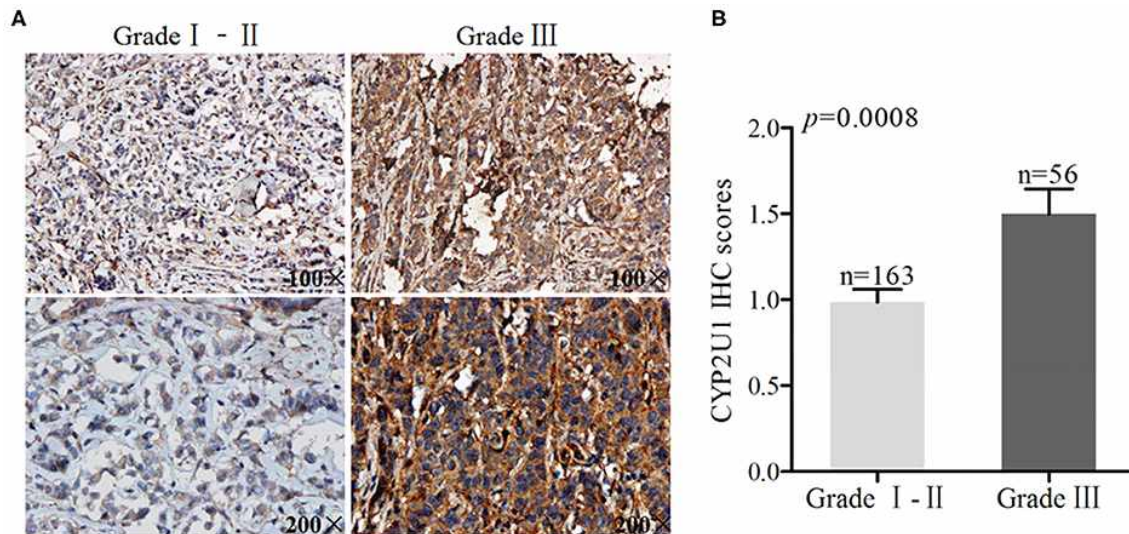


Figure 2. Analyses of cytoplasm CYP2U1 expression in low-grade and high-grade breast tumors. (A) Representative images of CYP2U1 protein abundance in low-grade and high-grade breast tumors are shown. (B) Semi-quantitative result is displayed as the mean ± SEM.

<예시-4> 비소세포폐암(non-small cell lung cancer): 조직 미세 배열 절편에서 비소세포폐암의 AhR, **CYP1B1**, EGFR 및 p53 면역조직화학. AhR(A) 및 CYP1B1(B) 염색이 확산적이고 강한 세포질 양상을 보이는 선암. 편평세포암에서 확산적이고 세포막 EGFR 발현(C) 및 핵 내 p53(D) 염색을 보이는 사례. AhR, 아릴하이드록신수용체; CYP1B1; EGFR, 상피성장인자수용체. **비소세포폐암에서는 <그림-B>에서처럼 CYP1B1의 발현이 두드러짐**

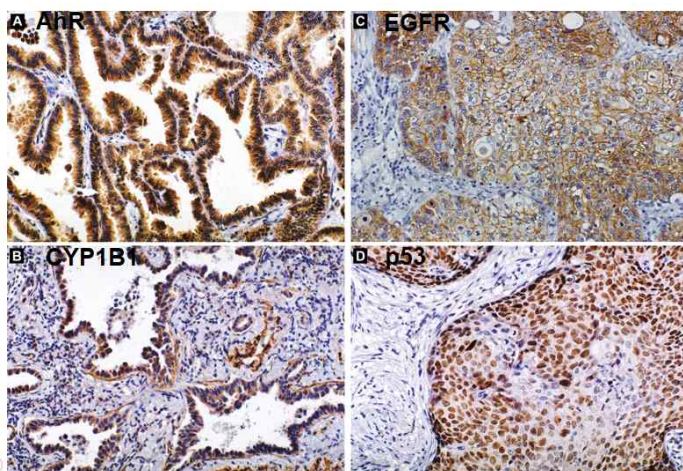


Figure 1. Immunohistochemistry of non-small cell lung cancer for AhR, CYP1B1, EGFR and p53 on tissue microarray sections.

2) Cancer cell의 metastasis와 cytochrome P450의 expression

<예시-1> Fig.3은 Papillary serous ovarian cancer (유두성 낭선종 난소암)의 복막전이(peritoneal metastasis)에 있어서 CYP2A/2B 발현의 변화를 나타냄. CYP2A/2B 발현이 특징적으로 나타나는 난소암세포가 복막으로 전이된 암세포에서 더욱 많은 발현이 이루어진 CYP2A/2B(Downie 등, 2005)

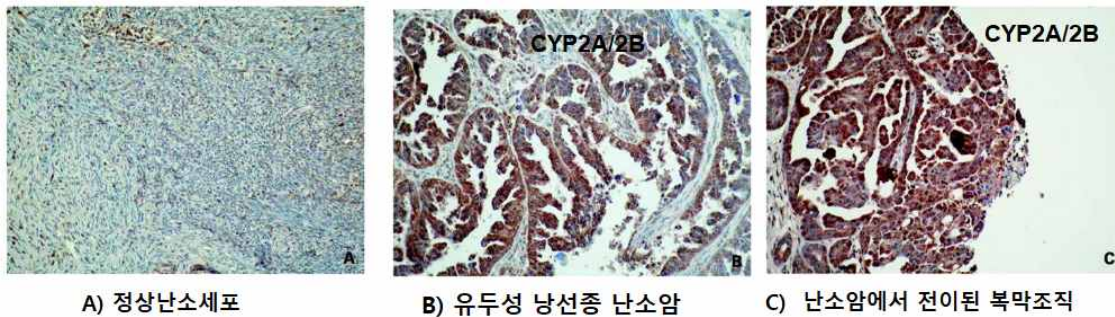


Fig. 3. The immunolocalization of cytochrome P450 CYP2A/2B in normal ovary (A), primary papillary serous ovarian cancer showing strong CYP2A/2B immunoreactivity (B), and strong immunoreactivity in a peritoneal metastasis from a papillary serous adenocarcinoma (C).

4. ADC와 ApDC의 Payload 선택에 있어서 독성학적 응용

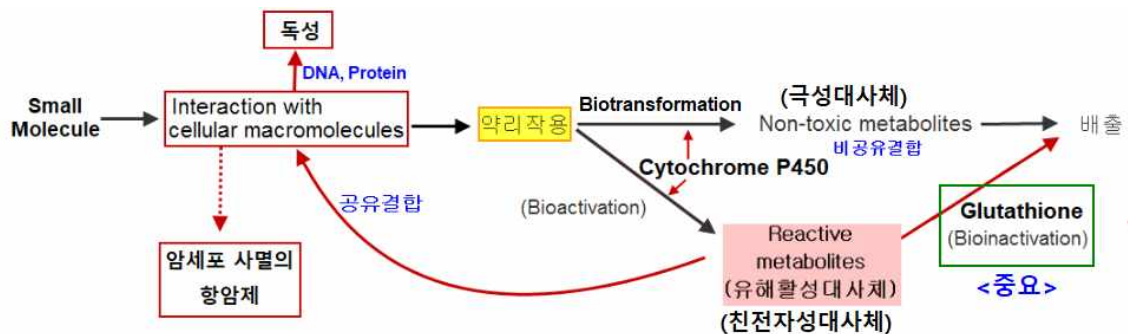
1) 암세포에 Cytochrome P450의 특이적 발현에 따른 결론

- 앞서 여러 <예시>처럼 대부분의 암세포의 암종 및 진행의 등급별로 발현의 특이성을 가지고 있음.
- 암세포가 전이가 되어도 동일한 cytochrome P450의 발현이 이루어지며 상황에 따라 전이 전의 암세포보다 더 많은 발현이 이루어지는 특성이 있음

2) ADC 및 ApDC의 payload 개발 방향

2-1) Cytochrome P450의 양면성

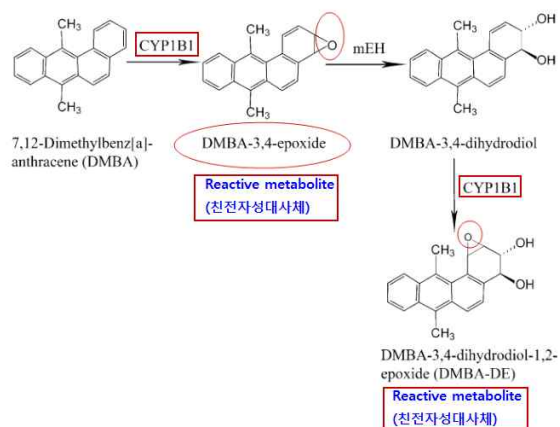
- Cytochrome P450은 아래와 같이 약물 대사에 있어서 양면성을 가지고 있음. 즉 무독성 대사체인 극성대사체와 DNA 및 단백질에 결합하는 독성대사체인 Reactive metabolite(intermediate) 등의 2 경로임



<그림> Cytochrome P450에 의한 약물의 2가지 대사경로

2-2) Cytochrome P450에 의하여 reactive metabolite(intermediate)로 전환하는 Payload

- 대부분의 항암제와 독성물질은 cytochrome P450에 의한 친전자성의 reactive metabolite로 전환되는 small molecule. 이와 같은 측면에서 독성은 양이라 아니라 질이라는 개념을 가져야 독성학의 기본 원리를 이해할 수 있음
- 자궁경부암<cervical cancer>의 ADC 및 ApDC 개발을 위한 Payload 개발:**경부암은 CYP1B1를 특이적으로 발현함. 전이가 되어도 동일한 CYP1B1이 예상됨. 따라서 CYP1B1에 의해 reactive metabolite로 전환되는 기질을 payload를 선택. 특히 payload의 효율성을 위해 <그림>의 DMBA 같이 연속적으로 동일한 CYP1B1에 의해 reactive metabolite를 전환되는 payload 선택의 필요성(Gao 등, 2007)



- Based on its structure, the first epoxide substrate (DMBA-3,4-epoxide) produced by CYP1B1 will be biotransformed to DMBA-3,4-dihydrodiol (Fig. 1). Finally, the ultimate metabolite, DMBA-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide (DMBA-DE) can be produced, leading to covalent binding to DNA and resultant DNA damage (Dipple and Nebzdoski, 1978; Tierney et al., 1978; Wislocki et al., 1980).

FIG. 1. Metabolic pathway for potential bioactivation of DMBA via CYP1B1 and mEH leading to systemic immunotoxicity. (Gao 등, 2007)

5. ADC와 ApDC의 Payload 선택과 독성학적 응용에 대한 결론

- 신약의 platform 기술, 표적 특이성, 환자 맞춤형 신약의 현대 개발 특성 상황에서 전 세계적으로 이와 같은 이론적 배경으로 ADC 및 ApDC 개발을 위한 **cytochrome P450 플랫폼**은 아직 없음. 따라서 Blue ocean 영역으로 국내 토종의 플랫폼이 될 있음.
- Cytochrome P450 플랫폼-기반** ADC 및 ApDC 항암제는 표적 특이성 높아 off-target effect를 최소화하고 말기 및 전이된 암환자 치료에 큰 도움이 될 것으로 사료됨.

<참고문헌>

- Alshammari, Fatemah & Al-saraireh, Yousef & Youssef, Ahmed & Al-Sarayra, Yahya & Alrawashdeh, Hamzeh Mohammad. (2021). Cytochrome P450 1B1 Overexpression in Cervical Cancers: Cross-sectional Study. Interactive Journal of Medical Research. 4. e31150.
- Luo B, Chen C, Wu X, Yan D, Chen F, Yu X and Yuan J (2020) Cytochrome P450 2U1 Is a Novel Independent Prognostic Biomarker in Breast Cancer Patients. Front. Oncol. 10:1379.
- JANG-MING SU, PINPIN LIN, CHIEN-KAI WANG and HAN CHANG. Overexpression of Cytochrome P450 1B1 in Advanced Non-small Cell Lung Cancer: A Potential Therapeutic Target Anticancer Research February 2009, 29 (2) 509-515.
- Diane Downie; Morag C.E. McFadyen; Patrick H. Rooney; Margaret E. Cruickshank; David E. Parkin; Iain D. Miller; Colin Telfer; William T. Melvin; Graeme I. Murray. Profiling Cytochrome P450 Expression in Ovarian Cancer: Identification of Prognostic Markers. Clin Cancer Res (2005) 11 (20): 7369–7375.
- Jun Gao, Fredine T. Lauer, Leah A. Mitchell, Scott W. Burchiel, Microsomal Epoxide Hydrolase Is Required for 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)–Induced Immunotoxicity in Mice, Toxicological Sciences, Volume 98, Issue 1, July 2007, Pages 137–144.
- Jiaxuan He, Duan Q, Ran C, Fu T, Liu Y, Tan W. Recent progress of aptamer-drug conjugates in cancer therapy. Acta Pharm Sin B. 2023.
- CD creative diagnostics, 2025.
<https://www.creative-diagnostics.com/antibody-drug-conjugates-adcs.htm>.
- Sun, Hongguang et al. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. Molecular Therapy Nucleic Acids, Volume 3, e182

80. AI-기반 대사체 분석 프로그램과 약물의 독성학적 Optimization 예시

<내용>

<요약>

1. AI-기반 대사체 분석의 중요성
2. Small molecule의 기존 AI-기반 대사체 분석 방법
3. 최신 AI-기반 대사체 분석의 특징
4. AI-기반 대사체 분석을 위한 프로그램
5. 독성 및 약리학적 대사체의 화학적 특성 전환에 있어서 의미
6. AI-기반 대사체 예측 프로그램의 기본 원리 – MTX 및 MTX-OH에 적용
 - 6-1. SOM (Site of metabolism, 대사 부위)-기반 대사체 예측 - SMARTCyp 3.0
 - 6-2. SOM (Site of metabolism, 대사 부위)-기반 대사체 예측 – Way2Drug
7. MTX의 MTX-OH로 전환을 통한 약물 Optimization의 적격성

<참고문헌>

<요약>

- 본 보고서에서 핵심은 AI-기반 대사체 예측 프로그램에 대한 소개와 활용 그리고 약물의 Optimization 활용 가능성임. 이를 위해 다음과 같은 예시와 결과를 통해 설명되었음.
- MTX(Methotrexate)의 경구투여에 의한 생체이용률이 저조, 이를 극복하기 위해 극성기인 -OH(수산기)를 MTX에서 제거하여 신물질 MTX-OH(Methotrexate-OH)를 확보
- MTX 및 구조 변경 약물인 MTX-OH의 AI-기반 대사체 분석을 통해 두 물질의 약리기전이 친전자성이라는 것은 확인하였음.
- MTX 및 MTX-OH의 toxic endpoint를 AI-based 독성 예측 프로그램을 통해 MTX-OH가 MTX보다 18.2배 독성이 강하며 이는 항암제 약리기전이 18.2배 높다는 것을 의미함.
- MTX 및 MTX-OH의 친지질성과 생체이용률의 비교에서 MTX-OH에서 모두 높을 것을 확인할 수 있음. 이는 극성을 띠는 -OH(수산기)를 제거함으로 MTX-OH의 경구를 통한 생체이용률이 급격하게 증가된 것이 원인으로 추정됨.
- 결과적으로 MTX-OH의 AI-기반 대사체 예측 프로그램 및 AI-based 독성 예측 프로그램을 통해 약물의 Optimization이 가능함을 확인할 수 있음.

1. AI-기반 대사체 분석의 중요성

- 이를 통해 질병 바이오마커 발굴, 약물 설계, 안전성 평가에 활용. 따라서 대사산물은 원래 약물과 다른 효능·독성을 가질 수 있어 신약 개발 초기 단계에서 예측이 중요.
- 그러나 기존 규칙 기반 예측은 특정 효소군(CYP450 등)에 제한 및 일반화가 어렵고 false positive가 많음.

2. Small molecule의 기존 AI-기반 대사체 분석 방법

- 분자 도킹, QSAR 모델링, 규칙 기반 방법 등을 활용해 효소 특이성, 대사 위치(SoM: sites of metabolism), 잠재적 대사산물을 예측.

3. 최신 AI-기반 대사체 분석의 특징(Zhu 등, 2024; Zhang 등, 2025; Satheeskumar, 2025; Ree 등, 2025; Zhai 등, 2023)

- ① 규칙 없는(end-to-end) 딥러닝 접근: 대사 예측을 분자 서열 번역(sequence translation) 방법으로 처리.
- ② 프롬프트 엔지니어링 도입: 대사 위치(SoM)를 지정하는 프롬프트를 SMILES 문자열에 삽입해 모델이 더 정확히 예측하도록 유도.
- ③ 전이학습(transfer learning): 일반 화학 반응 데이터로 사전 학습 후 대사 반응 데이터로 미세 조정.
- ④ 2단계 구조:
 - SOM 자동 식별
 - 프롬프트 기반 대사산물 예측
- ⑤ 앙상블 전략(ensemble learning): 여러 모델을 결합해 예측 다양성과 정확성을 높임
- ⑥ 원자의 친전자성 및 친핵성 측정 모델(Atom-based machine learning for estimating nucleophilicity and electrophilicity)

4. AI-기반 대사체 분석을 위한 프로그램

- AI-based drug metabolite의 프로그램은 아래의 <표>에서처럼 크게 2분류로 구분됨. ADME 프로그램에서 저해제 및 기질 측면을 예측하는 프로그램과 대사체-분석 전문 프로그램. 대사체-분석 전문 프로그램보다 ADME 프로그램에서 저해제 및 기질 측면을 예측하는 프로그램들은 예측 근거의 부족으로 신뢰성이 부족함.

<표> AI-기반 대사체 분석을 위한 프로그램	
ADME 프로그램에서 저해제 및 기질 측면을 예측하는 프로그램	대사체-분석 전문 프로그램
<ul style="list-style-type: none"> HelixADMET: CYP inhibitors and substrate Interpretable-ADMET: CYP inhibitors and substrates FP-ADMET: CYP inhibitors and substrates ADMETlab2.0: CYP inhibitors and substrates AdmetSAR2.0: CYP inhibitors and substrates CYPstrate: CYP substrates DL-CYP: CYP inhibitors CYPlebrity: CYP inhibitors SuperCYPsPred CYP inhibitors VirtualRat CYP inhibitors ICDrugADMET CYP inhibitors and substrates SwissADME CYP inhibitors 	<ul style="list-style-type: none"> GLORYx: Metabolite structure FAME3: Phase1 and 2 SOMs for CYP BioTransformer3.0: Metabolic transformation PreMetabo: Phase 1 and 2 SOMs for CYP, UGT, and SULT SMARTCyp3.0: SOMs for CYP MetaTrans CypReact CYPstrate CyProduct MetaSite Drugmetab(=DeepMetab) D-CyPre SuperCYPsPred: http://insilico-cyp.charite.de/SuperCYPsPred Xenosite CypBoM RS-predictor PreMetabo SimulationPus Way2Drug

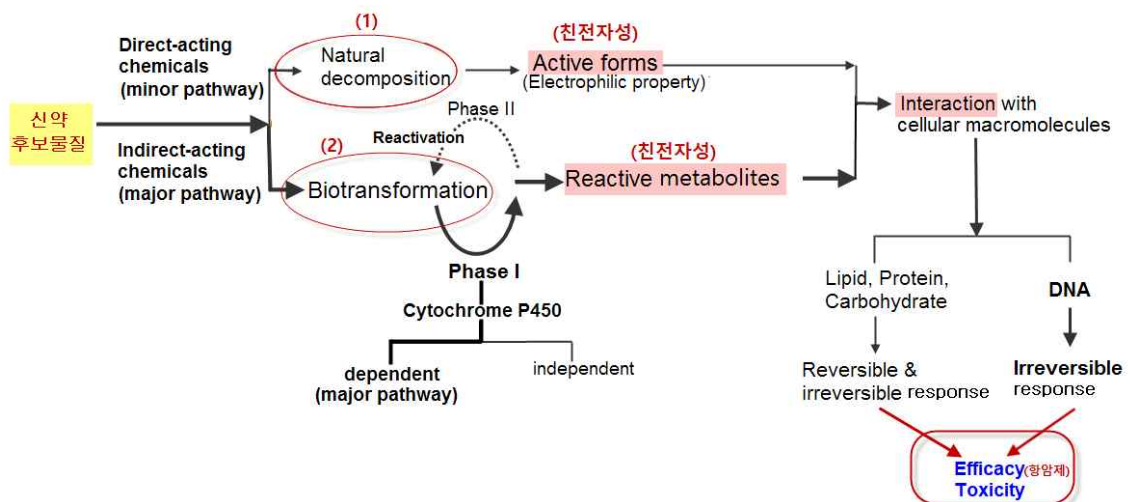
5. 독성 및 약리학적 대사체의 화학적 특성 전환에 있어서 의미

1) 약물의 친전자성(electrophilic)

- 생체 내에는 정상적인 당, 단백질, 지질, 핵산 등 생체를 구성하는 거대분자 내에는 친전자성(electrophilic) 특성은 없으며 친핵성(nucleophilic) 특성임.
- 따라서 약물이 대사 또는 자연분해를 통해 친전자성으로 전환되면 비가역적 공유결합을 통해 효소의 불활성 및 DNA의 돌연변이를 유발함.
- 표적이 암세포이면 암세포의 효소 불활성 및 DNA의 돌연변이를 유발하여 항암제 역할을 하여 모든 화학 항암제는 친전자성 특성을 가짐.
- 따라서 약물의 친전자성으로 전환은 정상세포에서는 독성, 반면에 암세포에 대해서는 약리 기전의 핵심적인 화학적 특성이라고 할 수 있음

2) 약물의 친전자성 전환 기전에 대한 2가지 경로

- 아래의 <그림>은 약물이 친전자성으로 전환되는 2가지 경로인 가수분해와 같은 (1)Natural decomposition(자연분해)와 Cytochrome P450 효소에 의한 (2) Biotransformation(생화학적 전환) 등 (박영철, 2010).



<그림> 약물의 친전자성 특성으로 전환되는 2가지 경로 - 독성기전의 Central dogma
(박영철, 2010)

- 따라서 약물의 원물질 및 대사체의 확인이 필요한 이유가 자연분해 및 biotransformation의 친전자성 물질로 전환되는 유무를 확인하는 것임.

6. AI-기반 대사체 예측 프로그램의 기본 원리 - MTX 및 MTX-OH에 적용

6-1. SOM (Site of metabolism, 대사 부위)-기반 대사체 예측 - SMARTCyp 3.0

1) SOM 알고리즘

- 분자 내에서 사이토크롬 P450에 의한 대사 가능성이 가장 높은 대사 부위(SOM, Site of metabolism)를 예측하는 방법. 즉, 각 원자에서의 산화에 필요한 에너지가 Cytochrome P450 패턴에 대한 단편 매칭으로 예측.
- SOM 예측은 공식에 따라 원자들의 점수로 이루어지며 점수가 낮을수록 대사 부위가 될 확률이 높아짐.
- 약물 원자의 Score는 아래의 공식과 같이 산출되며 이를 기본 반응성(reactivity)이라고 함

$$S = E - 8 \cdot A - 0.04 \cdot SASA$$

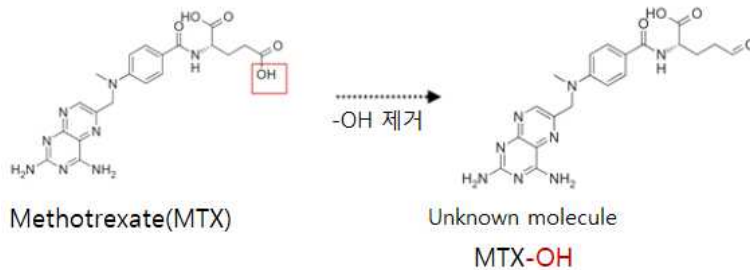
- **에너지 = E:** E는 CYP의 촉매 부위와 이 원자에서의 분자 간 반응에 대한 근사적 활성화 에너지. 이는 각 원자에 대해 알고리즘 규칙과 활성화 에너지가 kJ/mol 단위로 기재됨.
- **접근성 = A:** 접근성은 원자가 분자 중심으로부터의 위상학적 거리를 상대적으로 측정한 값으로, 항상 0.5(원자가 중심에 위치)와 1(원자가 말단에 위치) 사이의 수치임
- **용매 접근 표면적 = SASA:** SASA는 원자의 국소적 접근성을 설명하며, 분자 토폴로지(배치 형태)로부터 이 값을 예측하는 2DSASA 알고리즘을 사용하여 계산됨. **정확한 값을 얻으려면 2D보다 3차원 좌표가 필요함.**
- 약물 원자의 기본 반응성에 cytochrome P450 모델의 알고리즘에 따른 약물의 여러 원자 거리가 추가되어 특정 cytochrome P450에 대한 점수가 추정됨. 이렇게 설정된 S값 즉 점수가 낮을수록 대사 부위가 될 확률이 높아짐.
- **<매칭을 위한 CYP2D6 알고리즘 예시>** 약물 원자의 Score, 즉 약물 반응성에 분자 말단까지의 원자 거리(Span2End)와 양성자화된 아민 질소 원자까지의 원자 거리(N+dist)를 추가됨. 이후 선형 보정을 적용하여 최종 CYP2D6의 점수인 S가 산출됨. N+dist는 8을 초과하지 않도록, Span2End는 4를 초과하지 않도록 cut-off 값이 적용

$$S = \text{Energy} + 6.7 \cdot (8 - N + \text{dist} + \text{Span2End})$$

- **N+dist_correction:** N+dist is the number of bonds from an atom to a protonated amine. The correction is computed as follows:
 - $N + \text{dist} < 8$: $N + \text{dist_correction} = 6.7 \cdot (8 - N + \text{dist})$
 - $N + \text{dist} \geq 8$: $N + \text{dist_correction} = 0$
- **Span2End_correction:** Span2End is the number of bonds between an atom and the end of the molecule. The correction is computed as follows:
 - $\text{Span2End} < 4$: $\text{Span2End_correction} = 6.7 \cdot \text{Span2End}$
 - $\text{Span2End} \geq 4$: $\text{Span2End_correction} = 6.7 \cdot 4 + 0.01 \cdot \text{Span2End}$

2) SOM 예측 예시

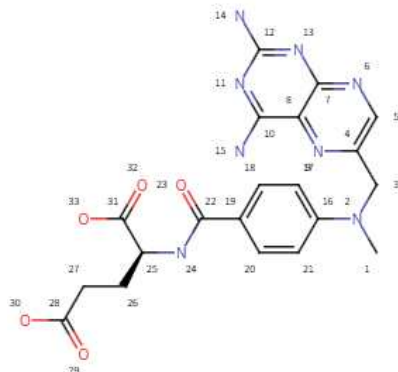
2-1) Methotrexate(MTX) vs Methotrexate(MTX)-OH: MTX의 경구 흡수율 증가를 위해 -OH 제거 후 unknown molecule인 MTX-OH



2-2) SMILES

- **MTX:** CN(CC1=CN=C2C(=N1)C(=NC(=N2)N)N)C3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)O
- **MTX-OH:** CN(CC1=CN=C2N=C(N)N=C(N)C2=N1)C1=CC=C(C=C1)C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)O

2-3) MTX의 SMARTCyp 3.0 응용 예측



<그림> MTX의 원자의 numbering

- ① CYP3A4: 효소에 의해 일산화 촉매반응이 발생하는 우선 순위는 S 점수가 낮은 C1, C3, N14로 예측됨. SMARTCyp 3.0은 아래의 표에서처럼 데이트 베이스의 검증 분자인 쿼리(query) 분자와 모델 단편 간의 유사도(similarity) 측정도 포함되어 있으며 높은 점수가 유사성이 높다는 것을 의미함

3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	Energy	2DSASA	Span2end	Relative Span	Similarity
1	C.1	34.1	41.1	49.6	7	0.6	0.7
2	C.3	35.2	41.1	21.0	7	0.6	0.4
3	N.14	44.1	54.1	50.2	0	1.0	0.7

- ② CYP2D6: 효소에 의해 일산화 촉매반응이 발생하는 우선 순위는 S 점수가 낮은 N14, N15, C1로 예측됨.

2D6 Ranking	Atom	2D6 Score	Energy	2DSASA	Span2end	N+dist	Similarity
1	N.14	52.1	54.1	50.2	0	0	0.7
2	N.15	65.7	54.1	44.9	2	0	0.7
3	C.1	66.0	41.1	49.6	7	0	0.7

- ③ CYP2C9: 효소에 의해 일산화 촉매반응이 발생하는 우선 순위는 S 점수가 낮은 N14, C1, C3로 예측됨.

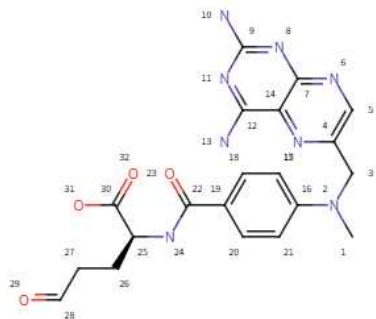
2C9 Ranking	Atom	2C9 Score	Energy	2DSASA	Span2end	COO-Dist	Similarity
1	N.14	52.1	54.1	50.2	0	19	0.7
2	C.1	62.8	41.1	49.6	7	12	0.7
3	C.3	63.9	41.1	21.0	7	12	0.4

④ 결론 및 Validation

- 일반적으로 CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 등이 20 여종의 약물대사효소 cytochrome P450 중에서 약물대사의 50%를 차지함
- SMARTCyp 3.0은 CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 등의 3개 cytochrome P450 효소에 대한 점수를 출력하지만 다음과 같이 다른 cytochrome P450 효소를 동시에 예측함
 - 3A4 : The standard SMARTCyp score (see below) was originally benchmarked towards CYP3A4 but performs reasonably well also to predict sites of metabolism for CYP1A2, 2A6, 2B6, and 2E1.
 - 2C9 : The SMARTCyp score 2C9 score was developpe for CYP2C9, but is also used to predict SOMs for 2C8 and 2C19.
 - 2D6 : The 2D6 score is used for CYP2D6.
- MTX는 매칭 점수가 가장 낮은 C1이 CYP3A4의 대사 부위가 됨. CYP3A4에 부속되는 효소는 CYP1A2, 2A6, 2B6과 2E1 등이 있음
- Validation: Neuman 등(1999)의 논문에서처럼 CYP2E1과 CYP3A에 의해 MTX가 대사된다는 것을 확인할 수 있음.

Methotrexate(MTX) interacts significantly with cytochrome P450 enzymes. These enzymes, particularly the CYP2E1 and CYP3A subfamilies, play a crucial role in the metabolism of methotrexate (Neuman등, 1999)

2-4) MTX-OH의 SMARTCyp 3.0 응용 예측



<그림> MTX-OH의 원자의 numbering

- ① CYP3A4: 효소에 의해 일산화 탄소화 촉매반응이 발생하는 우선 순위는 S 점수가 낮은 C28, C1, C3로 예측됨.

3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	Energy	2DSASA	Span2end	Relative Span	Similarity
1	C.28	31.3	40.2	33.3	1	0.9	0.7
2	C.1	34.1	41.1	49.6	7	0.6	0.7
3	C.3	35.2	41.1	21.0	7	0.6	0.4

- ② CYP2D6: 효소에 의해 일산화 탄소화 촉매반응이 발생하는 우선 순위는 S 점수가 낮은 C28, N10, N13로 예측됨.

2D6 Ranking	Atom	2D6 Score	Energy	2DSASA	Span2end	N+dist	Similarity
1	C.28	45.6	40.2	33.3	1	0	0.7
2	N.10	52.1	54.1	50.2	0	0	0.7
3	N.13	65.7	54.1	44.9	2	0	0.7

- ③ CYP2C9: 효소에 의해 일산화 탄소화 촉매반응이 발생하는 우선 순위는 S 점수가 낮은 N10, C28, C1로 예측됨.

2C9 Ranking	Atom	2C9 Score	Energy	2DSASA	Span2end	COO-Dist	Similarity
1	N.10	52.1	54.1	50.2	0	17	0.7
2	C.28	62.5	40.2	33.3	1	5	0.7
3	C.1	62.8	41.1	49.6	7	10	0.7

④ 결론

- MTX-OH는 매칭 점수가 가장 낮은 C28 부위가 CYP3A4에 의해 우선적으로 대사되는 부위이며 특히 C28부위는 CYP2D6에 의해서도 촉매반응이 발생할 수 있을 것으로 예측됨

3) SOM 예측의 한계

- SOM은 대사의 위치를 cytochrome P450와 매칭하여 대사 부위를 확인하지만 대사체를 확인하는 과정은 아님
- P450은 기질에 **1 산소원자**를 첨가하며 이에 필요한 전자를 NADPH로부터 얻기 때문에 monooxygenase이라고 하며 다양한 기질의 원자에 일산화물이 이루어지며 아래와 같은 cytochrome P450 촉매반응을 기질의 원자별로 구분하여 예측이 어려움.
 - 탄소수산화(C-hydroxylation, carbon hydroxylation)는 P450에 의한 가장 대표적인 촉매반응
 - Heteroatom oxygenation은 헤테로 원자들의 비결합 전자쌍이 P450의 Fe에 전자전달을 통해 일산화물이 이루어짐. P450에 의한 heteroatom release은 2개의 alkyl로 분리되어 이루어진다.
 - P450에 의한 epoxidation은 외인성물질의 독성을 유발하는 중요한 생체전환 기전이다.
 - P450에 의한 group migration은 NIH shift와 유사한 과정으로 이루어지며 그 외 P450에 의한 다양한 촉매반응이 있음

6-2. SOM (Site of metabolism, 대사 부위)-기반 대사체 예측 - Way2Drug

1) RA(Reacting Atom) 예측 프로그램의 개념

- Way2Drug의 반응 원자(eacting Atom) 예측 프로그램은 RA는 반응 원자의 컴퓨터 시뮬레이션 예측을 위한 프로그램.
- 즉, 물질 활성 스펙트럼 예측 기술, 라벨링된 다중 수준 원자 근접성(LMNA, Labelled Multilevel Neighbourhoods of Atoms) 기술자(descriptor) 및 주요 생체변환 반응 유형을 기반으로 생성된 훈련 세트를 활용하여 대사 부위 예측 프로그램
- 약물 유사 화합물의 변환 부위 예측을 위한 9가지 반응 유형: cytochrome P450 등에 의한 Phase I reaction의 지방족 수산화, 방향족 수산화, C-산화, N-산화, S-산화, 그리고 Phase II reaction의 N-글루쿠로니드화, O-글루쿠로니드화, N-탈알킬화, O-탈알킬화 등

2) RA 알고리즘

- 대사 부위(SOM) 예측 하에 신규 화합물에 대해 적절한 LMNA 기술자를 가진 모든 가능한 SoLA(Structure with one labelled atom, 라벨링된 원자 하나를 가진 구조) 집합이 생성(Rudik 등, 2-016)
- 신규 화합물에 대한 SOM 예측 결과는 화합물에 대해 생성된 모든 SoLA의 예측 결과를 IAP(Invariant Accuracy of Prediction, 불변 예측 정확도)로 확인됨.
- 각 SoLA는 하나의 적절한 SOM과 관련되며 모든 SoLA에 대해 다음 값들이 계산됨.
 - Pt(True Probability): SoLA 내 표지된 원자가 해당 효소의 SOM일 확률
 - Pf(False Probability): SoLA 내 표지된 원자가 해당 효소의 SOM이 아닐 확률
- 화합물 내 원자들은 $\Delta P(Pt - Pf)$ 값에 따라 배열됨.
- 생성된 방법의 정확도를 추정하기 위해 AUC(ROC 곡선 아래 면적)와 유사한 불변 예측 정확도(IAP, Invariant Accuracy of Prediction) 기준이 사용됨.
- 수학적으로, IAP 값은 무작위로 선택된 양성 예시(표지된 원자가 SOM인 SoLA, $\Delta P+$)에 대해 ΔP 추정값이 무작위로 선택된 음성 예시(표지된 원자가 SOM이 아닌 SoLA, $\Delta P-$)에 비해 더 높은 값을 가질 확률과 동일함
 - $IAP = \text{확률}\{\Delta P+ > \Delta P-\}$ 즉, $IAP = \Delta P+ > \Delta P-$ 의 확률
- 훈련 절차 동안 각 SoLA는 훈련 세트에서 제외되므로, 1개 제외 교차 검증(LOO CV, leave-one-out cross-validation) 절차가 수행

3) 약물 유사 화합물의 변환 부위 예측을 위한 9가지 반응 유형

- Cytochrome P450 등에 의한 Phase I reaction의 지방족 수산화, 방향족 수산화, C-산화, N-산화, S-산화, 그리고 Phase II reaction의 N-글루쿠로니드화, O-글루쿠로니드화, N-탈알킬화, O-탈알킬화 등

3-1) MTX의 Reacting atom 예측

① MTX(Methotrexate)의 IAP와 반응

- <표-2>은 MTX-OH에 있어서 $P_a > P_i$ 보다 높은 곳이 SOM(site of metabolism)이며 MTX의 N-Oxidation이 발생할 확률이 가장 높음
- <표-1>에서 특이한 점은 $P_a < P_i$ 이지만 glutathione의 결합반응과 epoxidation 반응임. 독성학적인 측면에서 이는 MTX가 비효소적 반응인 가수분해에 의해 친전자성 epoxidation을 형성하여 glutathion 결합에 의해 친수성으로 전환 및 배출된다는 것을 가정할 수 있음

<표-1> MTX(Methotrexate)의 IAP와 반응		
Pa	Pi	Activity
0.338	0.106	N-Oxidation
0.298	0.083	Hydrolysis
0.283	0.082	N-Hydroxylation
0.158	0.075	N-Acetylation
0.185	0.160	N-Glucuronidation
0.051	0.062	O-Phosphorylation
0.165	0.336	Aromatic Hydroxylation
0.023	0.437	N-Dealkylation
0.063	0.529	Hydrogenation
0.063	0.538	Aliphatic Hydroxylation
0.103	0.632	C-Oxidation
0.045	0.605	Glutathionation
0.033	0.606	Epoxidation
0.042	0.620	Methylation
0.019	0.601	O-Glucuronidation
0.032	0.653	O-Dealkylation
0.011	0.692	O-Sulfation
0.014	0.708	Glycination
0.080	0.786	Dehydrogenation

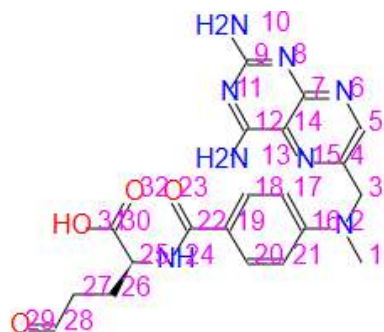
3-2) MTX-OH의 Reacting atom 예측

① MTX(Methotrexate)-OH의 IAP와 반응

- <표-2>는 MTX에 있어서 $P_a > P_i$ 보다 높은 곳이 SOM(site of metabolism)이며 MTX의 N-Oxidation이 발생할 확률이 가장 높음
- <표-2>에서 도 마찬가지로 특이한 점은 세 번째 $P_a > P_i$ 의 반응인 가수분해 반응과 더불어 $P_a < P_i$ 이지만 glutathione의 결합반응과 epoxidation 반응임. 독성학적인 측면에서 이는 MTX가 비효소적 반응인 가수분해에 의해 친전자성 epoxidation을 형성하여 glutathion 결합에 의해 친수성으로 전환 및 배출된다는 것을 가정할 수 있음

<표-2> MTX-OH의 IAP와 반응		
Pa	Pi	Activity
0.299	0.132	N-Oxidation
0.256	0.100	N-Hydroxylation
0.200	0.123	Hydrolysis
0.140	0.085	N-Acetylation
0.049	0.066	O-Phosphorylation
0.170	0.215	Hydrogenation
0.143	0.215	N-Glucuronidation
0.219	0.340	C-Oxidation
0.115	0.407	Aromatic Hydroxylation
0.016	0.516	N-Dealkylation
0.045	0.593	Methylation
0.045	0.603	Glutathionation
0.012	0.645	O-Glucuronidation
0.030	0.712	Aliphatic Hydroxylation
0.016	0.712	Epoxidation
0.022	0.741	O-Dealkylation
0.008	0.750	O-Sulfation
0.041	0.885	Dehydrogenation
0.009	0.892	Glycination

② MTX-OH에서 반응 발생 Atom의 순위



<그림> MTX-OH의 원자 numbering

- N-Oxidation: 1순위로 발생하는 N-oxidation의 MTX-OH에서 10 및 13번 등의 순위

<표> MTX-OH에서 N-Oxidation 발생 순위

Atom	Rank	DeltaP
10	1	0.415
13	2	0.339
2	3	0.201
11	4	0.108
24	5	0.054

- Epoxidation: MTX-OH에서 친전자성대사체인 Epoxidation 발생 순위는 원자 번호 5과 4번임. 친전자성대사체는 4대거대분자와 결합을 통해 독성을 유발함. MTX-OH의 원자번호 5번과 4번은 독성을 줄이기 위한 구조 변화의 위치라고 할 수 있음

<표> MTX-OH에서 Epoxidation 발생 순위

Atom	Rank	DeltaP
5	1	0.154
4	2	0.135
17	3	0.065
21	3	0.065
18	4	0.056
20	4	0.056

4) MTX 및 MTX-OH의 대사 효소 – Cytochrome P450

- 약물의 Biotransformation(생화학적 전환)에 있어서 약물 자체와 대사체를 예측치를 SMP(substrate's and metabolite's specificity) 예측이라고 함. 이 또한 Pa 및 Pi 값을 통해 효소를 예측이 가능함.
- 일반적으로 CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 등의 3개 cytochrome P450 효소군은 아래와 같은 다른 cytochrome P450 효소를 동시에 예측함
 - CYP3A4: also to predict sites of metabolism for CYP1A2, 2A6, 2B6, and 2E1.
 - CYP2C9 : The SMARTCyp score 2C9 score was develop for CYP2C9, but is also used to predict SOMs for 2C8 and 2C19.
 - CYP2D6 : The 2D6 score is used for CYP2D6.

4-1) MTX의 제1상반응 및 제1상반응의 예측 효소

4-1-1) 약물 자체에 대한 예측결과 (Substrate based prediction result)MTX

- MTX 원물질은 <표-1>에서처럼 CYP1A2에 의해 대사 가능성이 가장 높으며 CYP3A4에 의한 대사도 예측됨.

<표-1> MTX: Substrate based prediction result		
Pa	Pi	Enzyme
0.587	0.074	1A2 (CYP3A4)
0.212	0.015	N-Acetyltransferase
0.273	0.219	2C9
0.288	0.276	1A1
0.170	0.349	2C19
0.173	0.383	2B6
0.032	0.293	UGT2B10
0.116	0.415	2D6
0.011	0.341	UGT1A4
0.104	0.441	3A4
0.041	0.388	Sulfotransferase
0.012	0.375	UGT1A6
0.114	0.509	2E1
0.100	0.506	1B1
0.008	0.470	UGT1A9
0.138	0.618	2C8
0.004	0.507	UGT1A1
0.064	0.675	2A6
0.009	0.652	UGT2B4
0.006	0.655	UGT1A7
0.003	0.683	UGT1A10
0.004	0.695	UGT1A3
0.003	0.739	UGT2B7
0.004	0.812	UGT1A8
0.004	0.882	UGT2B17
0.004	0.891	UGT2B15
0.028	0.929	Aldoketoreductase

4-1-2) MTX의 | 대사체에 대한 예측(Metabolite based prediction result)

- MTX의 대사체 역시 <표-2>에서처럼 CYP1A2에 의해 대사 가능성이 가장 높으며 CYP3A4에 의한 대사도 예측됨. 제2상반응으로 N-Acetyltransferase와 UGT1A4에 의해 대사될 가능성이 높을 것으로 예측됨

<표-2> MTX: Metabolite based prediction result

Pa	Pi	Enzyme
0.450	0.169	1A2
0.363	0.277	2C9
0.062	0.015	N-Acetyltransferase
0.277	0.266	UGT1A4
0.148	0.372	2B6
0.128	0.379	2E1
0.198	0.458	UGT2B10
0.132	0.442	UGT1A9
0.131	0.480	UGT2B7
0.129	0.485	2C19
0.111	0.483	UGT1A3
0.101	0.474	UGT1A1
0.092	0.491	1A1
0.135	0.557	UGT2B4
0.096	0.525	UGT1A6
0.094	0.527	3A4
0.003	0.442	Sulfotransferase
0.091	0.549	2D6
0.084	0.584	2C8
0.047	0.551	1B1
0.067	0.627	2A6
0.059	0.634	UGT1A7
0.050	0.632	UGT1A10
0.036	0.777	UGT1A8
0.026	0.855	Aldoketoreductase
0.028	0.879	UGT2B17
0.020	0.906	UGT2B15

4-2) MTX-OH의 제1상반응 및 제1상반응의 예측 효소

4-1-1) 약물 자체에 대한 예측결과 (Substrate based prediction result)MTX

- MTX 원물질은 <표-1>에서처럼 CYP1A2에 의해 대사 가능성이 가장 높으며 CYP3A4에 의한 대사도 예측됨.

<표-1> MTX-OH: Substrate based prediction result		
Pa	Pi	Enzyme
0.731	0.043	1A2
0.379	0.142	2C9
0.375	0.187	1A1
0.163	0.021	N-Acetyltransferase
0.190	0.309	2C19
0.105	0.314	Aldoketoreductase
0.146	0.361	3A4
0.115	0.418	2D6
0.133	0.467	2B6
0.165	0.578	2C8
0.129	0.545	2A6
0.021	0.446	UGT2B10
0.027	0.491	Sulfotransferase
0.096	0.560	2E1
0.009	0.489	UGT1A6
0.076	0.617	1B1
0.008	0.563	UGT1A4
0.006	0.609	UGT1A9
0.003	0.656	UGT1A1
0.005	0.787	UGT1A7
0.003	0.786	UGT1A10
0.006	0.834	UGT2B4
0.003	0.853	UGT1A3
0.003	0.896	UGT2B7
0.003	0.907	UGT1A8
0.003	0.957	UGT2B17
0.003	0.958	UGT2B15

4-2-2) MTX-OH의 | 대사체에 대한 예측(Metabolite based prediction result)

- MTX의 대사체 역시 <표-2>에서처럼 CYP1A2에 의해 대사 가능성이 가장 높으며 CYP3A4에 의한 대사도 예측됨. 제2상반응으로 N-Acetyltransferase와 UGT1A4에 의해 대사될 가능성이 높을 것으로 예측됨.

<표-2> MTX-OH: Metabolite based prediction result		
Pa	Pi	Enzyme
0.355	0.228	1A2
0.046	0.022	N-Acetyltransferase
0.207	0.215	2E1
0.160	0.348	2B6
0.203	0.502	2C9
0.103	0.453	1A1
0.122	0.485	2A6
0.137	0.516	UGT1A4
0.095	0.577	2C19
0.076	0.606	2C8
0.073	0.611	UGT1A9
0.003	0.550	Sulfotransferase
0.067	0.624	2D6
0.055	0.615	3A4
0.050	0.655	UGT1A1
0.039	0.661	1B1
0.042	0.678	Aldoketoreductase
0.079	0.727	UGT2B10
0.043	0.704	UGT1A3
0.063	0.737	UGT2B7
0.052	0.732	UGT1A6
0.069	0.792	UGT2B4
0.031	0.785	UGT1A10
0.038	0.800	UGT1A7
0.018	0.896	UGT1A8
0.015	0.963	UGT2B17
0.012	0.970	UGT2B15

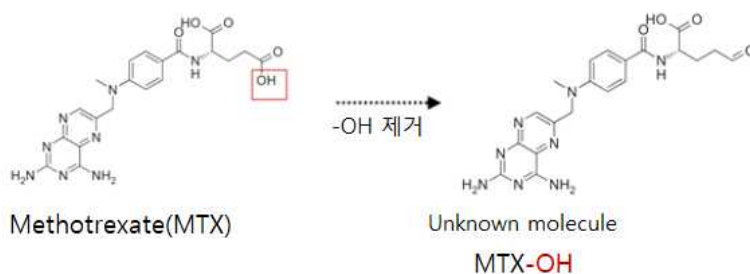
7. MTX의 MTX-OH로 전환을 통한 약물 Optimization 적격성

7-1) MTX 처방의 문제점

- Methotrexate(MTX)는 다양한 암종, 공격적 섬유 증증(Aggressive fibromatosis), 건선(Severe psoriasis), 아토피 등을 적응증으로 하는 치료제
- 처방의 제한점: 경구 생체이용률이 낮아 피하주사를 통한 투약(It can be given orally or subcutaneously (SC). SC MTX offers higher bioavailability and more predictable exposure, Alhamwi 등, 2025)
- 치료 용량의 생체이용률을 위해 높은 용량으로 처방하면 전신독성이 증가됨(Doses are usually taken weekly, not daily, to limit toxicity(The American Society of Health System Pharmacists, 2016)

7-2) 해결책

- 아래의 <그림>과 같이 Methotrexate(MTX)에서 -OH(hydroxyl group)을 제거하여 Methotrexate(MTX)-OH로 경구 흡수율 증가를 유도. 여기서 MTX-OH는 합성되지 않은 unknown molecule임



7-3) 대사체 분석

- 항암제의 항암기전은 biotransformation 및 자연분해를 통해 친전자성으로 전환되어 비가역적 공유결합을 통해 효소의 불활성 및 DNA의 돌연변이 유발을 통한 항암기전. 또한 방추사와 같은 세포주기와 관련된 필라멘트의 합성 저해를 통해 항암기전
- SOM (Site of metabolism, 대사 부위)-기반 대사체 예측 프로그램인 SMARTCyp 3.0 및 Way2Drug 등을 이용하여 확인 및 validation을 통해 methotrexate(MTX)와 hydroxyl group을 제거한 Methotrexate(MTX)-OH의 대사 및 친전자성대사체 형성은 유사한 것으로 추정되었음.

7-4) Toxic endpoint의 비교

- 동물 독성시험을 통한 Methotrexate의 LD₅₀은 43mg/kg이었지만 AI-based 독성 예측 프로그램을 통해 hydroxyl group을 제거한 Methotrexate(MTX)-OH의 LD₅₀은 평균 2.363mg/kg이었음. 이는 MTX-OH가 MTX보다 18.2배 독성이 강한 것으로 예측되었음

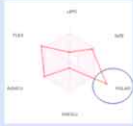
<표-1> Acute Oral Test (LD50)prediction을 위해 이용된 Software	
• Pro-Tox 3.0 prediction: 3mg/kg	
• AI Drug Lab: 1.45 mg/kg	
• Vega-GUI-1.2.4: Prediction is N/A	
• ADMETlab: 2.762 mg/kg	
• ADMET-AI: 2.24mg/kg	

- 기타 반복투여에 의한 경구 LOAEL(lowest observed adverse effect level, 최소독성용량)은 1.8358mg/kg/day, 그리고 NOAEL(No observed adverse effect level, 최대무독성용량): 0.3633mg/kg/day로 추정되었음

7-5) MTX-OH의 생체이용률의 높아진 원인

- <표>는 MTX 및 MTX-OH의 친지질성과 생체이용률의 비교에서 MTX-OH에서 모두 높을 것을 확인할 수 있음. 이는 극성을 띠는 -OH(수산기)를 제거함으로 MTX-OH의 경구를 통한 생체이용률이 급격하게 증가된 원인임.

<표> MTX 및 MTX-OH의 친지질성과 생체이용률의 비교

	Methotrexate	Methotrexate-OH	비고
Partition coefficient <Log P = Log (Kow)>	- 1.85	- 0.25	Log (Kow) < 1 → 친수성 물질 (물에 잘 용해됨) Log (Kow) 1 ~ 3 → 중간 성질 (중간 수준의 흡수) Log (Kow) > 3 → 소수성 물질 (높은 지용성) Admesar 3.0
Polarity			Swiss adme
Bioavailability	F20% F30% F50%	F20% F30% F50% +	Admetlab 3.0

7-6) 결론

- MTX(Methotrexate)의 경구투여에 의한 생체이용률이 저조, 이를 극복하기 위해 극성기인 -OH(수산기)를 MTX에서 제거하여 신물질 MTX-OH(Methotrexate-OH)를 확보
- MTX 및 구조 변경 약물인 MTX-OH의 AI-기반 대사체 분석을 통해 두 물질의 약리기전이 친전자성이라는 것은 확인하였음.
- MTX 및 MTX-OH의 toxic endpoint를 AI-based 독성 예측 프로그램을 통해 MTX-OH가 MTX보다 18.2배 독성이 강하며 이는 항암제 약리기전이 18.2배 높다는 것을 의미함.
- MTX 및 MTX-OH의 친지질성과 생체이용률의 비교에서 MTX-OH에서 모두 높을 것을 확인할 수 있음. 이는 극성을 띠는 -OH(수산기)를 제거함으로 MTX-OH의 경구를 통한 생체이용률이 급격하게 증가된 것이 원인으로 추정됨.
- 결과적으로 MTX-OH의 AI-기반 대사체 예측 프로그램 및 AI-based 독성 예측 프로그램을 통해 약물의 Optimization이 가능함을 확인할 수 있음.

<참고문헌>

Zhai J, Man VH, Ji B, Cai L, Wang J. Comparison and summary of in silico prediction tools for CYP450-mediated drug metabolism. Drug Discov Today. 2023 Oct;28(10):103728.

Manzhan Zhang, Yuxin Wan, Jing Wang, Shiliang Li, Honglin Li, Artificial intelligence and computational methods in human metabolism research: A comprehensive survey, Journal of Pharmaceutical Analysis, Volume 15, Issue 8, 2025, 101437, ISSN 2095-1779,

Keyun Zhu, Mengting Huang, Yimeng Wang, Yaxin Gu, Weihua Li, Guixia Liu, Yun Tang, MetaPredictor:in silicoprediction of drug metabolites based on deep language models with prompt engineering,Briefings in Bioinformatics, Volume 25, Issue 5, September 2024, bbae374,

R. Satheeskumar, Enhancing drug discovery with AI: Predictive modeling of pharmacokinetics using Graph Neural Networks and ensemble learning, Intelligent Pharmacy, Volume 3, Issue 2, 2025, Pages 127-140, ISSN 2949-866X,

Nicolai Ree, Jan M. Wollschläger, Andreas H. Göller, Jan H. Jensen, Atom-based machine learning for estimating nucleophilicity and electrophilicity with applications to retrosynthesis and chemical stability††Electronic supplementary information (ESI) available. Chemical Science,Volume 16, Issue 13, 2025, Pages 5676-5687, ISSN 2041-6520,

박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

Rudik AV, Dmitriev AV, Lagunin AA, Filimonov DA, Poroikov VV. Prediction of reacting atoms for the major biotransformation reactions of organic xenobiotics. J Cheminform. 2016 Nov 28;8:68.

Alhamwi, N., Saleh, A.O., Hammadeh, B.M. et al. Comparative efficacy and safety of oral versus subcutaneous methotrexate in the treatment of psoriasis: a systematic review, pairwise and network meta-analysis with CINeMA and GRADE assessment. Inflammopharmacol (2025). <https://doi.org/10.1007/s10787-0>

81. FDA 2020-2024년 승인된 합성신약의 대사체-90% 예측 AI-프로그램

1. 현재 약물대사 예측 알고리즘을 위한 2 가지 계산적 접근법

① NLP 모델에 기반한 데이터 주도적 방법(data-driven method based on NLP model)

- 자연어 처리(NLP, natural language processing) 모델에 기반한 데이터 주도적 방법으로 약물 대사 관련 텍스트(논문, 임상 데이터 등)에서 대사체 정보를 추출하거나, 관련 키워드를 식별하는 방식.
- 그러나 약물 대사체 확인의 가장 중요한 목적인 독성을 유발하는 활성중간대사체(Reactive intermediates 또는 reactive metabolite)를 간과하는 문제점
- 프로그램 예시: Metapredictor

② 기전 기반 방식(mechanism-based approach)

- 대사 효소의 체계적 예측, **대사 부위(SOM, sites of metabolism)** 식별, 관련 대사 변환 규칙(relevant metabolic transformation rules) 적용을 통해 대사산물을 생성하는 방법 등이 적용됨. 특히 대사 부위(SOM, sites of metabolism) 식별로 다수 예측 프로그램이 이루어지고 있음
- 그러나 SOM 예측에만 특화되어 약물의 대사경로를 완전하게 제공하지 못하며 독성대사체 특징(toxic metabolic characterization)에도 제한점
- 또한 다양한 cytochrome P450 isozyme이 존재하지만 3가지에 제한되거나 cytochrome P450 정보를 제공하지 못하는 경우도 있음.
- 프로그램 예시: GLORYx, BioTransformer3.0, SMARTCyp3.0, FAME3, CyProduct

2. 최근의 추가적인 mechanism-based approach를 통한 대사 예측

① 양자화학 접근법(Quantum chemistry approaches)

- 제한된 데이터 set와 단순한 알고리즘에도 불구하고 계산화학과 ML(machine learning)이 결합하여 대사 예측을 위한 일반화가 가능한 모델 생성의 잠재성(Singh, 2024)

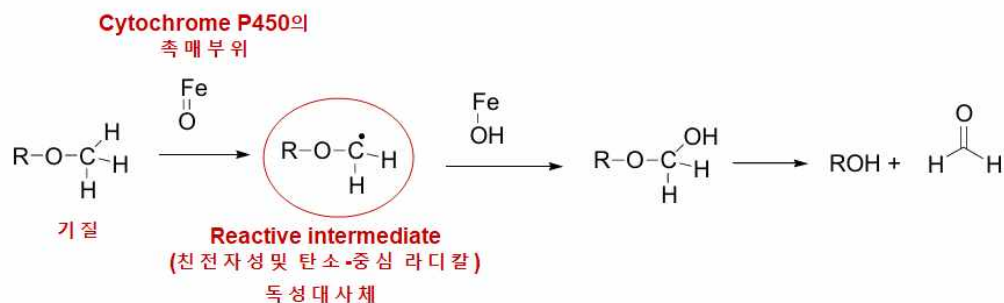
② Graph Convolutional Networks(GCNs)-기반 Deep learning 기법

- 분자 topology 그래프에서 직접 특징을 추출하는 GCN을 기반으로 효소 SOM 예측을 훨씬 더 정교함을 보여줌. 기본적인 화학적 특징에 의존하여 중요한 반응성 및 물리화학적 세부 사항의 부족으로 서로 다른 cytochrome P450의 대사를 효과적으로 구분에 어려움이 있음(Porokhin 등, 2023)

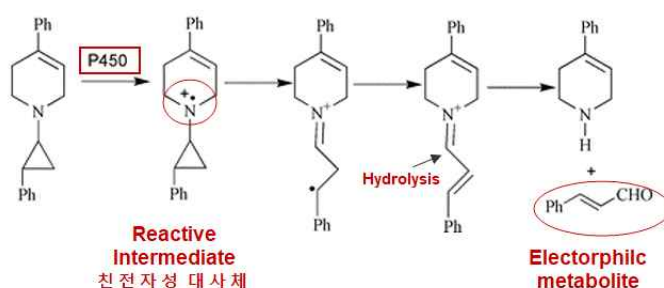
3. AOM과 BOM의 결합한 SOM 라벨링 접근법

- 지금까지의 대사 예측 알고리즘은 **대사 원자(AOM, Atom of metabolism)**에만 의존하여 대사 부위(SOM, sites of metabolism)를 예측.
- 그러나 원자와 Cytochrome P450의 모호한 매칭의 극복하고 다양한 촉매반응의 오분류를 줄이기 위해 **AOM과 BOM(bond of metabolism)의 결합을 통한 SOM labelling의 필요성**
- 즉, hydroxylation 및 heteroatom oxidation과 같은 **단일 원자** 위치에서 발생하는 반응은 AOM으로 labelling하고 화학결합이 이루어지는 원자쌍이 관여하는 반응인 dealkylation, hydrolysis, 그리고 epoxidation은 BOM으로 labelling. **특히 cytochrome P450에 의한 이들 반응(dealkylation, hydrolysis, 그리고 epoxidation)은 친전자성 대사체의 Reactive intermediate을 생성에 있어 핵심적인 역할을 함.**
- <예시-1>에서 <예시-3>은 cytochrome P450에 의해 발생하는 반응에 의하여 독성대사체인 reactive intermediate의 생성되는 예시들임

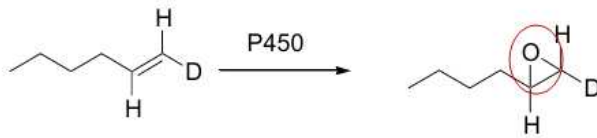
<예시-1> Cytochrome P450에 의한 O-dealkylation(산소 원자와의 결합 부위에서 탈알킬화)



<예시-2> Cytochrome P450에 의한 N-dealkylation & hydrolysis



<예시-3> Cytochrome P450에 의한 Epoxidation (arene oxides, oxeranes)



(Source: UW Courses Web Server courses.washington.edu. medch527)

- 결론적으로 AOM-기반 SOM을 통한 불완전한 대사 규칙을 AOM과 더불어 기질 내 서로 다른 원자쌍이 관여하는 반응의 대사결합(BOM, Bond of metabolism)과 통합함으로써 보다 더 **완전한 대사반응 규칙**에 의한 대사체 예측이 가능함. 이와 같은 통합 기전 배경으로 이루어진 접근법을 **AOM과 BOM-기반 SOM labelling**이라고 함

4. Deep learning에 사용된 Graph Neural Network (GNN) 알고리즘

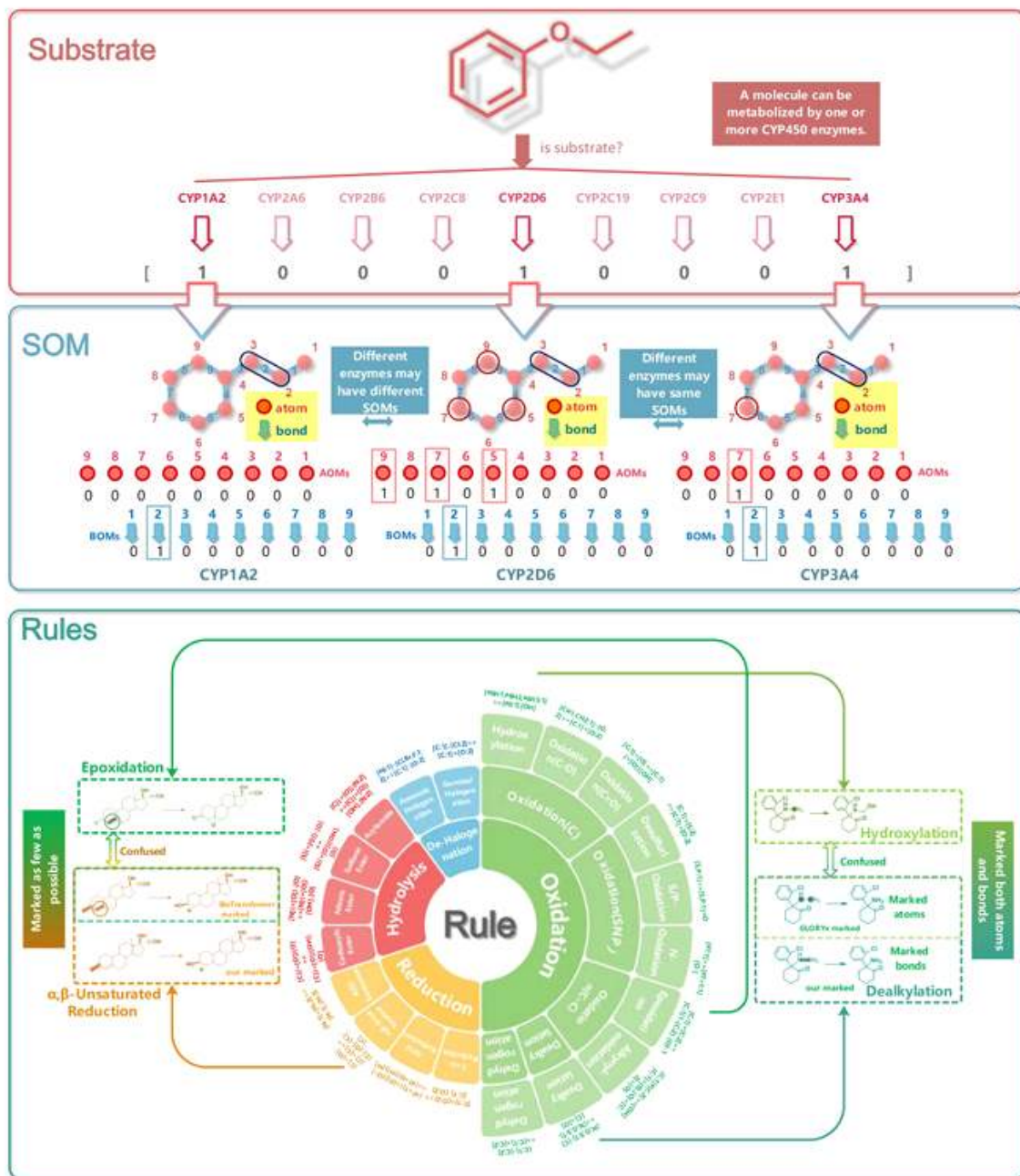
- AOM과 BOM 기반 대사 예측은 주어진 분자가 기질로 작용할 수 있는 cytochrome P450 예측 모듈과 해당하는 효소들에 대한 분자의 대사 부위를 예측하는 SOM 예측 모듈 등의 2 모듈로 구성됨.
- 두 모듈 모두 그래프 신경망인 GNN 기반으로 함. GNN은 화학구조 데이터로부터 표현을 학습하도록 맞춤화되어 분자 구조와 관계를 포착할 수 있는 능력이 있어 화학정보 작업에 최적화된 알고리즘.
- 특히 SOM 확인 알고리즘 $S = E - 8 \cdot A - 0.04 \cdot SASA$ 에서 E(에너지) 특징이 결합 유형과 연결된 원자 유형과 같은 node 특징으로부터 도출되어 그래프의 방향성이 결정되기에 GNN architecture는 중요함.

5. 양자 역학적 특성을 GNN으로 확장

- 계산화학 기법의 양자화학 접근법은 분자 상호작용 및 메커니즘에 관해 보다 포괄적이고 상세한 정보를 제공
- GNN은 화학구조 데이터로부터 표현을 학습하도록 맞춤화되어 분자 구조와 관계를 포착할 수 있는 능력
- 현대의 대사 예측 프로그램에 있어 알고리즘과 표현 방식의 본질적 한계에 의한 대사 예측에 restriction, 그리고 이러한 restriction은 약물 유사 분자의 광범위한 화학적 및 구조적 전반에 걸쳐 정확성 및 응용성을 크게 저해를 유도함. 또한 **체계적이며 계층적으로 구조화된 대사 규칙(rules)의 공식화 부재**에 따른 대사 산물 생성의 견고성, 재현성, 및 정밀도가 훼손됨
- 이와 같은 표현 방식의 본질적 한계를 극복하고 약물 유사 분자의 이용을 통한 대사 규칙 부재는 양자 역학적 특성을 DL의 GNN으로의 확장으로 극복이 가능함.

6. DeepMetab의 알고리즘

- <그림-1>에서처럼 기질 프로파일링, 대사 부위(SOM) 국소화, 대사산물 생성이라는 세 가지 핵심 예측 작업을 통합된 다중 작업 아키텍처 내에서 독보적으로 통합한 예측 프로그램으로 다음과 전략을 기반으로 개발된 Mechanism-based approach (Zhou 등, 2025)
 - ① 원자의 대사위치(AOM) 및 원자쌍의 대사 결합(BOM) 수준 반응성을 동시에 포착하는 이중 라벨링 전략을 채택하여 대사 부위(SOM) 예측
 - ② CYP450 매개 약물 대사의 종단간 예측을 위한 최초의 포괄적이고 기전적 정보를 반영한 DL GNN-기반 학습 프레임워크
 - ③ 결론적으로 원자 및 결합 수준 반응성을 동시에 포착하는 이중 라벨링 전략을 채택하며, 양자 기반 및 토폴로지적 설명자를 포함한 다중 스케일 특징을 그래프 신경망(GNN) 백본에 융합
 - ④ 전문가들이 도출한 **반응 규칙**으로 구성된 선별된 지식 기반은 대사체 합성 과정에서의 기전적 일관성을 추가로 보장하는 전략 - **즉, 산화, 환원, 가수분해, 탈할로겐화 등 주요 범주를 포함한 대사 반응 규칙의 계층적 분류를 제시**



<그림-1> 기질 및 SOM 데이터셋의 큐레이션과 대사 반응 규칙 편찬의 작업 흐름. 이 도표는 다양한 기질이 서로 다른 CYP450 효소에 의해 처리되어 서로 다른 SOM으로 전환되는 과정을 보여줌. 또한 중앙의 파이 차트에 표시된 산화, 환원, 가수분해, 탈할로겐화 등 주요 범주를 포함한 대사 반응 규칙의 계층적 분류를 제시

7. DeepMetab의 기질 분포 및 SOM 데이터셋 특성(Zhou 등, 2025)

7-1) 9 종 cytochrome P450의 dataset

- Table 1과 같이 일단 DeepMetab에서 예측된 cytochrome P450 이소형은 9종으로 지금까지 대사 예측 프로그램 중에서 가장 많은 효소에 대한 예측으로 판단됨. 이들 효소는 CYP1A2 CYP2A6 CYP2B6 CYP2C8 CYP2C9 CYP2C19 CYP2D6 CYP2E1 CYP3A4 등으로 Figure 2 및 4에서처럼 인체 약물의 대부분을 대사시키는 효소임(Zhao 등, 2021).

Figure 2. Contribution of different enzymes to drug metabolism. UGT, UDP glucuronosyl transferase; FMO, flavin-containing monooxygenase; NAT, N-acetyltransferase; MAO, monoamine oxidase.

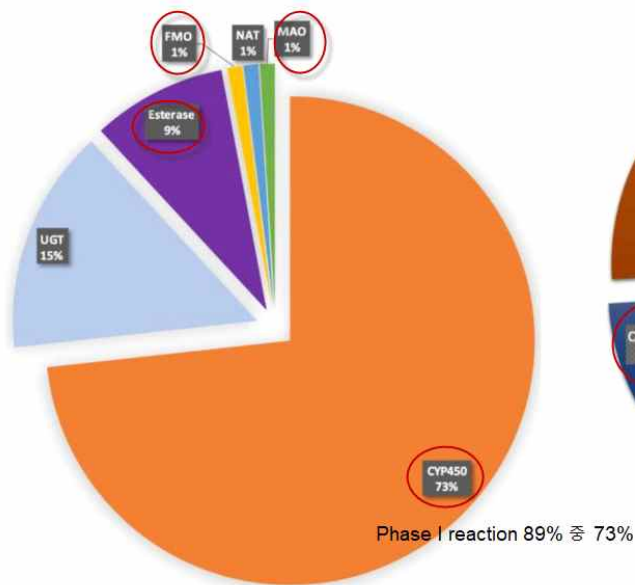
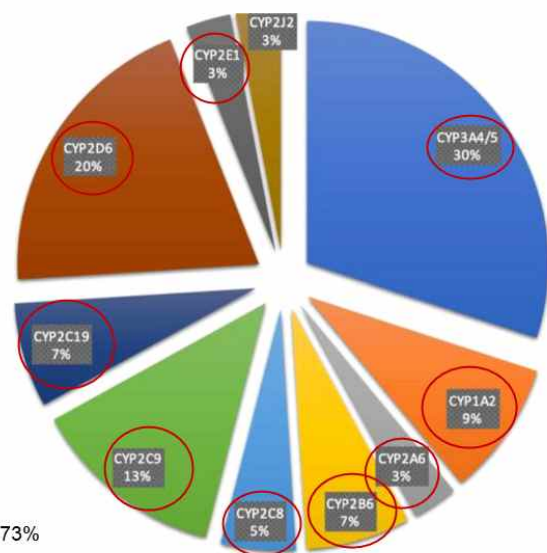


Figure 4. Fraction of specific CYP isoforms contribution to 248 drug metabolisms.



(Zhao et al., 2021)

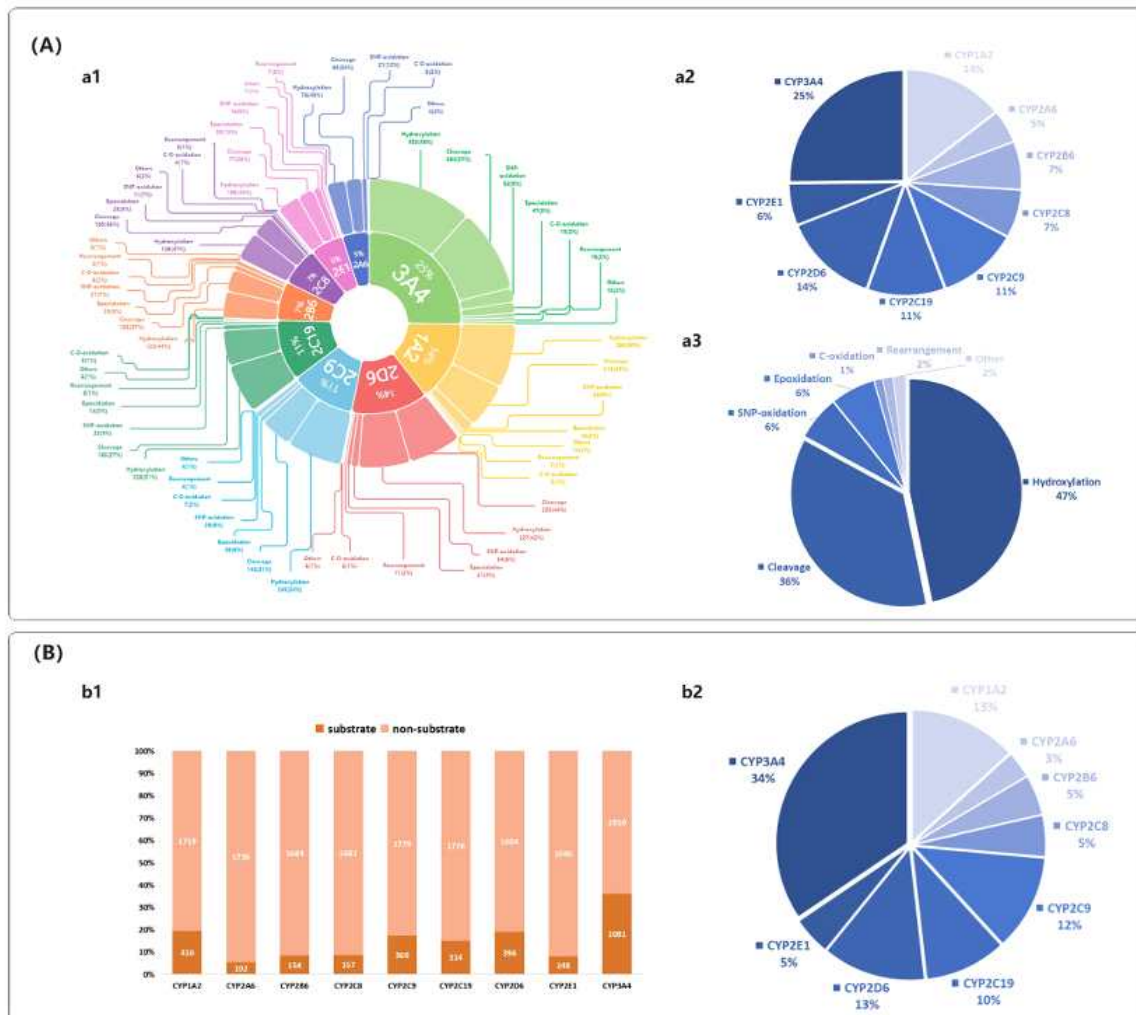
- Table 1은 cytochrome P450 9종의 효소 기질 모듈을 위한 선별된 훈련 및 테스트 데이터셋을 나타낸 것이다. 기질 훈련 데이터셋은 3500개 이상의 분자로 구성되었으며 약 1500개 분자가 하나 이상의 cytochrome P450 효소에 의해 대사가 이루어짐.

Table 1 Curated training and test datasets for the substrate module of nine cytochrome P450 enzymes

	Enzyme	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
Training	Substrate	416	102	154	157	369	314	396	148	1081
	Non-substrate	1719	1736	1684	1681	1779	1776	1694	1690	1910
Test	Substrate	40	14	12	12	33	29	27	8	63
	Non-substrate	115	120	123	120	114	120	117	122	113

7-2) 기질 분포 및 SOM 데이터셋 특성에 대한 종합적인 분석

- <Fig. 2>는 (A) SOM 훈련 데이터셋 분석과 (B) 기질 훈련 데이터셋 분석을 각각 나타낸 것임
- <Fig. 2B>는 9종 CYP 이소형 각각에 대한 기질 및 비기질 분자수를 비교하여 상당한 클래스의 불균형을 보여줌. 이러한 불균형은 특히 CYP2A6 및 CYP2E1과 같은 '틈새' 이소형에서 두드러지며, 여기서 양성 대 음성 사례의 비율은 1:10 미만임.
- 반면, 더 많은 이소형들은 상대적으로 더 나은 균형을 보이고 있음. 예를 들어, CYP3A4의 양성 대 음성 비율은 약 1:2. 이 비율은 해당 효소의 대사 활성뿐만 아니라, 더 널리 분포된 효소에 대한 데이터의 가용성이 더 높다는 점도 반영함.



<Fig. 2> 기질 분포 및 SOM 데이터셋 특성에 대한 종합 분석: (A) SOM 훈련 데이터셋 분석: (a1) 반응 유형의 전체 구성은 CYP 450 효소에 의해 매개되는 대사 반응의 비율을 나타냄. (a2) 대사 과정에 대한 CYP450 이소형의 차등적 비율, 그리고 비율에 따라 상대적 중요성을 보여줌. (a3) 반응 유형의 상세 분류 및 전체 대사에 대한 비례적 비율. (B) 기질 훈련 데이터셋 분석: (b1) 기질 데이터셋 분석은 CYP450 이소형별 기질 및 비기질의 클래스 분포를 제시함. (b2) 특정 CYP450 이소형별로 분류된 기질 화합물의 분포

7-3) Cytochrome P450 9종 효소에 대한 SOM 모듈용 선별된 훈련 및 테스트 데이터셋

- Table 2에서 SOM 훈련 데이터셋에는 874개의 기질 분자에서 유래한 약 1500개의 반응이 포함되어 있음. CYP 효소 9종에 대한 포괄적인 통계 분석이 수행되었고, AOM 및 non-AOM으로 분류된 기질의 수와 BOM 및 non-BOM에 중점을 두었음.
- 결과에 따르면 가장 많은 수의 기질이 CYP3A4, CYP1A2 및 CYP2D6에 의해 대사되며, CYP3A4가 전체의 절반 이상을 차지함. 이는 SOM 훈련 데이터셋에서 420개의 AOM과 361개의 BOM과의 연관성을 반영하는 것임.
- CYP1A2는 276개의 AOM과 214개의 BOM으로 뒤를 이었으며, CYP2D6는 724개의 AOM과 90개의 BOM이 확인됨. 이는 해당 효소들이 대사에 있어서 중요성 부각을 유도하여 이를 기반으로 모델 개발 촉진 및 더 효과적인 응용 달성이 가능하게 함.

Table 2. Cytochrome P450 9종 효소에 대한 SOM 모듈용 선별된 훈련 및 테스트 데이터셋

	Enzyme	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
Training	Substrates	313	104	152	150	251	238	297	129	550
	AOM	276	80	125	115	224	210	209	98	420
	Non-AOM	2515	718	1135	1374	2502	2201	2694	724	6105
	BOM	214	72	108	105	152	142	217	90	361
	Non-BOM	3272	890	1609	1850	2371	2441	3854	923	7561
Test	Substrates	17	9	13	14	17	16	27	10	40
	AOM	293	86	123	112	220	197	213	107	390
	Non-AOM	2649	793	1136	1310	2532	2145	2671	798	5713
	BOM	230	83	113	108	157	153	225	115	348
	Non-BOM	3438	1083	1657	1884	2627	2578	3949	1169	7182

8. DeepMetab의 대사 예측의 규칙 설정

- DeepMetab에서는 원자 및 결합 수준 반응성을 동시에 포착하는 이중 표지 전략을 채택하며, 양자 기반 및 위상학적 설명자를 포함한 다중 스케일 특징을 그래프 신경망(GNN) 백본에 통합하여 대사 예측이 이루어짐.
- 방법론적으로 이중 표지 전략, 다중 스케일 특징 그리고 이들의 그래프 신경망(GNN) 백본에 통합됨.
- 이들의 궁극적 최종 목표는 포괄적이고 체계적이며 계층적으로 구조화된 대사 규칙의 공식화임. 또한 이의 공식화는 전문가들의 도출한 반응 규칙과 기전적 일관성을 가져야 함. 즉, 기전적 정확성, 전체적 통합성 및 화학적 해석 가능성을 가져야 함. Table 3에서는 cytochrome P450 효소에 의한 촉매반응의 대사 규칙 설정에 대한 체계적 정리를 나타낸 것임
- Table 3은 CYP450 효소에 의해 매개되는 대사 반응의 주요 범주와 예시이며 반응 규칙과 다양한 대사 과정에 따라 적용된 SOM 주석 기법(SOM annotation method)임. 데이터셋은 총 6개의 AOM과 14개의 BOM을 예시로 포함하였고 관련 특정 효소 활성을 반영하는 라벨링 유형에 따라 세분화하여 분류됨.
- 또한 반응 유형(reaction type) 분류는 명확성과 포괄성을 위해 간소화된 접근법으로 이루어졌음. 예를 들어 Table 3의 12번처럼 탈알킬화(dealkylation) 반응 범주 내에서 N-탈알킬화, O-탈알킬화, S-탈알킬화를 효과적으로 통합하여 X-탈알킬화라는 단일 범주로 분류됨. 이 범주는 광범위한 개념인 헤테로원자 탈알킬화를 포괄하여 근본적 메커니즘에 대한 이해를 용이하게 함.
- 반대로 Table 3의 13번과 14번처럼 에스터 가수분해 반응(ester hydrolysis reaction)을 검토할 때는 thioester 및 nitrate esters와 같은 다양한 그룹을 일반 탄소 에스터(general carbon ester)와 구분하여 생화학적 차이를 반영함.
- 이와 같은 구분은 대사 경로 연구에서 정확한 표기법의 필요성이 요구됨. 또한 이러한 분류를 잘 예시하기 위해 "SOM 주석 방법(SOM annotation method)" 열은 특정 반응 유형의 대표적 사례를 제공하여 관련된 신호 전달 경로를 밝히는데 기여함. 특히, 빨간색 표시는 분자 구조상 표기된 부위를 나타내며, 대사 변환 과정에서 영향을 받는 핵심 기능 그룹에 주목을 유도.

Table 3 A systematic compilation of metabolic reaction rules governing cytochrome P450 enzymes

No.	Type	Reaction type	SOM annotation method	No.	Type	Reaction type	SOM annotation method
1	AOM	NO ₂ -reduction		11	BOM	α,β-Unsaturated carbonyl reduction	
2	AOM	N-Oxidation		12	BOM	X-Dealkylation	
3	AOM	Hydroxylation (N)		13	BOM	Hydrolysis 1	
4	AOM	S/P-Oxidation		14	BOM	Hydrolysis 2	
5	AOM	C=O oxidation		15	BOM	Azo-reduction	
6	AOM	Hydroxylation		16	BOM	Desulfurization	
7	BOM	Rearrangement		17	BOM	Geminal halide oxidation	
8	BOM	Epoxidation		18	BOM	Dehalogenation	
9	BOM	C-O oxidation		19	BOM	Dehydrogenation	
10	BOM	C=O reduction		20	BOM	Alkynyl-oxidation	

9. DeepMetab의 대사 예측의 규칙 설정과 예시

- 전자적, 입체적, 입체전자적 특성에 의해 결정되는 화학적 환경은 대사 부위 예측에 매우 중요함.
- 그래프 기반 메시지 전달 신경망은 정확한 예측을 위해 이러한 특징을 효과적으로 학습함.
- Fig. 6은 DeepMetab의 학습 과정을 추가 분석하고 대사 부위의 패턴을 규명하기 위해, SOM 모듈의 숨겨진 표현을 시각화.
- Fig 6A는 SOM 훈련 세트에서 무작위로 선택한 300개 이상의 분자에서 다양한 대사 부위 환경에 속한 원자들의 숨겨진 계층 표현에 대한 t-SNE 클러스터링 결과임. t-SNE는 t-분산 확률적 이웃 임베딩(t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding)의 약자로 고차원 데이터를 저차원으로 효과적으로 시각화하는 알고리즘.
- 색상 체계는 특정 환경 내 원자와 실제 대사 원자 간의 코사인 유사도(similarity)를 나타내며, 진한 파란색일수록 대사 원자일 가능성이 높음을 의미
- **시각화 분석을 통해 몇 가지 중요한 패턴을 확인:**
 - 방향족 탄소 원자, 특히 오르토(ortho) 및 파라(para) 위치에 있는 원자들은 주로 파란색을 띠며, 이는 페놀성 수산화 반응에 관한 경험적 지식 및 전문가의 규칙과 일치
 - a-탄소 위치는 독특한 바이모달 분포(bimodal distribution)를 보이며, <Fig 6C>에서처럼 상세한 사례 분석을 통해 $-SO_2-$ 그룹에 인접한 적색 영역은 높은 극성으로 인해 대사적으로 억제될 수 있음을 알 수 있음(Case 1 & Case 2)
 - 황 및 인 원자(Sulfur and phosphorus atoms)는 **대사적 경향과 비대사적 경향 사이에 거의 동일한 분포를 보이며**, Case 5와 Case 6은 적색을 띠는 인 위치가 일반적으로 최고 산화 상태의 원자를 나타내어 추가적인 대사 반응이 열역학적으로 불리함을 나타냄
 - 또한, quaternary nitrogen(4차 질소)인 T3N 사이트의 넓은 영역이 붉은 색을 띠고 있는데, 이는 수소 원자가 없는 4차 질소 원자(quaternary nitrogen atom)가 일반적으로 산화에 덜 취약하다는 점과 일치함.
- Fig. 6B는 동일한 방법론을 적용하여 다양한 환경적 맥락에서 화학적 결합을 시각화 분석한 결과를 제시함
 - 분석 결과 C-N 결합과 방향족 결합이 주로 청색을 띠며, 이는 예측된 반응성이 높음을 나타내는 것임
 - 마찬가지로 특정 C-O, C-X 및 방향족 결합 역시 반응성 잠재력이 증가된 것으로 나타났다
 - Fig 6D에 제시된 구체적 사례들은 이러한 패턴에 대한 심층적 통찰을 제공한다고 할 수 있음. 예를 들어, **Case-2는 특정 C-O 결합의 적색 표시는 탄소 중심에 이용 가능한 수소 원자가 부재하기 때문임. 이는 해당 부위에서 일반적으로 흔한 탈알킬화 반응을 차단하는 것임**
 - Case 1, 3, 4는 Figure에서 강조된 다른 사례들은 경험적으로 높은 대사 반응성이 기록된 부위들을 나타냄.
 - **Case 5와 Case 6은 similarity 점수가 높은 방향족 탄소-탄소 결합의 예시임. 경험적 지식에 따르면, 에폭시화(epoxidation) 반응은 일반적으로 이 부위에서 발생함**

10. 미국 FDA에 승인된 약물 18종에 대한 독성 유무에 대한 Case 연구

10-1) 특별 약물의 3 case에 대한 예측

- DeepMetab의 실용적 유용성을 입증하기 위해 여러 임상 관련 시나리오에서의 적용을 조사하여 이루어졌음. 기능적 약물 대사산물 예측의 중요성을 더욱 부각시키기 위해 대사 독성, 대사 비활성화, 대사 활성화 등 핵심 시나리오를 포괄하는 다양한 사례를 선정하여 입증됨
- 검증을 위한 화합물들은 훈련 데이터셋에 포함되지 않은 새로운 구조를 지니고 있어 모델의 강력한 일반화 능력과 약물 대사 예측의 핵심 과제 해결 능력을 입증.
- Case 1: 간독성 위험 가능성이 알려진 FDA 승인 항부정맥제(1985년)인 amiodarone(AMD)에 대한 예측(Fig. 7A)
 - Amiodarone의 CYP450-매개 대사산물이 간 손상의 주요 원인으로 의심됨. DeepMetab은 CYP2C8과 CYP3A4를 책임 효소로 하여 각각 점수 0.86 및 0.93로 식별하였음
 - 대사 부위를 0.98의 확률로 예측했고, 해당 N-탈알킬화 biotransformation(생체변환) 규칙을 적용하여 desethylamiodarone(DEA) 형성을 정확히 예측하였음
 - DEA 대사산물은 Shohei 등(2016) 등의 실험을 통해 산화 스트레스 기전을 통해 간독성을 유발하는 것으로 검증되었음.
- Case 2: 기능적으로 중요한 대사산물 예측 능력을 추가 평가하기 위해 codein 대사를 분석(Fig. 7B)
 - 초기 opioid 약물 중 하나인 Codeine코데인은 치료 효과에 결정적인 대사 변형이 이루어짐
 - 특히 DeepMetab은 훈련 데이터셋에 포함된 CYP2D6 매개 활성화 대사산물인 morphine의 생성을 정확히 예측하였음.
 - 또한 훈련 데이터에 존재하지 않았음에도 불구하고, 해당 탈알킬화 생체변환(dealkylation biotransformation) 규칙을 적용하여 CYP3A4를 통해 주로 생성되는 비활성 대사산물 Norcodeine을 효소 및 대사 부위 예측 점수 모두 0.99를 기록하며 예측
- Case 3: 유럽에서 1982년 최초로 출시된 나트륨 채널 차단제인 flecainide에 대한 예측(Fig. 7C)
 - Flecainide 대사는 CYP450 매개 경로를 포함하며, CYP3A4가 Hydroxy-flecainide 생성에 주요 효소로 작용하는 것으로 알려졌다.
 - DeepMetab은 CYP3A4에 의한 탈알킬화에 의한 Hydroxy-flecainide 생성 점수 0.77 그리고 대사 부위 예측 점수 0.98로 확인됨

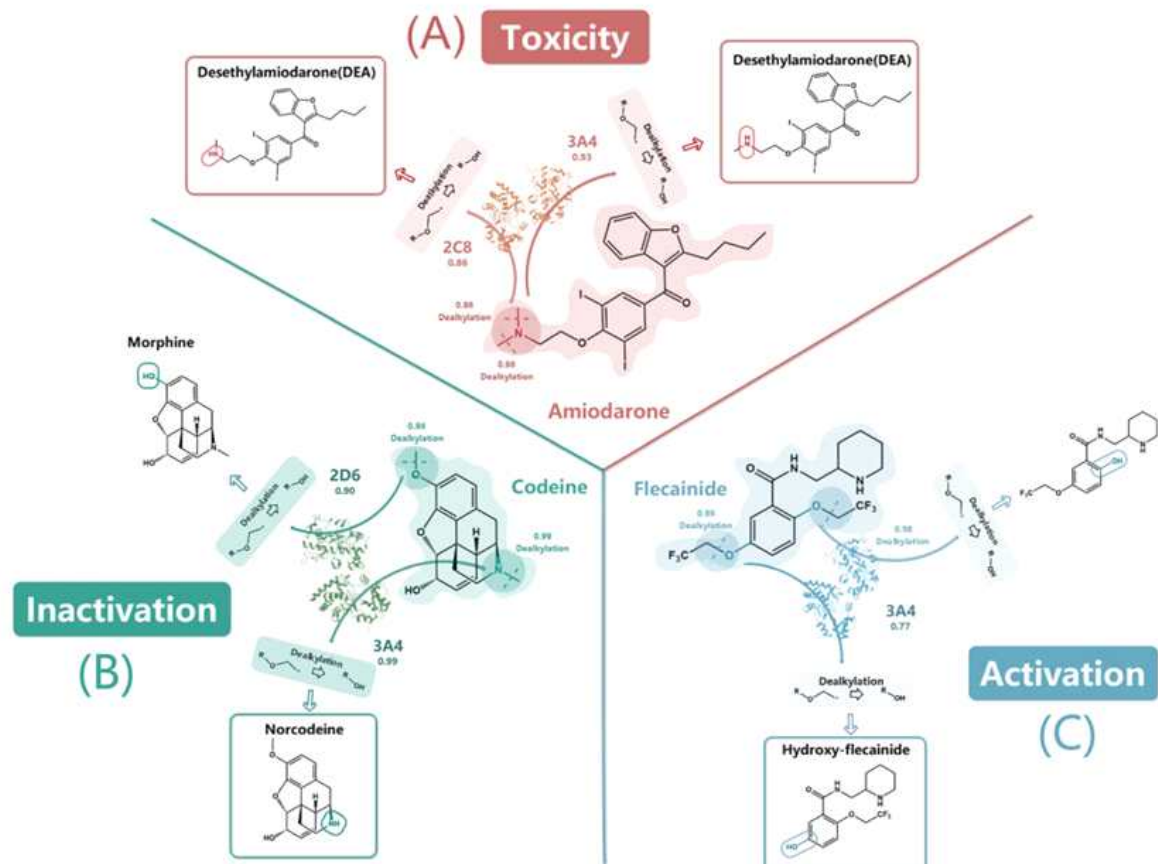


Fig. 7. 세 가지 약물 사례에 대한 DeepMetab의 대사 경로 예측 종합 시각화. 도표는 기능적 결과별로 분류된 예측된 약물 대사 패턴을 보여주고 있음. (A) Desethylamiodarone(DEA)으로 이어지는 아미오다론의 독성 경로, (B) Norcodeine으로 대사되는 codeine의 비활성화 경로, (C) Hydroxy-flecainide 전환되는 flecainide의 활성화 경로. 각 분자 구조 내 주요 SOM이 강조 표시되었으며, 각 대사 변환 옆에 예측 점수가 표시됨. 특정 CYP450 이소형의 관여가 각 반응 경로에 매핑되어, 약물 대사에서 대사산물과 관여 효소 모두를 예측하는 모델의 능력을 입증함.

10-2) 경구 투여용 FDA 승인 약물에 대한 예측(2020-2024)

- Fig 8에서 DeepMetab이 기존에 특성화되지 않은 약물 분자의 대사산물에 대한 예측 능력을 추가로 평가하기 위해, 2020년부터 2024년 동안 FDA 승인을 받은 경구용 약물을 활용한 검증 수행. 중요한 점은, 이 약물들이 DeepMetab 모델 개발에 사용된 훈련 데이터에 포함되지 않아 성능 평가의 독립성이 보장되었다는 점.
- 이와 같은 작업의 주요 어려움은 대부분의 신약 승인 시 대사산물 정보가 공개되지 않으며, 공개되더라도 일반적으로 포괄적인 프로파일 아닌 가장 중요한 1~2개의 대사산물만 포함된다는 점. 이러한 제약을 해결하기 위해 문헌에서 대사 경로와 관련 대사산물이 명확히 기록된 18개 약물을 선별되었음.
- DeepMetab은 18개 약물 중 14개 약물에 대해 주요 CYP 매개 대사산물(TOP-1)을 정확

히 예측하여 약 78%의 정확도를 보였음. 반면 나머지 4개 약물(Mobocertinib, Ritlecitinib, Quizartinib, and Palovarotene)의 경우 올바른 대사산물이 두 번째로 높은 예측값(TOP-2)으로 나타났으며, 이로 인해 전체 TOP-2 정확도는 100%를 기록하였음.

- DeepMetab은 모델의 효과적인 종단간 예측 능력을 반영하는데 CYP3A4 및 CYP2D6과 같은 주요 대사 CYP 효소들을 0.81에서 1.00 사이의 점수로 성공적으로 식별하였음.
- 또한 CYP2C8에 의한 Infigratinib 대사와 같은 점수 0.74의 흔하지 않는 효소들도 예측하였음. 동시에 DeepMetab은 대사 부위를 정확히 위치 파악했으며, 0.9 이상의 점수를 기록하였음. 예를 들어 avacopan의 탈알킬화 부위(0.97)와 daprodustat의 하이드록실화 부위(0.92)가 대표적임. 마지막으로, 이 모델은 탈알킬화, 하이드록실화, 에폭시화, S/P-산화, 가수분해와 같은 특정 대사 변환 규칙을 적용하여 효소 및 부위 예측과 일치하는 상세한 대사체 구조를 생성함으로써 정확하고 포괄적인 대사 예측을 수행하였음.

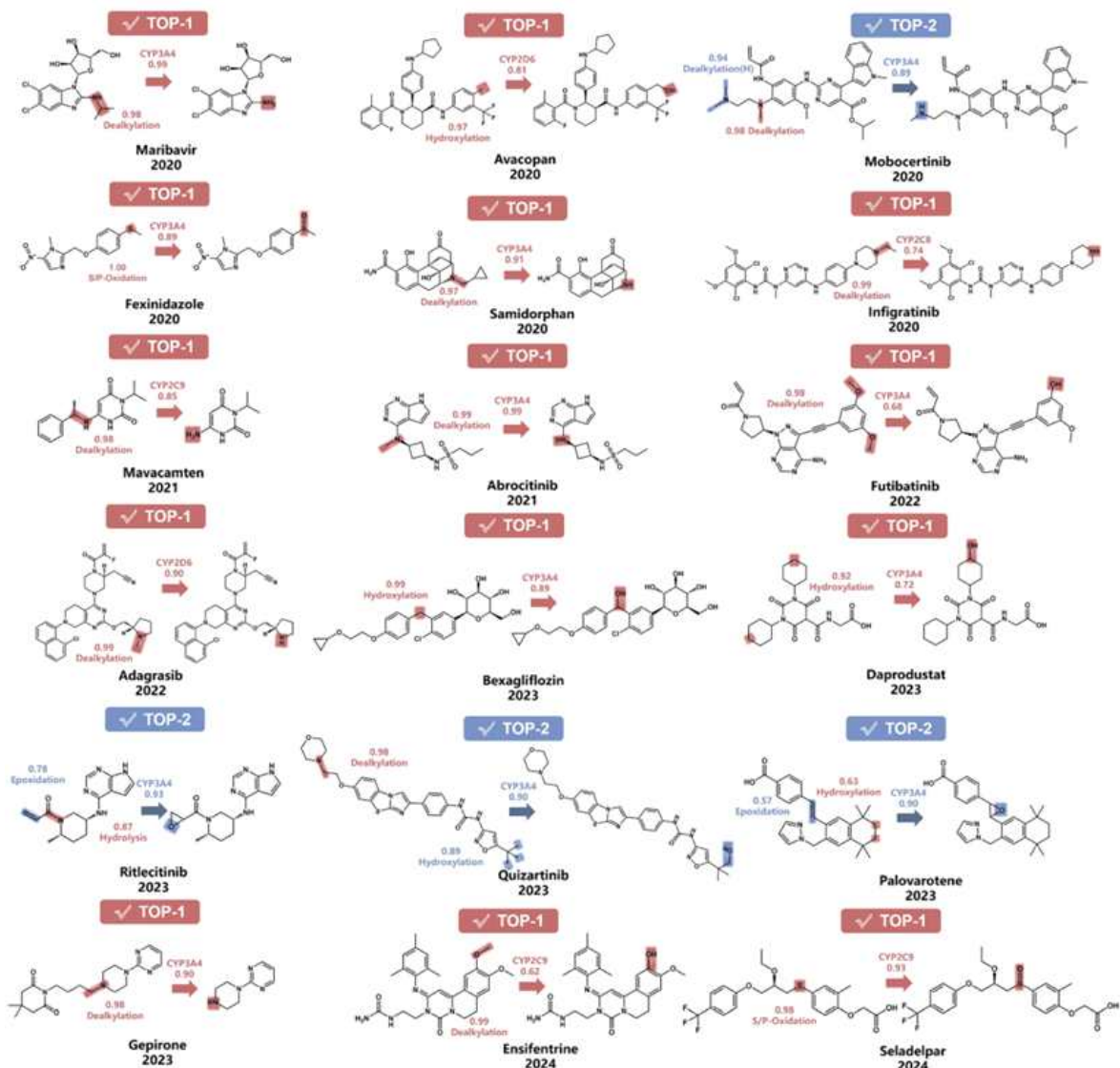


Fig. 8 경구 투여용 FDA 승인 약물에 대한 예측(2020–2024). 본 그림은 DeepMetab 예측 작업 흐름 전체를 제시한 것으로 예측된 대사 효소와 관련 점수 확인된 것임. 예측된 대사 부위는 밝은 색상으로 별도로 강조 표시됨. 또한 예측 확률과 적용된 대사 변환 규칙의 범주를 명시하였음 구체적으로 TOP-1은 예측 결과에서 해당 대사산물이 1위를 차지, TOP-2는 상위 2개 예측 안에 포함되었음을 의미함.

11. 결론

- 약물의 대사체에 대한 주요한 목적은 독성대사체 생성 유무와 약물-약물 상호작용임. 그러나 오늘날 AI-기반 대사체 예측은 신약 개발 및 기존 약물의 독성 및 효능을 변화시키는 optimization 용도를 가짐
- 현재 AI-기반 대사체 예측의 기존 원리는 대사 기전 측면에 SOM (Site of metabolism, 대사 부위)을 통한 대사체 예측. 이는 CYP 아종별 촉매 부위와 원자에서의 분자 간 반응에 대한 근사적 활성화 에너지로 유추하는 기전임
- SOM-기반 대사체 예측에서 문제점은 독성을 유발하는 epoxidation, dealkylation 등의 반응에 의한 독성대사체 생성 유무를 파악하지 못하는 한계점.
- **DeepMetab은 이와 같은 SOM 기반 대사체 예측에 있어서 한계점을 극복하기 위해 다음과 같은 방법으로 알고리즘 개발**
 - ① 원자의 대사위치(AOM) 및 원자쌍의 대사 결합(BOM) 수준 반응성을 동시에 포착하는 이중 라벨링 전략을 채택하여 대사 부위(SOM) 예측
 - ② CYP450 매개 약물 대사의 종단간 예측을 위한 최초의 포괄적이고 기전적 정보를 반영한 DL GNN-기반 학습 프레임워크
 - ③ 결론적으로 원자 및 결합 수준 반응성을 동시에 포착하는 이중 라벨링 전략을 채택하며, 양자 기반 및 토폴로지적 설명자를 포함한 다중 스케일 특징을 그래프 신경망(GNN) 백본에 융합
 - ④ 전문가들이 도출한 **반응 규칙**으로 구성된 선별된 지식 기반은 대사체 합성 과정에서의 기전적 일관성을 추가로 보장하는 전략 - **축, 산화, 환원, 가수분해, 탈할로겐화 등 주요 범주를 포함한 대사 반응 규칙의 계층적 분류를 제시**
- 결과적으로 보다 정확한 대사 위치 예측이 가능하였고 약물 대사의 90% 차지하는 9종의 cytochrome P450별 대사산물 예측. 이는 CYP450 촉매 대사에서 다중 잠재 패턴을 기반하는 **대사 반응의 규칙**을 설정에 기인함. 특히 대사 반응에 대한 예측은 독성대사체 생성 유무를 확인이 가능함으로 합성의약품의 후보약물 탐색에 크게 기여할 것으로 추정됨
- 특히 상세한 대사 경로 정보가 제한된 경우에도 높은 정확도로 가장 중요한 대사 산물을 식별하고 우선순위를 부여하는 능력과 더불어 신규 및 미탐구 분자에 대한 약물 대사 연구를 크게 진전시킬 잠재력을 발휘할 것으로 예측됨
- 이와 같은 판단은 미국 FDA에서 2020-2024년 승인된 합성의약품에 대한 대사 예측을 평균 80%-90% 정확도로 확인된 사례에서 기인함

<참고문헌>

- V. Porokhin, L. P. Liu and S. Hassoun, Using graph neural networks for site-of-metabolism prediction and its applications to ranking promiscuous enzymatic products, *Bioinformatics*, 2023, 39(3), btad089.
- Singh D. Quantum Computing Assays: Advancing Drug Metabolism Studies and Drug Delivery Design. *Drug Metab Bioanal Lett.* 2024;17(3):99-103.
- Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, Huai C, Shen L, Zhang N, He L, Qin S. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 26;22(23):12808.
- UW Courses Web Server [courses.washington.edu. medch527](https://courses.washington.edu/medch527). Cytochrome P450 Mechanism B Major Types of P450 oxidation Reactions
- S. Takai, S. Oda, K. Tsuneyama, T. Fukami, M. Nakajima and T. Yokoi, Establishment of a mouse model for amiodarone induced liver injury and analyses of its hepatotoxic mechanism, *J. Appl. Toxicol.*, 2016, 36,35–47.
- Yiling Zhou et al., DeepMetab: a comprehensive and mechanistically informed graph learning framework for end-to-end drug metabolism prediction. *Chem. Sci.*,2025,16, 18884

82. 2025/12/16 미국 상원을 통과한 FDA Modernization Act 3.0

1. FDA Modernization Act 3.0의 핵심 내용

- 미국 상원은 12월 16일 만장일치로 FDA 현대화법 3.0(S.355)을 통과시켜, 의회가 2022년에 제정한 Modernization Act의 변경 사항을 반영하도록 FDA가 규정을 개정하도록 요구하는 법안을 하원으로 송부
- 법안은 보건복지부(HHS)가 FDA 국장을 통해 **법 시행 후 1년 이내에 잠정 최종 규칙**을 발표하도록 지시하는 내용
- 해당 규칙은 연방규정집(CFR) 제21편 특정 조항(specified sections of Title 21 of the Code of Federal Regulations)에서 '**동물' 실험, 데이터, 연구, 모델 및 연구에 대한 언급을 '비임상' 실험('nonclinical' tests)으로 대체하며**, 이 용어는 기존 동물 연구와 새로운 접근법(NAMs; New Approach Methodologies) 즉 **인체 세포 기반 모델·오가노이드· 장기 온칩· AI 독성 예측 등 대체시험법을 공식 평가 수단으로 반영을 의미**
- **이에 따라 FDA는 법안에 따라 1년 내에 다음 내용을 수립하여야 함**
 - ① **승인 경로 수립(Establish a Pathway):** 의약품 개발을 위한 비임상 시험 방법(NAMs) 승인을 신청할 수 있는 공식 절차를 마련해야 함
 - ② **우선 심사(Prioritise Review):** 승인된 비임상 방법을 사용하여 개발된 의약품에 대해 우선 심사 권한을 부여함
 - ③ **투명성 및 보고(Transparency and Reporting):** 접수된 신청 건수, 승인된 방법 유형, 그 결과로 예상되는 동물 구출 수에 대해 매년 보고

2. 상원 조치에 대한 다양한 의견과 기타 주요 사항

- 상원의 이번 조치는 다양한 질병 분야와 연구 방식에서 비동물적 방법이 동물실험을 얼마나 신속하게 대체할 수 있는지에 대한 광범위한 논쟁 속에서 이루어짐
- 미국생물의학연구협회(NABIR)는 규제 기관들이 대체 방법에 대한 경로를 확대하고 있음에도 불구하고 "현재 생물의학 연구 및 신약 개발에서 동물 모델을 완전히 대체할 수 있는 방법은 존재하지 않는다"고 주장
- 미국국립보건원(National Institutes of Health)은 NAMs를 포함한 더 다양한 접근법을 장려하기 위한 정책 전환을 설명했지만, 이것이 동물모델을 사용하는 연구 제안에 대한 전면적 금지 조치를 의미하지는 않는다 점을 강조
- 그러나 미국 질병통제예방센터(CDC, Center for Disease Control and Prevention)는 과학

자들에게 2025년 말까지 모든 원숭이 연구를 중단하라고 지시. 이는 NIH가 10년 전 연구용 침팬지 프로그램을 종료한 이후 미국 기관이 **자체 비인간 영장류 프로그램 (in-house nonhuman primate program)**을 종료하는 첫 사례가 될 것으로 예상됨

3. 미국 FDA의 기존 Roadmap과 미래 Roadmap의 핵심 요소

1) 기존 Roadmap

- 2025년 4월, FDA는 비임상 평가 현대화 추진의 일환으로 동물 실험 감축 계획을 발표했으며, NAMs를 기반으로 인공지능 기반 계산 모델링, 인간 장기 모델 기반 실험실 시험, 실제 인간 데이터를 활용함으로써 환자에게 더 안전하고 신속하며 신뢰할 수 있는 치료법을 제공함을 목표를 제시.
- 특히 이러한 목표는 “패러다임 전환”이라 규정하며 비동물적 방법을 활용한 강력한 안전성 자료 패키지를 제출할 경우 심사 간소화 등 잠재적 규제 인센티브를 제시함

2) 미래 Roadmap의 핵심 요소

- ① **단계적 이행(Stepwise Implementation):** FDA는 초기에는 단일클론 항체 및 기타 생물학적 제제에 대한 동물 실험 감축에 집중한 후, 대체 방법이 검증되고 수용됨에 따라 다른 약물군으로 확대할 것임
- ② **인간 관련 방법 사용(Use of Human-Relevant Methods):** 동물 모델보다 인간 생물학을 더 가깝게 반영하는 첨단 체외 모델(예: 오가노이드, 칩 위의 장기), 컴퓨터 시뮬레이션 모델링 및 AI 기반 독성 예측의 사용을 장려할 것임
- ③ **국제 데이터 활용(Leveraging International Data):** 의약품 개발자들은 규제 기준이 유사한 다른 국가에서 얻은 기존의 인간 안전성 데이터를 제출할 것을 권장받을 것임. 충분한 국제적 인간 데이터가 존재할 경우, FDA 심사관이 특정 안전성 문제를 확인하지 않는 한 추가 동물 실험이 필요하지 않을 수 있음.
- ④ **새로운 접근법 방법론 데이터 저장소 구축(Building a New Approach Methodologies Data Repository):** 비임상 기관 및 기업은 대체 방법 사용을 뒷받침하는 강력한 증거 체계를 구축하기 위해 기존 동물 데이터와 함께 NAM 데이터를 제공할 필요성. 검증된 NAM 데이터를 제공하는 기업은 요구되는 동물 연구 반복 횟수 감소와 같은 규제 완화를 받을 수 있도록 해야함.
- ⑤ **협력 및 검증(Collaboration and Validation):** 타 기관 및 미국 대체 방법 검증 기관간 조정 위원회(ICCVM)를 통해 NAM의 검증 및 채택을 가속화할 것임. 공개 워크숍 및 시범 프로그램은 실제 환경에서의 테스트와 피드백을 지원할 것임. 이러한 조항들은 안전성 및 유효성 기준을 유지하면서 NAM에 대한 규제 명확성과 수용성을 높이기 위한 수단이 됨.

4. 전임상 생태계 전반에 미치는 영향

- 규제 당국이 NAM에 대한 수용성을 높여감에 따라, 전임상 생태계 전반의 기업들은 인체-관련 시험(human-relevant testing) 역량을 확대
- 기존 서비스와 병행하여 비동물적 옵션을 확대하기 위해 'Alternative Methods Advancement Project(대체 방법 발전 프로젝트)'를 비임상기업에서 마련의 필요성
- 시장조사에 따르면 NAM 기술의 급속한 성장을 전망:
- '장기-온-어-칩(organ-on-a-chip)' 시장이 2024년 약 1억 5,700만 달러에서 2030년까지 9억 5,200만 달러로 성장할 것으로 예측. 이는 연평균 복합 성장률(CAGR) 35%를 초과하는 수치임.
- 오가노이드 시장은 2025년 14억 달러에서 2035년까지 40억 달러로 성장할 것으로 예상
- 비동물적 방법(NAM) 기업들은 동물 실험을 통과한 약물의 90~95%가 인간 임상 시험에서 실패하였다는 점을 강조하며 공격적 마케팅 예상

5. FDA Modernization Act 3.0과 전반적으로 고려해야 할 사항

- ① **데이터 검증 및 재현성(Data Validation and Reproducibility):** 비임상 기업은 NAM이 품질, 재현성 및 인간 관련성에 대한 규제 기대치를 충족하도록 보장의 필요성
- ② **과학적 엄밀성 확보(Ensuring Scientific Rigour):** 새로운 방법이 대체하는 동물 실험과 최소한 동등한 수준으로 환자 안전을 보호할 수 있도록 보장의 필요성
- ③ **신규 접근법 데이터 제출 장려(Encouraging Submission of New Approach Methodologies Data):** 식약처 등의 규제기관은 동물 실험 데이터와 병행하거나 대체하여 NAMs 데이터를 제출하도록 장려하여 경험 데이터 저장소를 구축할 필요성.
- ④ **규제기관과 조기 및 빈번한 소통(Engagement with FDA Early and Often):** 허용 가능한 방법론 및 연구 설계에 대한 합의를 도출하기 위해 IND 제출 전 회의 및 서면 커뮤니케이션을 전략적으로 활용할 필요성.
- ⑤ **규제 유연성(Regulatory Flexibility):** FDA는 안전성 및 유효성 기준 충족을 위한 단계적 접근을 유지하면서, 견고한 비동물 데이터를 제공하는 비임상 기업 및 개발자에게 사례별 면제 또는 예외를 부여할 수 있어야 함.
- ⑥ **규제 인센티브(Monitor Regulatory Updates):** NAMs를 채택하는 기업에 대한 잠재적 인센티브(예: 신속한 회의 또는 심사)가 있어야 함.
- ⑦ **규제 업데이트 모니터링(Monitor Regulatory Updates):** NAM 및 동물 실험 조건과 관련된 규제기관 및 미국 FDA의 새로운 지침, 워크숍, 정책 변경 사항을 지속적으로 파악 필요성. 규제 기대치는 너무나 빠르게 진화하고 있음.
- ⑧ **비임상 기업의 윤리적 및 투자자 영향(Ethical and Investor Impact):** 동물 복지와 혁신에 대한 헌신을 입증하면 이해관계자의 신뢰를 높이고 ESG 중심 투자를 유치할 필요성.

6. FDA Modernization Act 3.0과 국내 규제기관의 점검 요소

- ① 임상시험에서 초기 용량을 결정에서 있어서 전반적인 **이익-위험 평가**를 기반으로 IND 수행하고 있는지? (예시: NOEL과 NOAEL의 구별)
- ② 합성의약품에 적용한 유전독성시험을 **바이오의약품에 적용**하고 있지는 않는지? (예시: 독감이나 감기에 의한 바이러스에 감염되면 유전적 변형이 발생하는가? 발생은 극히 예외적임)
- ③ **동물과 사람에서의 발생하는 독성 차이에 대한 기본적인 원리**를 바탕으로 심사가 이루어지는가?
- ④ 유전독성시험에 너무나 많이 발생하는 **위양성(false positive)**에 대한 이론적 근거를 수용할 수 있는가?
- ⑤ 미국에서는 사용이 엄격하게 적용되고 있는 **독성시험에서 NHP(non-human primate, 비인간 영장류) 사용**을 요청하고 있지는 않는가?
- ⑥ 불필요한 2년 기간의 발암성시험과 1년 기간의 만성독성시험을 weight of evidence 기반으로 대체에 대한 가이드라인은 제정하였는지?
- ⑦ 학문적 및 전문적 지식을 기반으로 융통성이 적용될 수 있는 규제가 가이드라인이 아니고 법률적인 고시로 규정되어 있지는 않는가?
- ⑧ 아래와 같은 NAMs를 수용하기 위해서는 독성학적 기전에 대한 설명이 필요하며 특히 **'Adverse Outcome Pathways (AOPs) and mechanistic frameworks'** 중요성에 인지 필요성
 - In vitro models (cell- and tissue-based systems)
 - In silico models (computational tools and artificial intelligence)
 - Ex vivo models (tissues/organs outside the body)
 - Microphysiological systems (MPS) (organ-on-chip)
 - Omics-based technologies (genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics)
 - **Adverse Outcome Pathways (AOPs) and mechanistic frameworks**
- ⑨ 오늘날 논문으로 작성된 서류만으로 IND에서 통과되는 FDA 사례와 같이 미국 FDA는 통과되고 국내 규제기관에서는 통과가 되지 않는 이유에 대해 공개하고 명확하게 설명이 가능한지?
- ⑩ 위와 같은 사항과 신약개발의 전주기 단축에 대한 고찰의 필요성은 있지 않을까?

83. 알츠하이머병의 치료제 개발에 대한 실패 원인과 NAMs

1. 목적

- 동물 실험에서 안전하고 효과적으로 보였던 약물의 90% 이상이 주로 안전성 및/또는 효능 문제로 인해 인간 대상 FDA 승인을 받지 못함(Marshall 등, 2023)
- 이와 같은 현실에서 미국 입법기관은 Modernization 3.0 통해 FDA가 법 시행 후 1년 이내에 아래와 같이 3가지 잠정 규칙을 발표하도록 지시하는 내용
 - ① 승인 경로 수립(Establish a Pathway): 의약품 개발을 위한 비임상 시험 방법(NAMs) 승인을 신청할 수 있는 공식 절차를 마련해야 함
 - ② 우선 심사(Prioritise Review): 승인된 비임상 방법을 사용하여 개발된 의약품에 대해 우선 심사 권한을 부여함
 - ③ 투명성 및 보고(Transparency and Reporting): 접수된 신청 건수, 승인된 방법 유형, 그 결과로 예상되는 동물 구출 수에 대해 매년 보고
- 특히 입법기관은 생명윤리적인 측면에서 동물실험의 감소에 중점을 둠. 반면에 규제기관 입장에서는 동물실험을 줄이면서 **신약개발의 비임상 분야에서 비동물-신규 평가방법(NAMs; New Approach Methodologies)**을 통해 임상시험에서의 안전성을 어떻게 확보할 것인가 하는 문제에 직면하게 됨. 또한 안전성뿐만 아니라 유효성에 대한 질환모델이 과연 신약개발에 있어서 적절했는지에 대한 검증도 필요
- 동물 기반 데이터를 통해 안전성 및 효능 측면에서 가장 낮은 예측 성공율을 보인 질병은 암(Mak 등, 2014), 알츠하이머병(Pippin 등, 2019), 염증성 질환(Seok 등, 2013) 등이었음. 예측성공율이 낮은 이유는 인간과 다른 동물 종 사이의 기본적인 생리학적 차이가 강조되고 있음
- 가장 낮은 예측 성공율을 보인 질병에 대한 실패 원인의 분석을 통해 동물모델의 활용이 효과적인 새로운 치료법을 제공하지 못한 이유를 살펴볼 필요성이 있음. 이는 궁극적으로 **문제를 해결하기 위해 인간과 더 관련성이 높은 새로운 접근법과 방법론을 어떻게 적용할 수 있을지에 대한 대안을 제시할 수 있을 것으로 예상됨**

2. 알츠하이머 질환의 동물모델과 치료제 개발의 실패 원인

- 알츠하이머병 치료제 개발의 실패율은 매우 높아, 임상시험의 99%에서 약물과 위약 간 차이가 나타나지 않았음(Cummings 등, 2019). 전 세계적으로 5,500만 명 이상이 치매로 고통받고 있다는 점을 고려할 때, 이는 막대한 글로벌 공중보건 비용이 소요됨. 수천 가지의 약물이 전통적인 동물 및 비동물 접근법을 통해 알츠하이머병 치료제로서의 잠재력을 시험받아 왔음. 그러나 1995년 이후 FDA가 알츠하이머병 치료제로 승인한 약물은 단 6종에 불과함. 이 약물들이 모든 환자에게 효과가 있는 것은 아니지만 경우 인지 및 행동 증상 개선에 도움을 주는 정도임.

1) 항알츠하이머 신약개발의 실패 원인

- 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD) 치료제 개발의 전반적인 실패에는 아밀로이드 침착을 표적으로 하는 약물뿐만 아니라 다른 작용 기전을 통해 작용하는 약물들도 포함됨. Mullane 등(2019)의 논문에서 알츠하이머병 치료제 개발에서 막대한 실패를 설명할 수 있는 주요 원인들을 다음과 같이 제시함.
- ① **질병의 다인성 병인을 고려하지 못한 점:** AD 치료제 개발은 두 가지 고전적 특징인 뇌 내 아밀로이드 플라크와 신경섬유 엉킴의 침착에 지나치게 집중되어 왔음.
 - ② **AD의 염증성, 면역성 및 대사성 요소를 지닌 다인성 증후군이라는 증거 축적의 증가:** 가족성/유전자 기반 조발성 알츠하이머병(FAD: Familial Alzheimer's disease, 전체 알츠하이머병 사례의 약 1~3% 차지)과 후기발병 산발성 알츠하이머병(LOAD: Late-onset Alzheimer's disease, 나머지 97~99% 차지)이 근본적으로 동일하다는 일반적인 가정. FAD와 LOAD가 동일한 행동 및 병리학적 특징을 보인다는 점은 입증되었지만 FAD 동물 모델은 유전적 특성이나 LOAD의 발병 및 진행 과정을 재현하지 못한다는 것이 확인됨.
 - ③ **신약 후보물질의 효능, 표적 선택성, 약력학적 및 약동학적 특성 등 관련 측면을 전임상 평가 과정에서 소홀히 하는 경향:** 효능에 대한 확실한 증거가 없음에도 불구하고 여러 후보물질이 임상시험 후기 단계로 진행된 사례가 많음
 - ④ **제한적인 질환모델:** 알츠하이머병 동물 모델의 제한된 구축 가능성 또는 예측 타당성

2) 부적절한 알츠하이머 동물모델의 예시

2-1) 근친 교배/자연 발생 동물모델 vs 형질전환 동물모델 예시

- **근친 교배/자연 발생 동물모델**은 해마에서 β -amyloid 수치의 상승과 행동 장애를 동반한 노화 축진을 보일 수 있으며 대표적인 동물모델은 SAMP8 및 SAMP10 마우스 모델 등이 있음(Carter 등, 2005). **형질전환 동물**은 유전적으로 변형되어 FAD에서 확인된 일부 유전적 변이를 발현함. 또한 유전자 변형 마우스는 아밀로이드 플라크와 신경섬유다발(NFT,

neurofibrillary tangle)의 형성, 신경교증, 일부 시냅스 변화 및 일부 인지 지연의 징후를 보일 수 있음. 그러나 아밀로이드 침착이 발생함에도 불구하고, 이러한 형질전환 마우스는 종종 신경세포 손실을 보이지 않음(Sanchez-Varo 2022). 이와 같은 결과는 궁극적으로 위음성 결과를 초래할 수 있으며 잠재적으로 효과적인 치료 화합물이 임상 시험에서 배제되는 결과를 초래함(Sukoff 등, 2020).

2-2) 동반 질환의 위험요인이 반영되지 않은 질환모델의 예시

- LOAD은 일반적으로 질환과 연관된 심혈관 질환, 염증성 질환, 면역 체계 장애, 수면 장애 및 대사 증후군과 장내 미생물군집 등의 관련 위험 요인들 동반하여 발생하는데 알츠하이머 동물모델 중 어느 것도 인간에서 발생하는 질병의 병리 기전을 반영하지 않음 (Veening-Griffioen 등, 2019; Cavanaugh 등, 2014). 이와 같은 위험요인들은 AD의 병인 발생에서 생활 방식이 차지하는 핵심적 역할을 의미함. 따라서 생활습관 요인과 관련 동반 질환의 기여도를 고려하지 않은 동물모델은 중간 차이를 유도하여 약물 개발에 있어서 동물모델의 타당성에 심각한 영향을 미칠 것으로 예상됨(Pound 등, 2018).

3. 알츠하이머병의 치료제 개발을 위한 NAMs

- 항알츠하이머 치료제 개발을 위해서는 궁극적으로 동물-기반 시험이 아니라 인체-기반 시험에 더하여 환경적·생활습관적 위험 요인이 반영한 NAM이 요구됨. 또한 조기 진단을 위한 새로운 생체표지자를 발견, AD 증상 및 진행을 감소시키는 데 효과가 입증된 예방적 중재 전략을 식별이 가능하여함(Pistollato 등, 2018; van den Brink 등, 2019).
- 현재 안전성 시험 측면에서도 고려될 수 있는 이용 가능한 NAMs는 다음과 같다: i) 환자 유래 세포(예: iPSCs)로부터 생성된 인간 세포 모델 및 신경세포 및 아교세포 배양 ii) 복합 조직 및 장기-온-칩 기술; iii) 다중 '오믹스' 고처리량 기술 iv) 계산적 분석 접근법; 그리고 v) 새로운 신경영상 판독법 등이 있음. 아래의 <표>는 알츠하이머병(AD) 연구에 적합하고 약물 개발에 적용 가능한 인간 기반 연구, 모델 및 분석 지표 등의 예시이다.

<표> 알츠하이머병 연구와 치료제 개발에 적용 가능한 인체-기반 NAMs

Human-based models/tools	응용성	참고문헌
역학 연구, 무작위 임상 시험, 진단 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 환경적 유발 요인, 유전적 취약성, 성별, 성 정체성, 식이, 신체 활동, 동반 질환(예: 당뇨병), 인지 훈련 등 위험 요인 간의 복잡한 상호 관계를 평가하기 위함. • 조기 진단을 위한 새로운 바이오마커를 식별하고 새로운 약물 표적 설계. 	(Makin, 2018; Robbins 등, 2017; Langley 등, 2014; Pistollato 등, 2015 & 2016; Calitz 등 2015; Hernandez 등, 2015; Pistollato 등, 2018; van
신경영상 기법(예: MRI, PET, MRI 섬유추적법), 연결체학(connectomics), PET(positron	<ul style="list-style-type: none"> • 생체 내 및 생체 외 연구를 통해 2차원 및 3차원 이미지를 이용한 인간 뇌 해부학 연구, 알츠하이머 병(AD) 진단, 치료 효과 평가. 	

emission tomography) 미세 투여	<ul style="list-style-type: none"> 다른 동반 질환과 공유되는 신경해부학적 특징 식별, 새로운 진단 마커 확인 및 AD 임상시험 대상자 모집 촉진을 위해 뇌 연결체(brain connectome)를 구축. 알츠하이머병 치료제 후보 화합물들의 약동학 및 약력학 평가를 수행 	den Brink 등, 2019; Ngandu 등, 2015; Langley 등, 2014; Marshall 등, 2023; Mak 등, 2014; Pippin 등, 2019; Veening-Griffioen 등, 2019)
환자 유래 샘플(예: 뇌척수액, 혈액/혈장, 섬유아세포, 림프구), 사후 뇌조직	<ul style="list-style-type: none"> 알츠하이머병의 초기 바이오마커를 규명하고, 이중 세포가 포함되지 않은 인간 유도만능줄기세포(human induced pluripotent stem cells, iPSCs)를 생성하기 위함. 환자 이질성을 고려하고 세포 및 구조적 병리를 연구하기 위함. 새로운 바이오마커를 확인하고 질병 진행에 관여하는 요인에 대한 분석을 정교화하기 위함. 	
조기 발병, 가족성 및 후기 발병 알츠하이머병 환자 iPSCs 및 그 분화된 기능적 파생세포(2차원 및 3차원)	<ul style="list-style-type: none"> 알츠하이머병 표현형 특성(예: Aβ 생성, 인산화 타우 단백질) 및 β 및 γ 세크레타제 억제제(secretase inhibitors)에 대한 반응성을 연구하기 위함 유전체 편집 기술(예: zinc-finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases 및 CRISPR/Cas9)을 활용하여 알츠하이머병 관련 특정 유전자의 서열을 추가하거나 수정하고, iPSC 유래 뉴런에 미치는 영향을 측정하며, 환자 맞춤형 치료법을 설계할 수 있음. 	
뇌 오가노이드, 마이크로유체학, 장기-온-어-칩	<ul style="list-style-type: none"> 조직의 복잡성을 조사하고 치료 화합물의 효과를 평가하기 위함. 	
다중 오믹스(Multi-omics)	<ul style="list-style-type: none"> 알츠하이머병 신호 전달 경로를 평가하고, 후성유전적 및 유전적 변이, 유전자 발현, 평생 노출을 확인 	
계산모델링(Computational modelling)	<ul style="list-style-type: none"> 분자, 신호 전달 경로, 세포 수준에서의 상호작용, 인과 관계, 약물 설계, 환자 분류, 진단 및 질병 진행 개선, 단일 및 다중 규모에서의 중재 결과 예측을 조사 신약 후보물질(예: 아세틸콜린에스테라제 억제제)의 설계 및 선별 또는 효율적인 환자 분류 및 진단을 지원하여, 더 나은 환자 계층화 및 임상시험 설계를 가능하게 함 	

4. 결론

- 동물모델을 이용하여 안전성 및 효능 측면에서 가장 낮은 예측 성공율을 보인 질병 중 하나가 알츠하이머병이며 이는 치료제 개발에 어려움을 주는 가장 중요한 요인임.
- 동물과 인체의 생리적 차이가 낮은 예측 성공률을 낳게 한다고 추측을 할 수 있지만 무엇보다도 중요한 것은 알츠하이머 발병의 환경적·생활습관적 위험 요인에 의한 다중병인론을 동물에게 반영할 수 없다는 점.
- 따라서 위험 요인 간의 복잡한 상호 관계를 평가하기 위한 다양한 NAMs가 요구됨. 특히 이러한 NAMs는 동물과 인체의 생리학적 및 병리학적 차이를 줄이기 위해서는 인체-기반이어야 함. 예를 들어 뇌 오가노이드, 마이크로유체학, 장기-온-어-칩 등을 이용한 분석에 있어서 인체 조직의 응용이 필요하다고 할 수 있음
- 여전히 의문은 국소적 NAMs 이용하여 안전성 및 유효성에 있어서 임상시험에 적용되는 전신적 영향을 어떻게 평가하고 투여에 결장할 것인가의 문제가 있음

<참고문헌>

Calitz C, Pollack KM, Millard C, et al. National Institutes of Health funding for behavioral interventions to prevent chronic diseases. *Am J Prev Med* 2015; 48: 462–471.

Hernandez SS, Sandreschi PF, da Silva FC, et al. What are the benefits of exercise for Alzheimer's disease? A systematic review of the past 10 years. *J Aging Phys Act* 2015; 23: 659–668.

Pistollato F, Iglesias RC, Ruiz R, et al. Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A focus on human studies. *Pharmacol Res* 2018; 131: 32–43.

van den Brink AC, Brouwer-Brolsma EM, Berendsen AAM, et al. The mediterranean, Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), and Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) diets are associated with less cognitive decline and a lower risk of Alzheimer's disease - A review. *Adv Nutr* 2019; 10: 1040–1065.

Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A, et al. A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): A randomised controlled trial. *Lancet* 2015; 385: 2255–2263.

Langley GR. Considering a new paradigm for Alzheimer's disease research. *Drug Discov Today* 2014; 19: 1114–1124.

Pistollato F, Cavanaugh SE and Chandrasekera PC. A human-based integrated framework for Alzheimer's disease research. *J Alzheimers Dis* 2015; 47: 857–868.

Pistollato F, Ohayon EL, Lam A, et al. Alzheimer disease research in the 21st century: Past and current failures, new perspectives and funding priorities. *Oncotarget* 2016; 7: 38999–39016.

Robbins JP and Price J. Human induced pluripotent stem cells as a research tool in Alzheimer's disease. *Psychol Med* 2017; 47: 2587–2592.

Pistollato F, Iglesias RC, Ruiz R, et al. Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A focus on human studies. *Pharmacol Res* 2018; 131: 32–43.

van den Brink AC, Brouwer-Brolsma EM, Berendsen AAM, et al. The mediterranean,

Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), and Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) diets are associated with less cognitive decline and a lower risk of Alzheimer's disease - A review. *Adv Nutr* 2019; 10: 1040–1065.

Sukoff Rizzo SJ, Masters A, Onos KD, et al. Improving preclinical to clinical translation in Alzheimer's disease research. *Alzheimers Dement* (NY) 2020; 6: e12038.

Cummings J, Feldman HH and Scheltens P. The "rights" of precision drug development for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2019; 11: 76.

Mullane K and Williams M. Preclinical models of Alzheimer's disease: Relevance and translational validity. *Curr Protoc Pharmacol* 2019; 84: e57.

Veening-Griffioen DH, Ferreira GS, van Meer PJK, et al. Are some animal models more equal than others? A case study on the translational value of animal models of efficacy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2019; 859:172524.

Cavanaugh SE, Pippin JJ and Barnard ND. Animal models of Alzheimer disease: Historical pitfalls and a path forward. *ALTEX* 2014; 31: 279–302.

Pound P and Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med* 2018; 16: 304.

Makin S. The amyloid hypothesis on trial. *Nature* 2018; 7715: S4–S7

Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*. 2014 Jan 15;6(2):114-8.

Pippin, John J., et al. "Animal Research for Alzheimer Disease: Failures of Science and Ethics." *Animal Experimentation: Working Towards a Paradigm Change*, edited by Kathrin Herrmann and Kimberley Jayne, vol. 22, Brill, 2019, pp. 480–516. JSTOR,

Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al; Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 26;110(9):3507-12.

Carter TA, Greenhall JA, Yoshida S, et al. Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice. *Genome Biol* 2005; 6: R48.

Sanchez-Varo R, Mejias-Ortega M, Fernandez-Valenzuela JJ, et al. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: An integrative analysis. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 5404

84. 파킨슨병 치료제 개발의 실패 원인과 NAMs

1. 목적

- 파킨슨병 치료는 여전히 증상 완화에 그치며, 현재 신경보호제나 질병 진행 억제 치료법은 존재하지 않음(Hauser 등, 2023).
- 이는 동물 모델에서 신경재생 접근법의 전임상적 성공에도 불구하고(Blesa 등, 2023), 설치류에 급성 독소 투여로 질병을 유발하는 방식이 인간 질환의 특징인 만성적이고 진행성 신경세포 사멸을 재현하지 못해 동물모델의 임상적 적용 가능성을 과대평가하게 만든다는 점을 시사하는 것임
- 파킨슨병 연구를 위한 NAMs가 다양하게 존재함. 그러나 각 방법에 있어서 잠재력과 한계 또한 존재함. 그러나 이들 NAMs는 화학적으로 손상된 설치류 및 비인간 영장류의 동물모델보다 질병 발병 및 진행 과정을 좀 더 세밀하게 관찰이 가능하다고 사료됨. 따라서 기존 파킨슨병의 동물모델에 대한 문제점과 NAMs에 대한 고찰은 Modernization 3.0 법안을 넘어 향후 파킨슨병 치료제 개발에 큰 도움이 될 것으로 사료됨.

2. 파킨슨병의 특징과 치료제의 문제점

1) 특징

- 파킨슨병(PD)의 핵심 증상은 휴식 시 떨림과 운동 둔화(resting tremor with slowness of movement and muscle rigidity) 그리고 자세 불안정(disease-related postural instability)으로 흑질의 **도파민 신경세포 손실**과 **잔존 신경세포 내 α -시누클레인(alpha-synuclein) 축적**과 연관(Samii 등, 2004). 연구에 따르면 최근 “신경계 질환이 현재 세계의 인류 장애의 주요 원인이며, 파킨슨병은 신경계 질환군 중 가장 빠르게 증가하는 질환” 규정(GBD, 2018; Stocchi 등, 2024)

2) 치료제의 문제점

- 최초 사용 이후 40년이 넘는 현재까지도 도파민계 치료제인 레보도파(Levodopa: 뇌 조직 내에서 흥분 전달 물질의 하나인 도파민으로 변화되어 파킨슨병 억제 작용을 하는 치료제)는 모든 파킨슨병 환자에게 가장 효과적인 치료제로 소개되고 있음(Doherty, 2025).
- 그러나 Levodopa를 복용한 142명 환자를 대상으로 수행된 10년 추적조사의 코호트 연구를 통해 약물에 대한 파킨슨병 환자 집단의 이질성(heterogeneity)이 확인됨(Williams-Gray 등, 2013). 즉, 10년 후, 55%가 사망, 68%는 자세 불안정성, 46%에서는 치매가 확인되었음. 그리고 23%는 10년 후 치매/자세 불안정이 없이 생존의 양호한 결과가 확인. 대다수의 사망은 영국인 평균 사망률과 유사한 비율로 파킨슨병과 직접적인 관련이 없음. 결과적으로 파킨슨병의 예후는 복용한 환자의 4분의 1만 양호한 상태이며 나머지는 호전이 없는 이질적이었음

- 이와 같이 파킨슨병의 대표적인 치료제인 Levadopa의 이질성을 통해 도파민계 치료제가 파킨슨병-관련 자세 불안정(disease-related postural instability)에 효과가 없는 대표적인 예시임.

3. 파킨슨병 치료제 개발의 위한 동물질환모델

- 도파민-부족에 기인한 파킨슨병 치료제 개발을 위해서 사용되는 동물모델은 <표>에서처럼 1) 화학물질 처리에 의한 동물모델 또는 2) 형질전환에 의한 동물모델로 구분되며 대부분 모델에 있어서 도파민계 시스템을 파괴하여 제작됨. 동물은 주로 mouse, rat 또는 marmoset 등이 사용됨(Bloem 등, 1996; Zeiss 등, 2017; Michael 등, 2023; Reeve 등, 2014; Hemmer 등, 2017; Blesa, 2016; Doherty, 2025)

<표-1> 파킨슨병 연구에 현재 이용 가능한 모델 생성, 유도 방법, 질병 특성 및 모델의 한계점.

(1) 화학물질 처리에 의한 동물모델			
처리 물질	유도 방법	질환 특성	단점
6-hydroxydopamine	뇌내 주사	L-dopa(=Levodopa) 반응성 운동 기능 장애	급성 독성. 비도파민성 병리 소견 없음. 루이소체(Lewy bodies: 신경세포 내에서 발달하는 비정상적인 단백질 집합체) 없음.
MPTP/MPP ⁺	일반적으로 정맥 내/복강 내 주사. 다양한 투여 경로/투여 요법을 사용하여 서로 다른 생쥐 모델을 생성	신경염증, 선조체 도파민 감소, 흑질-선조체 도파민 신경세포 퇴화, 운동 기능 장애.	급성 병리를 유발. 도파민계 외 증상은 없음. 단백질성 봉입체(proteinaceous inclusions) 또는 루이소체가 결여됨. 청색핵의 퇴행이 없음.
Paraquat	일반적으로 복강 내 주사	신경염증, 흑질-선조체 퇴행, 청반 퇴행, α-synuclein 축적, 선조체 tyrosine hydroxylase 감소.	혈액-뇌장벽이 없는 뇌 부위의 축적. 운동 및 행동 증상 감소
Rotenone	전신 투여: 피하, 복강 내 주사.	도파민 및 도파민 대사 산물을 감소시킴. 세포질 봉입체를 생성함.	흑질 침범 없이 선조체 손상. 랫드 모델에서 높은 사망률. 매우 다양한 병리 소견. 비정형 희소돌기아교세포(oligo-dendrocyte) 및 간 독성을 유발함.

(2) 형질전환에 의한 동물모델			
처리 물질	유도 방법	질환 특성	단점
α -synuclein overexpression	인간 유전자의 과 발현	α -synuclein 양성 봉입체. 운동 및 비운동 기능 장애.	도파민 기능 장애에도 불구하고 흑질-선조체 도파민 신경세포의 제한적 진행성 퇴행.
PARKIN modification	기능 상실 돌연변이(Knock-out)	도파민 항상성 상실. 흑질-선조체 퇴행. α -synuclein 축적	도파민성 뉴런의 손실 없음. 제한된 병리학적 소견(돌연변이에 따라 다름). 타우 축적과 같은 비정형 병리학적 소견
	기능 획득 돌연변이 (Knock-in)	진행성 운동 기능 저하. 선조체 도파민 감소. α -synuclein 축적. 흑질-선조체 도파민 신경세포의 노화 관련 퇴행.	루이소체 없이 α -synuclein의 축적이 있는 상태.
DJ-1 modification	Knock-out	경미한 운동 기능 장애. 도파민 항상성 변화.	흑질-선조체 퇴행 없음. α -synuclein의 병리적 축적 없음.
PINK1 modification	결손	경미한 파킨슨병 증상. 선조체 도파민 감소. 도파민 대사 증가.	단백질성 봉입체 없음. 흑질-선조체 시스템의 퇴행 없음.
LRRK modification	Knock-out	α -synuclein 축적. 자식소체 기능 장애. 세포 사멸 증가. 산화적 손상.	파킨슨병 병변 부재. 도파민계 기능 정상.
	Knock-in	진행성 운동 기능 저하. 선조체 도파민 감소. α -synuclein 축적. 흑질-선조체 도파민 신경세포의 노화 관련 퇴행.	흑질-선조체 시스템에 변화 없음. 유전자 변형 모델의 문제점: 외래 유전자 삽입 부위 문제, 프로모터 문제, 마우스 배경 계통 문제
	Point mutations	도파민 관련 병리의 영역. 연령 관련 운동 기능 장애. 선조체 도파민 대사의 연령 관련 감소.	신경퇴행성 변화의 증거가 거의 없음.

4. 파킨슨병(PD) 연구에 활용이 가능한 인체-기반 MAMs

1) 비임상 연구 및 NAMs 방향성

- Williams-Gray 등(2013)의 10년 추적조사의 코호트 연구를 통해 약물에 대한 파킨슨병 환자 집단의 이질성(heterogeneity)에 기인하여 치료제는 겨우 환자집단의 23%에서 효능이 확인됨.
- 이와 같이 **치료제의 낮은 치료율은 파킨슨 환자의 다양한 하위군에 대한 연구가 지나치게 단순화되고 대표성이 부족한 동물질환모델을 사용에 기인함.** 환자 집단의 이질성을 줄이기 위한 하위집단을 위한 효과적인 질병 수정 치료법이 요구되며 좀 더 <표-2>에서 처럼 **세부적인 비임상연구 및 인체- 및 비동물-신규 평가방법(NAMs; New Approach Methodologies)**가 필요한 실정임(Cassotta 등, 2022).

<표-2> 인체- 및 비동물-신규 평가방법(NAMs; New Approach Methodologies)

(1) In vitro 모델			
In vitro	세포주 종류	질환 특성	고려할 점
인간 세포주	불멸화된 세포주 (예: SH-SY5Y, NTERA-2, LUHMES)	도파민성 뉴런의 특성(예: tyrosine hydroxylase 발현). 파킨슨병 관련 유전자 발현. 스트레스 또는 독소에 의존적인 α -synuclein 증가가 응집체 유발 신경퇴행을 초래	불멸화됨; 단일 배양은 복잡한 뇌를 대표하지 못함. 즉 분리되어 있으며, 지지 조직이 결여됨.
	줄기세포	도파민성 신경세포 유형. 비파킨슨병 대조군 세포 대비 증가된 α -synuclein 단백질. 감소된 신경돌기 성장 및 증가된 자가포식 소포. 자가이식을 위한 조직 생성	단일 배양은 복잡한 뇌를 대표하지 않음. 즉, 고립된 배양, 다른 지지 조직 없음 등. 파킨슨 환자의 줄기세포 추출이 필요함.
(2) In silico model			
In silico	방법	주요 표적 또는 기전 확인	고려할 점
경로-기반 접근법	Adverse outcome pathway(AOP)	미토콘드리아 기능 장애 메커니즘.	AOP 위키 (https://aopwiki.org/aops/3)는 지속적으로 생산되고 있지만 기전적 지식은 아직 완전하지 않고 또한 동물 실험 데이터를 기반으로 하는 것이 문제점
Imaging	Positron emission tomography (PET)	특이적 추적자(특정 표지자)를 통해 파킨슨병을 다른 질환과 구별이 가능. 증상 발현 이전 도파민 신경퇴행의 생체표지자 응용.	모든 환자에게 적용이 가능하지 않음. 방사성 추적자 사용 가능. 고비용. 파킨슨병 초기 단계에서는 이용의 제한점
	Functional MRI	신경 활동 매핑을 통해 치	표준화된 방법론의 부재와

		료에 따른 시간 경과에 따른 악화/변화 측정 가능	영상 아티팩트
	Single photon-emission computed tomography (단일 광자방출컴퓨터단층촬영)	초기 임상 진단을 개선 효과. 질병 진행 및 치료 효과를 모니터링 가능. 비정형 파킨슨병과 파킨슨병을 구분 가능	PET보다 낮은 해상도와 정량화에 어려움.
	Magnetoencephalography(자기뇌파검사)	약물이 뇌파 활동에 미치는 영향 정량화. 파킨슨병의 새로운 신경생물학적 지표 확인. 파킨슨병 진단.	결함에 예민한 기록과 고비용. 표준화 부족.
<참고문헌>	Cassotta 등, 2022		

5. 결론

- 파킨슨병 치료제 개발 과정에서 동물-기반 전임상 시험 결과가 임상 적용에 실패하는 데는 여러 이유가 있음. 파킨슨병 치료를 위한 동물모델 266건의 연구(Zeiss 등, 2017)에 대해 전임상의 후향적 데이터 분석이 이루어졌음(Zeiss 등, 2017). 마우스를 대상으로 한 연구의 90%, 랫드를 대상으로 한 연구의 95%, 비인간 영장류를 대상으로 한 시험의 67~80%에서 파킨슨병의 진행에서 개선이 되었음이 확인됨. 그러나 인간 대상 시험에서는 단 32%만이 임상적 개선이 확인되었음(Zeiss 등, 2017). 이와 같은 결론을 통해 전임상 연구의 실험적 세부 사항을 검토뿐만 아니라 다음과 같은 여러 편향적 디자인에 대한 면밀한 이해가 요구됨.
 - ① 비인간 영장류를 대상으로 한 연구에서는 성별 편향이 나타나지 않았으나, 주로 젊은 성체를 사용하였음.
 - ② 마우스 모델을 사용한 연구에서는 수컷 동물을 주로 사용했으며, 특정 유전자 계통이 우세하였음.
 - ③ 랫드를 대상으로 한 연구에서도 수컷 편향이 관찰되었으나, 더 다양한 유전자 계통을 사용하였음.
- 동물모델의 내적·외적 타당성 문제와 더불어 동물과 인간의 치료 반응 간 일치도가 낮다는 점은 **더 깊고 넓은 인체-관련성 방법 개발에 집중할 필요성**을 제시하는 것임. 파킨슨병 분야는 더 좋은 바이오마커, 조기 진단, 질병 기전 이해도 향상, 환자의 하위집단 이질성을 극복하기 위한 질병의 특이적 유형의 명확한 분류를 기반한 임상시험 설계 등이 요구됨
- <표-2>와 같이 파킨슨병 연구를 위한 NAMs가 다양성하게 존재함, 그러나 각 방법에 있어서 잠재력과 한계 또한 존재함. 그러나 이들 NAMs는 화학적으로 손상된 설치류 및 비인간 영장류의 동물모델보다 질병 발병 및 진행 과정을 좀 더 세밀하게 관찰이 가능하다고 사료됨.

<참고문헌>

Samii A, Nutt JG and Ransom BR. Parkinson's disease. Lancet 2004; 363: 1783–1793.

GBD 2016 Parkinson's disease collaborators. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurology 2018; 17: 939–953.

Stocchi, F., Bravi, D., Emmi, A. et al. Parkinson disease therapy: current strategies and future research priorities. Nat Rev Neurol 20, 695–707 (2024).

Colleen Doherty, Parkinson's Disease Treatment; Drugs, Surgery, and Everything in Between. <https://www.verywellhealth.com>. 2025

Williams-Gray CH, Mason SL, Evans JR, et al. The CamPaIGNstudy of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013; 84: 1258–1264.

Zeiss CJ, Allore HG and Beck AP. Established patterns of animal study design undermine translation of disease modifying therapies for Parkinson's disease. PLoS One 2017; 12: e0171790.

GBD 2016 Parkinson's disease collaborators. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurology 2018; 17: 939–953.

Bloem BR, Beckley DJ, van Dijk JG, et al. Influence of dopaminergic medication on automatic postural responses and balance impairment in Parkinson's disease. Mov Disord 1996; 11: 509–521.

Michael J, Fox Foundation. The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research 2015 Annual Report, <https://www.michaeljfox.org/2019-2020-annual-report-milestones-and-momentum> (2016, accessed 12 January 2023).

Parkinson's Foundation. Statistics, <https://www.parkinson.org/UnderstandingParkinsons/Statistics> (2022, accessed 12 January 2023).

Reeve A, Simcox E and Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? Ageing Res Rev 2014; 14: 19–30.

Aarsland D and Kurz MW. The epidemiology of dementia associated with Parkinson disease. J Neurol Sci 2010; 289:18–22

Hemmer K, Smits LM, Bolognin S, et al. In vivo phenotyping of Parkinson-specific stem cells reveals increased α -synuclein levels but no spreading. bioRxiv 2017, DOI: <https://doi.org/10.1101/140178>

Hauser RA. Parkinson disease treatment & management, <https://emedicine.medscape.com/article/1831191-treatment> (2019, accessed 13 January 2023).

Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, et al. Animal models of Parkinson's disease. Challenges in Parkinson's disease, <http://dx.doi.org/10.5772/63328> (2016, accessed 31 January 2023).

Cassotta M, Geerts H, Harbom L, et al. The future of Parkinson's disease research: A new paradigm of human specific investigation is necessary, and possible. ALTEX 2022; 39: 694–709.

85. 류머티즘성 관절염 치료제의 반응률 임계치와 NAMs

1. 류머티즘성 관절염의 특성

- 류머티즘성 관절염(Rheumatoid arthritis, RA)은 지속적인 활막염과 다양한 정도의 뼈 및 연골 침식으로 특징지어지는 만성 자가면역 질환이며, 결국 관절 파괴를 초래하여 통증과 장애를 유발(Gibofsky, 2012).
- 류마티스 관절염과 관련된 전신성 염증은 관절 외 심혈관계 질환 등을 포함한 동반 질환과 연관되어 있기 때문에 류마티스 관절염 환자의 사망률을 증가시킴(Gibofsky 등, 2014).
- 류머티즘성 관절염은 유전적 및 환경적 요인에 의해 좌우되지만, 질병 발병 위험의 약 50%는 흡연과 같은 환경적 요인에 기인함(Tobon 등, 2010). 선진국에서는 인구의 약 1%가 류마티스 관절염을 앓고 있어 가장 흔한 염증성 관절염 형태. 중년기에서 발병하며, 현재 이용 가능한 약물 치료법이 있음에도 불구하고 상당한 사회적·경제적 영향을 미치는 질환임(Roodenrijs 등, 2022; Bogas 등, 2017).

2. 류머티즘성 관절염의 치료제 개발 현황과 환자 반응률의 임계치

1) 류머티즘성 관절염의 치료제 개발 현황

- 류마티스 관절염의 현재 치료 옵션에는 비스테로이드성 항염증제, glucocorticoids과 질병조절항류마티스제(DMARDs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs)은 conventional synthetic(cs) DMARDs, biological(b) DMARDs 그리고 targeted synthetic(ts) DMARDs 등으로 분류됨.
- **csDMARDs**는 methotrexate, leflunomide과 sulfasalazine, **bDMARDs**로는 TNF 저해제인 infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab pegol과 golimumab 등, T 세포 공동 자극 억제제인 abatacept, differentiation 20(CD20) inhibitor 클러스터인 rituximab, IL-6R inhibitor인 tocilizumab와 sarilumab 등, **tsDMARDs**로는 JAK inhibitor인 tofacitinib, baricitinib과 upadacitinib 등이 있음(Smolen 등, 2020).
- 고무적으로 csDMARDs, bDMARDs 및 tsDMARDs가 개발되면서 RA의 치료 결과가 점차 개선되었음에도 불구하고, DMARDs 단독요법 또는 병용요법을 시행한 RA 환자를 대상으로 한 다양한 임상시험에서 **최고 반응률에 임계치는 약 40-60%에 머무는 것으로 확인됨** (Wang 등, 2021; Taylor 등, 2016).
- 생물학적 치료제의 가용성 증가로 류마티스 관절염 환자의 예후는 크게 개선되었으나, **여전히 효과적인 치료법이 없는 쇠약성 만성 질환으로 남아 있음**

2) 임상시험에서 최고 반응률에 임계치 약 40-60%에 대한 예시와 부작용

- 반응 임계치의 대표적인 문제점은 다양한 유형의 DMARDs의 작용 기전이나 CD20, TNF, IL-6, CD80-CD86, JAK-STAT 경로와 같은 다양한 특정 세포, 분자 및 신호 전달 표적과 무관하게 관찰된다는 점임(Favalli 등, 2017; Feldmann 등, 2015).
- 예를 들어 약물에 만족스러운 반응을 보이지 않는 환자에게 bDMARD인 종양괴사인자- α 억제제(TNF- α inhibitor)가 추가 투여하여 류마티스 관절염을 치료가 이루어지고 있음. 그러나 TNF- α 차단제로 치료받은 환자의 약 40%는 여전히 치료에 반응하지 않음(Wijbrandts 등, 2017). 또한 초기 반응자이라도 최대 50%는 치료 시작 후 12개월 이내에 반응을 상실함(Buch 등, 2007; Juarez 등, 2012).
- 약물은 평생 치료가 필요하지만, 독성 발현 및 감염이나 암 발생 위험 증가 등과 같은 심각한 전신적 부작용(systemic adverse effects)의 발생이 보고됨(Wang 2018; Liao 등, 2017; Atzeni 등, 2012; Haynes 등, 2013).

3. 치료제 개발을 위한 In vitro 모델 및 동물질환모델의 한계점

1) In vitro 모델의 대표적인 예시와 단점

- 지금까지 RA는 주로 다양한 체외 분석법과 동물 모델을 통해 연구되어 왔음. 세포 기반 체외 분석법은 비교적 단순한 배양 시스템을 기반으로 세포 부착, 세포 이동, 항원 제시 및 림프구 활성화를 조사하는 데 사용되었음(Pretzel 등, 2007; Giese 등, 2014)
- **예시:** 전통적인 인간 활막 세포 배양은 TNF- α 차단제 개발에 결정적인 역할을 해왔으며, 이는 현재까지 질병 진행을 늦추고 증상을 완화하는 데 가장 성공적인 치료법임(Brennan 등, 1989).
- **단점:** 정적이며 비생리적 조건(예: 플라스틱 배양 용기 내)에서 세포 및 조직을 배양하거나 암 세포주를 사용하는 것은 결과의 현실성에 심각한 영향을 줌(Pamies 등, 2017; Di Nardo 등, 2011).

2) In vivo 모델의 대표적인 예시와 단점

- 모델 예시: 마우스, 랫드, 토끼, 원숭이 등의 다양한 종에서 유래한 많은 전임상 관절염 모델이 개발되었음. 항원-유도성 관절염 모델로는 프로테오글리칸-유도 관절염(proteoglycan-induced arthritis), 연쇄상구균 세포벽-유도 관절염(streptococcal cell wall arthritis), 콜라겐-유도 관절염, 항원-유도 관절염(antigen-induced arthritis)등으로 면역반응이 요구되는 모델 등이 있음(Brand 등, 2005). 또한 보조제(예: oil-induced arthritis)에 의해 유도된 모델, TNF- α transgenic mouse과 K/BxN T-cell receptor transgenic mouse 등과 같은 자연발생 모델(spontaneous models), 인간화 모델(humanised model) 등이 있음(Hopkins 등, 1984; Donaldson 등, 2007; Butler 등, 1997; Kouskoff 등, 1996; Schinnerling 등, 2019).

- **단점:** 위와 같은 류마티스 관절염-유사 설치류 모델(RA-like rodent models)은 관절 부종, 활막염, 판누스 형성 및 골 침식 등 류마티스 관절염에서 발견되는 전형적인 특징 일부를 나타냄. 그러나 각 모델은 질병 발병 속도, 만성화 정도, 중증도, 회복 및 조직병리학 측면에서 차이가 있음(McNameee 등, 2015). 특히 이들 설치류 모델들은 각각 조직병리학적으로 차이가 있을 뿐만 아니라, 인간 류마티스 관절염의 조직병리학적 측면에서도 차이가 있음.
- **동물모델의 문제점 예시-1:** 위와 같은 모델 중 어느 것도 진정한 류마티스 관절염(RA)을 재현하지 않으며, 환자에서 치료제의 효과를 일관되게 예측하지 못하고 있음. 예를 들어, 현재까지 RA 치료의 1차 DMARD인 메토트렉세이트는 콜라겐-유도 관절염 모델에서 극히 제한적인 효과만을 보이고 있음. 인터루킨-6 결핍은 관절염의 수동적 전이 모델이나 TNF 트랜스제닉 의 인간화 마우스에서도 거의 효과가 없었음(Shultz 등, 2012)
- **동물모델의 문제점 예시-2:** 류마티스 관절염에 널리 사용되는 차세대 치료제인 항-CD20 항체는 질병 유발 초기 단계에 투여할 때만 콜라겐-유도 관절염 모델에서 효과가 있으며, 후기 단계에서는 효과가 없었음(Hegen 등, 2008).
- **동물모델의 문제점 예시-3:** 비스테로이드성 항염증제는 쥐의 보조제 관절염에서는 현저히 효과적이지만, 류마티스 관절염 환자에게는 미미한 완화 효과만이 확인되었음(Firestein 등, 2009)

4. 류머티즘성 관절염 치료제 개발을 위한 NAMs

- 다양한 동물모델이 류마티스 관절염의 근본적으로 면역학적 기전 이해에 기여한 것은 분명하지만 임상 개발 단계에서 신약 후보물질의 낮은 성공률에 대한 우려와 통증을 유발하는 동물 모델 사용에 대한 윤리적 문제 인식이 높아지고 있음. 이에 따라 **복잡한 인간 질환 연구에서의 유용성과 약물 표적 식별 효과성에 대한 의문이 제기되고 있음**(Leist 등, 2013; van de Stolpe 등, 2015; Wagar 등, 2018; Davis 등, 2008; Khanna 등, 2011).
- 이와 같은 의문이 제기되고 있고 이를 극복하기 위해서는 **인체-기반 첨단 접근법 및 인체- 및 비동물-신규 평가방법인 NAMs(NAMs; New Approach Methodologies)을 <표-1>에 서술됨.** 특히 줄기세포 기술, 미세공학, 미세유체학, 컴퓨팅 파워, 인공지능 및 관련 다학제적 협력 분야의 최근 발전은 복잡한 인간 질환을 연구하는 대담한 새로운 방식을 제시하고 광범위하며 의미 있는 인간 관련 데이터를 산출하는 놀라운 연구 접근법임.

<표-1> 류마티스 관절염(RA) 연구에 적합한 인간 기반 도구, 모델 및 접근법		
인간 기반 도구/모델/접근법	응용 및 표적	참고문헌
역학 연구, 무작위 대조 임상 시험	<ul style="list-style-type: none"> 임상적 특징, 류마티스 관절염 관련 위험 인자 (예: 유전적 취약성, 흡연, 식이 등 환경적 유발 요인), 동반 질환(예: 비만, 심혈관 질환 등)을 확인하기 위함 	Zhang 등, 2025
다중 오믹스, 고처리량 단일 세포 기술, 고함량 분석법	<ul style="list-style-type: none"> 류마티스 관절염 위험 관련 유전자 평가: 다양한 질병 하위 표현형과 연관된 유전적 요인 분석, 약물의 분자적 효과 규명 진단 지원: 다양한 관절염 유형 간 감별, 질병 기전 이해 증진, 조기 바이오마커 탐지 RA 신호전달 경로 평가. 	Marshall 등, 2025; Gong 등, 2024
환자 유래 샘플(예: 혈액), 세포 및 조직, 그리고 첨단 세포 및 조직 모델(예: 3차원 공학적 세포 배양, 환자 유래 오가노이드, 난자 외 세포(OOCs), 다중 세포 시스템(MPS))	<ul style="list-style-type: none"> 류마티스 관절염(RA)의 조기 바이오마커를 규명하고 환자 특이적 유도만능줄기세포(iPSCs)를 생성 환자 이질성을 고려하며, 생리학적 관련성을 고려한 방식으로 인간 세포 및 조직을 배양. 질병 발병 및 진행에 관여하는 세포 및 분자적 요인을 독립적으로 조절 및 변형하여 다기관 수준에서 RA 발병 과정과 영향을 연구 OOCs = organs-on-chips; MPS = microphysiological systems 	He 등, 2025; Siwei 등, 2023; Calvo 등, 2017
hiPSCs(human induced pluripotent stem cells, 인체유도만능줄기세포)	<ul style="list-style-type: none"> 류마티스 관절염(RA)의 유전적 기여도를 연구하고, 환자로부터 유래한 인간 유도만능줄기세포(hiPSCs) 특유의 이질성을 포착하기 위함. 유전체 편집 기술(예: CRISPR/Cas9)을 활용하여 RA 관련 특정 유전자의 서열을 추가하거나 변형시키고, 이를 iPSC 유래 분화 세포(예: 심근세포)에 미치는 영향을 측정 맞춤형 또는 정밀 치료법을 설계할 수 있음 	Wolnik 등, 2022; Cerneckis 등, 2024
Computational modelling	<ul style="list-style-type: none"> 환자의 생물학적 샘플, 실험실 결과, 병력, 치료 및 결과에 대한 대규모 다차원적 컬렉션을 분석 분자 및 신호 전달 경로 연구 및 약물의 효과를 모방하기 위함 	Shi 등, 2024; Nabi 등, 2024

5. 결론

- 류마티스 관절염(RA)은 염증과 골파괴를 특징으로 하는 자가면역 질환임. RA의 정확한 기전은 아직 알려지지 않았으나, 다양한 면역 사이토카인, 신호전달 경로 및 주효 세포 (effector cells)가 관여하는 질환임.
- 고무적으로 csDMARDs, bDMARDs 및 tsDMARDs가 개발되면서 RA의 치료 결과가 점차 개선되었음에도 불구하고, DMARDs 단독요법 또는 병용요법을 시행한 RA 환자를 대상으로 한 다양한 임상시험에서 최고 반응률에 임계치는 약 40-60%에 머무는 것으로 확인됨
- 개별 환자에게 특정 DMARD를 권장하기에는 이러한 노력들이 아직도 턱없이 부족하다는 점을 인식하고 있고 질병 관리에 대한 고도로 개인화되고 맞춤형 접근법을 제안하는 신형 의료 모델을 위한 NAMs가 <표>에서처럼 다양한 측면에서 개발되고 있음.
- 특히 다양한 첨단 기술과 빅데이터의 도입과 함께 류마티스 관절염 치료 실패 극복을 위한 정밀의학 잠재력을 위한 이들 NAMs는 동물과 인체 차이를 줄이면서 보다 정밀한 병인의 확인을 통해 임상시험에서 최고 반응률에 임계치인 약 40-60%를 훨씬 넘는 거대한 진전을 가져올 것으로 사료됨.

<참고문헌>

- Smolen JS, Landewe RBM, Bijlsma JWW, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis With Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2019 Update. *Ann Rheum Dis* (2020) 79(6):685–99.
- Zhang, Z., Gao, X., Liu, S. et al. Global, regional, and national epidemiology of rheumatoid arthritis among people aged 20–54 years from 1990 to 2021. *Sci Rep* 15, 10736 (2025).
- Marshall, L., Raychaudhuri, S. & Viatte, S. Understanding rheumatic disease through continuous cell state analysis. *Nat Rev Rheumatol* 21, 323–335 (2025).
- Gong X, Su L, Huang J, Liu J, Wang Q, Luo X, Yang G and Chi H (2024) An overview of multi-omics technologies in rheumatoid arthritis: applications in biomarker and pathway discovery. *Front. Immunol.* 15:1381272
- He, C., Ren, Z., Xia, X. et al. A single-cell RNA-seq dataset of synovial fluid from rheumatoid arthritis treated with TNF- α /JAK inhibitor. *Sci Data* 12, 977 (2025).
- Siwei Wang et al., Advances in experimental models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 2023;53:2249962.
- Calvo IO, Byrne RA, Karonitsch T, et al. 3D synovial organoid culture reveals cellular mechanisms of tissue formation and inflammatory remodelling. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2017;76:A49-A50.
- Wolnik J, Kubiak G, Skoczyńska M, Wiland P, Fearon U, Veale D, Dulak J, Binińska M. Generation of two hiPSC lines, (DMBi003-A and DMBi004-A), by reprogramming peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Stem Cell Res.* 2022 Oct;64:102886.
- Cerneckis, J., Cai, H. & Shi, Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Sig Transduct Target Ther* 9, 112 (2024).
- Shi Y, Zhou M, Chang C, Jiang P, Wei K, Zhao J, Shan Y, Zheng Y, Zhao F, Lv X, Guo S, Wang F and He D (2024) Advancing precision rheumatology: applications of machine learning for rheumatoid arthritis management. *Front. Immunol.* 15:1409555.
- Nabi T, Riyed TH, Ornob A. Deep learning based predictive modeling to screen natural compounds against TNF-alpha for the potential management of rheumatoid arthritis: Virtual screening to comprehensive in silico investigation. *PLoS One.* 2024 Dec 5;19(12):e0303954.
- Favalli EG, Raimondo MG, Becciolini A, Crotti C, Biggioggero M, Caporali R. The Management of First-Line Biologic Therapy Failures in Rheumatoid Arthritis: Current Practice and Future Perspectives. *Autoimmun Rev* (2017) 16(12):1185–95.
- Feldmann M, Maini R. Can We Get Closer to a Cure for Rheumatoid Arthritis? *Arthritis Rheumatol* (Hoboken NJ) (2015) 67(9):2283–91.

Wang Z, Huang J, Xie D, He D, Lu A and Liang C (2021) Toward Overcoming Treatment Failure in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 12:755844.

Hay M, Thomas DW, Craighead JL, et al. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 40–51.

Hartung T. Food for thought. Look back in anger - What clinical studies tell us about preclinical work. *ALTEX* 2013;30: 275–291.

von Herrath MG and Nepom GT. Lost in translation: Barriers to implementing clinical immunotherapeutics for autoimmunity. *J Exp Med* 2005; 202: 1159–1162.

Blumberg RS, Dittel B, Hafler D, et al. Unraveling the autoimmune translational research process layer by layer. *Nat Med* 2012; 18: 35–41.

Wang Z, Huang J, Xie D, et al. Toward overcoming treatment failure in rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 2021;12: 755844.

Leist M and Hartung T. Inflammatory findings on species extrapolations: Humans are definitely no 70-kg mice. *Arch Toxicol* 2013; 87: 563–567.

van de Stolpe A and Kauffmann RH. Innovative human specific investigational approaches to autoimmune disease. *RSC Advances* 2015; 5: 18451–18463.

Wagar LE, DiFazio RM and Davis MM. Advanced model systems and tools for basic and translational human immunology. *Genome Med* 2018; 10:73.

Davis MM. A prescription for human immunology. *Immunity* 2008; 29: 835–838.

Khanna R and Burrows SR. Humanimmunology: A case for the ascent of non-furry immunology. *Immunol Cell Biol.* 2011; 89: 330–331.

Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 2012; 18: S295–S302.

Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A synopsis. *Am J Manag Care* 2014; 20: S128–S135.

Tobon GJ, Youinou P and Saraux A. The environment, geoepidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010; 35: 10–14.

Roodenrys NMT, Welsing PMJ, van Roon J, et al. Mechanisms underlying DMARD inefficacy in difficult-to-treat rheumatoid arthritis: A narrative review with systematic literature search. *Rheumatology (Oxford)* 2022; 61: 3552–3566.

Bogas P, Plasencia C, Pascual-Salcedo D, et al. SAT0168 discontinuation of first biologic therapy in rheumatoid arthritis: Main causes and correlation between secondary inefficacy and development of immunogenicity. *Ann Rheum Dis* 2017; 76(Suppl. 2): 833–834.

Wijbrandts CA and Tak PP. Prediction of response to targeted treatment in rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 1129–1143.

Buch MH, Bingham SJ, Bryer D, et al. Long-term infliximab treatment in rheumatoid arthritis: Subsequent outcome of initial responders. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46:1153–1156.

Juarez M, Filer A and Buckley CD. Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13529.

Wang W, Zhou H and Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur J Med Chem* 2018; 158: 502–516.

Liao H, Zhong Z, Liu Z, et al. Comparison of the risk of infections in different anti-TNF agents: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 2017; 20: 161–168.

Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Botsios C, et al. Long-term anti TNF therapy and the risk of serious infections in a cohort of patients with rheumatoid arthritis: Comparison of adalimumab, etanercept and infliximab in the GISEA registry. *Autoimmun Rev* 2012; 12: 225–229.

Haynes K, Beukelman T, Curtis JR, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibitor therapy and cancer risk in chronic immune-mediated diseases. *Arthritis Rheum* 2013; 65:48–58.

Taylor PC, Moore A, Vasilescu R, et al. A structured literature review of the burden of illness and unmet needs in patients with rheumatoid arthritis: A current perspective. *Rheumatol Int* 2016; 36: 685–695.

Pretzel D, Pohlers D, Weinert S, et al. In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R25.

Giese C and Marx U. Human immunity in vitro - solving immunogenicity and more. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 6970: 103–122.

Brennan FM, Jackson A, Chantry D, et al. Inhibitory effect of TNFalpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989; 334:244–247.

Pamies D and Hartung T. 21st century cell culture for 21st century toxicology. *Chem Res Toxicol* 2017; 30: 43–52.

Di Nardo P, Minieri M and Ahluwalia A. Engineering the stem cell niche and the differentiative micro- and macro environment: Technologies and tools for applying biochemical, physical and structural stimuli and their effects on stem cells. In: Artmann G, Minger S and Hescheler J (ed) *Stem cell engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011, pp. 41–59.

Brand DD. Rodent models of rheumatoid arthritis. *Comp Med* 2005; 55: 114–122.

Hopkins SJ, Freemont AJ and Jayson MIV. Pristane-induced arthritis in Balb/c mice I. Clinical and histological features of the arthropathy. *Rheumatol Int* 1984; 5: 21–28.
Donaldson L and Chillingworth N. Arthritis model, adjuvant-induced arthritis. In: Schmidt R and Willis W (eds) *Encyclopedia of pain*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007, pp. 111–115.

Butler DM, Malfait AM, Mason LJ, et al. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: Characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol* 1997; 159: 2867–2876.

Kouskoff V, Korganow A-S, Duchatelle V, et al. Organ specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996; 87: 811–822.

Schinnerling K, Rosas C, Soto L, et al. Humanized mouse models of rheumatoid arthritis for studies on immunopathogenesis and preclinical testing of cell-based therapies. *Front Immunol* 2019; 10: 203.

McNamee K, Williams R and Seed M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? *Eur J Pharmacol* 2015; 759: 278–286.

Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, et al. Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:786–798.

Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1505–1515.

Firestein GS. Rheumatoid arthritis in a mouse? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009; 5:1.

86. 침팬지를 이용한 HIV/AIDS 백신 시험에서 인간으로의 외삽에 대한 현실성 평가

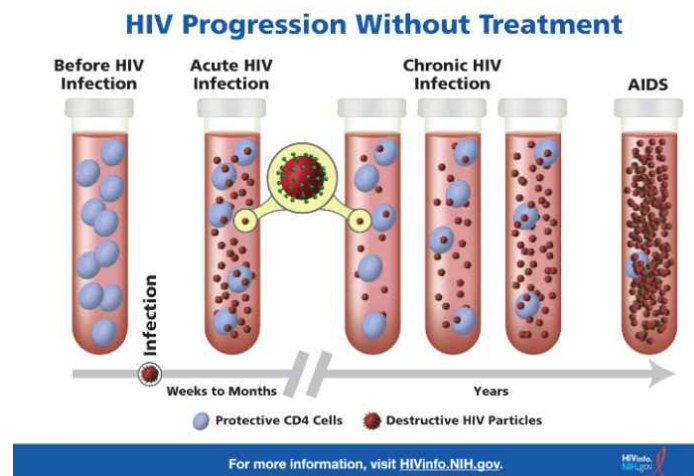
(본 리포트는 아래의 내용이 제외되어 작성되었음을 미리 알려드립니다)

- Lenacapavir (branded as Yeztugo)의 6개월간 보호 효과를 제공하는 최초이자 유일한 FDA 승인 HIV 예방 백신(Gilead, 2025)
- 2025년의 백신 개발의 주요 이정표는 연간 단 두 번의 주사로 HIV 예방이 가능한 **Lenacapavir (branded as Yeztugo)**의 FDA 승인이었음.
- 임상시험에서 남성 간 성관계를 가진 남성 및 시스젠더 여성 대상 효능은 거의 100%에 달하였음. 글로벌 라이선싱 계약을 통해 Gilead는 120개국 이상에서 로열티 없는 생산을 마련했으나, 초기 비용과 유통 장벽은 여전히 상당함.
- 르완드의 수도, 키갈리에서 열린 IAS(국제에이즈학회) 2025에서 WHO는 레나카파비르(Lenacapavir) 주사제 사용을 권고하는 새로운 지침을 발표했으며, MERCK의 카보테그라비르(Cabotegravir, CAB)/릴피비린(Rilpivirine, RPV)는 월 1회 또는 2개월에 1회 투여 방식으로 계속해서 출시되고 있음

1. HIV/AIDS의 개념과 백신 개발 현황

1) 개념과 발생률

- HIV 바이러스(human immunodeficiency virus, 인간 면역결핍 바이러스)는 사람의 면역 체계를 공격해 면역력을 떨어뜨리는 바이러스. <그림>에서처럼 HIV 감염으로 인체의 면역력이 상당히 저하되면 감염증이나 종양이 나타나기 시작하는데, 이를 후천성면역결핍증후군(AIDS, acquired immunodeficiency syndrome)이라고 함(An official website of the United States government, 2025).



- HIV는 여전히 세계에서 가장 도전적인 감염병 중 하나로, 2020년 한 해에만 150만 명의 신규 감염자와 68만 명의 사망자가 발생(Fortner 등, 2022)
- 이와 같은 심각한 글로벌 문제임에도 불구하고 1984년 미국 보건복지부 장관은 2년 내 백신 개발 선언과 클린턴 대통령의 2007년을 목표 제시도 약속에 그쳤음.

2) 백신 개발 현황

- HIV 백신 연구는 1980년대 후반에 시작되었으며, 지난 30년 동안 수많은 백신 전략이 시험되었음. <Table 2>는 1990년부터 현재까지 진행된 주요 HIV 백신 또는 면역 전략 임상시험을 요약한 것으로, 백신 구성 요소, 플랫폼, 보조제, 임상시험 단계/대상 집단, 유효성 또는 결과를 나타낸 것임(Shim 등, 2025). 이와 같이 약 20년간의 노력에도 불구하고 성공적인 인간용 백신으로 이어지지는 못하였음.
- 1990년대의 초기 접근법은 **재조합 HIV 외피 당단백 서브유닛 백신**(예: AIDSVAX gp120 백신)을 이용한 항체 반응 유도에도 초점을 맞췄으나(Adis International, Ltd, 003), 최초의 3상 임상시험(북미/유럽의 VAX004 및 태국의 VAX003)에서는 예방 효능이 입증되지 않았음(Corey 등, 2013)
- 2000년대에 이어진 **T-세포 백신 전략**은 아데노바이러스 5형과 같은 바이러스 벡터를 이용해 강력한 CD8+ T세포 면역을 유도하였음(Buchbinder 등, 2008). 2004년부터 2007년까지 진행된 STEP 임상시험은 감염 예방이나 바이러스 부하 감소에 실패했을 뿐만 아니라 특정 백신 접종자 하위집단에서 오히려 감염률이 더 높게 나타났음(Corey 등, 2013).
- 2009년 태국에서 진행된 RV144 시험은 전환점이 되었음(Rerks-Ngarm 등, 2009). 카나리 아포스 벡터(ALVAC)와 gp120 단백질을 이용한 **이종 프라임-부스트 요법(A heterologous prime-boost regimen)**으로, HIV 감염 위험을 31.2% 다소 감소시키는 것으로 확인되었음(Esparza, 2013). RV144는 HIV 백신이 인간을 보호할 수 있다는 첫 개념 증명(proof-of-concept)을 제공했으며, 이 결과를 개선하기 위한 새로운 임상시험 물결을 촉발하였음.
- 이후 **다양한 플랫폼((DNA, viral vectors, protein subunits, mRNA vaccines)과 새로운 면역원(mosaic antigens, stabilized envelope trimers, etc.)**을 평가하는 주요 유효성 시험 및 다수의 1/2상 연구가 수행되었으며, **광범위 중화 항체(broadly neutralizing antibodies, bnAbs)**를 이용한 수동 면역 접근법(passive immunization approaches)도 병행되었음(Haynes 등, 2023).
- 그러나 **비인간-영장류(침팬지와 마카크 원숭이 등의 non-human primate, NHP)에서 고무적인 결과를 보인 85종의 서로 다른 백신 제품이 197건의 임상시험으로 이어졌으나, 약 20년간의 노력에도 불구하고 성공적인 인간용 백신으로 이어지지는 못했음**(Shim 등, 2025; Marshall 등, 2023)

Table 2. The table below summarizes key trials of HIV vaccine or immunization strategies from 1990 to the present, including the vaccine components, platforms, adjuvants, trial phase/population, and efficacy or outcome.

Trial	Years	Vaccine Components and Platforms	Adjuvants	Population and Phase	Outcome/Efficacy
VAX004	1998–2003	Bivalent gp120 (subtype B/B) protein subunit	Alum	MSM, High-risk Women; Phase 3	Vaccine efficacy (VE) 6% (95% CI –17 to 24)—not significant.
VAX003	1998–2003	Bivalent gp120 (subtype B/E) protein subunit	Alum	Injection drug users; Phase 3	VE 0% (95% CI –7 to 6). Highlighted limited protection from single protein immunogens.
STEP (HVTN 502)	2004–2007	Recombinant Ad5 vector encoding gag, pol, nef	None	MSM; Phase 2b	VE –18% overall; HR 1.4 (Ad5-seropositive uncircumcised subgroup). Indicates possible increased risk in some Ad5-seropositive individuals.
Phambili (HVTN 503)	2007	Recombinant Ad5 vector encoding gag, pol, nef	None	General; Phase 2b	Halted due to STEP results; Interim VE –69% (wide CI)
RV144	2003–2009	Canarypox vector (ALVAC) prime; gp120 protein boost (AIDSVAX B/E)	Alum	General community; Phase 3	VE 31.2% (95% CI 1.1–52.1) at 42 months, Demonstrated importance of prime-boost approach.
HVTN 505	2009–2013	DNA plasmid prime (Env, Gag, Pol, Nef) and Ad5 vector boost (Env, Gag-Pol)	None	MSM, Trans women; Phase 2b	VE –25%; $p = 0.44$. Underscored limits of DNA/ Ad5 platform for HIV prevention.
HVTN 100	2015	ALVAC-HIV (subtype C Env, clade B Gag/Pol) prime; gp120 protein boost	MF59	General; Phase 1b	Immunogenic. 80% V1V2-IgG responders; GMT 1:–6300, but neutralization limited to Tier-1 strains
HVTN 702 (Uhambo)	2016–2020	ALVAC-HIV subtype C prime; gp120 subtype C protein boost	MF59	Adults at risk; Phase 2b/3	HR 1.02 (95% CI 0.81–1.30) → 0% VE. Illustrated challenges in translating RV144 efficacy to different populations and HIV strains.
Imbokodo (HVTN 705)	2017–2021	Ad26 vector mosaic Env, Gag-Pol prime; subtype C gp140 protein boost	Alum	High-risk women; Phase 2b	VE 14% (95% CI –22 to 40) months 7–24. Highlighted difficulties in inducing protective immune responses against diverse HIV variants.
Mosaico (HVTN 706)	2019–2023	Ad26 vector mosaic Env, Gag-Pol prime; mosaic gp140 protein boost	Aluminum Phosphate	MSM, Transgender; Phase 3	Futility stop; VE $\approx 0\%$. Further indicated limitations of mosaic immunogen approaches.
AMP Studies (HVTN 703/704)	2016–2021	Passive immunization with VRC01 bnAb	None	General; Phase 2b	Overall VE 0%; 75% VE vs. VRC01-sensitive viruses ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$), demonstrating strain specificity and need for bnAb combinations.
IAVI G001	2021	Germline-targeting eOD-GT8 60mer nanoparticle immunogen	None	General; Phase 1	97% (35/36) generated VRC01-class precursors Represents a promising new strategy for inducing bnAbs.
HVTN 302	2022–Present	mRNA vaccines encoding different stabilized HIV Env antigens	Lipid nanoparticles	General; Phase 1	Phase 1 safety; early data show >90% binding-IgG seroconversion by day 28

MSM: Men who have sex with men; bnAb: broadly neutralizing antibody; Prime boost: initial vaccination (prime) followed by later booster shots (boost) to enhance immune response; ALVAC: canarypox virus vector; Ad26/ Ad5: adenovirus serotype 26/5 vectors.

2. 백신 개발을 위한 비인간-영장류(non-human primate, NHP) 동물모델의 현실

1) HIV 백신 개발에서 NHP 모델 응용에 대한 평가의 필요성

- 비인간-영장류(침팬지와 마카크 원숭이 등의 non-human primate, NHP)에서 고무적인 결과를 보인 85종의 서로 다른 백신 제품이 197건의 임상시험으로 이어졌으나, 약 20년간의 노력에도 불구하고 성공적인 인간용 백신으로 이어지지 못했음.
- 이와 같은 사실은 **NHP-동물모델**에서 인간에게 유익한 결과를 도출하는데 성공이나 희망이 있었는가, 아니면 여전히 실패하고 있는가에 대한 평가가 필요함.
- 특히 **NHP와 인간 사이의 종 차이와 연구에 사용되는 인간 면역결핍 바이러스인 HIV(Human immunodeficiency virus)와 원숭이 면역결핍 바이러스인 SIV(Simian Immunodeficiency Virus) 사이의 종 차이로 인한 병리학적 차이에서 비롯된 결과임을 분명히 인식이 필요하다고 사료됨.**

2) 종간 및 SIV/HIV 병리학적 측면에서 백신 개발에서 실패 원인

2-1) 실패 원인: 비인간 영장류(NHP)와 인간 사이의 생물학적 차이, 그리고 HIV와 SIV 사이의 차이에 기인한 실패 원인은 다음과 같음

- 긴팔원숭이(cynomolgus macaques)와 인간 사이의 CD4 T-세포 및 CD8 T-세포에서 현저히 다른 전사체 프로파일(Tan 등, 2019).
- 종간 SIV 및 HIV 질병 진행과 이환율에서 성별 차이(George 등, 2019), 그리고 반응 유전자 변화 및 SIV 감염 레서스원숭이(rhesus macaques)에서 백신 유도 항체의 종별 차이 및 기능 차이가 발생함(Miller-Novak 등, 2018).
- HIV/AIDS 연구에 사용되는 다양한 NHP의 CD4 T세포에서 $\alpha 4\beta 7$ integrin(대부분의 백혈구에서 발현되는 이종 이량체 세포 표면 수용체) 발현 차이. 이 수용체는 감염의 주요 표적 중 하나이며 질병의 경과와 진행 속도에 영향을 미침(Byrareddy 등, 2015).
- HIV/AIDS 연구에 사용되는 다양한 NHP와 인간 간에 관찰되는 여러 인터페론 유도형 막 단백질(IFITM, interferon-induced trans membrane protein) 유전자의 차이점. IFITM는 SIV/HIV 감염 및 복제를 억제할 수 있음(Sharma 등, 2019).
- SIV/HIV 억제를 극복하는 Nef 및 Vpu 유전자/단백질의 종 특이성. Nef 및 Vpu 유전자는 극소수의 아미노산에 국한되어 매핑됨(Jia 등, 2009).

2-2) 중간 외삽의 영향 요인: 영장류에서 인간으로의 데이터 전환에 영향을 미칠 수 있는 주목할 만한 문제점은 다음과 같음(Del Prete 등, 2016).

- HIV의 인간 감염 경로는 상대적으로 잘 이해되지 않으며, 이는 영장류 모델링에 영향을 미침.
- NHP를 대상으로 한 많은 전파 및 바이러스 노출 연구에서 무세포 바이러스 저장액 (cell-free virus stocks)을 사용되었음. 이는 감염 세포 사용과 같은 잠재적으로 더 관련성 높은 방법들이 대부분의 NHP 연구에서 생략된다는 것을 의미함
- NHP에서는 정맥 내 전파 경로가 자주 사용되지만, 이는 HIV 전파와 관련하여 임상적 측면에서 관련성이 가장 낮다는 것을 의미함
- NHP 프로토콜은 대량의 체액과 다수의 바이러스 입자를 포함하는 경우가 많으며, 이는 인간 전파를 모사하는 데 적합하지 않음.
- NHP에서 사용되는 점막 감염 실험이 인간 관련성 측면에서 우려가 제기되어 왔음.
- **유전자 조작을 통해 HIV 복제에 필수적인 것으로 알려진 단백질이 <참고자료-1>에서처럼 존재함.** 이들 단백질은 유전자 변형되지 않은 원숭이와 연구에 사용되는 소동물 모델에서는 결핍됨. 특히 이들 단백질을 발현하도록 설계된 유전자 변형 동물조차도 강력한 바이러스 복제나 질병 발병을 지원하지 못한다고 알려졌다. 이는 HIV 복제에 필수적인 다른 보조인자 및 HIV를 억제하는 다른 단백질들 때문으로 추정되고 있음.

<참고자료-1> Hatzioannou T and Evans DT. Animal models for HIV/AIDS research. Nat Rev Microbiol 2012; 10: 852–867.

- 에이즈를 유발하는 바이러스인 HIV-1과 HIV-2는 아프리카 유인원과 구세계 원숭이에게 풍토병으로 존재하는 레트로바이러스 군에 속하며, 총칭하여 영장류 렌티바이러스로 알려져 있다. 전 세계적 에이즈 유행을 일으키는 HIV-1과 서아프리카 지역에서 에이즈를 유발하는 HIV-2는 주로 이성 간 성접촉을 통해 전파되며, CD4+ T 세포와 대식세포 내에서 복제된다.
- HIV-1 치료제 및 백신 개발의 주요 한계 중 하나는 인간에서 발생하는 HIV-1 감염의 모든 주요 특징을 재현하는 동물모델이 부족하다는 점이다. HIV-1은 중앙아프리카 침팬지 (Pan troglodytes troglodytes)를 감염시키는 바이러스인 SIVcpz1,2의 직접적인 후손으로, 야생 침팬지 집단에 상당한 영향을 미칠 수 있다³. 그럼에도 사육 환경의 침팬지에서 HIV-1 감염이 질병으로 발전하는 경우는 드물다^{4,5}. 또한 멸종 위기 상태와 높은 사육 비용으로 인해 침팬지는 AIDS 연구에 실용적인 모델이 아니다. **인간 이외의 종을 HIV-1 감염 모델로 고려할 때, 해당 종의 세포 단백질이 바이러스 복제를 지원해야 함은 명백하다. 필요한 단백질에는 바이러스 침입에 관여하는 수용체 및 공동수용체(CD4와 CC-케모카인 수용체 5(CCR5) 또는 CXCR4-케모카인 수용체 4(CXCR4)), 전사 인자(사이클린 T1), 핵 수출 인자(CRM1; EXP1으로도 알려짐), 그리고 신생 바이러스 입자의 분출을 매개하기 위**

해 동원되는 단백질(ESCRT(수송에 필요한 소포체 분류 복합체) 경로에 속함) 등이 포함된다. 최근 몇 년간 HIV-1 복제의 특정 단계를 억제하는 세포 인자들도 확인되었다(BOX 1). HIV-1은 이러한 '제한 인자'를 극복하고 인간에서 필요한 세포 보조인자를 활용하도록 적응했지만, 다른 종에서는 그러지 못했다⁶. 이는 적어도 부분적으로 HIV-1이 인간 외 대부분의 종에서 복제하거나 질병을 일으키지 못하는 이유를 설명한다.

- 주요 사용 종(rhesus, pig-tailed, cynomolgus macaques; 붉은털원숭이, 돼지꼬리원숭이, 긴꼬리원숭이) 각각은 “SIV 감염 결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는” 고유한 특성을 지니고 있으며, “혼란스럽거나 해석 불가능한 결과로 이어질 수 있는 함정을 피하기 위해” 이에 대한 깊은 이해가 필요함(Bailey 등, 2014; Del Prete 등, 2016; Hatzioannou 등, 2012).
 - ▶ <예시-1> 인도계 레서스원숭이는 감염 후 1~2년 내에 AIDS를 발병하는 반면, 인간은 8~10년이 소요됨. 이는 인간과 원숭이의 MHC 유전자는 여러 측면에서 차이에 기인함
 - ▶ <예시2> 중국계 및 버마계 레서스원숭이는 인도계 레서스 원숭이와 매우 다른 병리학적 경과를 보임. 이는 중요한 면역유전학적 차이로 인한 것으로 추정됨
 - ▶ <예시-3> 돼지꼬리원숭이는 레서스원숭이보다 절반 조금 넘는 시간 내에 에이즈를 발병함
 - ▶ <예시-4> 사이노물구스원숭이는 인도계 또는 중국계 원숭이에게 병원성을 보이는 SIV/SHIV에 감염될 경우 병원성이 낮아지고, 바이러스 부하가 수 로그(log) 단위로 낮아지며 변동성이 커짐. 이에 대한 근본 원인은 바이러스 전파에 상당한 영향을 미칠 수 있음. 단순히 중국산 원숭이에 더 '특이적으로 적응된' 다른 유형의 SIV를 사용하자는 제안은 피상적으로 보임.
 - ▶ 기타 사항 사항은 HIV 백신 면역원들이 SIV에 의한 감염 실험으로 검증될 수 없다는 점과 SIV가 많은 HIV 억제제에 민감하지 않다는 점, 그리고 바이러스들이 일부 유사한 공동 수용체를 가질 수 있지만 서로 다른 수용체도 가지고 있다는 점 등이 있음.

3. HIV/AIDS 백신 개발에 있어 인간 특이적 발견과 데이터의 중요성

- 앞서 논하였던 NHP 모델의 고려사항 및 주의점 외에도 **백신 개발을 위한 인간 특이적 연구의 수행과 능력**에 대한 이해의 필요성이 대두되며 예시는 다음과 같음
 - <예시-1> 장내 미생물군 항원(개인마다 차이가 있음)이 HIV에 대한 면역반응을 변화시켜 HIV 감염을 막을 수 있는 항체 유도를 차단할 수 있다는 점이 입증됨(Williams 등, 2018).
 - <예시-2> 바이러스 제거에서 CD8+ 세포의 핵심적 역할은 NHP 연구에 기인하지만 (Schmitz 등, 1999), 잘 디자인된 인간 엘리트 컨트롤러(human elite controllers) 연구에서도 입증되었으며 이는 여전히 극히 중요함(Leong 등, 2016; He 등, 2016).
 - <예시-3> 급성 감염된 인간을 연구하는 것의 중요성, 특히 CD8+ 세포 반응과 이러한 반응이 시간에 따라 어떻게 변화하고 바이러스 저장소 크기와 바이러스 다양성, 그리고 중요한 숙주-바이러스 상호작용에 영향 등에 대한 중요성(Robb 등, 2016)
 - <예시-4> HIV 감염자로부터 광범위 중화항체(bNAbs, broadly neutralising antibodies)를 분리하여 낸 것은 이 항체들이 표적하는 HIV 자체의 취약 부위에 대한 이해를 높였음. 이러한 bNAbs는 HIV 환자 상당수에서 5년 이상 경과 후 생성되며, 다양한 HIV 균주를 효과적으로 중화시킬 수 있음. 이와 같은 항체에 대한 이해와 함께, HIV envelope protein(HIV 외피 단백질)의 미세 구조 및 항체-바이러스 공동 진화에 관한 연구는 현재 및 미래 백신 설계 방향을 제시하는 데 중요함(Pancera 등, 2017; Safritz 등, 2016).
 - <예시-5> 소수의 HIV 감염자에서 관찰되는 우수한 혈청 중화능을 가진 bNAbs 연구를 통해 bNAbs 활성을 유도할 수 있는 다양한 방법이 제시되었으며, 주요 bNAbs 결합 부위의 여러 곳이 확인되었음(McCoy 등, 2017). 유전자 변형 마우스를 사용하는 일부 연구자들은 HIV 백신에서 bNAbs의 역할 연구를 진전시키기 위해 이들의 사용을 주장하고 있지만, bNAbs 생산의 제한 요인을 식별하고 이를 촉진할 수 있는 백신 전략을 제시할 수 있는 동물모델의 기존 부재를 해결할 수 있을지는 의문임(Verkoczy 등, 2017).

4. 인간 특이적 발견과 결론

- 30년 이상의 연구와 수십억 달러의 투자에도 불구하고, 인간에게 효과적인 예방 또는 치료용 HIV/AIDS 백신은 아직 개발되지 못했음. 다양한 유형의 후보 백신들이 비인간 영장류(NHP)에서 고무적인 면역 반응을 유도했지만, 대부분은 인간 대상 임상시험에서 동일한 효과를 재현하지 못하였음. 인간에게서 관찰된 효과는 기껏해야 미미한 수준으로 평가되었으며, 일부 유망한 백신은 오히려 HIV 감염률을 증가시키기도 하였음. 인간과 비인간 영장류 간의 유전적·생물학적 차이가 점차 밝혀지고 있는 점을 고려할 때, 이러한 결과와 비인간 영장류 데이터의 인간 HIV/AIDS 적용 가능성에 대한 우려는 전혀 놀랍지 않음.
- 특히 점점 더 많은 과학자들이 이 분야에서 비인간 영장류 사용은 기껏해야 신뢰할 수 없을 뿐만 아니라, 오해를 불러일으키고 인간, 동물, 재정 자원을 낭비할 정도로 불충분하다고 주장하고 있음. 연구자들은 질량 세포계측법, 구조 분석, 면역원 설계, 오믹스 기술, 임상 연구, 엘리트 컨트롤러 연구 등 **인간 특이적 신기술(human-specific technologies)의 가능성과 필요성을 강조하여 바로 여기에 미래의 노력과 초점이 맞춰져야 한다고 주장되고 있음**(Xu 등, 2025; Graciaa 등, 2024; Koff 등, 2014).

<참고문헌>

An official website of the United States government; 2025.
<https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/hiv-and-aids-basics>.

GILead. 2025. <https://www.gilead.com/news/news-details/2025/yeztugo-lenacapavir>

Shim I, Rogowski L, Venketaraman V. Progress and Recent Developments in HIV Vaccine Research. *Vaccines* (Basel). 2025 Jun 26;13(7):690.

Fortner, A.; Bucur, O. mRNA-based vaccine technology for HIV. *Discoveries* 2022, 10, e150.

Adis International, Ltd (2003). "HIV gp120 vaccine - VaxGen: AIDSVAX, AIDSVAX B/B, AIDSVAX B/E, HIV gp120 vaccine - Genentech, HIV gp120 vaccine AIDSVAX - VaxGen, HIV vaccine AIDSVAX - VaxGen". *Drugs in R&D*. **4** (4): 249–53.

Buchbinder SP, et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*. 2008; 372:1881–1893.

Corey, L.; Nabel, G.J.; Dieffenbach, C.; Gilbert, P.; Haynes, B.F.; Johnston, M.; Kublin, J.; Lane, H.C.; Pantaleo, G.; Picker, L.J.; et al. HIV-1 Vaccines and Adaptive Trial Designs. *Sci. Transl. Med.* 2011, 3, 79ps13.

Esparza, J. What Has 30 Years of HIV Vaccine Research Taught Us? *Vaccines* 2013, 1, 513–526.

Rerks-Ngarm, S.; Pitisuttithum, P.; Nitayaphan, S.; Kaewkungwal, J.; Chiu, J.; Paris, R.; Premisri, N.; Namwat, C.; De Souza, M.; Adams, E.; Benenson, M.; Gurunathan, S.; Tartaglia, J.; McNeil, J. G.; Francis, D. P.; Stablein, D.; Birx, D. L.; Chunsuttiwat, S.; Khamboonruang, C.; Thongcharoen, P.; Robb, M. L.; Michael, N. L.; Kunasol, P.; Kim, J. H.; Moph-Taveg, I. (2009). "Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand". *New England Journal of Medicine*. **361** (23): 2209–2220.

Haynes, B.F.; Wiehe, K.; Borrow, P.; Saunders, K.O.; Korber, B.; Wagh, K.; McMichael, A.J.; Kelsoe, G.; Hahn, B.H.; Alt, F.; et al. Strategies for HIV-1 vaccines that induce broadly neutralizing antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 2023, 23, 142–158.

Marshall LJ, Bailey J, Cassotta, Marshall LJ, Bailey J, Cassotta M, Herrmann K, Pistollato F. Poor Translatability of Biomedical Research Using Animals - A Narrative Review. *Altern Lab Anim*. 2023 Mar;51(2):102-135.

Tan T, Xia L, Tu K, et al. Improved Macaca fascicularis gene annotation reveals evolution of gene expression profiles in multiple tissues. *BMC Genomics* 2018; 19: 787.

George J, Johnson RC, Mattapallil MJ, et al. Gender differences in innate responses and gene expression profiles in memory CD4 T cells are apparent very early during acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS One* 2019;14: e0221159.

Miller-Novak LK, Das J, Musich TA, et al. Analysis of complement-mediated lysis of Simian

ImmunodeficiencyVirus (SIV) and SIV-infected cells reveals sex differences invaccine-induced immune responses in Rhesus macaques.J Virol 2018; 92: e00721-18.

Byraredddy SN, Sidell N, Arthos J, et al. Species-specificdifferences in the expression and regulation ofalpha4beta7 integrin in various nonhuman primates.J Immunol 2015; 194: 5968–5979.

Sharma A, McLaughlin RN Jr, Basom RS, et al. Macaqueinterferon-induced transmembrane proteins limit replicationof SHIV strains in an envelope-dependent manner. PLoSPathog 2019; 15: e1007925.

Jia B, Serra-Moreno R, Neidermyer W, et al. Specieesspecific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. PLoS Pathog 2009; 5:e1000429.

Del Prete GQ, Lifson JD and Keele BF. Nonhuman primatemodels for the evaluation of HIV-1 preventive vaccinestrategies: Model parameter considerations and consequences. Curr Opin HIV AIDS 2016; 11: 546–554.

Hatziiioannou T and Evans DT. Animal models for HIV/AIDS research. Nat Rev Microbiol 2012; 10: 852–867.

Bailey J. Monkey–based research on human disease: Theimplications of genetic differences. Altern Lab Anim 2014;42: 287–317.

Williams WB, Han Q and Haynes BF. Cross-reactivity of HIVvaccine responses and the microbiome. Curr Opin HIVAIDS 2018; 13: 9–14.

Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, etal. Control of viremiainsimian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. Science 1999; 283: 857–860.

Leong YA, Chen Y, Ong HS, et al. CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. Nat Immunol 2016; 17: 1187–1196.

He R, Hou S, Liu C, et al. Follicular CXCR5- expressing CD8(+) Tcells curtail chronic viral infection. Nature 2016;537: 412–428.

Robb ML and Ananworanich J. Lessons from acute HIVinfection. Curr Opin HIV AIDS 2016; 11: 555–560.

Pancera M, Changela A and Kwong PD. How HIV-1 entrymechanism and broadly neutralizing antibodies guide structurebased vaccine design. Curr Opin HIVAIDS 2017; 12: 229–240.

Safrit JTand Koff WC.Novel approaches in preclinical HIVvaccine research. Curr Opin HIV AIDS 2016; 11: 601–606.

McCoy LE and McKnight A. Lessons learned from humoral responses of HIV patients. Curr Opin HIV AIDS 2017; 12:195–202.

Verkoczy L, Alt FWand Tian M. HumanIgknockin mice tostudy the development and regulation of HIV-1 broadlyneutralizing antibodies. Immunol Rev 2017; 275: 89–107.

Koff WC, Gust ID and Plotkin SA. Toward a human vaccines project. Nat Immunol 2014; 15: 589–592.

Xu N, Shen Y, Huang W, Nie J. The Current Status in Terms of Vaccination for Individuals Infected with Human Immunodeficiency Virus. Viruses. 2025 Jan 25;17(2):171.

Graciaa DS, Walsh SR, Rouphael N. Human Immunodeficiency Virus Vaccine: Promise and Challenges. Infect Dis Clin North Am. 2024 Sep;38(3):475-485.

87. 호흡기 질환인 천식 치료제의 실패 원인과 NAMs

1. 천식의 일반적 특성과 치료제 현황

- 천식은 가변적이고 재발하는 증상, 가역적인 기도 폐쇄, 그리고 쉽게 유발되는 기관지 경련을 특징으로 하며, 이는 재발하는 호흡 곤란, 천명, 기침, 흉부 압박감 등의 증상으로 나타남. 증상의 중증도와 빈도는 개인마다 다름(World Health Organisation. Asthma, 2023). 천식의 원인은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 유전적 소인과 흡입된 입자에 대한 환경적 노출이 복합적으로 작용하는 것으로 추정됨. 이러한 입자들은 기도를 자극하거나 알레르기 반응을 유발할 수 있음. 국가별 유병률 차이로 인해 전 세계 인구의 1~18%가 영향을 받는 것으로 추정되며, WHO는 현재 2억 3,500만 명이 천식으로 고통받고 있다고 추정됨(World Health Organisation. Asthma, 2023).
- 질병 메커니즘에 대한 효과적인 통찰력을 제공하지 못하거나 인간의 성공적인 치료에 있어서 적절한 표적을 제공하지 못하면서 치료제 개발에 과도하게 의존하는 질병 중의 하나가 호흡기 질환(Respiratory diseases)임(Ghorani 등, 2017; Wright 등, 2008; Zosky 등, 2007; Bates 등, 2009).
- 따라서 천식(asthma)은 전 세계적으로 유행 수준에 달한 주요 비전염성 호흡기 질환(non-communicable respiratory diseases)으로 모든 연령층에 영향을 미치며 유병률이 증가하고 있지만, **현재까지 치료법이 개발되지 않고 있음**(Morishima 등, 2025; World Health Organisation. Asthma, 2023; World Health Organisation. Chronic obstructive pulmonarydisease, 2023)

2. 천식(asthma)의 동물모델에서 표적 공략 성공, 그러나 임상시험에서 실패 사례

- <표-1>은 동물 모델에서는 성공적인 전임상 결과를 보였으나 환자 치료에서 실패한 천식 표적의 약물을 나타낸 것임. 대부분 동물 실험에서 약리 효능이 있었지만, 천식 환자 대상의 임상시험은 실패로 귀결되었음.
- 천식 동물모델은 인간 질환의 병리생리학을 모방하는 것을 목표로 함. 초파리, 기니피그, 양, 고양이, 개, 말, 비인간 영장류 등 다양한 동물종이 천식 실험 모델에 사용되었음(Aun 등, 2017; Roeder 등, 2009; Canning 등, 2008; Kirschvink 등, 2009; Nials 등, 2008). . 가장 흔히 연구되는 종/계통은 BALB/c 마우스로, 이 동물들은 인간 질환을 대표하는 Th2 편향 면역 반응을 나타내기 때문임. 그러나 BALB/c 마우스는 천식 연구에 사용되는 대부분의 다른 종과 마찬가지로 자연적으로 이 질환을 발병하지 않음. 따라서 질병 증상을 보이는 동물 모델을 만들기 위해, 오발부민과 같은 단백질을 기도 내로 주입하거나 보조제와 함께 동물에 주사하여 강력한 면역 반응을 자극함으로써 인위적으로 질환을 유발함. 이는 인간의 질병 자연 경과와는 크게 동떨어져 있으며, 질병 발병이나 진행을 효과적으로 모사하지 못함. 실제로 동물 모델에서는 단백질 자극이 제거되면 급성 폐 염증이 소실되는 경향이 있는 반면, 천식 환자에게는 염증이 지속되며 질병 중증도에 따라 악화될 수 있음.

<표-1> 동물 모델에서는 성공적인 전임상 결과를 보였으나 환자 치료에서 실패한 전식 표적				
표적	치료제 (참고문헌)	동물모델 및 제작방법	동물시험에서 결과	임상시험에서 결과
IL-13	인간 단일클론 항체 (tralokinumab) (Piper 등, 2013)	<ul style="list-style-type: none"> 기관내 IL13 투여를 받은 mice. ovalbumin으로 감작된 인간 IL-13 knock-in mice. Cynomolgus macaque. 	<ul style="list-style-type: none"> 억제된 기도 호산구 증가증, 트랄로키누맙 사전 투여는 IL-13 유발 기도 과민반응을 감소 시킴. 기도 과민반응 감소, 제 1회 항염증 효과. 트랄로키누맙 사전 투여는 기도 과민반응 억제하고 혈청 IgE를 감소시켰음. 	<ul style="list-style-type: none"> 제3상 임상시험에서 주요 평가변수 달성 실패. 중증 조절 불능 천식에 대한 효과가 일관되지 않음. 중증 천식에서 스테로이드 절감 효과 없음. 전식 치료제 개발 중단.
	인간화 단일클론 항체 (lebrikizumab) (Sher 등, 2022)	<ul style="list-style-type: none"> 집먼지진드기 추출물로 처리를 받은 마우스에 항체는 이형대조물질을 투여함. 	<ul style="list-style-type: none"> 기도의 호산구 감소 	<ul style="list-style-type: none"> 2건의 3상 임상시험 실패로 인해 전식 치료제 개발 중단. FEV1(1초간 강제초기량) 개선 효과 확인되었으나 악화 및 효과 없음. 혈중 호산구 수치 증가.
IL-4 receptor α subunit	인간 단일클론 항체 (IL-4Rα 표적), IL-13 및 IL-4 활성 차단 (Kerwin 등, 2025)	<ul style="list-style-type: none"> Cockroach-allergen으로 비강 내 감작된 마우스를 최대 4주간 재야기 	<ul style="list-style-type: none"> 혈청 IgE 수치 감소 기도 염증 감소 및 기도 과민성 감소 	<ul style="list-style-type: none"> 2상 임상시험 무작위 배정, 위약 대조, 2009년 완료. 293명의 환자가 12주 치료 후 4주간 추적 관찰을 시행함. 1차 및 2차 주요 평가 변수를 충족하지 못했으며, 예측 FEV1 %에 변화가 없었음. 개발 중단됨.
	재조합 돌연변이 IL-4 단백질, 경쟁적 항체 (pitakinra) (Antoniou 등, 2010)	<ul style="list-style-type: none"> Ascaris suum으로 Cynomolgus macaques 감작. 약물의 피하 투여와 흡입 투여 비교 	<ul style="list-style-type: none"> Pitakinra는 알레르기 유발 기도 과민반응을 억제했으나 기도 호산구 감소 효과는 매우 미미. DNA 분석 결과, 유전적 변이의 알레르기 과민반응과 관련된 단일염기다형성(SNP)이 인간과 마acaques 간의 SNP와 상이한 것으로 나타남. 이는 반응이 개체별로 차이를 있다는 점을 시사함. 	<ul style="list-style-type: none"> 무작위 배정, 이중 맹검, 위약 대조, 병렬군 제2상 임상시험. 피하 투여 시 FEV1에 일부 긍정적 영향이 있었으나, 주사 부위 관련 여러 이상반응 발생(대부분 pitakinra 투여 환자에서 관찰됨). 자극성 AHR(airway hyperresponsiveness)에 있어 pitakinra와 위약 간 유의미한 차이는 없었으며, 가래 호산구 또는 혈액 호산구에서도 유의미한 차이는 관찰되지 않았음. 주어진 일화에는 효과가 없는 것으로 나타나 개발 중단됨.
IL-4	인간화 단클론 항체 (pascolizumab) (Facet Biotech. 2012)	<ul style="list-style-type: none"> Cynomolgus macaques HDM 감작된 인간 면역세포로 사전 처리된 SCID 마우스에 IL-4를 투여하여 IgE 증가를 유도함 HDM: house dust mite antigen 	<ul style="list-style-type: none"> 9개월 치료기간 동안에 부작용 없이 잘 견뎌냄. Pascolizumab은 용량 의존적으로 IgE 억제를 유도함. 	<ul style="list-style-type: none"> 경증에서 중등도 천식 환자 24명을 대상으로 한 1상 무작위 이중맹검 위약 대조 시험에서 임상적 효능이 입증되지 않았음. 개발이 중단됨.
Inducible nitric oxide synthase (iNOS)	저해제 (GW274150) (GSK, 2005)	<ul style="list-style-type: none"> Ovalbumin 감작된 랫드를 3일간 야기 모델 오발부민 감작에 의해 유발된 랫드 폐 염증 모델 알레르기성 천식의 	<ul style="list-style-type: none"> LAR(late asthmatic response) 및 기도 염증을 억제함. 그러나 반복 투여로 인한 과도한 NO 활성 감소는 유해하였음. 염증 세포 침윤 감소, 폐 케모카인 발 	<ul style="list-style-type: none"> 스테로이드 미경험 천식 환자 28명이 이중맹검, 무작위 배정, 위약 대조, 위약 대조군을 포함한 3기간 교차 연구에 참여하였음. 선택적 iNOS 억제는

		기니피그 모델	<ul style="list-style-type: none"> 현 감소. 기니피그에서 알레르기 반응 억제. 유발성 기도 과민성염증(AHR) 및 폐로의 염증 세포 침윤을 억제함. 	알레르기성 기관지염이나 기도 과민성염증에 의해 유발되는 만성 폐쇄성 질환의 치료 효과를 명확히 나타내지 못했음.
Platelet activating factor (PAF)	수용체 길항제 (Kasperska-Zajac 등, 2008)	<ul style="list-style-type: none"> 오발부민으로 감각된 자극된 마우스 수용체 대항으로 PAF 수용체 길항제로 처리. 에어로졸화의 오발부민에 감각된 기도를 특정 PAF 길항제로 처리 	<ul style="list-style-type: none"> 모든 림프구 군집의 감소. C57Bl/6 마우스에서는 기도 내 호산구 침윤 감소가 관찰되었으나 BALB/c 마우스에서는 그렇지 않음. 기도 과민성 감소 및 LAR(late asthmatic response) 감소. 기관지 및 폐 조직 내 호산구 및 호중구 축적 감소. 	<ul style="list-style-type: none"> 무작위 이중맹검 위약 교차 연구에서 레조루마블 초기 또는 후기 단계에 대한 효과는 관찰되지 않았음. 무작위 이중맹검 위약 대조 교차 연구에서 흡입 알레르겐에 대한 초기 또는 후기 반응 또는 히스타민에 대한 기관지 확장 효과가 없었음. 급성 천식 환자에서 FEV1 또는 기종전 후 호흡기 매개변수의 변화가 없었다. 단독 요법으로 사용된 길항제는 중단되었다.
IL-5	인간화 단클론 항체 (reslizumab) (Richard 등, 2020)	<ul style="list-style-type: none"> 오발부민으로 감각된 쥐(복강 내 주사)에 에어로졸화된 오발부민을 투여하여 자극. 오발부민으로 감각된 기니피그. 흡입된 돼지회충(Ascaris suum)으로 반복 야기된 긴 꼬리원숭이. 	<ul style="list-style-type: none"> 기도 호산구 감소. 호산구 감소. 기도 과민성 변화 없음. 기도 호산구 감소. 	<ul style="list-style-type: none"> 혈액 및 가래 호산구 수치는 감소했으나, 폐 기능이나 천식 증상은 호전되지 않았음. 호산구 천식에 코르티코스테로이드(corticosteroid)와 다른 표준 치료를 병용해도 충분히 조절되지 않을 때 사용할 수 있는 보조 요법.
	단클론 항체 (mepolizumab) (Alam 등, 2023)	<ul style="list-style-type: none"> Cynomolgus-macaques에 흡입된 돼지 회충(Ascaris suum)을 반복적으로 노출시킨 실험. 	<ul style="list-style-type: none"> 혈액 및 기도 호산구 수는 감소했으나, 항원은 반응에는 변화가 없음. 	<ul style="list-style-type: none"> 경증 알레르기성 천식으로 24명을 대상으로 한 이중맹검 위약 대조 연구. 혈액 및 가래 호산구 수치는 감소했으나, 기도 과민성 또는 LAR에는 영향 없음. 반복 투여 연구에서도 호산구 감소 효과는 관찰되지 않음. 중증 난치성 호산구 증가 치료제로 추가 평가 필요.
Very late antigen-4 (VLA-4)	단클론 항체 길항제 (IVL745) (Ravensberg 등, 2006)	<ul style="list-style-type: none"> 마우스 나백 알레르기 감각 모델(후기 반응), 나백으로 감각된 야기된 랫드 모델. 에어로졸화된 나백으로 감각된 야기된 기니피그 모델. 신생 토끼에 집먼저진드기 추출물 면역화하여 IgE 매개 알레르기 반응을 유도한 토끼 모델. 돼지회충 흡입을 통해 유발된 알레르기성 천식 양 모 	<ul style="list-style-type: none"> 정맥 투여는 호산구 증가를 감소시켰으나, 기도 과민반응(AHR)에는 영향을 미치지 않았지만 비강 내 투여는 염증과 AHR을 차단하였음. 항체는 히스타민 방출을 억제하고 초기 반응을 약화시킴. 항원 유발 기관지 과민성염증 시, 기도 내 호산구 및 호중구 수치를 감소시켰고, 폐 조직 내 호산구 및 호중구 수치를 감소시켰음. 	<ul style="list-style-type: none"> 위약 대조, 이중 맹검, 무작위 배정, 2방향이 포함된 설계. 단독 요법으로는 베타2-agonist로 조절된 중증 천식 환자 16명과 흡입 알레르겐에 대한 반응(LAR)이 환자가 참여하는 임상 시험에 포함되었음. 환자 반응은 초기 또는 후기 지표에 대한 영향이 없었다. 1차 평가 변수를 충족하지 못함.

		델.	설패 감소, 기관지 과 민 반응, 감소했으나 호산구 수에는 유의 한 변화 없음. 초기 반응에는 영향 없 음. 후기 반응 및 기 과민 반응 억제. 투여 도량내 투여 모 두 효과적임.	• 천식 치료제로 중단 됨/사용 불가.
CD4	Chimaeric 원숭이/인간 단일클론 항 체(keliximab) (Kon 등, 2001)	• 인간 CD4 단백질을 발현하는 트랜스제닉 마우스.	• 내약성이 우수하며, CD4 T-세포에만 영향을 미침.	• 위약 대조, 용량 증량 연구 • FEV1 개선 없음. • CD4 T-세포 수치 감소로 연구 중단.

AHR = airways hyperresponsiveness; BHR = bronchial hyperresponsiveness; EAR = early asthmatic response; IgE = Immunoglobulin E; LAR = late asthmatic response; PAF = platelet activating factor

3. 천식(asthma)의 MAMs(New Approach Methodologies, 비동물-신규 평가방법)

- 근래에 과학계가 동물모델 사용에서 벗어나고 있다는 일부 증거가 존재. 유럽 공공-민간 협력체인 혁신의약품이니셔티브(IMI 3TR, European public-private partnership Innovative Medicines Initiative)의 최근 프로젝트는 다양한 염증성 및 자가면역 질환 환자(치료 전후)의 임상 데이터 분석을 요구하며, 궁극적으로 환자가 특정 치료에 반응할 가능성을 결정하는 요인을 규명하는 것을 목표함(Innovative Medicines Initiative, 2023).
- 또한 유럽연합 집행위원회 공동연구센터(JRC, European Commission Joint Research Centre)는 호흡기 질환을 위한 비동물 모델 집합(a collection of non-animal models for respiratory tract disease) 개발을 후원하고 있음(Hynes 등, 2020).
- 현재 이용 가능한 천식 비동물 모델 현황 조사 결과, 염증, 기관지 수축, 기도 재형성 등 질병의 다양한 주요 측면을 다루는 41개의 서로 다른 모델 시스템 NAMs이 개발 중인 것으로 확인됨(Hynes 등, 2020). 이와 같이 더 효과적인 치료법과 궁극적인 치료 목표를 위해 필요한 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환 메커니즘에 대한 이해를 위해 인간 관련 비동물 방법론의 개발은 필수적이며 시대의 흐름이라고 할 수 있음(Pereira 등, 2025; Gribaldo 등, 2022; Buckland, 2011).

NAMs	방법 및 특성	참고문헌
인간 조직 및 조직 공학적 접근법 (Human tissue and tissue engineering approaches)	<ul style="list-style-type: none"> • 3차원 공기-액체 계면(ALI, (Air-Liquid Interface, ALI) 배양 기술의 발전으로 생체 내에서 관찰되는 가성충상 점액섬모 상피 표현형을 재현하는 생리학적으로 더 정확한 모델을 구축 가능. • 정상 및 병변 인간 조직 확보의 한계로 제약을 받고 있음. • ALI에서 세포를 배양하면 다중 세포 유형으로 	Edwards 등, 2015; Bals 등, 2004

	<p>구성된 분극화된 가성총상 상피층으로 분화되며, 이로 인해 정점 섬모 활동 및 점액 분비를 포함한 결과적 기능성을 갖는 것으로 나타났음.</p>	
In silico or methemathematical model	<ul style="list-style-type: none"> • in silico 또는 수학적 모델은 천식에 대한 이해를 향상시키는 새로운 통찰력을 제공할 수 있으며 여러 모델이 개발 중임. • 주로 기도 평활근 수축성 등을 연구하는 데 사용되어 왔으며, 이는 다른 더 단순화된 세포 기반 모델에서는 불가능한 것임. • 그러나 많은 인간 조직 기반 모델과 마찬가지로, 정상 및 병변 기도에 대한 고품질 조직의 확보는 문제가 될 수 있음. 특히 기증자 간 변이도 문제가 될 수 있음 • 폐 질환 연구에서, 약물 침착 및 흡수에 대한 조사에 있어 계산적(in silico) 방법이 더욱 두드러지게 되었음. 여기에는 유망한 약물 후보 물질의 선별을 돕기 위한 생리학적 기반 약동학(PBPK) 모델링 및 정량적 구조-활성 관계(QSAR)의 개발이 포함됨. • 예를 들어, IPRLu(isolated perfused respiring rat lung) 는 분리된 관류 쥐 폐 데이터를 사용하여 구축된 새로운 QSAR 모델로, 폐 흡수를 정확하게 예측함. 특히 제시된 새로운 QSAR 모델은 합성 전 화합물 순위 지정 및 분류를 위한 IPRLu 모델 데이터의 일상적 생성을 대체할 수 있다고 동물 모델 대체 가능성을 제시함. • 계산 모델은 또한 직접 측정 기법으로 도출 가능한 정보를 넘어서는 정보를 제공하는 종합적 예측 프레임워크 개발을 지원할 수 있음. 예를 들어, 기관지 수축은 소기도 사이의 복잡한 상호작용을 수반하여 환기 불량 영역을 초래함. • 기관지 수축에 관여하는 메커니즘의 수학적 모델링은 이러한 복잡한 기도 행동에 대한 통찰력을 얻을 수 있게 함. 더 나은 기전적 이해는 새로운 약물 표적의 식별로 이어질 수 있음. 	<p>Bals 등, 2004; Adamson 등, 2011; Benam 등, 2015; Martonen 등, 2003; Rebello 등, 2022. Jarvis 등, 2015; Edwards 등, 2016; Tawhai 등, 2015; Winkler 등, 2015</p>

4. 결론

- 질병 메커니즘에 대한 효과적인 통찰력을 제공하지 못하거나 인간의 성공적인 치료에 있어서 적절한 표적을 제공하지 못하면서 치료제 개발에 과도하게 의존하는 질병 중의 하나가 천식을 포함한 호흡기 질환(Respiratory diseases)임. 모든 연령층에 영향을 미치며 유병률이 증가하고 있지만, **현재까지 치료법이 개발되지 않고 있음.**
- 질병 증상을 보이는 동물 모델을 만들기 위해, 오발부민과 같은 단백질을 기도 내로 주입하거나 보조제와 함께 동물에 주사하여 강력한 면역 반응을 자극함으로써 인위적으로 질환을 유발함. 이는 인간의 질병 자연 경과와는 크게 동떨어져 있으며, 질병 발병이나 진행을 효과적으로 모사하지 못함. 실제로 동물 모델에서는 단백질 자극이 제거되면 급성 폐 염증이 소실되는 경향이 있는 반면에, 천식 환자에게는 염증이 지속되며 질병 중증도에 따라 악화될 수 있음.
- 천식에 대한 치료제 개발 및 임상시험에서의 실패는 궁극적으로 동물모델-의존성이 높고 이에 따라 인체에 대한 천식 발병 이전에 완벽한 이해의 부족에 기여하는 것으로 추정됨. 이러한 실패의 총 비용을 정량화하는 것은 불가능하지만, 모든 실패한 임상시험이 재정적으로 막대한 손실을 초래한다는 점은 명백함.
- 따라서 임상시험에서 거의 실패를 초래한 동물실험에서 도출된 안전성 및 효능 결정을 인간에게 그대로 적용하는 방식의 신약 개발 파이프라인은 비용과 시간 측면에서 가장 효율적인 방법이 아님. 결론적 연구 패러다임을 전환하여 인간 관련 방법을 신약 발굴 과정 초기에 집중적으로 도입한다면, 추가적인 비용이 드는 실패를 방지하는 데 도움이 될 수 있음.
- 특히 간단하게 소개된 인간 조직 및 조직 공학적 접근법 (Human tissue and tissue engineering approaches) 및 In silico or mathematical model 포함하여 현재 이용 가능한 천식 비동물 모델 현황 조사 결과, 염증, 기관지 수축, 기도 재형성 등 질병의 다양한 주요 측면을 다루는 41개의 서로 다른 모델 시스템 인간-관련 및 비동물 NAMs이 개발을 촉진하여 이용이 필요하다고 사료됨.

<참고문헌>

- Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, et al. Experimental animal models for COPD: A methodological review. *Tob Induc Dis* 2017; 15: 25.
- Wright JL, Cosio M and Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L1–L15.
- Zosky GR and Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 973–988.
- Bates JH, Rincon M and Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297:L401–L410.
- World Health Organisation. Asthma, key facts, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma> (2022, accessed 16 January 2023).
- World Health Organisation. Chronic obstructive pulmonarydisease (COPD), key facts, [https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)) (2022, accessed 16 January 2023).
- Morishima Y, Hizawa N. Clinical Benefits of Targeting Treatable Traits in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Intern Med.* 2025 Jan 1;64(1):17-23.
- Innovative Medicines Initiative. 3TR, <https://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/3tr>(undated, accessed 16 January 2023).
- Hynes J, Marshall LJ, Adcock IM, et al. Review of non animal methods in use for biomedical research: Respiratory tract diseases, EUR 30334 EN. Luxembourg: Publications Office of the EU, 2020.
- Cazzola M, Matera MG, Hanania NA, Rogliani P. Established and Emerging Biological Therapies for the Treatment of Comorbid Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Inflamm Res.* 2025 Dec 11;18:17319-17341.
- Pereira De Oliveira R, Droillard C, Devouassoux G and Rosa-Calatrava M (2025) In vitro models to study viral-induced asthma exacerbation: a short review for a key issue. *Front. Allergy* 6:1530122.
- Gribaldo L, Dura A. EURL ECVAM Literature Review Series on Advanced Non-Animal Models for Respiratory Diseases, Breast Cancer and Neurodegenerative Disorders. *Animals (Basel).* 2022 Aug 25;12(17):2180.
- Buckland G. Harnessing opportunities in non-animal asthma research for a 21st-century science. *Drug Discov Today* 2011; 16: 914–927.
- Edwards J, Belvisi M, Dahlen SE, et al. Human tissue models for a human disease: What are the barriers? *Thorax* 2015; 70: 695–697.
- Bals R, Beisswenger C, Blouquit S, et al. Isolation and air liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 49–51.
- Adamson J, Haswell LE, Phillips G, et al. In vitro modelsof Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). In: Martin-Loeches I (ed) *Bronchitis*. London: InTech, 2011,pp. 41–66.
- Benam KH, Dauth S, Hassell B, et al. Engineered in vitro disease models. *Ann Rev Pathol* 2015; 10: 195–262.
- Rebello J, Brashier B, Shukla S. Assessment of the predictive capability of modelling and simulation to determine bioequivalence of inhaled drugs: A systematic review. *Daru.* 2022 Jun;30(1):229-243.
- Ted Martonen, John Fleming, Jeffry Schroeter, Joy Conway, Dongming Hwang, In silico modeling of asthma, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 55, Issue 7, 2003, Pages 829-849, ISSN 0169-409X,
- Jarvis J, M J Seed, Susan Jill Stocks. A refined QSAR model for prediction of chemical

asthma hazard. 2015. Occupational Medicine 65(8).

Edwards CD, Luscombe C, Eddershaw P, et al. Development of a novel Quantitative Structure–Activity Relationship model to accurately predict pulmonary absorption and replace routine use of the isolated perfused respiring rat lung model. Pharm Res 2016; 33: 2604–2616.

Tawhai MH and Bates JHT. Computational models of lung diseases. Drug Discov Today Dis Models 2015; 15: 1–2.

Winkler T, Venegas JG and Harris RS. Mathematical modeling of ventilation defects in asthma. Drug Discov Today Dis Models 2015; 15: 3–8.

Aun M, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, et al. Animal models of asthma: Utility and limitations. J Asthma Allergy 2017; 10: 293–301.

Roeder T, Isermann K and Kabesch M. Drosophila in asthma research. Am J Respir Crit Care Med 2009; 179: 979–983.

Canning BJ and Chou Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. Pulm Pharmacol Ther 2008;21: 702–720.

Kirschvink N and Reinhold P. Use of alternative animals as asthma models. Curr Drug Targets 2008; 9: 470–484.

Nials AT and Uddin S. Mouse models of allergic asthma: Acute and chronic allergen challenge. Dis Model Mech. 2008; 1: 213–220.

임상

Edward Piper. et al., A phase II placebo-controlled study of tralokinumab in moderate-to-severe asthma. European Respiratory Journal 2013 41(2): 330-338;

Sher, Ellen et al. 2022. Post-hoc Analyses of Lebrikizumab Phase 3 Trials (LAVOLTA I and II): Enhanced Efficacy in Patients With Prior Exacerbations and Elevated Baseline FENO or Blood Eosinophilia. Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 149, Issue 2, AB64

Edward Kerwin et al., Rademikibart Treatment for Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma: A Phase 2B Randomized Clinical Trial. Am J Respir Crit Care Med Vol 211, Iss 5, pp 749–758, May 2025

Antoniou SA. Pitrakinra, a dual IL-4/IL-13 antagonist for the potential treatment of asthma and eczema. Curr Opin Investig Drugs. 2010 Nov;11(11):1286-94.

Facet Biotech. 2012. A Phase I/II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Pilot Study of SB 240683 in Patients With Symptomatic Steroid-Naive Asthma. ICH GCP US Clinical Trials Registry Clinical Trial NCT00024544

GSK 2005, udy With GW274150 In Patients With Mild Asthma. NCT00273013

Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Platelet-activating factor (PAF): a review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2008 Jan;2(1):72-6.

Richard Beasley, et al. Anti-interleukin-5 therapy in patients with severe asthma: from clinical trials to clinical practice, The Lancet Respiratory Medicine, Volume 8, Issue 5, 425 – 427.

Noor Alam, S. Latha, Anoop Kumar, Safety and efficacy of monoclonal antibodies targeting IL-5 in severe eosinophilic asthma: A systematic review and meta-analysis of

randomized controlled trials, Health Sciences Review, Volume 8, 2023, 100103, ISSN 2772-6320.

Ravensberg AJ, Luijk B, Westers P, Hiemstra PS, Sterk PJ, Lammers JW, Rabe KF. The effect of a single inhaled dose of a VLA-4 antagonist on allergen-induced airway responses and airway inflammation in patients with asthma. Allergy. 2006 Sep;61(9):1097-103.

O.M. Kon B.S. Sihra L.C. Loh J. Barkans C.H. Compton N.C. Barnes M. Larché A.B. Kay. The effects of an anti-CD4 monoclonal antibody, keliximab, on peripheral blood CD4+ T-cells in asthma, European Respiratory Journal 2001 18(1): 45-52.

Hynes J, Marshall LJ, Adcock IM, et al. Review of nonanimal methods in use for biomedical research: Respiratorytract diseases, EUR 30334 EN. Luxembourg: Publications. Office of the EU, 2020, DOI: 10.2760/725821.

88. Modernization 3.0과 IND를 위한 FDA의 NAM 활용 사례

1. 서론 - 동물실험과 임상시험의 불일치 원인

- 동물 기반 데이터를 통해 안전성 및 효능 측면에서 가장 낮은 예측 성공율을 보인 질병은 암(Mak 등, 2014), 알츠하이머병(Pippin 등, 2019), 염증성 질환(Seok 등, 2013) 등이었음.
- 이에 따라 AITOX 컨설팅보고서 번호 83-87까지의 내용은 **암(cancer)을 제외한** Alzheimer's disease, Parkinson's disease, respiratory tract diseases, rheumatoid arthritis (RA), and human immunodeficiency virus (HIV) infection/acquired immune deficiency syndrome (AIDS) 등의 치료제 개발에 대한 실패 원인을 분석한 것이었음. 종양학이 동물에서 사람으로의 외삽 가능성에서 문제가 더 크고 전통적 동물모델의 한계가 인정되는 분야 중 하나임. 그러나 '암'을 탐구 대상 질환에 포함시키지 못한 이유는, '암'으로 분류되는 200여 가지 이상의 질환을 다루려면 방대한 작업이 될 것이기 때문임.
- 이와 같이, 동물실험을 통한 다양한 질환에 대한 치료제 개발의 원인으로 다음같이 2가지로 요약됨

① 인간에서의 질병 메커니즘에 대한 효과적인 통찰력 부족

- 컨설팅보고서(83-87)를 통해 질환에 치료제 개발의 실패 원인은 **동물실험과 임상시험의 불일치라고 할 수 있음**. 즉, 인간에서의 질병 메커니즘에 대한 효과적인 통찰력을 제공하지 못하거나 성공적인 인간 치료로 이어지는 표적을 제공하지 못하는 **동물모델에 대한 과도한 의존**이 실패의 원인이라고 추정됨.
- 동물이 어느 수준에서든 예측할 수 있다고 하여도 인간의 유전적 변이를 고려할 때, 동물실험으로부터의 데이터가 어느 환자에게 어떻게 적용될 수 있을지 더 중요한 의문을 가지게 됨. 또한 식습관과 생활 방식 같은 환경 차이 등 외삽을 더욱 복잡하게 만들 수 있음.

② 환자 집단의 이질성(heterogeneity)

- 무엇보다도 중요한 원인으로 사료되는 것은 환자 집단의 이질성(heterogeneity)임. 이로 인하여 임상시험시험에서 치료제에 대한 환자의 반응률은 평균 25-30%임. 예를 들어 치매환자 집단 10년 추적조사에서 파킨슨병의 예후는 복용한 환자의 4분의 1만 양호한 상태이며 Levadopa의 이질성에 기인하는 것으로 확인되었음(Williams-Gray 등, 2013).

2. 미국 FDA 의약품평가연구센터의 규제 의사 결정을 위한 NAMs 활용 사례

- 동물실험으로부터 얻은 자료 기반으로 임상시험에서 실패가 신약 개발의 실패로 이어진다는 것을 확인할 수 있음. 이에 따라 미국 FDA는 IND(investigational new drug, 임상시험 승인절차)은 어떻게 NAMs 활용되고 있는지 살펴볼 필요성이 있음.
- 다음은 임상 개발 과정에서 독성을 위한 NAM 가이드라인과 유효성을 위해 제출된 NAM에 대한 CDER(Center for Drug Evaluation and Research, 의약품평가연구센터) 약리학/독성학 심사관의 평가 사례임.

2-1) 현재 NAM의 활용 현황 및 약물 개발을 위한 비임상의 독성 프로그램

- <표-1> 안전성(독성)을 위한 CDER의 규제 의사 결정에 모델 기반 접근법 활용 사례임. 현재 FDA에서 CDER의 약리학/독성학 심사관이 IND를 위하여 사용하는 NAMs의 예시이며 이들은 가이드라인이 마련되어 있음. 단순히 약물뿐만 아니라 의료기기에도 적용되고 있음. 현재 우리나라규제기관에서는 잠재적 변이원성 불순물에 대한 계산 독성학적 위험 평가만 in silico 가이드라인 있지만 적용 사례는 없는 것으로 추정됨.

<표-1> 안전성(독성)을 위한 CDER의 규제 의사 결정에 모델 기반 접근법 활용 사례

NAM의 활용 현황 및 약물 개발 비임상 프로그램에서의 적용 범위	
<ul style="list-style-type: none"> ● 규제 의사결정을 위해 허용 가능한 것으로 인정된 독성시험-NAMs 	<ul style="list-style-type: none"> ● 생체 내 비인간 시험에 대한 검증된 대체법(Validated alternatives to in vivo nonhuman tests) ● 발암성에 대한 증거의 무게(WoE, Weight of evidence (WoE)) 평가 ● 기형 및 배아-태아 치사성(MEFL, malformations and embryo-fetal lethality) 확인을 위한 대체 방법 ● 심혈관 위험 예측을 위한 포괄적 체외 부정맥 유발 시험(CiPA, Comprehensive in vitro proarrhythmia assay) ● 잠재적 변이원성 불순물에 대한 계산 독성학적 위험 평가(Computational toxicology risk assessment)

3-2) 현재 NAM의 활용 현황 및 약물 개발을 위한 비임상의 유효성 프로그램의 사례

- <표-2> FDA에서 약물 개발을 위해 IND에서 사용된 유효성 NAM의 사례임. 각 약물에 대한 자세히 살펴보면 환자의 하위 집단이라는 환자 집단의 특성이 존재한다는 것을 알 수 있음. 이는 환자 집단의 이질성(heterogeneity)을 최대한 줄여서 정확한 타킷 설정으로 **인간에서의 질병 메커니즘에 대한 효과적인 통찰력 부족을 극복하기 위한 사례로** 사료됨.

<p><표-2> 규제 의사 결정에 활용되는 유효성 NAM의 사례</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kalydeco(칼리데코; 낭포성 섬유증의 유전적 하위 집단) • Galafold(갈라폴드; 파브리병의 유전적 하위 집단) • Veopoz(베오포즈; CHAPLE병) - 전세계에서 약 100 명의 환자 • Kimmtrak(김트랙; 절제 불가능 또는 전이성 포도막 흑색종의 유전적 하위 집단)

- <표-3>은 동물모델이 없거나 비임상 자료가 실질적으로 효능 및 안전성을 지원하지 못할 경우에 NAMs이 어떻게 개되고 사용되는가와 더불어 FDA의 승인과 결정을 보여주는 사례라고 할 수 있음.

<표-3> 유효성을 위한 CDER의 규제 의사 결정에 모델 기반 접근법 활용 사례

약물 (광범위한 적응증)	NAM 종류 및 설명	규제적 영향(Regulatory Impact)
Kalydeco (cystic fibrosis) (NDA 203188)	<ul style="list-style-type: none"> • Fischer rat 갑상선 세포를 이용한 체외 CFTR 염화물 수송 분석법(돌연변이 발현) 및 낭포성 섬유증 환자로부터 유래한 인간 기관지 상피 세포에서의 염화물 수송 	<ul style="list-style-type: none"> • 내용: 추가 임상시험 없이 특정 CFTR 유전자 변이 환자를 포함하도록 칼리데코의 적응증을 확대하였음. • 방법: FDA는 치료 반응성 CFTR 돌연변이를 입증하기 위한 CFTR 염소 이온 수송 분석법을 승인했으며, 특정 반응 기준치(염소 이온 수송 >10%)로 지정하였음. • 영향: 이 반응 기준치는 적어도 하나의 CFTR 돌연변이를 가진 환자를 대상으로 한 적절하고 잘 통제된 임상시험의 효능 데이터와 시험관 내 반응 데이터를 상호 검증하여 결정되었음.
Galafold20 (Fabry disease) (NDA 208623)	<ul style="list-style-type: none"> • 특이적 돌연변이를 가진 GLA 유전자를 발현하는 HEK-293 세포를 이용한 체외 GAL(galactosidase) 활성 분석법으로 비정상적으로 침한 알파-갈락토시다제(α-galactosidase A; α-GAL A) 단백질을 생성함. 	<ul style="list-style-type: none"> • 내용: 추가 임상 시험 없이 특정 GLA 유전자 변이 환자를 대상으로 갈라폴드(Galafold)의 적응증을 확대하였음. 신청자는 파브리병을 앓고 있으며 치료 가능한 GLA 변이를 가진 성인 환자에서 갈라폴드의 임상적 이점을 확인하고 기술하기 위해 승인 후 임상시험을 수행해야 했음. • 방법: FDA는 α-GAL A 활성 검사를 활용하여 치료 반응성 GLA를 입증하기 위한 일련의 기준값을 수용했음. 구체적인 반응 기준값은 다음과 같음: 1) 치료 전 수준 대비 α-GAL A 활성의 상대적 증가율 $\geq 20\%$, 2) 야생형(정상) 알파-갈락토시다제 A 활성의 절대적 증가율 $\geq 3\%$. • 영향: 이러한 반응 기준치는 후속 임상시험에서 신장 간질 모세혈관 내 globotriaosylceramide (GL-3 또는 Gb3) 수치 감소라는 대리 평가 지표를 통해 얻은 데이터를 바탕으로 임상적 이점을 예측하거나 합리적으로 예측할 수 있는 것으로 판단되었음.
Veopoz21 (CHAPLE disease) (BLA 761339)	<ul style="list-style-type: none"> • 고전적 및 대안적 보체 시스템 억제에 대한 기전적 통찰을 위한 체외 분석법 및 검증된 생체외 용혈 분석법(CH50; the validated ex vivo 	<ul style="list-style-type: none"> • 내용: 미충족 의료 수요에 대한 1차 치료제인 베오포즈(Veopoz)의 승인을 지원하였음. 관련 임상 데이터와 함께, 기전적 비임상 데이터는 베오포즈의 효능에 대한 실질적 증거를 뒷받침하고 승인을 지원하기 위한 확인 증거로 활용되었음. • 방법: 약리학적으로 관련성 있는 종이 부재한 상황에서, 세포 기반 분석법을 통해 세포독성,

	hemolysis assay)	<p>용혈 및/또는 C5a 생성을 평가함으로써 베오포즈의 보체 활성화 차단 능력을 검증하였음. 검증된 생체외 용혈 분석법(CH50)에서 80% 이상의 억제율은 보체 활성화 감소 및 임상적 이점과 연관된 반응의 기준치로 설정되었음.</p> <ul style="list-style-type: none"> 영향: FDA는 동물, 건강한 지원자 및 Veopoz로 치료받은 CHAPLE 질환 환자에서 일관된 약력학적 반응(즉, 보체 매개 용혈 억제)을 입증한 종합적 증거 평가를 수용하였음
<ul style="list-style-type: none"> 채플병(CHAPLE disease)은 장을 통해 단백질이 손실되는 특징을 보이는 극히 드물고 심각한 유전 질환으로, 전 세계적으로 이 질환을 앓고 있는 환자는 100명 미만으로 알려져 있음. 		
<p>Kimmtrak22 (uveal melanoma) (BLA 761228)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 중 특이성 및 표적 결합 특이성을 증하고 35개 인간 조직에서 잠재적 교차 반응을 규명. 각 조직에 대해 과학적으로 타당한 기능적 평가 지표를 사용하여 13개 조직에서 장성 특이적 가능성을 평가하기 위한 인간 조직 및 세포 기반 체외 분석법 	<ul style="list-style-type: none"> 내용: 약리학적으로 관련성 있는 동물모델이 부재한 상황에서 Kimmtrak을 활용한 임상시험의 안전성을 입증하여 이 혁신적 생물학적 제제의 승인을 이끌어냄. 방법: 체외 분석법 세트는 Kimmtrak의 표적에 대한 높은 결합 특이성과 친화력을 입증했으며, HLA-A*02:01 양성 피부 및 포도막 흑색종 성장 억제 가설을 뒷받침하는 전염증성 사이토카인 및 세포용해성 단백질 수준을 평가하고, Kimmtrak의 표적/종양 외 교차반응 효과를 분석하여 HLA-A*02:01 양성 피부 및 포도막 흑색종 환자에 대한 임상적 효능 가능성을 입증함. 양성 피부 및 포도막 흑색종 성장 억제, Kimmtrak의 비표적/비종양 교차반응성 효과 평가, HLA-A*02:01 양성 절제 불가능 또는 전이성 포도막 흑색종 환자에 대한 임상적 효능 가능성 입증. 영향: 임상시험은 이후 조직학적 또는 세포학적 검사로 전이성 포도막 흑색종이 확인된 HLA-A*02:01 양성 환자 중 전이성 환경에서 치료 경험이 없거나 이전에 국소 간 표적 치료를 받은 환자를 대상으로 진행되었으며, Kimmtrak이 환자의 전체 생존율을 증가시킨다는 점을 입증하였음.
<ul style="list-style-type: none"> KIMMTRAK: 수술로 제거할 수 없거나 전이된 포도막 흑색종이 있는 HLA-A*02:01 양성 성인 환자의 치료에 사용되는 처방약. 그러나 KIMMTRAK은 중증 또는 생명을 위협할 수 있는 심각한 부작용을 유발할 수 있으며, 일반적으로 첫 세 번의 주입 기간 내에 발생함 		

3. 결론

- CDER(Center for Drug Evaluation and Research, 의약품평가연구센터) 약리학/독성학 심사관의 평가 사례를 통해 특정 과학적 질문 해결, 약물 개발 정교화, 안전성 관련 규제 의사 결정에 NAM 활용의 잠재력과 과제를 제시함.
- 그러나 독성시험의 비임상 연구에서 동물 사용을 줄이고 개선하는데 상당한 진전이 있었지만, 우리나라에서는 규제기관에서는 동물을 대체하기 위한 **MAMs(New Approach Methodologies, 비동물-신규 평가방법)**의 활용은 실망스러운 수준임. 매우 정교한 NAMs가 다수 존재함에도 불구하고, 이를 도입하는 데 사회적·규제적·정치적 장벽, 특히 인허가 측면에서 여전히 장벽이 존재함.
- 변화에는 비전이 필요하며, 성공적인 미래를 상상하면서 생각의 변화부터 시작해야 함. 이는 구체적으로 동물실험이 없이 안전하고 효과적인 의약품의 IND를 의미하며 현실적으로 다양한 측면이 고려되어야 장벽을 극복할 수 있을 것으로 사료됨.
- 즉, **NAMs 이용한 신약 개발의 성공적인 미래를 상상하면서 생각의 변화는 어느 스님께서 말씀하신 '산은 산이요, 물은 물이요'를 문구를 적용해 보면 신약개발에서 비임상에 대하여 '동물은 동물이요, 사람은 사람이다'이라는 인식부터 시작될 것으로 사료됨.**

<참고문헌>

Williams-Gray CH, Mason SL, Evans JR, et al. The CamPaIGNstudy of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013; 84: 1258–1264.

Food and Drug Administration. FDA Drug Approval Package NDA 203188: Kalydeco (ivacaftor). 2012.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/203188s000TOC.cfm

Food and Drug Administration. FDA Approval Package NDA 208623: Galafold (migalastat). 2018.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>

Food and Drug Administration. FDA Approval Package BLA 761339: VEOPOZ (pozelimab BBFG). 2023.

Food and Drug Administration. FDA Approval Package BLA 761228: KIMMTRAK (TEBENTAFUSP-TEBN). 2022. <https://www.accessdata.fda.gov/>

89. 의약품 발암성의 동물실험을 대체한 NAM의 예시

1. 신약개발에서의 NAMs 활용에 대한 근거

1-1) 규제 의사결정에 허용되는 것으로 인정된 MAMs(New Approach Methodologies, 비동물-신규 평가방법) 근거

- 비임상시험(NAMs). 2010년 국제조화협회의(ICH)의 산업 지침 개정판인 M3(R2) 의약품의 인체 임상 시험 수행 및 시판 허가를 위한 비임상 안전성 연구(Guidance for industry: M3(R2) nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals.)에서, FDA는 비임상 안전성 평가에 NAM을 통합하는 것에 대한 입장을 다음과 같이 설명(ICH, 2010.) "이 지침에서는 다루지 않았지만, 안전성 평가를 위해 새로운 체외 대체 방법의 사용을 고려해야 함. 이러한 방법은 검증되고 모든 ICH 규제 당국에 의해 수용될 경우, 현재의 표준 방법을 대체하는 데 사용될 수 있음." 그 이후로 NAM은 규제 의사결정을 위한 지침(예: ICH S5(R3), ICH S10, ICH E14 및 S7B 질문과 답변(2022), FDA 산업 지침: 의약품의 면역독성 잠재력 비임상 평가(nonclinical evaluation of the immunotoxic potential of pharmaceuticals) 등 여러 ICH 및 FDA 지침 문서에는 임상시험 및 승인을 위한 약물 안전성 평가에 NAM 사용을 장려하는 구체적인 내용이 <표-1>에서처럼 명시되어 있음.

<표-1> 임상시험 및 승인을 위한 약물 안전성 평가에 NAM 사용을 장려하는 구체적인 내용을 담은 ICH 및 FDA 지침 문서

- ICH M3(R2), 2010. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry: M3(R2) nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. 2010. <https://www.fda.gov/media/71542/download>. Accessed August 25, 2025.
- ICH S10. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry: S10 photosafety evaluation of pharmaceuticals. 2015. <https://www.fda.gov/media/85076/download>. Accessed August 25, 2025.
- ICH E14/S7B. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH E14/S7B: implementation working group clinical and nonclinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential: questions and answers. 2022. https://database.ich.org/sites/default/files/E14-S7B_QAs_Step4_2022_0221.pdf. Accessed August 25, 2025.
- FDA guidance. Food and Drug Administration. FDA guidance for industry: nonclinical evaluation of the immunotoxic potential of pharmaceuticals. 2023. <https://www.fda.gov/media/169117/download>
- ICH S7B. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry: S7B nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. 2005. <https://www.fda.gov/media/72043/download>. Accessed August 25, 2025.

1-2) FDA/CDER의 활용 중인 NAMs

- 미국 식품의약국(FDA) 산하 의약품평가연구센터(CDER; Center for Drug Evaluation and Research) 및 신약심사국(OND)은 신약의 안전성(OND; Office of New Drugs)은 신약의 안전성과 효능을 입증하는 데 있어 비임상시험의 활용도를 극대화하기 위해, 새로운 접근법(NAMs)을 활용한 비임상시험 자료 제출과 규제 당국과의 협력을 지속적으로 권장하고 있음.
- 예를 들어, 체외(in vitro) 분석법은 현재 안구 자극성 및 피부 감작성 평가의 표준이며, 광독성 잠재력 평가의 주요 수단으로 활용되고, 심혈관 안전성 평가의 일환으로 동물 연구(생체 내 비인간 시험)와 병행 사용됨(ICH S10, 2015; ICH E14/S7B, 2022; OECD test no. 432, 2019; OECD test guideline no. 439, 2021). 또한, 과학적으로 타당할 경우 불순물의 유전독성 위험 평가를 위해 컴퓨터 시뮬레이션(in silico) 평가가 활용되고 있음(ICH M7(R2)). 또한 FDA는 과학적으로 타당할 경우 랫드를 대상으로 한 2년간의 발암성 연구(ICH S1B(R1)), 일부 발달 및 생식 독성학 연구(ICH S5(R3), 2021) 및/또는 유년기 동물 연구(ICH S11, 2021)를 수행하는 대신 **증거비중도(WoE, weight of evidence) 평가를 대체하고 있음. 요약하면 <표-1>에서 ①은 자료 검토, ⑤은 in silico 그리고 ②에서 ④은 in vitro의 NAM임.**

<표-1> 안전성(독성)을 위한 CDER의 규제 의사 결정에 모델 기반 접근법 활용 가이드라인

NAM의 활용 현황 및 약물 개발 비임상 프로그램에서의 적용 범위	
<ul style="list-style-type: none"> ● 규제 의사결정을 위해 허용 가능한 것으로 인정된 독성시험-NAMs 	<p>① 발암성에 대한 증거비중도(WoE, Weight of evidence (WoE)) 평가(ICH S1B(R1)).</p> <p>② 체외(in vitro) 분석법은 현재 안구 자극성 및 피부 감작성 평가(ICH S10, 2015; OECD test no. 432; OECD test guideline no. 439).</p> <p>③ 기형 및 배아-태아 치사성(MEFL, malformations and embryo-fetal lethality) 확인을 위한 대체 방법(ICH S5(R3), 2021; ICH S11, 2021)</p> <p>④ 심혈관 위험 예측을 위한 포괄적 체외 부정맥 유발 시험(CiPA, Comprehensive in vitro proarrhythmia assay)(ICH E14/S7B, 2022)</p> <p>⑤ 잠재적 변이원성 불순물에 대한 계산 독성학적 위험 평가(Computational toxicology risk assessment)(ICH M7(R2), 2023).</p>

2. 발암성에 대한 증거비중도(WoE, Weight of evidence) 평가의 의미

2-1) ICH S1B(R1) 가이드라인에 대한 이해

① 발암성시험과 관련된 가이드라인

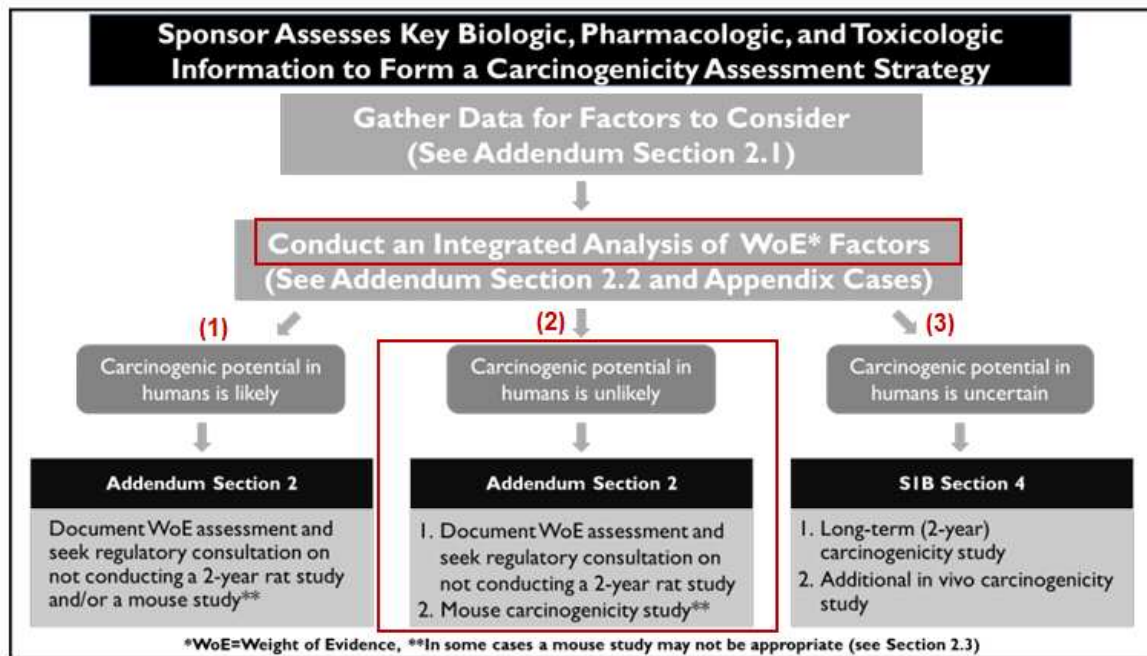
- 합성의약품의 발암성시험은 ICH S1A의 의약품의 장기 설치류 발암성 연구 필요성(1996년 3월), S1B의 의약품 발암성 시험(1997년 7월), S1C(R2) 발암성 연구를 위한 용량 선정(2008년 9월) 등과 더불어 2022년 ICH S1B(R1)이 가이드라인으로 제정되었음. 따라서 합성의약품의 발암성시험은 4가지 가이드라인을 참고하여 수행되어야 함.

② ICH S1B(R1)

- 가이드라인의 이름이 나타내듯 ICH S1B(R1)은 의약품 발암성에 대한 S1B 시험에 대한 부록(Addendum to S1B testing for carcinogenicity of pharmaceuticals)임. 본 부록은 ICH S1A에 명시된 발암성 시험이 필요한 모든 의약품에 적용되지만 생물공학 유래 의약품의 경우, ICH S6(R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals(생물공학 유래 의약품의 전임상 안전성 평가. 2012년)를 참조함.
- 중요한 것은 ICH S1B(R1)은 기존 ICH S1B에 기술되지 않은 추가 접근법을 도입하여 의약품의 인체 발암성 위험 평가 절차를 확장하는 것임. 즉, 이는 2년 랫드 연구를 통해 인체 발암성 위험 평가할 필요성이 있는지에 대한 여부를 판단하는 구체적인 **증거비중도(Weight of Evidence) 기준**을 제공하는 통합적 접근법임. 통합적 접근법의 적용은 3R 원칙(감소/개선/대체)에 따라 동물 사용을 줄이고, 자원을 더 과학적인 기전 기반 발암성 평가 생성으로 전환하는 동시에 신약 개발의 안전성과 윤리성을 지속적으로 촉진하기 위함임.

2-2) ICH S1B(R1)의 핵심적인 내용

- 독성시험 등을 포함한 다양한 자료를 통해 의약품의 인체 발암 가능성 평가 유무를 증거비중도를 결정하는 것을 의미함. 따라서 다양한 자료는 생물학적, 약리학적, 독성학적 정보를 고려한 과학적으로 견고한 발암성 평가 전략을 수립하는 것이 중요함.
- 증거비중도(WoE)는 <그림-1>과 같이 해당 의약품의 인체 발암 가능성에 대한 결론을 뒷받침할 수 있음: (1) 인체 발암 가능성이 높음(Likely): 2년 랫드 발암성 시험을 수행할 필요성이 없는 발암물질. (2) **인체 발암 가능성이 낮음(Unlikely): 2년 랫드 발암성 시험을 수행할 필요성이 없음** (3) 불확실함(uncertain): 2년 랫드 발암성 시험을 수행함. 즉, WoE 평가가 인간 발암 가능성에 대한 불확실성 결론으로 이어지는 경우, ICH S1B에 설명된 장기 발암성 시험과와 추가적인 생체 내 발암성 연구를 병행하는 접근법이 가장 적절한 전략임.



<그림-1> 발암성 평가 전략 수립 및 2년 랫드 연구의 부가가치 결정 시 주요 단계와 선택지 개요에 대한 흐름도.

3. 발암성에 대한 증거비중도(WoE, Weight of evidence) 평가 방법

- S1B(R1) Addendum to S1B Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals 가이드라인에 따르면 증거비중고를 위해 다음의 <BOX-1>과 같이 5가지 factor를 justification 해야 함. 5가지 factor의 핵심 단어로 요약하면 Target biology, Secondary pharmacology, Histopathology chronic study, genotoxicity, immune modulation 등임.

<BOX-1> S1B(R1) Addendum to S1B Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals

A. Factors to Consider for a WoE Assessment (2.1): A WoE approach is based on a comprehensive assessment of the totality of data relevant to carcinogenic potential available from public sources and from relevant drug development studies. These factors include, but are not limited to:

Factor-1: Data that inform carcinogenic potential based on drug target biology and the primary pharmacologic mechanism of the parent compound and major human metabolites; this includes drug target distribution in rats and humans along with the pharmacologic activity and potency of the parent compound and major metabolites in these species; available information from genetically engineered models; human genetic association studies; cancer gene databases; and carcinogenicity information on class effects, if available.

Factor-2: Results from secondary pharmacology screens for the parent compound and major metabolites that inform selectivity and off-target potential, especially those that inform carcinogenic risk (e.g., binding to nuclear receptors) histopathology data from repeated-dose toxicity studies completed with the compound, with particular emphasis on the 6-month rat study, including plasma exposure margin assessments of parent drug and major metabolites.

Factor-3: Evidence for hormonal perturbation, including knowledge of drug target and compensatory endocrine response mechanisms; weight, gross and microscopic changes in endocrine and reproductive organs from repeated-dose toxicity studies; and relevant results from reproductive toxicology studies, if available.

Factor-4: Genetic toxicology study data using criteria from ICH guidance for industry S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use (June 2012); equivocal genotoxicity data that cannot be resolved in accordance with ICH S2(R1) recommendations increases uncertainty with respect to the carcinogenic potential

Factor-5: Evidence of immune modulation in accordance with ICH S8. Evidence of broad immunosuppression may provide sufficient concern for human risk that would not be further informed by standard rat and mouse carcinogenicity studies.

4. 발암성에 대한 증거비중도(WoE, Weight of evidence) 수행 예시

- AITOX는 2025년 FDA의 시험물질에 대한 발암성에 대한 요청에 대해 증거비중도 접근법으로 보고서를 작성하여 FDA 제출하였음

Official FDA Response

Additionally, you **have not explicitly** stated that the chemical characterization will address systemic endpoints such as **chronic toxicity and carcinogenicity**.

██████████, PhD, at 301-785-██████████ or ██████████@fda.hhs.gov.

● AITOX의 보고서 진술서

AITOX's Consulting Report

STATEMENT REGARDING THE REPORT

This report assessed the noncarcinogenicity and chronic toxicity of ██████████ using a non-experimental weight-of-evidence approach. The data used for the evaluation included biocompatibility data ██████████ other research materials, and the assessment was conducted truthfully. Furthermore, it is stated that permission to use the data for the preparation of this report was granted by ██████████

Report written by

Yeong-Chul Park Ph.D. in Toxicology

2025

Date

5. 결론

- 본 예시는 비동물-인간-관련 NAM의 대표적인 예시라고 할 수 있음.
- 발암성시험은 거의 10억원과 2년 반의 고비용-장기간 시험임. 많은 사례를 통해 독성학적으로 불필요한 발암성시험이지만 가이드라인을 제시 후 시험 수행을 요구함.
- 아래와 같이 발암성 시험을 위해서는 4개의 가이드라인을 검토 후 신중하게 수행되어야 함. 개발자의 입장에서는 경비와 시간을 무시하지 못함. 이와 같이 발암성에 대한 증거비중도와 같은 가이드라인이 우리나라 규제기관이 작성하면 오늘날 규제기관이 해결해야 하는 심사 기간의 단축에 큰 도움이 됨.
- (합성의약품의 발암성시험의 4개 가이드라인: ICH S1A의 의약품의 장기 설치류 발암성 연구 필요성(1996년 3월), S1B의 의약품 발암성 시험(1997년 7월), S1C(R2) 발암성 연구를 위한 용량 선정(2008년 9월) 등과 더불어 2022년 ICH S1B(R1)이 가이드라인으로 제정되었음. 따라서 합성의약품의 발암성시험은 4가지 가이드라인을 참고하여 수행되어야 함)

<참고문헌>

- ICH S10, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry: S10 photosafety evaluation of pharmaceuticals. 2015.
- OECD test no. 432. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD test no. 432: in vitro T3 NRU phototoxicity test. 2019.
- ICH E14/S7B, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH E14/S7B: implementation working group clinical and nonclinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential: questions and answers. 2022.
- OECD test guideline no. 439. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD test guideline no. 439: in vitro skin irritation: reconstructed human epidermis test methods. 2021.
- ICH M7(R2). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry: M7(R2) assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. 2023.
- ICH S1B(R1). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry S1B(R1): Addendum to S1B testing for carcinogenicity of pharmaceuticals. 2022.
- ICH S11. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for

Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry S11: nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. 2021.

- ICH S5(R3). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guidance for industry S5(R3): detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals. 2021.

90. 생물의약품의 IND를 위한 NAM-기반 사례에 대한 고찰

1. 안전성을 위한 비임상 프로그램의 유연성

- **질환의 중증도와 희귀질환 등의 유연성:** NAMs 기반 사례 연구의 빈도는 치료 대상 질환의 중증도를 반영함. ICH S9 지침에 따르면, 진행성 암 치료제 개발을 위한 비임상 프로그램은 다른 약물에 비해 더 유연할 수 있음(ICH S9). 또한 ICH S9에 명시된 유연성 중 일부는 사례별로 다른 SLTD(serious and life-threatening diseases. 중증 및 생명 위협성 질환)에도 적용될 수 있음(FDA. Rare Diseases). 예를 들어, FDA의 희귀질환 지침은 안전성과 유효성에 대한 적절한 기준을 유지하면서, 중증 장애 또는 생명을 위협하는 희귀질환 치료제에 대한 법적 기준 적용에 있어 폭넓은 유연성을 강조하고 있음.

2. 생물의약품에 대한 NAM-기반 비임상 안전성 프로그램 분석

1) 질환별 구성

- <표-1>은 2022년 modernization act 2.0 전후로 INDIND(investigational new drug, 임상 시험승인신청)를 위해 대동물의 안전성 자료가 없이 NAM-기반 안전성 자료 제출된 치료제인 23종의 생물의약품(biotherapeutics) 종류와 이유에 대해 설명한 것임. 대동물을 사용하지 않은 이유로 약리작용과 관련하여 동물이 없거나 교차반응성(cross-reactivity)이 없는 치료제로 제시됨. 적응증은 진행성 암(advanced cancer)의 16건, 중증 및 생명 위협성 질환(serious and life-threatening diseases)의 3건, 생명-비위험 치료 수요가 충족되지 않은 질환(Non-LTD<non-life-threatening disease> with unmet need)의 2건, 치료 옵션이 있는 생명을 위협하지 않는 질환(non-LTD<life-threatening disease> with therapeutic options)의 1건 등이었음. **특히 다소 놀라운 점은 거의 대부분 생물의약품에 대한 적절한 동물모델이 없다는 것임.**

<표-1>비임상 안전성 평가를 위한 대형 동물 종(Large Animal Species)을 사용하지 않은 NAMs 기반 사례 연구 예시

Case	Biotherapeutics Description	Species Justification Provided by Respondent
1	T-cell receptor engineered T cells against pMHC	No relevant animal models as target recognition is based on peptide presentation in context of human HLA
2	Multispecific against a solid tumor TAA	Target is expressed in animals, but we do not expect pharmacology based on modality/MoA in any preclinical species
3	Ex vivo gene therapy (presumed cell therapy) against malignant immune cells	No safety assessment done in large nonclinical species due to lack of pharmacology
4	Protein-based replacement drug for Factor VIII	No pharmacological effect in standard nonclinical species
6	TCE against pMHC	Lack of pharmacologically relevant animal species due to highly human specific target
7	Bispecific antibody targeting T cells and a TAA (presumed TCE)	No pharmacologically relevant animal species is available since one binder is human specific only
8	mAb targeting PD1 (receptor antagonist)	No response. Case study focused on an ePPND waiver, so assumption is NHP is a potentially relevant species.
9	TCE against a solid tumor TAA	Cynomolgus monkey was identified as a relevant species (comparable target expression pattern and drug binding to target)
10	Fc-modified anti-cytokine mAb	Cynomolgus monkey was identified as a relevant species

		(comparable binding, potency, and homology)
11	mAb targeting Amyloid protein component P	Dog: does not express target, rodents: express target but with different function, NHP expression is age-related (> 10 years)
12	CAR-T cell therapy against a solid tumor TAA	Standard species not relevant, used transgenic SCID mice
13	TCE (pMHCxCD3) against HIV	No relevant species
14	Bispecific protein TCRxCD3 against pMHC	No relevant species
15	Multispecific Ab against Alzheimer's disease	100% homology but target not found in healthy animals
16	Multispecific Ab against hematology TAA	Tumor target only, no target in healthy animals
17	TCE against a hematology TAA	Antibody is not cross-reactive to target in animal models
18	Multispecific Ab: bispecific co-stimulator against a hematologic TAA; non-CD3-based mAb	Low/no expression of target in healthy cells resulting in no pharmacological response
19	mAb targeting complement factor C5	No cross-reactivity or pharmacologic activity in non-human animal species
20	Engineered T cells against oncogene antigen	The engineered T cells do not cross-react with any normal toxicology species
21	Bispecific TCR-based therapeutic that targets and activates T-cells based on expression of oncogene peptide	Not cross-reactive in normal toxicology species
22	CAR-T cell therapy	Lack of target expression and homology of target
23	Multispecific Ab TCE against malignant immune cells	Lack of species cross-reactivity
ePPND: enhanced pre- and postnatal development(강화된 태전·태후 발달)		

2) 진행성 암(advanced cancer) 치료제의 NAM-기반 안전성 패키지(nonclinical safety package)

- Table 1은 실제로 제출된 사례로 진행성 암(advanced cancer) 치료를 위한 개발 중인 생물의약품(biotherapeutics) 23 case 중 16건이 IND(investigational new drug, 임상시험승인신청)를 위해 부분적으로 NAM-기반 안전성 자료가 제출되거나 NAM만을 기반으로 한 비임상 안전성 패키지(nonclinical safety package)로 FIH 또는 1상 임상시험 진행된 것이 확인됨. 특히 8건(Table 1의 노란색)은 in vivo 독성시험이 수행되지 않고 in silico 및 in vitro의 NAM-기반 안전성 자료만 제출되어 NAM에 대한 의존성 높은 것을 알 수 있음. 또한 in vivo 시험에서 수행은 대동물이 아닌 소동물임. 이는 진행성 암 치료제의 안전성에 대해 유연성이 그 만큼 크다는 것을 의미함(Shenton 등, 2025).

TABLE 1 진행성 암 치료제의 안전성 평가에 사용된 NAM 예시

NAM-based approaches for advanced cancer indications relied largely on NAMs.

Case	Description ^a	Types of NAMs applied in safety assessment		
		In silico	In vitro/ ex vivo	In vivo ^b
1	T-cell receptor engineered T cells against pMHC	Yes	Yes	No
2	Multi-specific against a solid tumor TAA	Yes	Yes	No
3	Ex vivo gene therapy (presumed cell therapy)	Yes	Yes	Yes ^{c,d}
6	TCE against pMHC	Yes	Yes	No
7	Bispecific antibody targeting T cells and a TAA (presumed TCE)	Yes	Yes	No
9	TCE against a solid tumor TAA	Yes	Yes	Yes ^{d,e}
12	CAR T-cell therapy against a solid tumor TAA	No	Yes	Yes ^{c,f}
14	Bispecific protein TCRxCD3 against pMHC	Yes	Yes	No
16	Multi-specific Ab against hematology TAA	No	Yes	Yes ^{c,d}
17	TCE against a hematology TAA	Yes	Yes	Yes ^{c,d}
18	Multi-specific Ab: bispecific co-stimulator against a hematologic TAA; non-CD3-based mAb	Yes	Yes	Yes ^{c,d,e}
20	Engineered T cells against oncogene antigen	Yes	Yes	No
21	Bispecific TCR-based therapeutic that targets and activates T cells based on expression of oncogene peptide	Yes	Yes	No
22	CAR T-cell therapy	Yes	Yes ^g	No
23	Multi-specific Ab TCE against malignant immune cells	Yes	Yes	No

CAR, chimeric antigen receptor; mAb, monoclonal antibody; pMHC, peptide-major histocompatibility complex (MHC); TAA, tumor-associated antigen; TCE, T-cell engager; TCR, T-cell receptor.
Note: Case Study 8 was focused on DART and not included in this table. Although we reported on 22 case studies, case study numbers ranged from 1 to 23 because one case study was excluded.

^a Case description is based on write-in text by the respondent. Assumptions listed are those of the authors.

^b None of these in vivo studies were dedicated nonclinical safety studies.

^c Pharmacology studies in mice (e.g., immunocompromised models) contributed to the weight-of-evidence for safety assessment.

^d PK studies in mice (e.g., immunocompromised, humanized, or FcRn transgenic mice) contributed to the weight-of-evidence for safety assessment and/or the justification of the clinical dose selection.

^e PK studies in large animals (e.g., NHPs or minipigs) supported nonclinical safety.

^f SCID mice injected with patient derived tumor were administered CAR T-cell therapy and at the end of the study all tissues were macroscopically and microscopically examined. These data were utilized to support clinical safety (cross-reactivity with murine target was established prior to study conduct).

^g Respondent reported that no safety endpoints were added to the pharmacology studies but adverse findings in the pharmacology studies would have been investigated although mice were not a relevant species.

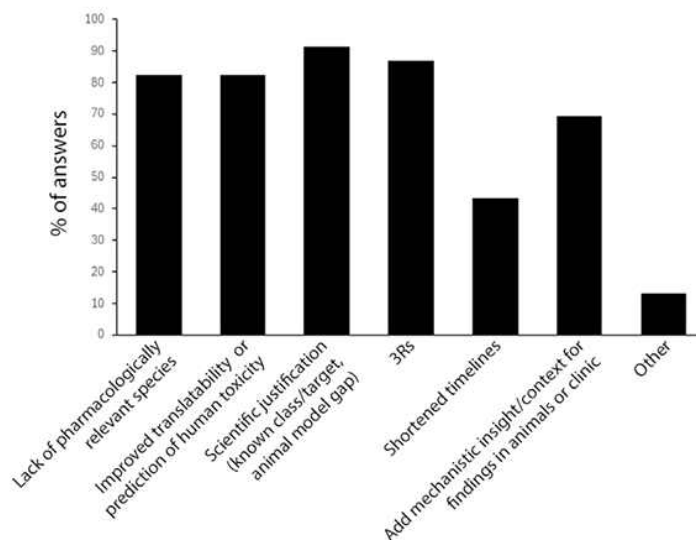
3) SLTD(특정 치료법이 없는 질환) 치료제의 안전성을 위한 비임상 프로그램

이러한 사례들은 ICH S9 적용 범위 외 질환을 대상으로 하는 의약품의 비임상 안전성 프로그램에서 유연성이 제한될 수 있다는 인식 때문에 특히 주목할 만했다.

- 23건 중 6건은 비종양학 적응증을 위해 개발 중이었음. 암과 관련된 비임상 가이드라인 ICH S9 적용 범위 외인 SLTD(특정 치료법이 없는 질환) 환자를 대상으로 개발 중인 사례는 6건 중 3건(<표-1> 11, 13, 19)이었음. 해당 적응증에는 혈청 아밀로이드증, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 일련의 희귀질환이 포함되었음.
- **알츠하이머 질환 치료제:** 진행성 암에 대한 NAM 기반 사례에서 in silico와 in vitro 패키지가 흔히 결합된 것과 달리, 이러한 적응증 개발 의약품의 경우 세 가지 사례 중 두 가지(혈청 아밀로이드증 및 희귀질환)에서 **안전성 평가에 마우스 모델이 사용되었음**. 혈청 아밀로이드증 프로그램(사례 11)의 경우, 최초 인체 임상시험(FIH)을 지원하기 위해 인간 혈청 아밀로이드 A knock-in 마우스 모델에서 항아밀로이드 성분 P 단일클론 항체(mAb)의 약리학 연구에 안전성 평가 지표가 포함됨. 희귀질환 사례(사례 19)에서는 NAM 기반 접근법이 마우스 교차반응성 대리 항체를 시험한 일련의 마우스 독성 연구를 활용하였음.
- **HIV 치료제:** 최종 비-ICH S9이지만 SLTD 사례(사례 13)는 HIV 치료를 위한 펩타이드-MHC 복합체(pMHCxCD3)를 표적하는 이중특이성 T세포 결합체(bis-specific T-cell engager)에 관한 것이었음. 채택된 접근법은 중양 항원(인간 특이적 pMHC 항원 포함)을 표적하는 T세포 결합체에 대한 접근법과 유사했음. 구체적으로, FIH(First-in-Human)를 가능하게 하는 독성학 패키지는 컴퓨터 시뮬레이션 평가(공개 및 독점 데이터베이스 검토), 시험관 내 세포 기반 기능 분석, 이차 약력학(PD) 연구(건강한 조직과의 비표적 교차 반응성 평가)로 구성되었음. NAM 기반 평가는 MABEL(minimum anticipated biological effect level, 생물학적영향-최소추정용량)을 기반으로 위험 식별, 위험 평가 및 FIH 용량 선택을 위해 응용되었음.

3. 결론 - 생물의약품의 IND를 위한 NAM-기반 사례에 대한 고찰

- NAM 자료를 사용하여 IND 통과 및 임상시험 진입에 성공한 생물의약품 23종 중 16종이 진행성 암(advanced cancer)이었고 나머지는 희귀질환으로 확인되었음.
- 특히 중요한 것은 이들 생물의약품의 비임상 안전성 프로그램에서 대동물을 전혀 사용하지 않았고 일부에서 소동물이 이용되었지만 50% 이상에서 in vitro 및 in silico 자료로 제출되었음.
- <그림>은 진행성 암에 대한 생물학제제 개발에 있어서 NAM을 사용한 이유에 대한 나타난 것으로 순서로 (1) 약리학적으로 관련성 있는 종의 부족, (2) 인간 독성에 대한 예측 가능성/전환성 향상, (3) 과학적 타당성 (잘 알려진 약물 계열/표적, 기존 동물 모델의 알려진 한계), (4) 3R 원칙, (5) 단축된 연구 기간, (6) 동물 또는 임상 연구 결과에 대한 추가적인 기전적 통찰력/맥락 제공, (7) 기타 등임. 이유로 (1) - (6)까지가 유사한 비율로 조사되었음.



<그림> Justifications for usage of NAMs

- NAM을 사용한 7가지 이유 중 4가지인 (1) 약리학적으로 관련성 있는 종의 부족, (2) 인간 독성에 대한 예측 가능성/전환성 향상, (3) 과학적 타당성 (잘 알려진 약물 계열/표적, 기존 동물 모델의 알려진 한계), (6) 동물 또는 임상 연구 결과에 대한 추가적인 기전적 통찰력/맥락 제공 등은 약리 및 독성 기전과 관련된 것임. 이는 생물의약품의 동물에서 표적 유무, 상호작용의 양적 affinity 그리고 약리/독성 mechanism에 대한 이해는 NAM 자료의 활용 가능성을 높이며 비용과 시간 절약에 결정적인 기여를 할 것으로 예측됨.

<참고문헌>

ICH (S9). Harmonised Tripartite Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals (S9). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

FDA. Rare Diseases: Considerations for the Development of Drugs and Biological Products Guidance for Industry. U.S. Food and Drug Administration.

Jacintha Shenton, Imein Bousnina, Michael Oropallo, Rhiannon David, Lucinda Weir, Thomas K. Baker, Helen-Marie Dunmore, Remi Villenave, Mary McElroy, Betty Pettersen, Tushar Kokate, Claudette L. Fuller, Kimberly A. Homan, Eloise Hudry, Charles Wood, Sam Gunter, Opportunities and insights from pharmaceutical companies on the current use of new approach methodologies in nonclinical safety assessment, Drug Discovery Today, Volume 30, Issue 4, 2025, 104328, ISSN 1359-6446,

91. 비임상 연구 도구인 NAM의 핵심 5원칙 - 인간 관련성(Human Relevance)

1. New Approach Methodologies (NAMs): 기원과 의미

- **비임상연구에서 동물실험의 기여도:** 동물 모델은 임상시험 전 의약품의 효능과 안전성을 입증하는 데 있어 가장 신뢰할 수 있는 방법으로 간주되었음. 그러나 약 80~90%의 의약품이 임상 시험에서 실패하며, 그중 40~70%는 임상적 효능 부족이나 독성으로 인해 2/3 상에서 실패함. 이에 대체 방법으로 전환하면 동물 실험과 관련된 윤리적 문제를 해결하고, 인간 상태를 더 정확하게 반영하며, 의약품의 품질, 안전성 및 효능을 더 정확하게 예측이 가능할 것으로 기대됨(Harrison, 2016).
- **용어의 최초 기원:** NAM(New Approach Methodologies)은 2016년 4월 헬싱키에서 열린 'New Approach Methodologies in Regulatory Science Proceedings of a scientific workshop'에서 공식적으로 제정된 용어로, 윤리적 연구 원칙을 수용하는 광범위한 기술, 기술 및 접근법을 포괄하며 전 세계 기관들의 규제 의사 결정에 점점 더 많이 채택되고 있음. 즉, 새로운 시험 또는 평가 방법이 NAM으로 인정받으려면 화학물질, 의약품 또는 기타 물질의 규제 위험성 또는 안전성 평가에 관련성이 있어야 함(ECHA, 2016).
- **동물대체법과 NAM의 차이점:** NAM은 동물 모델 대체법에 관한 오늘날의 논의 속에서 여러 가지 다른 의미를 지니게 되었음. 이 용어가 때로는 비동물적 방법 또는 새로운 대체 방법을 의미하기도 하지만, 대체적으로 NAM을 '신규 접근 방법론(New Approach Methodologies)'으로 정의하여 사용. 따라서 NAM은 단순히 동물대체법을 의미하거나 단순히 새로운 과학적 방법이 아님. NAM은 규제기관이 활용할 수 있는 방식으로 안전성을 평가하는 데 적합한 도구로서, 더 예측 가능하고 **인간 관련성이 높으며 비동물적 접근법임**(Lush Prize, 2005; Emulatebio, 2025; Devine 등, 2025). 따라서 **NAM이 동물대체시험법과 다른 점은 인간과 관련성이 더 높다는 것이고 결과적으로 이를 기반으로 하여야 규제기관의 활용성이 가능하다고 할 수 있음.**

<FDA, 2025> U.S. Food and Drug Administration sent this bulletin at 04/10/2025 04:11 PM EDT. US Food and Drug Administration FDA Announces Plan to Phase Out Animal Testing Requirement for Monoclonal Antibodies and Other Drugs

- FDA가 발표와 함께 공개한 새로운 로드맵은 신약의 안전성과 효능을 평가하기 위한 현대화된 프레임워크를 제시하며, 여기에는 신개념 평가 방법론(NAMs)이 대폭 도입된다. 주요 내용은 다음과 같다:
 - **인체 내 약물 행동을 모델링**하고 잠재적 독성을 예측하는 **인공지능 기반 시뮬레이션**.
 - **인간 세포 기반 모델 및 오가노이드**(실험실에서 배양한 소형 장기 모형)를 통해 실제 인간 조직이 새로운 치료법에 어떻게 반응할지 확인할 수 있음.
 - **글로벌 인간 안전성 데이터를 활용**함으로써 FDA는 유사한 규제 기준을 가진 타국의 기존 임상 증거를 신뢰할 수 있어 반복적인 동물 실험의 필요성을 줄일 수 있음.

<원문>

- The FDA's new roadmap, released alongside the announcement, outlines a modernized framework for assessing drug safety and efficacy—one that heavily incorporates New Approach Methodologies (NAMs). These include:
 - AI-based simulations that model how a drug behaves in the human body and predict possible toxicities.
 - Human cell-based models and organoids—miniature lab-grown versions of organs—that can show how real human tissue would respond to a new therapy.
 - Global human safety data, enabling the FDA to rely on existing clinical evidence from other countries with comparable regulatory standards, reducing the need for repetitive animal studies.

2. New Approach Methodologies의 5 원칙

- 입법기관으로는 동물 희생의 감소가 주요 목적이지만 규제기관으로서는 동물 희생의 감소와 더불어 인체에서 안전성 확보가 핵심목표. 또한 개발자 입장에서는 NAM은 신약개발의 전반적인 프로세스에서 비용과 시간을 감소시킬 수 있는 방향으로 개발이 필요함.
- NAMs(신규 접근 방법론 또는 신규 접근법)은 규제 결정을 지원하고 신약 개발을 촉진하기 위해 **인간 관련성(human-relevant)**, 신뢰성(reliable) 및 재현성(reproducible)이 보장된 데이터와 더불어 다음과같이 5가지 요소에 적합한 방향으로 발전이 필요함.

- ① 인간 관련성(Human Relevance)
- ② 기전적 통찰력(Mechanistic Insight)
- ③ 변동성 감소(Reduced Variability)
- ④ 시스템 수준 통합(Systems-Level Integration)
- ⑤ 고속 스크리닝(High-Throughput Screening)

3. 약물 모달리티별 독성기전의 차이

- 신약 개발에서 앞서 비임상 측면에서 약물 모달리티(modality)별 다음과 같은 독성기전에 대한 이해를 기반으로 출발이 중요함.

<비임상시험 항목>	합성의약품	폴리펩타이드 및 단백질 그리고 핵산 등의 고분자의약품	세포치료제
<ul style="list-style-type: none"> • 약리 표적과 관계 	<ul style="list-style-type: none"> • 무관하게 독성 발생 	<ul style="list-style-type: none"> • 수용체의 유무 • 수용체와의 affinity • 수용체/약물의 ratio 	<ul style="list-style-type: none"> • 표적치료제일 경우 관계가 있지만 영양적 요소 기전을 기반한 치료제는 무관
<ul style="list-style-type: none"> • 항원성 및 면역계 영향 	<ul style="list-style-type: none"> • 친전자성으로 전환되어 단백질과 결합할 경우에 발생하지만 낮은 빈도 	<ul style="list-style-type: none"> • 자체가 항원성을 가짐 • 특히 noncanonical amino acid일 경우 높음 	<ul style="list-style-type: none"> • 인체 및 환자-유래 세포이기 때문에 낮음
<ul style="list-style-type: none"> • 화학적 발암성 (chemical carcinogenesis) 	<ul style="list-style-type: none"> • 친전자성 대사체 발생에 의한 돌연변이원성으로 높음 	<ul style="list-style-type: none"> • noncanonical amino acid를 포함한 폴리펩타이드일 경우 주의 요함 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음
<ul style="list-style-type: none"> • 종양원성 (tumorigenesis) 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음 	<ul style="list-style-type: none"> • Immortal cell로 전환 가능성 높음
<ul style="list-style-type: none"> • 안전성약리 	<ul style="list-style-type: none"> • 종간 차이가 있기 때문에 임상시험에서 예측이 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 수용체와 상호작용 가능성으로 예측 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> • 낮음
<ul style="list-style-type: none"> • 독성기전의 핵심 요소 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytochrome P450 	<ul style="list-style-type: none"> • 약물의 사이즈와 noncanonical 아미노산 및 핵산을 포함한 약물 	<ul style="list-style-type: none"> • 암세포로의 전이성
<ul style="list-style-type: none"> • 기타 사항 	약물의 전달체 vector인 virus 및 lipi-nano particle은 고려하지 않음		

4. NAM의 제1요소 - 인간 관련성(Human Relevance)

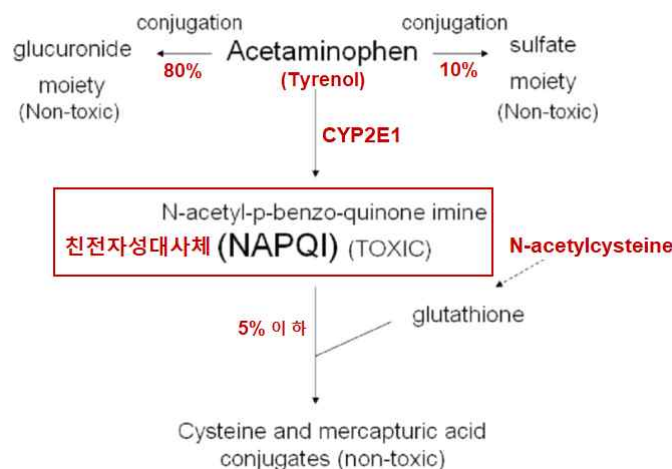
1) 합성의약품의 경우

- 앞페이지 '3. 약물 모달리티별 독성기전의 차이' 합성의약품에 있어서 독성기전의 핵심 요소는 cytochrome P450이라고 설명함.
- Cytochrome P450의 아종 CYP1, CYP2, CYP3 등의 효소는 약물 및 외인성물질 대사에 관여하는 효소로 극성대사체의 무독성 대사체와 친전자성 대사체의 독성대사체를 생성하는 양면성을 가지고 있음. 특히 친전자성 대사체는 DNA 염기와 결합하여 돌연변이를 유발하거나 효소 및 단백질에 결합하여 신호전달체계에 영향을 주어 독성을 유발함. 역으로 대부분의 항암제는 이와 같은 기전을 기반으로 암 치료제로 개발됨.

1-1) 인체의 모체와 태아 독성 차이 예시 - 타이레놀

① 타이레놀의 독성기전

- 지나친 과잉용량에 의해 제2상반응이 full 상태이면 tyrenol은 <그림>에서처럼 에탄올 대사의 핵심 **cytochrome P450인 CYP2E1에 의해 친전자성 대사체인 NAPQI 생성**. NAPQI는 간의 다양한 효소 결합 및 지질에 대한 영향을 통해 간독성의 원인이 됨. 따라서 tyrenol 용량이 제1상반응 대사의 기질이 되지 않도록 지속적으로 복용량이 감소되었음. 그럼에도 불구하고 빠른 해열을 위해 과잉복용을 하거나 음주 후 두통을 제거하기 위해 과잉용량으로 미국에서는 매년 50,000 여명의 응급실 입원과 약 500명이 사망함. 이는 과용량에 의한 친전자성대사체 생성에 의한 독성에 기인함. 유럽에서는 약효가 느린 서방정에 의해 과잉복용에 의한 부작용을 없애기 위해 서방정 제제 금지됨.



<그림> Tyrenol(acetaminophen)의 2가지 경로: 무독성대사체 vs 독성대사체 생성

② 임신 중 태아에서 CYP2E1과 tyrenol(=acetaminophen) 대사

- 친전자성대사체는 반응성이 발생 후 단백질과 10^{-8} 초 정도로 빠르게 이루어지기 때문에 모체에서 발생하여 태아에게 전달되기는 어려움. 따라서 태아에서 CYP2E1 유무가 Tyrenol의 독성을 추정하는 중요한 요소가 됨.
- <그림>은 인간 임신 초기 태아 및 성인 간에서의 상대적 CYP 발현량(로그 2 척도)
- <그림-A>은 태아의 성인 간에서 CYP 발현량. <그림-B>는 인간 만삭 태반과 성인 간에서의 상대적 CYP 발현량.
- 굵은 글씨로 표시된 CYP 유전자들은 두 기관군 간 차등 발현이 확인된 것들이임($p < 0.05$; 절대 발현 변화율(FC) > 1 , log2).
- <그림-A와 그림-B>에서 CYP2E1이 성인과 태아의 간 및 태반에서 가장 많이 발현 차이가 확인됨. 즉, 태아의 cytochrome P450 발현에서 CYP2E1은 가장 낮은 발현으로 확인됨 (파란 네모).

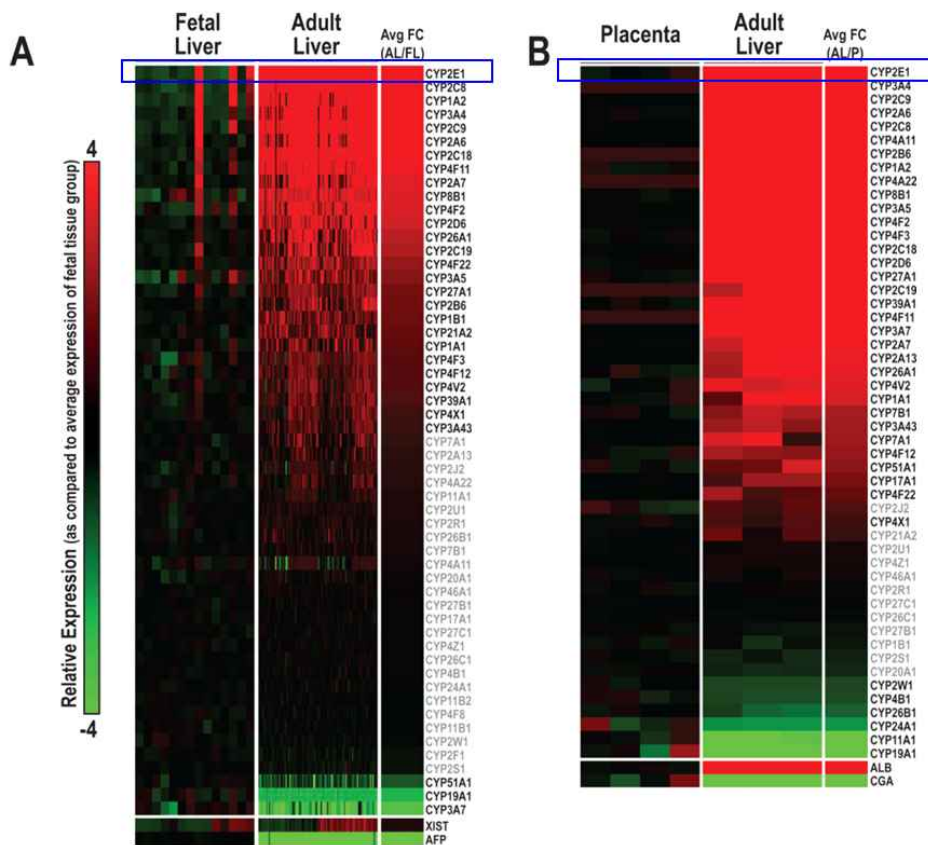


Figure 2: Global CYP expression profiles in human adult and fetal tissues.

④ 타이레놀의 모체와 태아에서의 독성 차이에 대한 이해

- Robinson(2020) 등의 연구에 따르면 CYP는 태아 조직 대비 성인 간에서 주로 높은 수준으로 발현됨. CYP 효소의 60%는 태반에서 정상 수준으로 발현되었음. 실험실 분석에서 성인 및 태아 조직 간 CYP 특이적 발현/활성 차이를 관찰되었으며 **CYP2E1 및 CYP3A4**는 성인 간 대비 태아 간에서 현저히 낮은 발현량을 보였음. 따라서 태아에 도달한 타이레놀은 CYP2E1 효소 활성이 없으므로 대사가 되지 않고 배출될 것으로 예상됨. 따라서 이러한 이유로 타이레놀에 대한 모체와 태아의 독성이 차이가 있음.

⑤ 트럼프, 임신초기 타이레놀 복용 시 자폐증(Autism) 유발에 대한 독성학적 결론

- 트럼프의 2025년 9월 23일발표
 - FDA가 임신 중 아세트아미노펜 사용이 자폐증(autism) 또는 자폐 스펙트럼 장애(ASD, autism spectrum disorder)위험과 관련 있다고 경고할 예정이라고 발표.
 - 타이레놀 사용을 가능한 한 피하라고 권고.
 - 백신도 소량으로, 장기간에 걸쳐 접촉해야 한다고 주장했으나 의학적 근거는 제시하지 않음.
- Tyrenol은 과잉용량 복용에 의하여 CYP2E1-기반 대사에 의해 친전자성대사체인 NAPQI 독성으로 미국에서는 매년 50,000 명의 응급실 입원과 약 500명이 사망함.
- 그러나 태아의 간 및 태반에서 친전자성대사체인 NAPQI를 생성하는 CYP2E1은 거의 발현되지 않음. 따라서 트럼프의 임신초기 타이레놀 복용 시 자폐증(Autism) 유발에 대한 독성학적 근거는 없음.

⑥ 결론: 인체의 모체와 태아 독성 차이 예시 - 타이레놀

- 특히 인체 내에서도 약물에 대해 모체와 태아에 대한 독성기전의 차이가 **cytochrome P450 발현 유무에 따라 차이가 있다는 것을 확인 할 수 있음.**

1-2) 제브라피쉬 기형 또는 배아-태아 치사율(MEFL) 평가 예시

① 제브라피쉬의 독성시험에 있어서 동물모델 적합성 주장

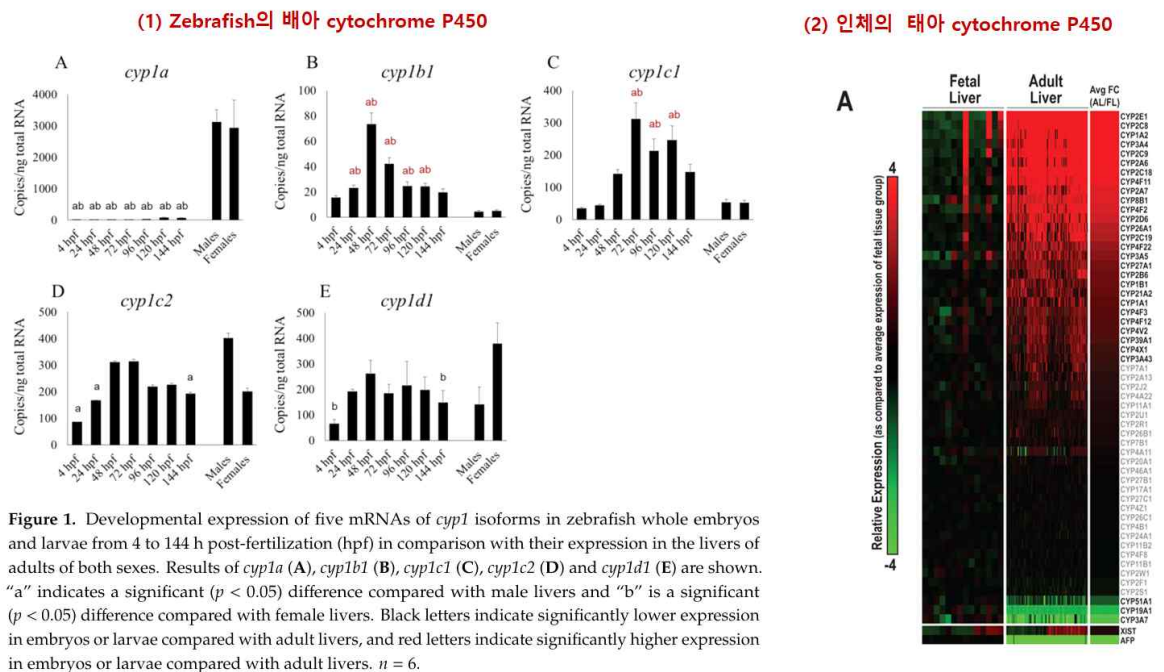
- 제브라피쉬(Danio rerio)는 어류와 인간 계통의 계통 발생학적 분석을 바탕으로 인간 질환 치료에 잠재적으로 활용 가능한 약물 선별에 적합한 모델이므로 주장됨. 특히 이는 신경계, 심혈관계, 소화계의 형태학적·생리학적 유사성을 보여준다고 함. 최근까지 제브라피쉬는 척추동물 발달 과정 중 약리학적 효과와 독성을 연구하기 위한 유망한 동물 모델이라고 주장됨(Chahardehi 등, 2020; Hong 등, 2024; Bauer 등, 2021). 이에 **인간과 제브라피쉬 사이**의 세포 구조적 및 생화학적 유사성은 화학 물질 및 기타 물질이 인간 사회에 미칠 수 있는 영향을 신속하게 예측할 수 있다고 함.

② 제브라피쉬 배아를 이용한 기형 또는 배아-태아 치사율(MEFL; the assessment of malformations or embryo-fetal lethality) 평가 소개

- 여러 연구에서 기형 또는 배아-태아 치사율(MEFL; the assessment of malformations or embryo-fetal lethality) 평가를 위해 제브라피쉬 배아를 사용할 것을 제안해 왔다. 그러나 국제조화위원회(ICH) S5(R3) 지침에 기반하여 전 세계적 요구를 충족하는 제브라피쉬 MEFL 시험 방법의 표준으로서 재현 가능한 프로토콜은 아직 확립되지 않았음
- 이러한 독성시험 방법을 확립하기 위해, 우리는 특히 기형 유발 가능성이 있는 화학물질에 의해 유발되는 MEFL을 검출하기 위한 새롭고 간편한 프로토콜을 개발하였음.
- 이 프로토콜은 발달 5일 이내의 수정된 제브라피쉬 난자(배아)를 사용함. 동한 프로토콜을 2~4개 실험실에서 수행한 독성 시험 결과, 높은 실험실 간 재현성이 확인되었음. 본 시험법은 랫드 MEFL을 유발한 22개 시험 화합물 중 18개를 검출할 수 있었음. 따라서 본 제브라피쉬 MEFL 시험법의 예측률은 랫드 대비 82%에 달했음. 종합적으로 본 연구는 ICH 가이드라인 S5(R3)를 충족하는 생식 및 발달 독성 평가용 제브라피쉬 MEFL 시험법의 간편하고 재현성 높은 프로토콜 확립을 제안하며, 이는 규제 목적으로 다른 출처의 정보와 결합하여 추가 고려되길 바람(Mori 등, 2024).

③ 제브라피쉬의 배아-태아 치사율 시험법에 대한 평가

- 제브라피쉬의 배아-태아 치사율 시험법에 대한 평가 시험법은 랫드 MEFL을 유발한 22개 시험 화합물 중 18개를 검출하였고 예측률은 랫드 대비 82%에 달했음(MEFL)
- 아래 <그림>은 zebrafish의 배아와 인체 태아의 cytochrome P450 발현에 대한 mRNA 수준에서 비교한 것임. Zebrafish 배아에서는 CYP1A, CYP1B1, CYP1C1, CYP1C2 그리고 CYP1D1 등의 5종이 확인되었음. 안체 태아에서는 CYP2J2가 가장 많이 발현되었고 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP4A 및 CYP2E1 등은 거의 발현되지 않았음. 이는 CYP1A 아종과 전혀 반대되는 발현으로 제브라피쉬의 배아-태아 치사율 시험법은 인체의 생식발달 독성에 대한 예측에 있어서 상당한 괴리가 있을 것으로 추정됨,



5. 결론: NAM의 제1요소 - 인간 관련성(Human Relevance)

- 합성의약품의 독성기전에서 핵심원리는 아래의 <표>에서처럼 cytochrome P450 효소이며 효소 대사에 의해 극성대사체 또는 친전자성 대사체 생성에 따라 독성이 결정됨.
- 타이레놀의 인간 모체와 태아의 독성 비교를 통해 동일한 신체 내에 존재하지만 Cytochrome P450 발현에 따라 독성이 달라짐.
- 동물대체법으로 사료되는 제브라피쉬의 배아-태아 치사율 시험법에 대한 평가 시험법 (MEFL; the assessment of malformations or embryo-fetal lethality)은 랫드 MEFL을 유발한 22개 시험 화합물 중 18개를 검출하였고 예측률은 랫드 대비 82%에 달했음. 그러나 Cytochrome P450의 일치성의 거의 없기 때문에 인체 생식-발달 독성 예측에 한계가 있을 것으로 추정됨.
- 대부분의 동물대체법 시험은 제브라피쉬의 배아-태아 치사율 시험법과 같이 이와 같은 독성기전에 이해가 없이 개발됨. NAM이 동물대체법 시험고 차이점은 바로 인간-관련성 (Human Relevance) 독성기전 이해가 시험법에 반영되어 개발된다는 점임. 이에 추가적으로 NAM의 방향은 Human Relevance를 기반한 약리시험과 독성시험이 동일한 시스템에서 이루어질 확률이 높을 것으로 예상됨.

<표> 신약 개발에서 앞서 비임상 측면에서 약물 모달리티(modality)별 다음과 같은 독성기전에 대한 이해를 기반으로 출발이 중요함.

<비임상시험 항목>	합성의약품	폴리펩타이드 및 단백질 그리고 핵산 등의 고분자의약품	세포치료제
• 약리 표적과 관계	• 무관하게 독성 발생	• 수용체의 유무 • 수용체와의 affinity • 수용체/약물의 ratio	• 표적치료제일 경우 관계가 있지만 영양적 요소 기전을 기반한 치료제는 무관
• 항원성 및 면역계 영향	• 친전자성으로 전환되어 단백질과 결합할 경우에 발생하지만 낮은 빈도	• 자체가 항원성을 가짐 • 특히 noncanonical amino acid일 경우 높음	• 인체 및 환자-유래 세포이기 때문에 낮음
• 화학적 발암성 (chemical carcinogenesis)	• 친전자성 대사체 발생에 의한 돌연변이원성으로 높음	• noncanonical amino acid를 포함한 폴리펩타이드일 경우 주의 요함	• 없음
• 종양원성 (tumorigenesis)	• 없음	• 없음	• Immortal cell로 전환 가능성 높음
• 안전성약리	• 종간 차이가 있기 때문에 임상시험에서 예측이 어려움	• 다양한 수용체와 상호작용 가능성으로 예측 어려움	• 낮음
• 독성기전의 핵심 요소	• Cytochrome P450	• 약물의 사이즈와 noncanonical 아미노산 및 핵산을 포함한 약물	• 암세포로의 전이성
• 기타 사항	약물의 전달체 vector인 virus 및 lipi-nano particle은 고려하지 않음		

<참고문헌>

Chahardehi AM, Arsad H, Lim V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants (Basel)*. 2020 Oct 12;9(10):1345.

Taeyeon Hong, Junho Park, Gwonhwa Song, Whasun Lim, Brief guidelines for zebrafish embryotoxicity tests, *Molecules and Cells*, Volume 47, Issue 8, 2024, 100090, ISSN 1016-8478.

Bauer B, Mally A, Liedtke D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 14;22(24):13417.

Nawaji T, Yamashita N, Umeda H, Zhang S, Mizoguchi N, Seki M, Kitazawa T, Teraoka H. Cytochrome P450 Expression and Chemical Metabolic Activity before Full Liver Development in Zebrafish. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Dec 11;13(12):456.

Mori K, Aoki Y, Mikashima F, Maki K, Tanaka T, Hayashi M, Sugimoto W, Ono M, Umekita S, Niino T, Fujiwara M, Ebata T, Hirata H, Kojima H. Validation of a new protocol for a zebrafish MEFL (malformation or embryo-fetal lethality) test method that conforms to the ICH S5 (R3) guideline. *J Toxicol Sci*. 2024;49(8):337-348.

Robinson JF, Hamilton EG, Lam J, Chen H, Woodruff TJ. Differences in cytochrome p450 enzyme expression and activity in fetal and adult tissues. *Placenta*. 2020 Oct;100:35-44.

92. 비임상 NAM의 핵심 5원칙 - (2) 기전적 통찰력(Mechanistic Insight)

1. New Approach Methodologies (NAMs): 기원과 의미

- **비임상연구에서 동물실험의 기여도:** 동물 모델은 임상시험 전 의약품의 효능과 안전성을 입증하는 데 있어 가장 신뢰할 수 있는 방법으로 간주가 되었음. 그러나 약 80~90%의 의약품이 임상시험에서 실패하며, 그중 40~70%는 임상적 효능 부족이나 독성으로 인해 2/3상에서 실패함. 이에 대체 방법으로 전환하면 동물 실험과 관련된 윤리적 문제를 해결하고, 인간 상태를 더 정확하게 반영하며, 의약품의 품질, 안전성 및 효능을 더 정확하게 예측이 가능할 것으로 기대되었음(Harrison, 2016).
- **용어의 최초 기원:** NAM(New Approach Methodologies)은 2016년 4월 헬싱키에서 열린 'New Approach Methodologies in Regulatory Science Proceedings of a scientific workshop'에서 공식적으로 제정된 용어로, 윤리적 연구 원칙을 수용하는 광범위한 기술, 기술 및 접근법을 포괄하며 전 세계 기관들의 규제 의사 결정에 점점 더 많이 채택되고 있음. 즉, 새로운 시험 또는 평가 방법이 NAM으로 인정받으려면 화학물질, 의약품 또는 기타 물질의 규제 위험성 또는 안전성 평가에 관련성이 있어야 함(ECHA, 2016).
- **동물대체법과 NAM의 차이점:** NAM은 동물 모델 대체법에 관한 오늘날의 논의 속에서 여러 가지 다른 의미를 지니게 되었음. 이 용어가 때로는 비동물적 방법 또는 새로운 대체 방법을 의미하기도 하지만, 대체적으로 NAM을 '신규 접근 방법론(New Approach Methodologies)'으로 정의하여 사용. 따라서 NAM은 단순히 동물대체시험법(Animal-alternative test)을 의미하거나 단순히 새로운 과학적 방법이 아님. NAM은 인간 관련성(Human Relevance)을 기반으로 비임상 자료 생산이 이루어지므로 임상시험에서 예측력이 더 높은 비동물적 접근법임(Lush Prize, 2005; Emulatebio, 2025; Devine 등, 2025). 따라서 NAM이 동물대체시험법과 다른 점은 인간 관련성(이 더 높다는 것이고 결과적으로 이를 기반으로 한 자료가 규제기관의 활용성이 가능하다고 할 수 있음).

<FDA, 2025> U.S. Food and Drug Administration sent this bulletin at 04/10/2025 04:11 PM EDT. US Food and Drug Administration FDA Announces Plan to Phase Out Animal Testing Requirement for Monoclonal Antibodies and Other Drugs

- FDA가 발표와 함께 공개한 새로운 로드맵은 신약의 안전성과 효능을 평가하기 위한 현대화된 프레임워크를 제시하며, 여기에는 신개념 평가 방법론(NAMs)이 대폭 도입된다. 주요 내용은 다음과 같다:

- **인체 내 약물 행동을 모델링**하고 잠재적 독성을 예측하는 **인공지능 기반 시뮬레이션**.
- **인간 세포 기반 모델 및 오가노이드**(실험실에서 배양한 소형 장기 모형)를 통해 실제 인간 조직이 새로운 치료법에 어떻게 반응할지 확인할 수 있음.
- **글로벌 인간 안전성 데이터를 활용**함으로써 FDA는 유사한 규제 기준을 가진 타국의 기존 임상 증거를 신뢰할 수 있어 반복적인 동물 실험의 필요성을 줄일 수 있음.

<원문>

- The FDA's new roadmap, released alongside the announcement, outlines a modernized framework for assessing drug safety and efficacy—one that heavily incorporates New Approach Methodologies (NAMs). These include:
- AI-based simulations that model how a drug behaves in the human body and predict possible toxicities.
- Human cell-based models and organoids—miniature lab-grown versions of organs—that can show how real human tissue would respond to a new therapy.
- Global human safety data, enabling the FDA to rely on existing clinical evidence from other countries with comparable regulatory standards, reducing the need for repetitive animal studies.

2. New Approach Methodologies의 5 원칙

- 입법기관으로는 동물 희생의 감소가 주요 목적이지만 규제기관으로서는 동물 희생의 감소와 더불어 인체에서 안전성 확보가 핵심목표. 또한 개발자 입장에서는 NAM은 신약개발의 전반적인 프로세스에서 비용과 시간을 감소시킬 수 있는 방향으로 개발이 필요함.
- NAMs(신규 접근 방법론 또는 신규 접근법)은 규제 결정을 지원하고 신약 개발을 촉진하기 위해 **인간 관련성(human-relevant)**, 신뢰성(reliable) 및 재현성(reproducible)이 보장된 데이터와 더불어 **다음과 같이 5가지 요소**에 적합한 방향으로 발전이 필요함.
 - ① 인간 관련성(Human Relevance): 동물 모델보다 인간 생물학을 더 가깝게 반영하는 첨단 체외 모델(예: 오가노이드, 칩 위의 장기), 컴퓨터 시뮬레이션 모델링 및 AI 기반 독성 예측의 사용을 장려할 것임. 이는 NAM이 인간 유래 세포를 활용하거나 인간 생리학적 조건을 모사하여 중간 외삽과 관련된 불확실성을 줄이기 위함임.
 - ② **기전적 통찰력(Mechanistic Insight)**
 - ③ **변동성 감소(Reduced Variability)**
 - ④ **시스템 수준 통합(Systems-Level Integration)**
 - ⑤ **고속 스크리닝(High-Throughput Screening)**

3. 약물 모달리티별 독성기전의 차이

- 신약 개발에서 앞서 비임상 측면에서 약물 모달리티(modality)별 다음과 같은 독성기전에 대한 이해를 기반으로 출발이 중요함.

<비임상시험 항목>	합성의약품	폴리펩타이드 및 단백질 그리고 핵산 등의 고분자의약품	세포치료제
<ul style="list-style-type: none"> • 약리 표적과 관계 	<ul style="list-style-type: none"> • 무관하게 독성 발생 	<ul style="list-style-type: none"> • 수용체의 유무 • 수용체와의 affinity • 수용체/약물의 ratio 	<ul style="list-style-type: none"> • 표적치료제일 경우 관계가 있지만 영양적 요소 기전을 기반한 치료제는 무관
<ul style="list-style-type: none"> • 항원성 및 면역계 영향 	<ul style="list-style-type: none"> • 친전자성으로 전환되어 단백질과 결합할 경우에 발생하지만 낮은 빈도 	<ul style="list-style-type: none"> • 자체가 항원성을 가짐 • 특히 noncanonical amino acid일 경우 높음 	<ul style="list-style-type: none"> • 인체 및 환자-유래 세포이기 때문에 낮음
<ul style="list-style-type: none"> • 화학적 발암성 (chemical carcinogenesis) 	<ul style="list-style-type: none"> • 친전자성 대사체 발생에 의한 돌연변이원성으로 높음 	<ul style="list-style-type: none"> • Noncanonical amino acid를 포함한 폴리펩타이드일 경우 주의 요함 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음
<ul style="list-style-type: none"> • 종양원성 (tumorigenesis) 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음 	<ul style="list-style-type: none"> • Immortal cell로 전환 가능성 높음
<ul style="list-style-type: none"> • 안전성약리 	<ul style="list-style-type: none"> • 종간 차이가 있기 때문에 임상시험에서 예측이 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 수용체와 상호작용에 의한 cross-reactivity 가능성으로 예측 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> • 낮음
<ul style="list-style-type: none"> • 독성기전의 핵심 요소 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytochrome P450 	<ul style="list-style-type: none"> • 약물의 사이즈와 noncanonical 아미노산 및 핵산을 포함한 약물 • Cross-reactivity 	<ul style="list-style-type: none"> • 암세포로의 전이성
<ul style="list-style-type: none"> • 기타 사항 	약물의 전달체 vector인 virus 및 lipid-nano particle은 고려하지 않음		

4. 비임상 NAM의 핵심 5원칙 - 기전적 통찰력(Mechanistic Insight)

1) NAM의 광범위한 채택을 가로막는 장애물

① 약물의 전신적 영향

- NAM은 큰 잠재력을 지녔음에도 불구하고, 광범위한 규제 승인을 위해 필요한 엄격한 과학적 검증 기준을 충족하는 데 있어 중대한 도전에 직면해 있음. 핵심 문제는 현재의 NAM이 일반적으로 단일 세포나 장기 수준에서의 통찰력만을 제공할 뿐, 여러 장기 간의 복잡한 상호작용이나 약물이 전신에 미치는 체계적 효과를 포착하지 못한다는 점임.
- 예를 들어 주요 장기 기능을 모방하는 3차원 세포 배양체인 오가노이드는 전체 장기 생리학을 재현할 수 있는 혈관 시스템을 갖추지 못함. 진전이 이루어지고 있지만, 전신적 약물 분포, 대사, 면역 반응을 아우르는 인간 생리학의 완전한 복잡성을 재현하는 것은 여전히 상당한 과학적·공학적 장벽임.

② 약물 모달리티별 전체적 독성 프로파일

- 다양한 NAM 분석법의 예측 가능성과 발전 정도는 상당히 차이가 있음. 예를 들어, 단백질과 같은 생물학적 제제의 예측 독성학 분야에서 NAM은 상당한 진전을 이루었는데, 이는 잘 정의된 단백질-단백질 상호작용이 체외 모델링에 더 적합하기 때문임.
- 반면, 합성의약품의 독성 예측은 뒤쳐져 있음. 이러한 화합물은 종종 "점착성(sticker)" 행동을 보이며 더 광범위한 생물학적 표적과 더 복잡하고 비특이적인 상호작용을 일으킴. 현재의 NAM으로 전체 독성학적 프로파일을 정확히 포착하기 어려움. 앞으로 이러한 과제를 해결하고 NAM의 잠재력을 완전히 실현하기 위해서는 강력한 검증 노력이 필수적일 것임.

2) 합성의약품의 독성기전

- Mechanism-based activation (MBA, 기전-기반 활성화)은 사이토크롬 P450에 의한 약물 대사적 생체활성화(metabolic bioactivation of a xenobiotic by cytochrome P450)로, 고반응성 중간체를 생성하여 이후 해당 효소에 결합함으로써 준불가역적 또는 불가역적 억제제를 초래하는 현상을 의미함.
- 약물의 기전-기반 활성화는 합성의약품의 drug-drug interaction에 의한 독성을 제외하고 합성의약품의 잠재적 기능성 그룹(예: 티오펜, 푸란, 알킬아민 등)이 cytochrome P450에 의한 고반응성 중간체(highly reactive intermediates) 생성에 기인함.
- 지난 10년간 분자 모델링 기법, 특히 밀도 함수 이론을 통해 약물이 CYP450 효소에 의해 고반응성 중간체(highly reactive intermediates)를 생성하는 가장 타당한 메커니즘이

밝혀졌음(Hirao 등, 2025; Goings 등, 2022). 따라서 CYP450 효소에 의해 고반응성 중간체(highly reactive intermediates) 생성 기전에 대한 이해는 합리적 약물 설계, 독성 예방 과정, 신규 억제제 및 촉매 발견 등을 통해 응용이 가능함.

- 특히 합성의약품에 대해 **NAM으로 전체 독성학적 프로파일을 정확히 포착하기 어려움을 돈이 확인할 필요성은 없음**. 이유는 **합성의약품의 비표적 전신독성**은 고반응성 중간체(highly reactive intermediates) 생성에 기인하기 때문임. 즉, 구체적으로 어느 기관에서 발생하는지에 대한 학인 어렵지만 독성 기전의 핵심 원리이기 때문에 비표적 전신독성을 유발하는다는 것은 추정이 가능함.

3) CYP450의 최신 computational NAM 모델 - **AOM과 BOM의 결합한 SOM 라벨링 접근법**

- 지금까지의 대사 예측 알고리즘은 **대사 원자(AOM, Atom of metabolism)**에만 의존하여 대사 부위(SOM, sites of metabolism)를 예측.
- 그러나 원자와 Cytochrome P450의 모호한 매칭의 극복하고 다양한 촉매반응의 오분류를 줄이기 위해 **AOM과 BOM(bond of metabolism)의 결합을 통한 SOM labelling의 필요성**
- 즉, hydroxylation 및 heteroatom oxidation과 같은 **단일 원자** 위치에서 발생하는 반응은 AOM으로 labelling하고 화학결합이 이루어지는 원자쌍이 관여하는 반응인 dealkylation, hydrolysis, 그리고 epoxidation은 BOM으로 labelling. 특히 **cytochrome P450에 의한 이들 반응(dealkylation, hydrolysis, 그리고 epoxidation)은 친전자성 대사체의 Reactive intermediate을 생성에 있어 핵심적인 역할을 함**.
- 이에 대한 자세한 내용은 AITOX 컨설팅보고서 **81. FDA 2020-2024년 승인된 합성신약의 대사체-90% 예측 AI-프로그램을 참조**

4) 합성의약품의 친전자성 물질 생성 기전: Cytochrome P450 vs Natural decomposition

4-1) 합성의약품에 대한 독성 예측에 대한 의견

- <참고문헌-1>은 NAM을 위해서 가장 문제되는 약물 모달리티가 '합성의약품의 독성 예측이 가장 뒤쳐져 있고 비특이적인 상호작용으로 인하여 전체 독성학적 프로파일을 정확히 포착하기 어렵다고' 주장함.

<참고문헌-1> Brandon Parry et al., How new approach methodologies are reshaping drug discovery. <https://www.mckinsey.com>. June 18, 2025.

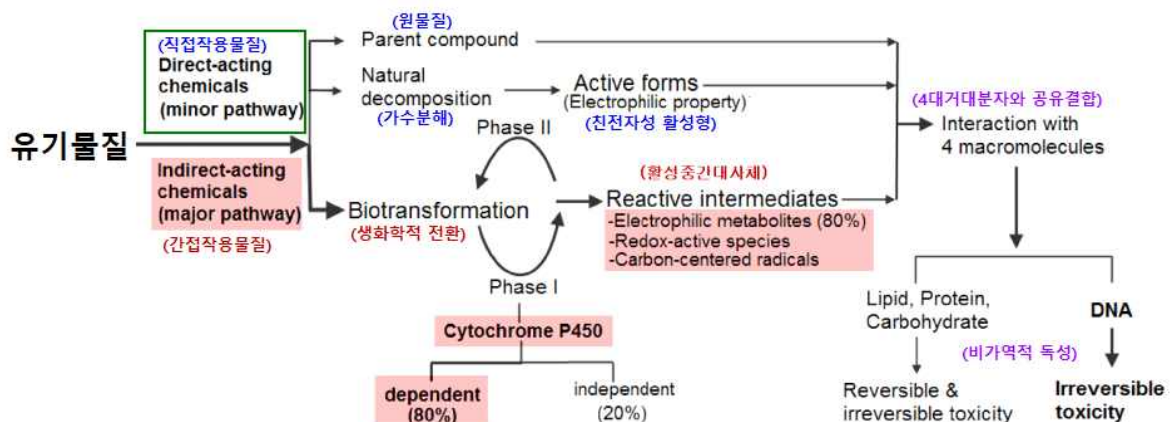
- <주장> 반면, 합성의약품의 독성 예측은 뒤쳐져 있음. 이러한 화합물은 종종 "점착성 (sticker)" 행동을 보이며 더 광범위한 생물학적 표적과 더 복잡하고 비특이적인 상호작용을 일으킴. 현재의 NAM으로 전체 독성학적 프로파일을 정확히 포착하기 어려움. 앞으로 이러한 과제를 해결하고 NAM의 잠재력을 완전히 실현하기 위해서는 강력한 검증 노력이 필수적일 것임.
- <원문>Conversely, predicting the toxicity of small molecules lags behind. These compounds often display "stickier" behavior and engage in more-complex, frequently nonspecific interactions with a broader range of biological targets, which complicates accurately capturing their entire toxicological profile with current NAMs. Looking ahead, strong validation efforts will be crucial in addressing these challenges and realizing the full potential of NAMs.

4-2) 친전자성 생성의 2 경로: Cytochrome P450 vs Natural decomposition

- 사실 <참고문헌-1>에 대한 주장은 독성학에 대한 기본 원리의 이해 부족으로 기인하는 것으로 추정됨. 파라셀수스의 용량이 약과 독으로 결정한다는 500년 전의 dogma 인식에 벗어나지 못하는 것임.
- 사실 규제기관이나 제약업계 등도 파라셀수스의 도그마에서 벗어나지 못하기 때문에 인허가 과정에서 수많은 비논리적이면서 비독성학적 기반의 troubleshooting 발생과 글로벌 신약 하나 제대로 개발을 못한 이유가 됨. 최근 국내의 모 규제기관에서는 인허가 과정을 신속하게 진행하기 위해 200 여명의 인허가 전문가를 모집한다고 함. 아주 다행스러운 정책 변화이지만 올바른 독성학을 배우지 못한 약대 출신 중심으로 선발된다면 규제기관의 미래는 아주 희망적이지 못할 것으로 추정됨. 가이드라인이나 펼치면서 막무가내의 주장에 얼마나 많은 개발자가 규제기관의 비논리적/비학문적 주장을 경험한 것은 인지상정임. 예를 들어 2019 Annual meeting of the American College of Toxicology에서 IND를 위한 약리/독성 평가자인 Dr. Alapatt의 발표된 내용에 따르면 팀내 또는 조직 내에서도 NOAEL에 대한 이해가 서로 다르다는 것임(Baldrick 등, 2020). 우리나라 규제기관의 비논리적/비학문적 테러라는 것은 획일성에서 나옴. FDA에서처럼 심사자들의 견해가 차이가 있다면 개발자와 의견과 일치하는 경우에는 개발자의 의견이 받아들일 수 있다는 점임. IND(Investigational new drug, 임상시험승인신청)의 심사위원은 대부분 약대 출신임. IND의 핵심은 비임상 독성과 약리를 기반으로 임상시험 예측에 대한 심사가 이루어짐. 대부분의 개발자 의견에 따르면 비임상 자료 분석에서 치밀하지 못하다는 것임. 이러한 측면에서 약대의 독성학 교육이 얼마나 허약한지 이해가 되며 동시에 약대에서 올바른

독성학 교육은 우리나라 신약 개발 중요한 기여를 한다는 것을 명심할 필요성 있음. 예를 들어 미국 FDA의 약리/독성 리뷰어들처럼 동물을 이용한 독성시험 자료 하나 없이 IND에서 임상시험 승인이 가능할 정도의 수준을 끌어 올릴 정도의 독성학 수준이 필요하다는 것임. 어떤 방법으로든 200 여명 인허가 전문가의 새로운 선발자들에게 제대로 된 독성학 교육이 필요하다고 사료됨. 만약 규제기관 내의 교육에서 벗어나지 못한다면 인허가에서 획일성은 더욱 증가되며 또 다른 인허가의 비논리적/비학문적 곤대를 양성할 뿐일 것으로 사료됨.

- **약대에서 IND를 위한 독성학 핵심은 파라셀수스의 용량이 약과 독으로 결정한다는 500년 전의 dogma 인식에서 벗어나야 함.** 벗어나는 우선적인 것은 어떻게 친전자성 물질이 생성되며 어떻게 이들에 의해 독성이 발현되는지에 대한 이해임. 아래의 <그림>은 합성의약품의 기본 성분인 유기물질이 체내에서 어떻게 친전자성으로 전환되는가에 대한 2가지 경로인 가수분해와 같은 비효소적인 친전자성 활성화형 생성 경로인 natural decomposition(자연분해)과 효소적 방법인 biotransformation에 의한 활성중간대사체(reactive intermediate, reactive metabolite)임. 이들은 DNA 및 단백질의 전자가 풍부한 친핵성 부위에 공유결합하여 돌연변이와 효소활성 저해를 유발, 또는 지질과산화물을 통해 독성을 유발함. 따라서 **합성의약품의 독성기전은 대부분 DNA 손상, 효소 비활성 그리고 산화적 스트레스 등 3가지 주요 원인**이 됨.



<그림> 유기물질이 독성기전의 기본 원리(박영철, 2010: Park 등, 2014)

- 대부분의 항암제 단독으로 처리하였을 경우에 수많은 부작용이 발생하는 이유는 이들 친전자성 전환물질이 암세포뿐만 아니라 정상세포도 공격하기 때문임. 따라서 앞서 <참고 문헌-1>에서 "이러한 화합물은 종종 "점착성(sticker)" 행동을 보이며 더 광범위한 생물학적 표적과 더 복잡하고 비특이적인 상호작용을 일으킴. 현재의 NAM으로 전체 독성학적 프로파일을 정확히 포착하기 어려움. 앞으로 이러한 과제를 해결하고 NAM의 잠재력을 완전히 실현하기 위해서는 강력한 검증 노력이 필수적일 것임."이라는 의미는 합성의약품의 독성학을 모른다는 자기 고백과 마찬가지로.

4-3) Cytochrome P450 vs Natural decomposition의 예시

4-3-1) Astrazeneca가 개발한 Osimertinib의 Biotransformation 예시

- 또한 cytochrome P450에 의한 친전자성으로 전환되는 물질들은 정상세포에는 독성을 유발하지만 암세포의 증식과 사멸을 유도하는 거의 모든 항암제 개발에 응용되는 기본 독성 원리임. 예를 들어 아래의 <Figure 1>의 Receptor tyrosine kinase(RTK) 저해제의 예시처럼 Astrazeneca가 개발한 Osimertinib와 유한양행의 Lasertinib에 주목할 점은 RTK의 TK-domain에서 돌연변이가 발생한 T790M 및 T790M에 각각 선택적이면서 공유결합(covalent bond)을 통한 비가역성의 친전자성(electrophilic)으로 전환되는 물질임(Sattler 등, 2023).

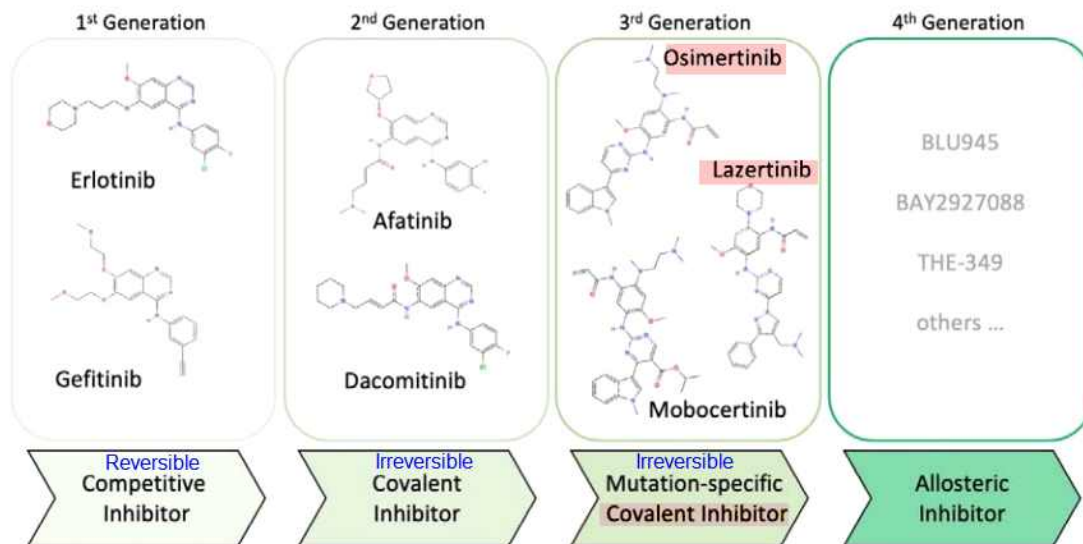


Figure 1. Evolution of EGFR tyrosine kinase inhibitors.

- Osimertinib은 주로 CYP3A4/5에 대사되어 7종의 대사산물이 확인되었음(Dickinson 등, 2016). 대사체의 확인은 cytochrome P450이 가장 많은 간세포 배양을 통해 확인되었고 마우스, 랫드, 개, 그리고 인간의 간세포 배양에서 각 종별 대사체가 Table 4에서처럼 모두 다름이 확인 할 수 있음. 친전자성대사체는 독성물질이므로 체내 방어체계는 간에서만 유일하게 합성되며 cysteine를 포함한 3개의 아미노산으로 구성된 glutathione(GSH)에 제거됨. GSH의 cysteine은 -SH의 전자가 풍부한 친핵성 물질임. GSH가 간에서만 합성되기 때문에 간이 해독의 중심기관임. Table 4에서 인간 간세포에서 생성된 대사체 중 M10 대사체만 GSH와 결합하기 때문에 CYP3A4/5에 의해 생성된 유일한 친전자성 대사체임. 특히 가 종별 친전자성 대사체 생성에서 차이가 나는데 이는 종간 cytochrome P450이 다르기 때문이며 이와 같은 기전에 인하여 독성의 종간 차이가 발생함. **따라서 M10 대사체가 암세포에서 Receptor tyrosine kinase(RTK)와 결합하여 암 성장을 억제하는 약리작용 핵심 대사체임을 알 수 있음.** 이와 같이 cytochrome P450에 의한 대사 경로와 친전자성 대사체 생성 여부에 대한 확인은 신약개발 및 독성기전 이해에 핵심요소

임.

TABLE 4. Semiquantification by ultraviolet (UV) spectroscopy of osimertinib metabolites in mouse, rat, dog, and human hepatocytes

Peak ID	Proposed Structure	Proportion (%) of UV Chromatogram (320–330 nm) ^a			
		Mouse	Rat	Dog	Human
M1	Oxidation (+O)	<1	<1	1–10	<1
M2	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N)	ND	<1	<1	<1
AZ7550	Demethylation (-CH ₃)	1–10	1–10	1–10	1–10
M4	Oxidation (+O)	1–10	1–10	1–10	1–10
M5	Oxidation (+O ₂)	<1	<1	<1	ND
AZ5104	Demethylation (-CH ₃)	<1	<1	<1	<1
M7	Oxidation (+O)	ND	ND	<1	ND
M8	Cysteine-glycine adduct	ND	<1	ND	<1
M9	Demethylation (-CH ₃) + oxidation (+O)	1–10	<1	<1	ND
M10	Glutathione adduct	1–10	>10	1–10	<1
M11	Acetylation or deamination + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M12	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N) + glutathione	1–10	ND	ND	ND
M13	Oxidation (+O) + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M14	Oxidation (+O) + sulfation	ND	ND	<1	ND
M15	Glutathione adduct	<1	<1	ND	ND
M16	Oxidation (+O) + glucuronidation	<1	<1	ND	ND

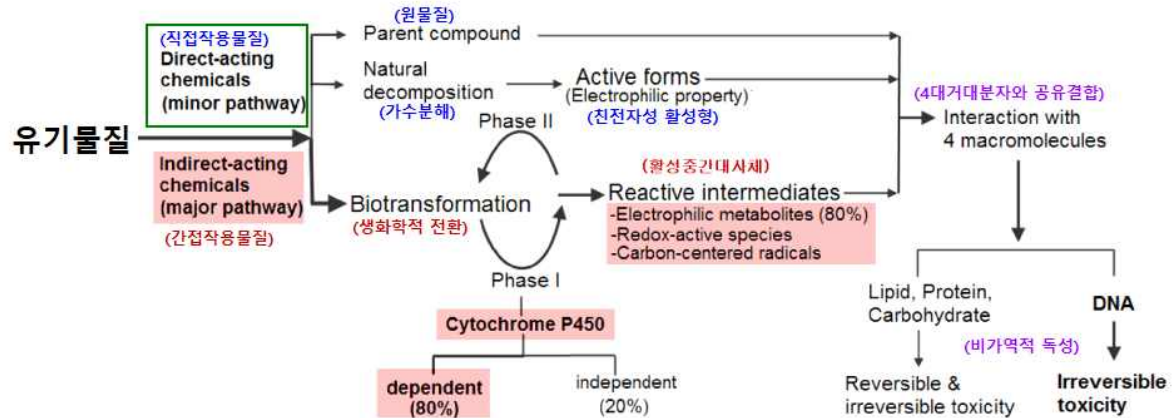
^a% represents percentage of parent (osimertinib) UV response
ND, not detectable by mass spectrometry.

4-3-2) 타이레놀은 인간 태아 독성을 유발하지 않지만 가슴기 살균제는 왜 유발하는가?

④ **타이레놀의 모체와 태아에서의 독성 차이에 대한 이해:** Robinson(2020) 등의 연구에 따르면 CYP는 태아 조직 대비 성인 간에서 주로 높은 수준으로 발현됨. CYP 효소의 60%는 태반에서 정상 수준으로 발현되었음. 실험실 분석에서 성인 및 태아 조직 간 CYP 특이적 발현/활성 차이를 관찰되었으며 CYP2E1 및 CYP3A4는 성인 간 대비 태아 간에서 현저히 낮은 발현량을 보였음. 따라서 태아에 도달한 타이레놀은 CYP2E1 효소 활성이 없으므로 대사가 되지 않고 배출될 것으로 예상됨. 따라서 이러한 이유로 타이레놀에 대한 모체와 태아의 독성이 차이가 있음. 즉, CYP2E1이 태아에서는 발현되지 않으므로 타이레놀의 친전자성대사체가 생성되지 않기 때문에 태아에 독성이 유발하지 않음(참고: 91. 비임상 NAM의 핵심 5원칙 - 인간 관련성(Human Relevance)).

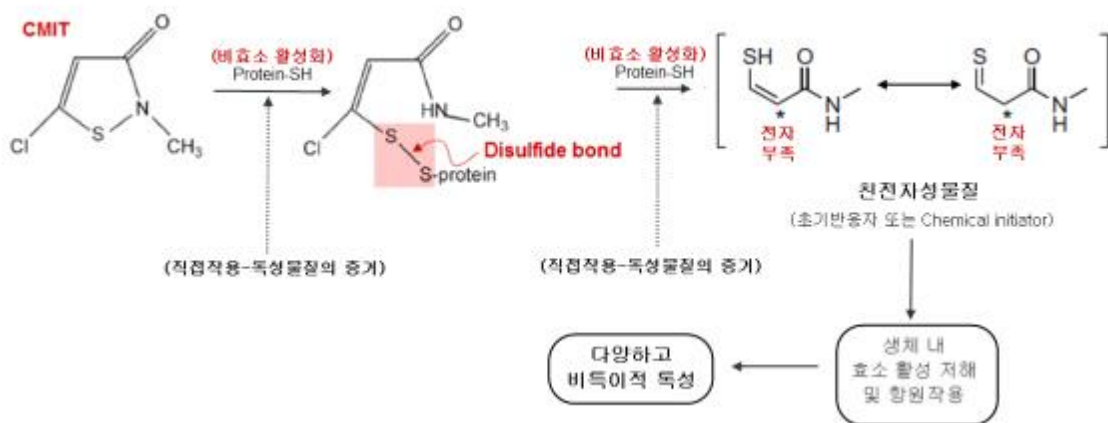
② **가슴기살제 CMIT/MIT의 태아 독성:** 체내를 구성하는 당, 단백질, 지질, 그리고 핵산 등과 공유결합을 하여 독성을 유발하는 물질은 반드시 아래의 <그림>에서처럼 2가지 경로인 가수분해와 같은 비효소적인 친전자성 활성화형 생성 경로인 natural decomposition(자연분해)과 효소적 방법인 biotransformation에 의한 활성중간대사체(reactive intermediate, reactive metabolite)임. 즉 이들은 친전자성물질은 비효소적 자연분해와 cytochrome P450에 의한 효소적 biotransformation에 기인함. 타이레놀이 성인에서 독성을 유발하고 태아에서 독성을 유발하지 않는 이유는 cytochrome P450의 CYP2E1에 의한 효소적 biotransformation에 의해 대사에 의해 친전자성대사체 생성 유무에서 차이가 있기 때문임. 가슴기살균제 CMIT/MIT는

친전자성 물질로 전환되며 4대거대분자와 결합하여 독성을 유발함. 친전자성 물질로의 전환이 효소적 경로가 아닌 비효소적 자연분해에 의해 이루어짐.



<그림> 유기물질이 독성기전의 기본 원리(박영철, 2010; Park 등, 2014)

- CMIT는 아래의 <그림 10-9>에서처럼 cytochrome P450에 의해 친전자성으로 전환되는 것이 아니라 생체 내 단백질 등과 비특이적 반응으로 친전자성 물질로 전환되어 생체내 거대분자와 결합하여 독성을 유발하는 기전임 (Mutschler 등, 2019). 따라서 중간 차이가 있는 cytochrome P450에 의존한 대사가 아니고 자연분해에 기인함으로 중간 독성의 차이가 없이 생체 내 물이 존재하는 어느 곳에서나 독성을 유발할 수 있음.



<그림 10-9> CMIT의 비효소적 활성화를 통해 독성을 유발하는 기전(박영철, 2019)

(Continued)

<참고문헌>

- Dickinson PA, Cantarini MV, Collier J, Frewer P, Martin S, Pickup K, Ballard P. Metabolic Disposition of Osimertinib in Rats, Dogs, and Humans: Insights into a Drug Designed to Bind Covalently to a Cysteine Residue of Epidermal Growth Factor Receptor. Drug Metab Dispos. 2016 Aug;44(8):1201-12.
- ICH S2 (R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use - Scientific guideline
- 박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.
- Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? Toxicol Res. 2014 Sep;30(3):179-84.
- Baldrick P, Cosenza ME, Alapatt T, Bolon B, Rhodes M, Waterson I. Toxicology Paradise: Sorting Out Adverse and Non-adverse Findings in Animal Toxicity Studies. International Journal of Toxicology. 2020;39(5):365-378.
- Sattler M, Mambetsariev I, Fricke J, Tan T, Liu S, Vaidehi N, Pisick E, Mirzapioiazova T, Rock AG, Merla A, Sharma S, Salgia R. A Closer Look at EGFR Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer through the Lens of Precision Medicine. J Clin Med. 2023 Mar 1;12(5):1936.

93. 비임상 NAM의 핵심 5원칙 - (3) 기전적 통찰력(Mechanistic Insight)

1. New Approach Methodologies (NAMs): 기원과 의미

- **비임상연구에서 동물실험의 기여도:** 동물 모델은 임상시험 전 의약품의 효능과 안전성을 입증하는 데 있어 가장 신뢰할 수 있는 방법으로 간주가 되었음. 그러나 약 80~90%의 의약품이 임상시험에서 실패하며, 그중 40~70%는 임상적 효능 부족이나 독성으로 인해 2/3상에서 실패함. 이에 대체 방법으로 전환하면 동물 실험과 관련된 윤리적 문제를 해결하고, 인간 상태를 더 정확하게 반영하며, 의약품의 품질, 안전성 및 효능을 더 정확하게 예측이 가능할 것으로 기대되었음(Harrison, 2016).
- **용어의 최초 기원:** NAM(New Approach Methodologies)은 2016년 4월 헬싱키에서 열린 'New Approach Methodologies in Regulatory Science Proceedings of a scientific workshop'에서 공식적으로 제정된 용어로, 윤리적 연구 원칙을 수용하는 광범위한 기술, 기술 및 접근법을 포괄하며 전 세계 기관들의 규제 의사 결정에 점점 더 많이 채택되고 있음. 즉, 새로운 시험 또는 평가 방법이 NAM으로 인정받으려면 화학물질, 의약품 또는 기타 물질의 규제 위험성 또는 안전성 평가에 관련성이 있어야 함(ECHA, 2016).
- **동물대체법과 NAM의 차이점:** NAM은 동물 모델 대체법에 관한 오늘날의 논의 속에서 여러 가지 다른 의미를 지니게 되었음. 이 용어가 때로는 비동물적 방법 또는 새로운 대체 방법을 의미하기도 하지만, 대체적으로 NAM을 '신규 접근 방법론(New Approach Methodologies)'으로 정의하여 사용. 따라서 NAM은 단순히 동물대체시험법(Animal-alternative test)을 의미하거나 단순히 새로운 과학적 방법이 아님. NAM은 인간 관련성(Human Relevance)을 기반으로 비임상 자료 생산이 이루어지므로 임상시험에서 예측력이 더 높은 비동물적 접근법임(Lush Prize, 2005; Emulatebio, 2025; Devine 등, 2025). 따라서 NAM이 동물대체시험법과 다른 점은 인간 관련성(이 더 높다는 것이고 결과적으로 이를 기반으로 한 자료가 규제기관의 활용성이 가능하다고 할 수 있음.

<FDA, 2025> U.S. Food and Drug Administration sent this bulletin at 04/10/2025 04:11 PM EDT. US Food and Drug Administration FDA Announces Plan to Phase Out Animal Testing Requirement for Monoclonal Antibodies and Other Drugs

- FDA가 발표와 함께 공개한 새로운 로드맵은 신약의 안전성과 효능을 평가하기 위한 현대화된 프레임워크를 제시하며, 여기에는 신개념 평가 방법론(NAMs)이 대폭 도입된다. 주요 내용은 다음과 같다:

- **인체 내 약물 행동을 모델링**하고 잠재적 독성을 예측하는 **인공지능 기반 시뮬레이션**.
- **인간 세포 기반 모델 및 오가노이드**(실험실에서 배양한 소형 장기 모형)를 통해 실제 인간 조직이 새로운 치료법에 어떻게 반응할지 확인할 수 있음.
- **글로벌 인간 안전성 데이터를 활용**함으로써 FDA는 유사한 규제 기준을 가진 타국의 기존 임상 증거를 신뢰할 수 있어 반복적인 동물 실험의 필요성을 줄일 수 있음.

<원문>

- The FDA's new roadmap, released alongside the announcement, outlines a modernized framework for assessing drug safety and efficacy—one that heavily incorporates New Approach Methodologies (NAMs). These include:
- AI-based simulations that model how a drug behaves in the human body and predict possible toxicities.
- Human cell-based models and organoids—miniature lab-grown versions of organs—that can show how real human tissue would respond to a new therapy.
- Global human safety data, enabling the FDA to rely on existing clinical evidence from other countries with comparable regulatory standards, reducing the need for repetitive animal studies.

2. New Approach Methodologies의 5 원칙

- 입법기관으로는 동물 희생의 감소가 주요 목적이지만 규제기관으로서는 동물 희생의 감소와 더불어 인체에서 안전성 확보가 핵심목표. 또한 개발자 입장에서는 NAM은 신약개발의 전반적인 프로세스에서 비용과 시간을 감소시킬 수 있는 방향으로 개발이 필요함.
- NAMs(신규 접근 방법론 또는 신규 접근법)은 규제 결정을 지원하고 신약 개발을 촉진하기 위해 **인간 관련성(human-relevant)**, 신뢰성(reliable) 및 재현성(reproducible)이 보장된 데이터와 더불어 **다음과 같이 5가지 요소**에 적합한 방향으로 발전이 필요함.
 - ① 인간 관련성(Human Relevance): 동물 모델보다 인간 생물학을 더 가깝게 반영하는 첨단 체외 모델(예: 오가노이드, 칩 위의 장기), 컴퓨터 시뮬레이션 모델링 및 AI 기반 독성 예측의 사용을 장려할 것임. 이는 NAM이 인간 유래 세포를 활용하거나 인간 생리학적 조건을 모사하여 중간 외삽과 관련된 불확실성을 줄이기 위함임.
 - ② **기전적 통찰력(Mechanistic Insight)**
 - ③ **변동성 감소(Reduced Variability)**
 - ④ **시스템 수준 통합(Systems-Level Integration)**
 - ⑤ **고속 스크리닝(High-Throughput Screening)**

3. 약물 모달리티별 독성기전의 차이

- 신약 개발에서 앞서 비임상 측면에서 약물 모달리티(modality)별 다음과 같은 독성기전에 대한 이해를 기반으로 출발이 중요함.

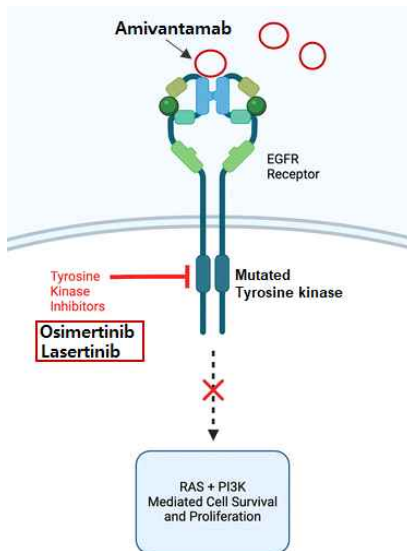
<비임상시험 항목>	합성의약품	폴리펩타이드 및 단백질 그리고 핵산 등의 고분자의약품	세포치료제
• 약리 표적과 관계	• 무관하게 독성 발생 • (Off-target toxicity)	• 수용체의 유무 • 수용체와의 affinity • 수용체/약물의 ratio	• 표적치료제일 경우 관계가 있지만 영양 적 요소 기전을 기반 한 치료제는 무관
• 항원성 및 면	• 친전자성으로 전환	• 자체가 항원성을 가짐	• 인체 및 환자-유래

역계 영향	<ul style="list-style-type: none"> • 되어 단백질과 결합할 경우에 발생하지만 낮은 빈도 	<ul style="list-style-type: none"> • 특히 noncanonical amino acid일 경우 높음 	<ul style="list-style-type: none"> • 세포이기 때문에 낮음
<ul style="list-style-type: none"> • 화학적 발암성 (chemical carcinogenesis) 	<ul style="list-style-type: none"> • 친전자성 대사체 발생에 의한 돌연변이원성으로 높음 	<ul style="list-style-type: none"> • Noncanonical amino acid를 포함한 폴리펩타이드일 경우 주의 요함 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음
<ul style="list-style-type: none"> • 종양원성 (tumorigenesis) 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음 	<ul style="list-style-type: none"> • 없음 	<ul style="list-style-type: none"> • Immortal cell로 전환 가능성 높음
<ul style="list-style-type: none"> • 안전성약리 	<ul style="list-style-type: none"> • 종간 차이가 있기 때문에 임상시험에서 예측이 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 수용체와 상호작용에 의한 cross-reactivity 가능성으로 예측 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> • 낮음
<ul style="list-style-type: none"> • 독성기전의 핵심 요소 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytochrome P450 	<ul style="list-style-type: none"> • 약물의 사이즈와 noncanonical 아미노산 및 핵산을 포함한 약물 • Cross-reactivity 	<ul style="list-style-type: none"> • 암세포로의 전이성
<ul style="list-style-type: none"> • 기타 사항 	약물의 전달체 vector인 virus 및 lipid-nano particle은 고려하지 않음		

5) Astrazeneca의 Osimertinib vs 유한양행의 Lasertinib의 신약 개발에서 독성학적 중요성

5-1) Osimertinib과 Lasertinib의 항암기전과 친전자성대사체

5-1-1) 항암기전: 유한양행의 Lasertinib은 비소세포폐암의 이중항체치료제인 아미반타맵(amivantamab)과 병용요법으로 이용되는 합성의약품임. 약리기전은 EGFR(epidermal growth factor receptor)의 세포막 내 영역에 존재하는 receptor tyrosine kinase(RTK)의 저해제임. Amivantamab이 암세포의 세포막 표면 영역의 부분에 결합하여도 돌연변이 tyrosine kinase가 존재한다면 암세포 증식을 막지 못함. <그림>에서처럼 Lasertinib과 Osimertinib은 **돌연변이 tyrosine kinase에 공유결합**하여 암세포 증식을 차단함. 만약 친전자성으로 RTK에 공유결합이 이루어지지 않는다면 쉽게 분리되어 돌연변이형 RTK의 비정상적인 활성화로 Amivantamab 역할도 넘어 세포 증식이 지속될 것임(Zhong 2021; Wu 등, 2022; Lee 등, 2025) .



<그림> Osimertinib과 Lasertinib의 receptor tyrosine kinase(RTK)의 저해 기전

5-1-2) Osimertinib과 Lasertinib의 친전자성 생성과정

① Osimertinib의 종별 친전자성 대사체 분석

- Table 4는 마우스, 랫드, 개 그리고 사람의 primary hepatocyte에서 대사체를 확인한 것임. 종별 대사체 프로파일링은 모두 다르다는 것을 확인할 수 있음. 인체 간세포에서 RTK 활성 저해가 가능한 유일한 친전자성 대사체는 glutathione(GSH)와 결합된 형태인 M10 대사체임. 친전자성대사체와 결합하는 유일한 생체 내 물질은 GSH뿐임. 반면에 마우스, 랫드 그리고 비글견인 경우에 M10뿐만 아니라 여러 친전자성대사체가 생성되는 것을 확인할 수 있음.

TABLE 4
Semiquantification by ultraviolet (UV) spectroscopy of osimertinib metabolites in mouse, rat, dog, and human hepatocytes

Peak ID	Proposed Structure	Proportion (%) of UV Chromatogram (320–330 nm) ^a			
		Mouse	Rat	Dog	Human
M1	Oxidation (+O)	<1	<1	1–10	<1
M2	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N)	ND	<1	<1	<1
AZ7550	Demethylation (-CH ₃)	1–10	1–10	1–10	1–10
M4	Oxidation (+O)	1–10	1–10	1–10	1–10
M5	Oxidation (+O ₂)	<1	<1	<1	ND
AZ5104	Demethylation (-CH ₃)	<1	<1	<1	<1
M7	Oxidation (+O)	ND	ND	<1	ND
M8	Cysteine-glycine adduct	ND	<1	ND	<1
M9	Demethylation (-CH ₃) + oxidation (+O)	1–10	<1	<1	ND
M10	Glutathione adduct	1–10	>10	1–10	<1
M11	Acetylation or deamination + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M12	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N) + glutathione	1–10	ND	ND	ND
M13	Oxidation (+O) + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M14	Oxidation (+O) + sulfation	ND	ND	<1	ND
M15	Glutathione adduct	<1	<1	ND	ND
M16	Oxidation (+O) + glucuronidation	<1	<1	ND	ND

^a% represents percentage of parent (osimertinib) UV response
ND, not detectable by mass spectrometry.

- Table 3을 통해 Osimertinib의 대사에 관여하는 cytochrome P450을 나타낸 것임. 약 50% 정도로 CYP3A4와 CYP3A5, 그리고 나머지 약 50%가 CYP1A2, 2A6와 2C9에 의해 대사되는 것을 확인할 수 있음. 논문에서는 확인이 되지 않았지만 약리작용을 하는 M10은 CYP3A4에 의해 생성될 가능성이 높을 것으로 추정됨.

TABLE 3
Percentage of metabolism^a of osimertinib, AZ5104, and AZ7750 through recombinant expressed cytochrome isoforms

Cytochrome Isoform	Compound		
	Osimertinib	AZ5104	AZ7750
1A2	12.0	0.373	ND
2A6	15.5	ND	ND
2B6	ND	ND	ND
2C8	ND	3.19	0.129
2C9	15.5	0.160	ND
2C19	ND	0.958	ND
2D6	ND	0.285	ND
2E1	3.0	ND	ND
3A4	44.4	67.0	99.9
3A5	9.6	28.1	ND

^aRelative contribution for the 10 displayed cytochrome isoforms only.
ND, not detected.

② Lasertinib

- LAZCLUZE® (lazertinib)에 대한 Medical Information(2025)에 따르면 lazertinib은 CYP3A4의 기질임. 또한 <참고문헌-1>에서처럼 **건강한 사람을 대상으로 임상시험에서 glutathione-S-transferase mu 1 (GSTM1)을 통해** glutathione conjugation이 되었음. 이는 CYP3A4에 의해 친전자성대사체로 biotransformation된다는 것을 의미함.

<참고문헌-1> Mehta J, Thompson C, Scheers E, Leclercq L, Jang SB, Kim DK, Haddish-Berhane N, Hellemans P, Jiao JJ, Clemens PL. Clinical Pharmacokinetic Assessment of Lazertinib in Healthy Adult Participants: Effects of GSTM1 Genotype. Clin Drug Investig. 2025 Dec;45(12):935-944.

Abstract

Background and objective: Lazertinib, a potent and irreversible third-generation oral **epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI)**, has shown promising efficacy and favorable tolerability in EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC). On the basis of in vitro findings, lazertinib is primarily metabolized by glutathione conjugation via **glutathione-S-transferase mu 1 (GSTM1)**, occurring via enzymatic activity of GST or non-enzymatic processes, as well as through **cytochrome P450 3A4**. Here, we report the effect of GSTM1 on lazertinib pharmacokinetics (PK) using clinical evaluations.

Methods: The effect of GSTM1 on lazertinib PK was evaluated in multiple phase 1 pharmacology studies. Clinical studies ([NCT03556436](#), [NCT04410081](#), and [NCT05076877](#)) involving healthy adult participants given lazertinib were analyzed on the basis of GSTM1 genotype (null [i.e., no expression] or non-null [i.e., expression]).

Results: In a clinical study where participants were genotyped and analyzed to determine the association of lazertinib plasma maximum concentration (C_{max}) and area under curve (AUC) with a panel of genes known to affect PK, GSTM1 genotype showed a statistically significant association with AUC. Compared with null GSTM1 participants, non-null GSTM1 participants had relatively lower plasma exposure owing to increased GSTM1-mediated clearance. The mean single-dose and steady-state plasma C_{max} and AUC of lazertinib was 1.1- to 1.8-fold and 1.4- to 2.2-fold higher in null GSTM1 participants, respectively. The safety profiles of lazertinib were generally comparable across null and non-null GSTM1 participants.

Conclusions: Overall, GSTM1 status affected lazertinib PK in healthy participants and hence further research is warranted to determine the magnitude of PK differences and whether they are clinically meaningful in the NSCLC patient population intended to be treated with lazertinib.

③ Osimertinib과 Lasertinib의 친전자성대사체 생성에서 공통점

- 인체의 간세포 및 인체에서 Osimertinib은 거의 50% 정도가 CYP3A4, 또한 Lasertinib도 CYP3A4에 의해 친전자성대사체로 전환된다는 점

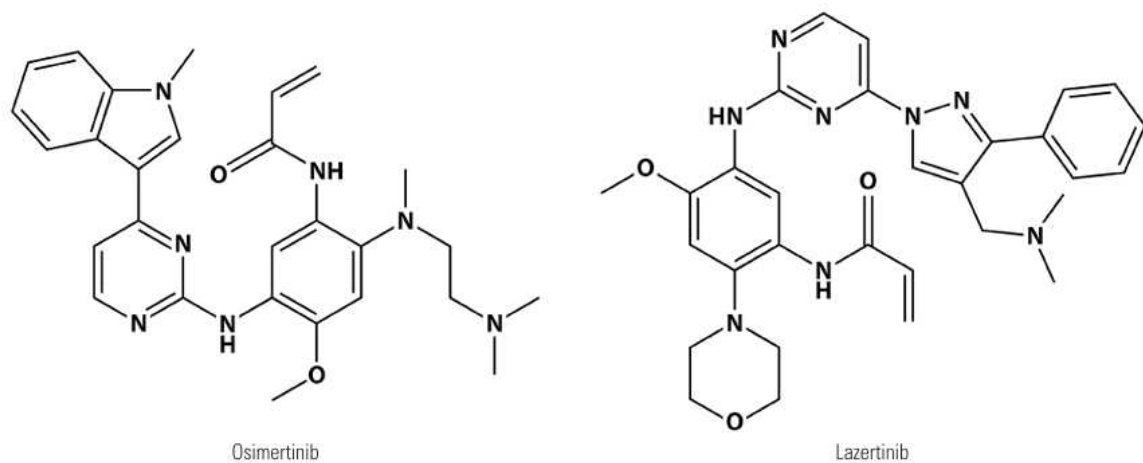


Fig. 1. Chemical structures of lazertinib and osimertinib.

④ Osimertinib vs Lasertinib의 신약 개발에서 독성학적 중요성

- 토픽의 중요성은 기전 기반 방식(mechanism-based approach)을 통한 Osimertinib 유사체 개발을 위한 다음과 같은 알고리즘 개발임
- Fig 1처럼 이들 원물질과 실제적으로 돌연변이 RTK에 공유결합하는 M10의 친전자성대사체로 전환되는 CYP3A4-관련 대사 변환 규칙(relevant metabolic transformation rules) 적용을 통한 알고리즘 개발. 물론 Lasertinib의 친전자성대사체도 포함되면 좀 더 예측력이 강화될 수 있을 것으로 예상됨. 물론 CY3A4에 의한 친전자성대사체를 형성되는 기질을 포함하여 dataset 구성하는 것도 도움이 될 수 있음.
- M10의 친전자성대사체 예측 프로그램 개발 후 Osimertinib과 Lasertinib의 다양한 변형을 통해 M10 대사체 확인. 그리고 인체 간세포를 이용하여 M10 대사체 형성 확인.
- 실제로 Lazertinib도 Osimertinib의 유사체로 개발된 것을 유한양행이 라이선스 획득 후 개발된 것으로 알려짐.

6) 유전독성시험의 문제점과 새로운 NAM의 방법 개발

6-1) 유전독성시험의 구성

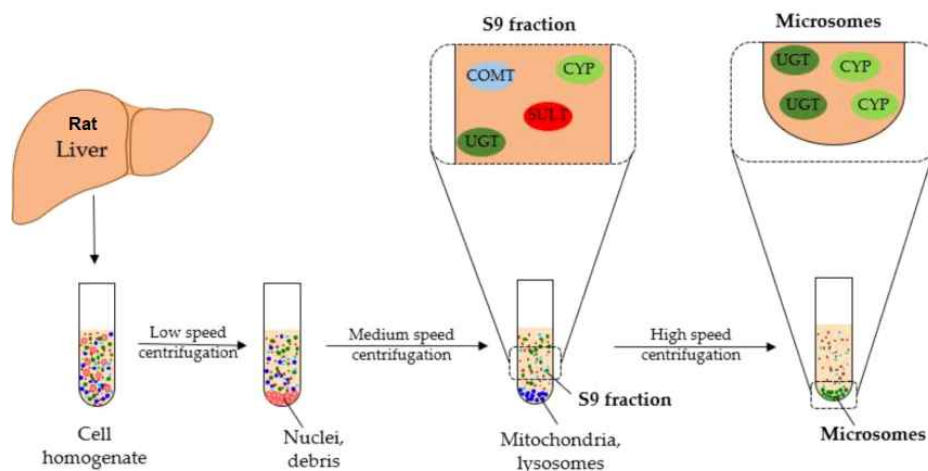
- 일반적으로 아래의 <표>에서 노란색 부분처럼 in vitro 복귀돌연변이시험, in vitro 염색체 이상시험, 마우스를 이용한 소핵시험 등 3가지로 구성되며 이의 결과를 인체의 유전독성을 예측함(ICH S2 (R1); 2012, OECD test methods for genotoxicity).

<Table> OECD test methods for genetic toxicity

Gene mutation	Clastogenicity/aneuploidy	DNA damage/repair
In vitro assays - Bacterial tests: TG 471 - Mammalian test: TG 476, TG 490	In vitro assays - Chromosomal aberration: TG 473 - Micronuclei and aneuploidy: TG 487	In vitro assays -
In vivo assays: - Somatic cells TG 488, TG 470 - Germline cell assays TG 488	In vivo assays - Chromosomal aberration: TG 475 - Micronuclei and aneuploidy: TG 474 - Germ cells assays: TG 483, TG 485, TG 478	In vivo assays - UDS TG 486 - Comet TG 489

6-2) In vitro 유전독성시험에서 S9 fraction

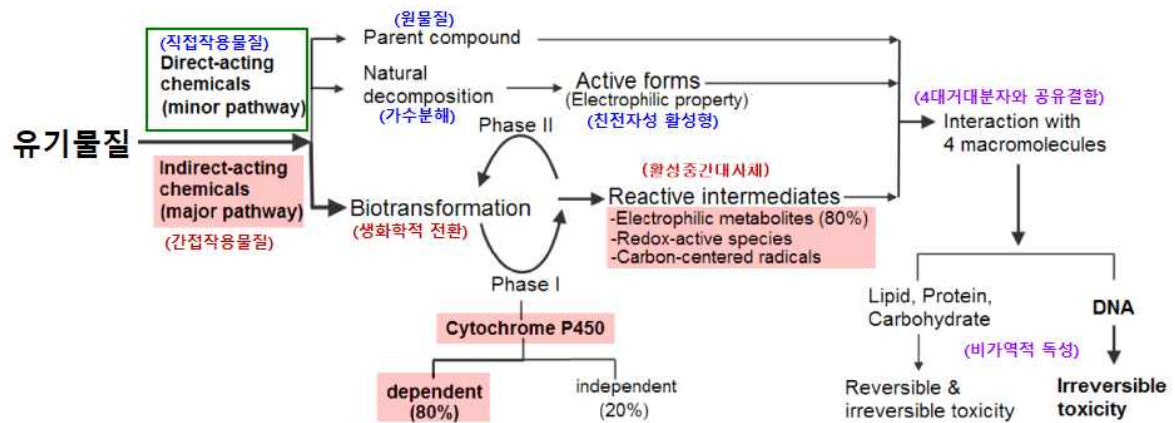
- In vitro 복귀돌연변이시험과 in vitro 염색체이상시험에서는 실제로 DNA 돌연변이를 유발하는 cytochrome P450 시스템을 가지고 있지 않음. 대사에 의한 친전자성대사체를 유도하기 위해 <그림>과 같이 랫드의 간 분획을 추출하여 cytochrome P450 효소 시스템을 추가하며 이를 S9 fraction이라고함. 따라서 In vitro 유전독성시험에는 S9 fraction은 넣은 유전독성시험법을 대사활성법, 포함하지 않는 유전독성시험을 직접법이라고 함.



<그림> 랫드의 간에서 추출한 cytochrome P450 효소 시스템인 S9 fraction 추출 과정

6-3) 유전독성시험과 독성기전의 원리와 관계

- <그림>에서처럼 cytochrome P450-비의존적 자연분해에 의해 직접작용물질의 친전자성 물질로 전환되는 과정은 유전독성시험에서 직접법에 해당하고 cytochrome P450-의존적 biotransformation에 의한 친전자성대사체가 생성되는 기전은 유전독성시험의 대사활성법이 됨.



<그림> 유기물질이 독성기전의 기본 원리(박영철, 2010: Park 등, 2014)

6-4) 유전독성시험을 통한 인체 예측력

- 만약 in vitro 유전독성시험에서 약물이 자연분해에 의해 친전자성물질로 전환되어 DNA 손상이 발생하면 인체에도 발생할 가능성이 높음. 그러나 이러한 물질은 활성이 아주 높아 흡수 후 바로 활성화되어 독성을 유발하기 때문에 실제적인 약물로 개발되기가 어려움. 우리가 다루는 약물의 경우 5% 정도가 직접작용물질임.
- 반면에 cytochrome P450-의존성 대사활성법에서 유전독성이 발생하면 자체를 해석하는데 한계가 있음. 친전자성 대사체를 포함하는 생체 유일한 물질이 glutathione임. 앞서 보여준 Table 4에서처럼 마우스, 랫드, 개 그리고 사람에서 glutathione과 결합하는 대사체가 모든 개체에 다르다는 것을 확인 할 수 있음. 이와 같은 차이는 인체 예측력을 낮추는 원인이 됨.

TABLE 4
Semiquantification by ultraviolet (UV) spectroscopy of osimertinib metabolites in mouse, rat, dog, and human hepatocytes

Peak ID	Proposed Structure	Proportion (%) of UV Chromatogram (320–330 nm) ^a			
		Mouse	Rat	Dog	Human
M1	Oxidation (+O)	<1	<1	1–10	<1
M2	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N)	ND	<1	<1	<1
AZ7550	Demethylation (-CH ₃)	1–10	1–10	1–10	1–10
M4	Oxidation (+O)	1–10	1–10	1–10	1–10
M5	Oxidation (+O ₂)	<1	<1	<1	ND
AZ5104	Demethylation (-CH ₃)	<1	<1	<1	<1
M7	Oxidation (+O)	ND	ND	<1	ND
M8	Cysteine-glycine adduct	ND	<1	ND	<1
M9	Demethylation (-CH ₃) + oxidation (+O)	1–10	<1	<1	ND
M10	Glutathione adduct	1–10	>10	1–10	<1
M11	Acetylation or deamination + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M12	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N) + glutathione	1–10	ND	ND	ND
M13	Oxidation (+O) + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M14	Oxidation (+O) + sulfation	ND	ND	<1	ND
M15	Glutathione adduct	<1	<1	ND	ND
M16	Oxidation (+O) + glucuronidation	<1	<1	ND	ND

^a% represents percentage of parent (osimertinib) UV response
ND, not detectable by mass spectrometry.

6-5) 유전독성시험을 통한 인체 예측력을 낮추는 원인

- 동물종과 사람의 Cytochrome P450의 공유율: <표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교를 나타낸 것임. 인체 cytochrome P450의 20 여종과 다른 동물종과의 공유율은 비인간-영장류 27%, 랫드 14.3%, 그리고 마우스 11.8%로 확인됨 (Konstandi 등, 2014)
- 이는 유전독성시험의 인간에 대한 예측률이 14.3%에 불과하다는 것을 의미함. 이와같은 중간 cytochrome P450 아종의 차이로 Table 4에처럼 다양한 종별 Osimertinib의 친전자성 대사체 생성에 차이가 발생하며 신약개발에 어려움을 줌.

<표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교

CYP family	CYP subfamily	CYP isozyme			
		Human	Monkey	Rat	Mouse
CYP1	CYP1A	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1
		CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2
	CYP1B	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1
CYP2	CYP2A	CYP2A6	CYP2A23	CYP2A1	CYP2A4
		CYP2A7	CYP2A24	CYP2A2	CYP2A5
		CYP2A13		CYP2A3	CYP2A12
	CYP2B	CYP2B6	CYP2B17	CYP2B1	CYP2A22
		CYP2B7		CYP2B2	CYP2B9
				CYP2B3	CYP2B10
	CYP2C	CYP2C8	CYP2C20	CYP2C6	CYP2C29
		CYP2C9	CYP2C43	CYP2C7	CYP2C37
		CYP2C18		CYP2C11	CYP2C38
		CYP2C19		CYP2C12	CYP2C39
				CYP2C13	CYP2C40
				CYP2C22	CYP2C44
				CYP2C23	CYP2C50
					CYP2C50
	CYP2D	CYP2D6	CYP2D17	CYP2D1	CYP2C55
		CYP2D7	CYP2D19	CYP2D2	CYP2D9
		CYP2D8	CYP2D29	CYP2D3	CYP2D10
			CYP2D30	CYP2D4	CYP2D11
			CYP2D42	CYP2D5	CYP2D12
				CYP2D18	CYP2D13
					CYP2D22
					CYP2D26
				CYP2D34	
			CYP2D40		
CYP2E	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1	
CYP3	CYP3A	CYP3A4	CYP3A8	CYP3A1	CYP3A11
		CYP3A5		CYP3A2	CYP3A13
			CYP3A9	CYP3A16	
		CYP3A43		CYP3A18	CYP3A25
			CYP3A62	CYP3A41	
				CYP3A44	
인체 CYP에 대한 일치율		4/15 = 27%	4/28 = 14.3%	4/34 = 11.8%	

(Konstandi, 2014)

6-6) 유전독성시험의 문제점과 새로운 NAM의 방법 개발

- <표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교와 Table 4의 다양한 종별 Osimertinib의 친전자성 대사체 생성 차이에서처럼 cytochrome P450의 차이는 독성 및 약리 작용을 파악하는데 있어서 cytochrome P450의 대사체 분석이 얼마나 중요한 역할을 하는 것에 대한 이해에 좋은 자료임.
- 이와 같은 cytochrome P450에 의한 종간 차이를 줄이고 인체 예측율을 높이기 이해서는 랫드의 cytochrome P450아니라 **인체 간의 cytochrome P450**을 사용하는 것이 바람직함
- **인체 간의 cytochrome P450을 이용한 유전독성 및 약리기전 스크린**은 규제 결정을 지원하고 신약 개발을 촉진하기 위해 **인간 관련성(human-relevant)과 관련된** NAM(신규 접근 방법론 또는 신규 접근법)의 핵심 예시라고 할 수 있음.
- 유전독성시험 방법도 NAM 측면에서 인간의 간 S9 fraction을 사용할 것으로 예상되며 이미 아래와 같이 상품화 제품도 많이 있음.

MilliporeSigma
www.sigmaaldrich.com › US › en

S9 from Liver, Pooled from human | Sigma-Aldrich

The hepatic S9 pools from a variety of biological sources represent the post-mitochondrial supernatant fraction from homogenized liver. Known to be a rich source of drug metabolizing...

Brand: SIGMA

xenotech.com
www.xenotech.com › 2023 › 03

Human Liver S9 Fraction – Pool of 50 Lot No. 2310054

To measure glutathione S-transferase activity (GST), liver S9 samples (5 to 50 µg/mL) were incubated in triplicate at 37 ± 2°C for 10 minutes in potassium phosphate buffer (100 mM, pH 6.5...

ScienceDirect
www.sciencedirect.com › s9-fraction

S9 Fraction - an overview | ScienceDirect Topics

The liver S9 fractions contain both microsomal and cytosolic fractions. They regroup therefore the same metabolic enzyme profile (phase I and phase II enzymes including their cofactors) as...

<참고문헌>

- Konstandi, M. (2014). Consequences of psychophysiological stress on cytochrome P450-catalyzed drug metabolism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 45:149–167.
- Mehta J, Thompson C, Scheers E, Leclercq L, Jang SB, Kim DK, Haddish-Berhane N, Hellemans P, Jiao JJ, Clemens PL. Clinical Pharmacokinetic Assessment of Lazertinib in Healthy Adult Participants: Effects of GSTM1 Genotype. *Clin Drug Investig*. 2025 Dec;45(12):935-944.
- Wu Q, Qian W, Sun X, Jiang S. Small-molecule inhibitors, immune checkpoint inhibitors, and more: FDA-approved novel therapeutic drugs for solid tumors from 1991 to 2021. *J Hematol Oncol*. 2022 Oct 8;15(1):143
- Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, Yang W, Tian C, Miao Z, Wang T, Yang S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 May 31;6(1):201.
- Lee SH, Lu S, Hayashi H, Felip E, Spira AI, Girard N, Kim YJ, Ostapenko Y, Danhaivijitr P, Liu B, Alip A, Korbenfeld E, Dias JM, Lee KH, Xiong H, How SH, Cheng Y, Chang GC, Chih-Hsin Yang J, Besse B, Thomas M, Shah S, Baig M, Curtin JC, Zhang J, Xie J, Sun T, Sethi S, Wang M, Fennema E, Daksh M, Ennis M, Bauml JM, Cho BC. Lazertinib Versus Osimertinib in Previously Untreated EGFR-Mutant Advanced NSCLC: A Randomized, Double-Blind, Exploratory Analysis From MARIPOSA. *J Thorac Oncol*. 2025 Nov;20(11):1655-1668.

94. 시스템 수준 통합(Systems-Level Integration): 인간 조직-유래 물질을 활용한 NAM과 MABEL로부터 MRSD 산출 예시

1. MAM의 5대 핵심 요소와 설명

- NAMs(신규 접근 방법론 또는 신규 접근법)은 규제 결정을 지원하고 신약 개발을 촉진하기 위해 **인간 관련성(human-relevant)**, 신뢰성(reliable) 및 재현성(reproducible)이 보장된 데이터와 더불어 **다음과 같이 5가지 요소**에 적합한 방향으로 발전이 필요함. 본 보고서를 통해 인간 관련성(Human Relevance)과 **기전적 통찰력(Mechanistic Insight)** 그리고 **변동성 감소(Reduced Variability)**은 대략적으로 설명되었다고 사료되며 다음과 같이 요약 됨.

- ① **인간 관련성(Human Relevance):** 임상시험에서 환자에 대한 안전성과 효력에 대한 예측하기 위해서 **NAM에서 가장 중요한 부분임. 앞서 예시에서처럼** 알츠하이머병, 파킨슨병, 류마티스성 관절염, 호흡기질환의 천식 등에서처럼 NHP(nonhuman primate)를 포함한 비글견 과 랫드 등에서 인간에서 예측에서 25% 이하의 반응예측률이 확인되었음. 이는 동물모델에 대한 지나친 의존성과 환자의 이질성을 고려하지 않은 결과임. 따라서 NAM은 **인간 유래 세포를 활용하거나 인간 생리학적 조건을 모사하여** 중간 외삽과 관련된 불확실성을 줄임.

<예시> NAM의 대표적인 수단인 organoid도 인체-유래 및 환자-유래 세포 및 조직을 이용하여 제작되어야 함. 동물모델의 예측률이 낮는데 동물-유래 세포 및 조직으로 제작된 organoid는 더욱 예측을 어렵게 함.

- ② **기전적 통찰력(Mechanistic Insight):** 오늘날 새로운 치료 기전으로 다양한 모달리티가 존재가 존재하는데 크게 합성의약품, 펩타이드-단백질-핵산 등의 고분자의약품 그리고 세포 치료제 등으로 구분할 수 있음. 이들의 약리기전은 대체적으로 표적 단백질 및 표적 세포 등의 표적을 가지고 있으므로 이들 표적을 가진 세포 및 조직 등을 이용한 NAM이 수행되어야 함. 따라서 NAM은 분자 및 세포 기전에 대한 상세한 이해를 제공하여 작용 기전 분석과 표적 위험 완화함. NAM 기반 접근법은 일반적으로 약리학적으로 관련성 있는 종이 부족한 사례에서 촉발되었음. 약리학적으로 관련성 있는 종이 부재할 경우, 표적 조절에 대한 기존 경험 및/또는 NAM 또는 임상적 완화 및 모니터링을 통해 추정 위험을 해결할 수 있는 능력이 NAM 기반 제출의 기초가 되었음. 따라서 약리학적으로 관련 있는 종의 유무와 무관하게 NAM 기반 제출의 촉발 요인이 될 것임.

<예시> 2006년 영국에서 백혈병 치료제인 TGN1412의 임상시험에 의한 비극을 예로 들 수 있음 TGN1412은 단일클론항체(Anti-CD28 monoclonal antibody)로 백혈구 표면의 면역계 단백질인 CD28에만 특이적 결합. 그러나 CD28은 사람에게만 존재하는 면역계 단백질임. 따라서 랫드와 NHP 동물을 이용한 독성시험에서 TGN1412의 adverse effect를 확인하기는 어려움. 결과적으로 임상시험에서 TGN1412 결합에 의한 CD28 활성화는 사이토카인(cytokine)의 과도한 분비 즉, 사이토카인 폭풍(cytokine storm)로 염증성 혈관손상과 다발성장기부전을 유도해 혼수상태, 그리고 후에 사망이 나 암도 유발됨

- ③ **시스템 수준 통합(Systems-Level Integration):** NAMs는 더 빠르고 효율적인 독성 시험을 가능하게 할 뿐만 아니라, 유해성 및 노출 평가 측면에서 인간과 더 관련성 높은 의사 결정을 가능하게 함으로써 오늘날의 규제 업무를 근본적으로 변화시킬 잠재력을 가지고 있음. 특히 여러 NAM 접근법을 결합할 수 있는 능력은 복잡한 생물학적 상호작용의 포괄적인 모델링을 가능하게 하여 보다 전체적인 안전성 평가 능력이 필요함. 그러나 현재 규제 위험 평가에서 NAMs의 광범위한 적용을 가로막는 몇 가지 장애물이 존재함. NAM은 동물모델 자체를 사용하는 것이 아니기 때문에 전신독성과 임상안전용량을 추정하기가 쉽지 않음.

<예시> NOAEL 및 LOAEL 등을 추정하는 반복투여독성 평가의 한계가 NAMs의 광범위한 적용을 위한 주요 과제됨.

- ④ **변동성 감소(Reduced Variability): 종 특이적 반응**을 피함으로써 NAM은 독성학 데이터의 일관성과 해석 가능성을 향상시킬 수 있음.

<예시> 독성시험에서 합성의약품의 설치류와 비설치류 등의 2종, 반면에 바이오의약품의 경우에는 1종으로 수행됨. 바이오의약품인 경우에 모든 종에서 대사 경로가 동일하지만 합성의약품의 경우에는 cytochrome P450의 중간 차이로 대사가 다르며 그 결과에 따라 독성 발현에서도 차이가 있음. 따라서 합성의약품의 독성시험을 통한 인체 예측 실패를 줄이기 위해 2종을 사용하며 이는 종 특이적 반응의 감소시키는 결과를 가져옴. 합성의약품에서 중요한 독성시험 중 하나가 유전독성시험임. 이때 in vitro 시험에서 랫드의 간에서 발체된 S9 fraction(cytochrome P450 효소계를 함유) 사용함. 향후에는 사람의 S사람의 S9 fraction를 사용할 필요성이 있음. 앞서 설명하였듯이 **변동성 감소에서** 무엇보다도 중요한 원인으로 사료되는 것은 환자 집단의 이질성(heterogeneity)임. 이로 인하여 임상시험시험에서 치료제에 대한 환자의 반응률은 평균 25-30%임. 예를 들어 치매환자 집단 10년 추적조사에서 파킨슨병의 예후는 복용한 환자의 4분의 1만 양호한 상태이며 Levodopa의 이질성에 기인하는 것으로 확인되었음(Williams-Gray 등, 2013).

- ⑤ **고속 스크리닝(High-Throughput Screening):** 이러한 방법은 대규모 화학 물질 라이브러리의 신속한 평가를 가능하게 하여 잠재적으로 유해한 물질의 조기 식별을 용이하게 함.

2. 시스템 수준 통합(Systems-Level Integration)의 개념과 예시 검토

1) NAM의 광범위한 채택을 가로막는 가장 큰 장애물 - 시스템 수준 통합

- NAM은 큰 잠재력을 지녔음에도 불구하고, 광범위한 규제 승인을 위해 필요한 엄격한 과학적 검증 기준을 충족하는 데 있어 중대한 도전에 직면해 있음. 핵심 문제는 현재의 NAM이 일반적으로 단일 세포나 장기 수준에서의 통찰력만을 제공할 뿐, 여러 장기 간의 복잡한 상호작용이나 약물이 전신에 미치는 체계적 효과를 포착하지 못한다는 점임.
- 예를 들어 주요 장기 기능을 모방하는 3차원 세포 배양체인 오가노이드는 전체 장기 생리학을 재현할 수 있는 혈관 시스템을 갖추지 못함. 진전이 이루어지고 있지만, 전신적 약물 분포, 대사, 면역 반응을 아우르는 인간 생리학의 완전한 복잡성을 재현하는 것은 여전히 상당한 과학적·공학적 장벽임.

- 궁극적으로 시스템 수준 통합에 대한 핵심 문제는 개체에 대한 실험이 없는 임상시험에서 인체 최초투여용량(first-in-human, FIH)이면서 임상최대권장초기용량인 MRSD(maximum recommended starting dose)을 어떻게 설정할 것인가 문제임.
- 예를 들어 <표 11-3>에서처럼 저분자 합성의약품과 바이오의약품에 대한 임상최대권장초기용량(maximum recommended starting dose, MRSD)의 결정을 동물실험을 통한 반복투여독성시험이 없이 어떻게 설정하는 것인가가 **NAM의 광범위한 채택을 가로막는 가장 큰 장애물이며 시스템 수준 통합의 문제임.**

<표 11-3> 약물 모탈리티별 임상시험에서 안전용량 추정 방법

항목	소분자 합성의약품	바이오의약품	성장호르몬, 사이토카인, 단클론항체, 면역강화제 등의 바이오의약품
독성용량기술치	NOAEL	NOAEL	MABEL
용량반응곡선의 특징	효능 및 독성의 곡선이 분리	효능 및 독성의 곡선이 분리	효능과 반응의 동일한 곡선
종내 차이에 대한 안전계수 (safety factor)	10	10	궁극적으로 전신혈관계 내에 존재하거나 전신혈관계로 이동하지 않는다면 '1'
종간 차이에 대한 안전계수 (safety factor)	HED = NOAEL x 전환계수	AED(동물등가용량) = HED	SF = RO ratio = 사람 RO/동물 RO
MRSD(임상임상 최대권장초기용량)	MRSD = HED/10	MRSD = AED/10	MRSD = MABEL/(RO ratio)
NOAEL: no observed adverse effect level, 최대비독성용량, HED: human equivalent dose, 인체등가용량, MABEL: minimum anticipated biological effect level, 최소기대생물학적영향용량, AED: animal equivalent dose, 동물등가용량, RO; receptor occupancy, 수용체점유율			

2) 시스템 수준 통합의 예시 검색

- <표-3>은 동물모델이 없거나 비임상 자료가 실질적으로 효능 및 안전성을 지원하지 못할 경우에 NAMs이 어떻게 사용되는가와 더불어 FDA의 승인과 결정을 보여주는 사례라고 할 수 있음(컨설팅보고서 참고: 88. Modernization 3.0과 IND를 위한 FDA의 NAM 활용 사례)
- 따라서 <표-3> 중 하나를 선택하여 NOAEL MABEL이 어떻게 추정되었는가에 대한 검토는 **시스템 수준 통합(Systems-Level Integration) 예시**가 됨.

<표-3> 유효성을 위한 CDER의 규제 의사 결정에 모델 기반 접근법 활용 사례

약물 (광범위한 적응증)	NAM 종류 및 설명	규제적 영향(Regulatory Impact)
Kalydeco (cystic fibrosis) (NDA 203188)	<ul style="list-style-type: none"> Fischer rat 갑상선 세포를 이용하여 체외 CFTR 염화물 수송 분석법(돌연변이 CFTR 단백질 발현) 및 낭포성 	<ul style="list-style-type: none"> 내용: 추가 임상시험 없이 특정 CFTR 유전자 변이 환자를 포함하도록 칼리데코의 적응증을 확대하였음. 방법: FDA는 치료 반응성 CFTR 돌연변이를 입증하기 위한 CFTR 염소 이온 수송 분석법을 승인했으며, 특정 반응 기준치(염소 이온 수송

	<p>섬유증 환자로부터 유래한 인간 기관지 상피 세포에서의 염화물 수송</p>	<p>>10%)로 지정하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> 영향: 이 반응 기준치는 적어도 하나의 CFTR 돌연변이를 가진 환자를 대상으로 한 적절하고 잘 통제된 임상시험의 효능 데이터와 시험관 내 반응 데이터를 상호 검증하여 결정되었음.
<p>• CFTR: 낭포성 섬유증(CF, cystic fibrosis)에서는 transmembrane conductance regulator) 유전자가 결함을 보임. 이 단백질은 세포 표면에 위치하여 염화물 및 중탄산염과 같은 다른 분자들을 수송하는 채널 역할을 함. CFTR 단백질을 암호화하는 유전자(CFTR이라고도 함)는 7번 염색체에 위치함. 이 유전자의 돌연변이는 낭포성 섬유증을 유발함. 1989년 CFTR 유전자가 발견된 이후로 2,500개 이상의 돌연변이가 확인되었음.</p>		<p>낭포성 섬유증 막전도도 조절자(CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 유전자가 결함을 보임. 이 단백질은 세포 표면에 위치하여 염화물 및 중탄산염과 같은 다른 분자들을 수송하는 채널 역할을 함. CFTR 단백질을 암호화하는 유전자(CFTR이라고도 함)는 7번 염색체에 위치함. 이 유전자의 돌연변이는 낭포성 섬유증을 유발함. 1989년 CFTR 유전자가 발견된 이후로 2,500개 이상의 돌연변이가 확인되었음.</p>
<p>Galafold20 (Fabry disease) (NDA 208623)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 특이적 돌연변이를 가진 GLA 유전자를 발현하는 HEK-293 세포를 이용한 체외 GAL(galactosidase) 활성 분석법으로 비정상적으로 침전 알파-갈락토실아세틸아제 (α-galactosidase A; α-GAL A) 단백질을 생성함. 	<ul style="list-style-type: none"> 내용: 추가 임상 시험 없이 특정 GLA 유전자 변이 환자를 대상으로 갈라폴드(Galafold)의 적응증을 확대하였음. 신청자는 파브리병을 앓고 있으며 치료 가능한 GLA 변이를 가진 성인 환자에서 갈라폴드의 임상적 이점을 확인하고 기술하기 위해 승인 후 임상시험을 수행해야 했음. 방법: FDA는 α-GAL A 활성 검사를 활용하여 치료 반응성 GLA를 입증하기 위한 일련의 기준값을 수용했음. 구체적인 반응 기준값은 다음과 같음: 1) 치료 전 수준 대비 α-GAL A 활성의 상대적 증가율 $\geq 20\%$, 2) 야생형(정상) 알파-갈락토시다제 A 활성의 절대적 증가율 $\geq 3\%$. 영향: 이러한 반응 기준치는 후속 임상시험에서 신장 간질 모세혈관 내 globotriaosylceramide (GL-3 또는 Gb3) 수치 감소라는 대리 평가 지표를 통해 얻은 데이터를 바탕으로 임상적 이점을 예측하거나 합리적으로 예측할 수 있는 것으로 판단되었음.
<p>• α-galactosidase A(EC 3.2.1.22, α-GAL, α-GAL A; 체계적 명칭 α-D-갈락토사이드 갈락토하이드롤라제)는 글리코사이드 가수분해 효소임. 이 효소는 당단백질, 당지질 및 다당류의 절단을 포함한 여러 이화 작용 과정을 촉매되며 GLA 유전자에 의해 암호화됨.</p>		
<p>Veopoz21 (CHAPLE disease) (BLA 761339)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 고전적 및 대안적 보체 시스템 억제에 대한 기전적 통찰을 위한 체외 분석법(CH50; the validated ex vivo hemolysis assay) 	<ul style="list-style-type: none"> 내용: 미충족 의료 수요에 대한 1차 치료제인 베오포즈(Veopoz)의 승인을 지원하였음. 관련 임상 데이터와 함께, 기전적 비임상 데이터는 베오포즈의 효능에 대한 실질적 증거를 뒷받침하고 승인을 지원하기 위한 확인 증거로 활용되었음. 방법: 약리학적으로 관련성 있는 종이 부재한 상황에서, 세포 기반 분석법을 통해 세포독성, 용혈 및/또는 C5a 생성을 평가함으로써 베오포즈의 보체 활성 차단 능력을 검증하였음. 검증된 생체외 용혈 분석법(CH50)에서 80% 이상의 억제율은 보체 활성화 감소 및 임상적 이점과 연관된 반응의 기준치로 설정되었음. 영향: FDA는 동물, 건강한 지원자 및 Veopoz로 치료받은 CHAPLE 질환 환자에서 일관된 약력학적 반응(즉, 보체 매개 용혈 억제)을 입증한 종합적 증거 평가를 수용하였음.
<p>• 채플병(CHAPLE disease)은 장을 통해 단백질이 손실되는 특징을 보이는 극히 드물고 심각한 유전 질환으로, 전 세계적으로 이 질환을 앓고 있는 환자는 100명 미만으로 알려져 있음.</p>		
<p>Kimmtrak22 (uveal melanoma) (BLA 761228)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 종 특이성 및 표적 결합 특이성을 입증하고, 35개 인간 조직에서 잠재적 교차 반응성을 규명. 각 조직에 대해 과학적으로 타당한 기능적 평가 지표를 사용하여 13개 조직에서 장기 특이적 독성 가능성을 평가하기 위한 인간 조 	<ul style="list-style-type: none"> 내용: 약리학적으로 관련성 있는 동물모델이 부재한 상황에서 Kimmtrak을 활용한 임상시험의 안전성을 입증하여 이 혁신적 생물학적 제제의 승인을 이끌어냄. 방법: 체외 분석법 세트는 Kimmtrak의 표적에 대한 높은 결합 특이성과 친화력을 입증했으며, HLA-A*02:01 양성 피부 및 포도막 흑색종 성장 억제 가설을 뒷받침하는 전염증성 사이토카인 및 세포용해성 단백질 수준을 평가하고, Kimmtrak의 표적/중량 외 교차반응 효과를 분석하여 HLA-A*02:01 양성 피부 및 포도막 흑색종 환자에 대한 임상적 효능 가능성을 입증함. 양성 피부 및 포도막 흑색종 성장 억제, Kimmtrak의 비표적/비중량 교차반응성 효과 평가, HLA-A*02:01 양성 절제 불가능 또는 전이

	직 및 세포 기반 체외 분석법	<p>성 포도막 흑색종 환자에 대한 임상적 효능 가능성 입증.</p> <ul style="list-style-type: none"> 영향: 임상시험은 이후 조직학적 또는 세포학적 검사로 전이성 포도막 흑색종이 확인된 HLA-A*02:01 양성 환자 중 전이성 환경에서 치료 경험이 없거나 이전에 국소 간 표적 치료를 받은 환자를 대상으로 진행되었으며, Kimmtrak이 환자의 전체 생존율을 증가시킨다는 점을 입증하였음.
<ul style="list-style-type: none"> KIMMTRAK: 수술로 제거할 수 없거나 전이된 포도막 흑색종이 있는 HLA-A*02:01 양성 성인 환자의 치료에 사용되는 처방약. 그러나 KIMMTRAK은 중증 또는 생명을 위협할 수 있는 심각한 부작용을 유발할 수 있으며, 일반적으로 첫 세 번의 주입 기간 내에 발생함 		

3. 포도막 흑색종 치료제인 IMCgp100의 MRSD를 통한 시스템 수준 통합 예시

- 융합단백질인 포도막 흑색종 치료제인 IMCgp100(tebentafusp)은 인간 조직 in vitro 실험임. 실험은 2차원 인간 암 세포주와 1차 세포의 공동 배양과 컴퓨터 시뮬레이션 접근법으로 보안을 통해 FIH(First-in-Human, 안전 초기 투여량)를 위한 MABEL 계산 후 임상 개발 단계로 진입, 결과적으로 2022년에 승인됨.

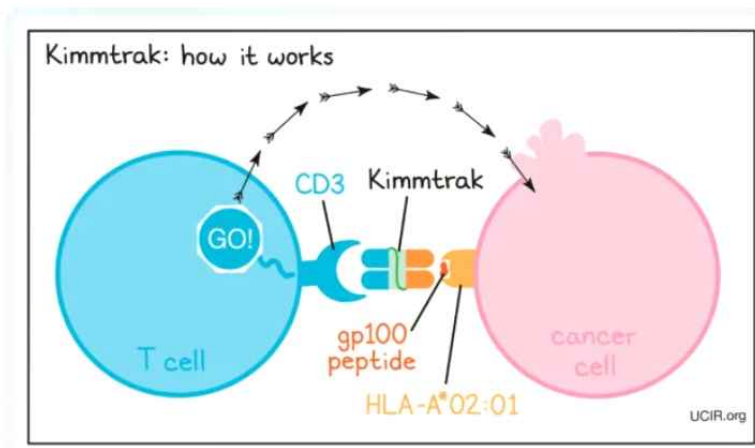
<표> KIMMTRAK의 비임상 NAM과 규제 결과 요약

약물 (광범위한 적응증)	NAM 종류 및 설명	규제적 영향(Regulatory Impact)
Kimmtrak (IMCgp100, tebentafusp) (uveal melanoma) (BLA 761228)	<ul style="list-style-type: none"> 종 특이성 및 표적 결합 특이성을 입증하고, 35개 인간 조직에서 잠재적 교차 반응성을 규명. 각 조직에 대해 과학적으로 타당한 기능적 평가 지표를 사용하여 13개 조직에서 장성 특이적 독성 가능성을 평가하기 위한 인간 조직 및 세포 기반 체외 분석법 	<ul style="list-style-type: none"> 내용: 약리학적으로 관련성 있는 동물모델이 부재한 상황에서 Kimmtrak을 활용한 임상시험의 안전성을 입증하여 이 혁신적 생물학적 제제의 승인을 이끌어냄. 방법: 체외 분석법 세트는 Kimmtrak의 표적에 대한 높은 결합 특이성과 친화력을 입증했으며, HLA-A*02:01 양성 피부 및 포도막 흑색종 성장 억제 역제 가설을 뒷받침하는 전염증성 사이토카인 및 세포용해성 단백질 수준을 평가하고, Kimmtrak의 표적/종양 외 교차반응 효과를 분석하여 HLA-A*02:01 양성 피부 및 포도막 흑색종 환자에 대한 임상적 효능 가능성을 입증함. 양성 피부 및 포도막 흑색종 성장 억제, Kimmtrak의 비표적/비종양 교차반응성 효과 평가, HLA-A*02:01 양성 절제 불가능 또는 전이성 포도막 흑색종 환자에 대한 임상적 효능 가능성 입증. 영향: 임상시험은 이후 조직학적 또는 세포학적 검사로 전이성 포도막 흑색종이 확인된 HLA-A*02:01 양성 환자 중 전이성 환경에서 치료 경험이 없거나 이전에 국소 간 표적 치료를 받은 환자를 대상으로 진행되었으며, Kimmtrak이 환자의 전체 생존율을 증가시킨다는 점을 입증하였음.
<ul style="list-style-type: none"> KIMMTRAK: 수술로 제거할 수 없거나 전이된 포도막 흑색종이 있는 HLA-A*02:01 양성 성인 환자의 치료에 사용되는 처방약. 그러나 KIMMTRAK은 중증 또는 생명을 위협할 수 있는 심각한 부작용을 유발할 수 있으며, 일반적으로 첫 세 번의 주입 기간 내에 발생함 		

3-1) IMCgp100의 약리기전과 비임상 구성

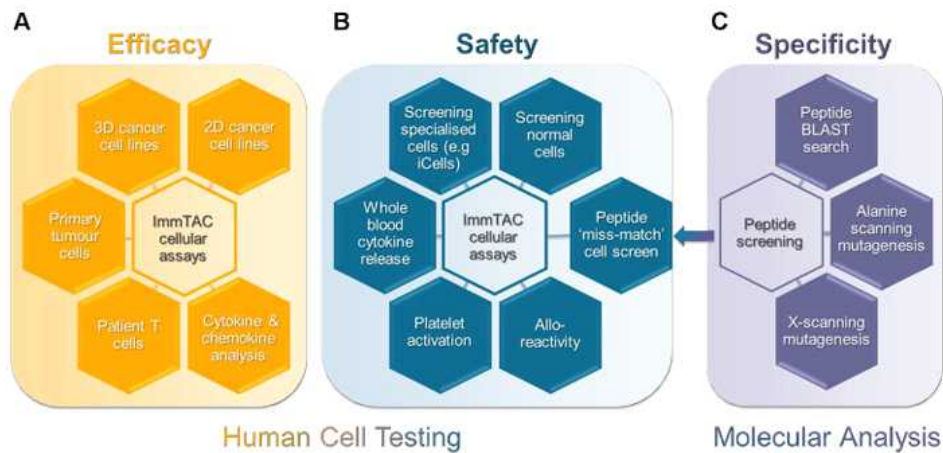
① IMCgp100 약리작용의 기전

- IMCgp100은 용해성 친화도 강화 T 세포 수용체(a soluble, affinity-enhanced T cell receptor (TCR))와 항-CD3 단일 사슬 가변 단편(scFv, single-chain variable fragment) 항체로 구성된 융합 단백질임(Boudousquie 등, 2017). IMCgp100은 HLA A*02:01에 gp100 항원결합부위를 제시하는 암세포와 CD3 발현 T 세포를 결합시키도록 설계되었음. 현재 테벤타푸스프(KIMMTRAK; Immunocore)로 알려진 이 약물은 2022년 포도막 흑색종 치료제로 승인되었음(Howlett 등, 2023). (포도막흑색종(uveal melanoma)은 눈의 포도막에 발생하는 안구암의 일종. 전통적으로는 홍채, 맥락막, 섬모체에서 발생하는 경우로 분류할 수 있으나, 전이 위험이 낮은 I형과 전이 위험이 높은 II형으로 나누는 것도 가능함. 흐린 시야, 시력 소실, 광시증 등의 증상이 나타날 수 있으나 증상이 없는 경우도 있음.)



<그림> IMCgp100 또는 KIMMTRAK에 의한 T-cell과 암세포의 gp100 항원결합부위 결합 작용

- ② 비임상 NAM 패키지의 개략도 설명: 안전성 및 효능에 대한 평가를 <그림-1>과 같이 요약됨. (A) 표적 펩타이드-HLA(human leukocyte antigen)를 제시하는 광범위한 적응증 관련 세포에 대한 ImmTAC(Immune Mobilising Monoclonal TCR Against Cancer) 분자의 효능을 평가. 이러한 세포 분석에는 관심 적응증과 관련된 환자 원발 종양 세포 및 환자 T 세포가 모두 포함됨. 사이토카인 및 케모카인 분석은 효능 측정의 핵심 요소이다. (B) ImmTAC 분자의 안전성 프로파일은 정상 및 특화된 항원 양성/음성 세포를 광범위하게 스크리닝하는 다양한 세포 분석법을 통해 측정됨. ImmTAC에 의한 사이토카인 방출 및 혈소판 활성화는 전혈에서 측정된다. 이중 반응성 분석법은 다양한 HLA 하위형에 대한 교차 반응성을 평가함. (C) 잠재적 펩타이드 교차반응성(cross-reactivity)을 평가하기 위해 컴퓨터 기반 BLAST 검색 및 알라닌/X-스캐닝 펩타이드 돌연변이 분석을 포함한 포괄적인 펩타이드 스크리닝 패키지를 사용함. 표적 펩타이드와 밀접하게 관련된 것으로 확인된 잠재적 off-target 펩타이드(펩타이드 '미스매치')는 교차반응성 평가를 위해 세포 분석법으로 추가 스크리닝됨.



3-2) IMCgp100의 NAM을 통한 MRSD 산출 - 시스템 수준 통합 예시

① **효능평가:** IMCgp100 및 유사한 공학화된 이중특이성 TCR 기반 분자의 비임상 효능 및 안전성 평가를 위해 Harper 등(2018)은 상용 2차원 인간 암세포주를 중심으로 한 강력한 체외 전용 평가 패키지를 개발하였음. 효능 평가를 위해 항원 특이적이고 적응증과 관련된 인간 종양 세포를 사용하여 젯산 탈수소효소(LDH) 방출 및 세포 사멸 측정을 통해 표적 세포 사멸에 대한 항원 제시의 영향을 측정하였음. **인터페론- γ (IFN γ) 방출 및 인체 종양 세포의 시험관 내 사멸**에 관한 데이터는 최소 예상 생물학적 효과 수준(MABEL, minimum anticipated biological effect level) 계산에 기여하였음. MABEL 계산은 임상시험을 위한 안전한 시작 용량을 도출하기 위한 보수적 접근법으로 활용되며, 여기서는 **인터페론- γ (IFN γ) 방출에 대한 약리** 효능을 측정하여 추정됨.

② **MABEL 및 MRSD 산출:** <그림-2>은 흑색종 환자(ImmTAC-gp100) 또는 건강한 기증자(ImmTAC-nybr1, ImmTAC-mageA3 및 ImmTAC-nyeso용) 등이 4인으로 기증된 효능 세포(E = PBMC)인 말초혈 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 이용한 ImmTAC-gp100의 농도에 따른 IFN γ 방출의 용량-약리반응 곡선을 나타낸 것임. 정상인 기증자 3인의 분석에서 거의 동일하게 ImmTAC-gp100 농도 10^{-11} 에서 10^{-9} M 사이에서 효능이 확인됨. 그러나 환자의 경우에는 10^{-12} 에서 반응이 확인되어 최소약리반응 용량인 MABEL(minimum anticipated biological effect level, 최소기대생물학적영향용량)은 1 pM로 설정됨. 따라서 임상시험에서 IMCgp100(또는 ImmTAC-gp100) 초기용량은 MRSD = 1 pM/RO ratio 이지만 사람의 세포를 사용하였기 때문에 중간 안전계수인 RO ratio는 제외되어 MRSD = 1 pM됨. 실제로 IMCgp100에 대한 IFN γ 방출은 포화되어 특이성이 사라지는 10^{-9} M 즉, 1 nM 까지 치료 안전 영역이라고 할 수 있음. 따라서 임상시험에서 1 pM부터 시작하여 dose escalation 방법으로 1 nM까지 투여 가능할 것으로 추정됨. 특히 건강한 기증자 3인과 암 환자의 표적 세포에 대해 비슷한 면역 반응을 보여 암 환자의 면역 체계가 손상되지 않았음을 나타냄.

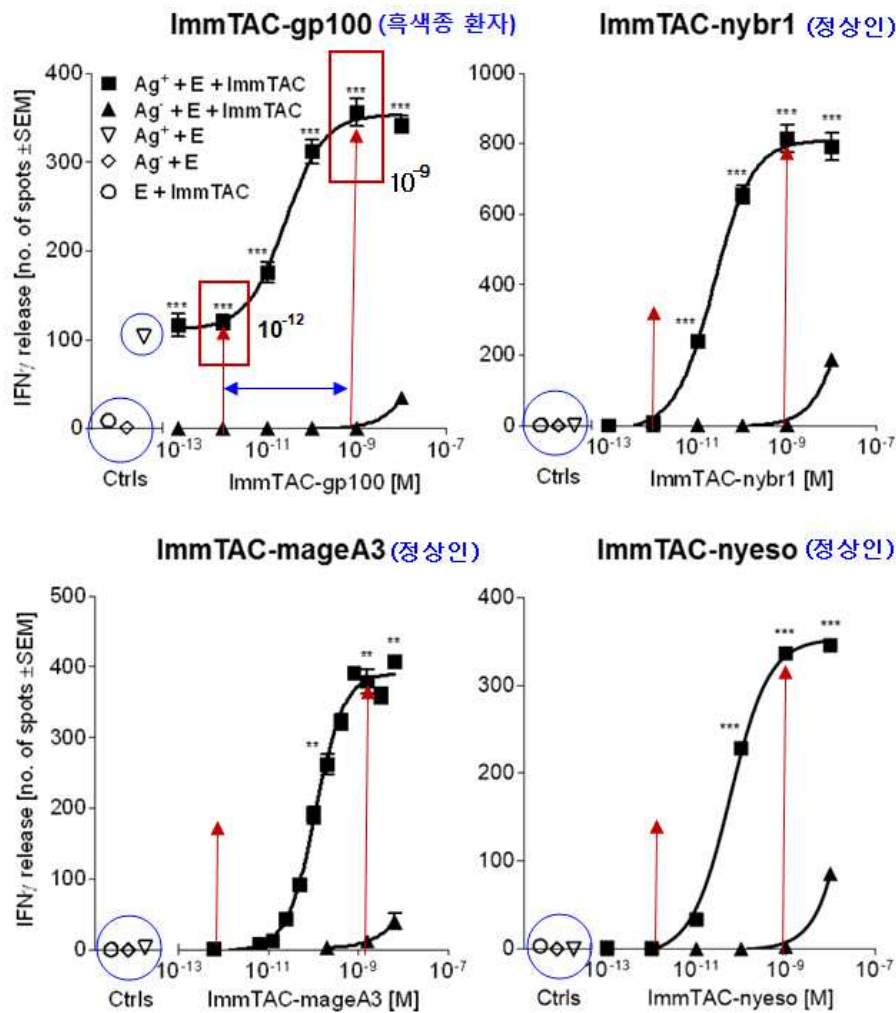
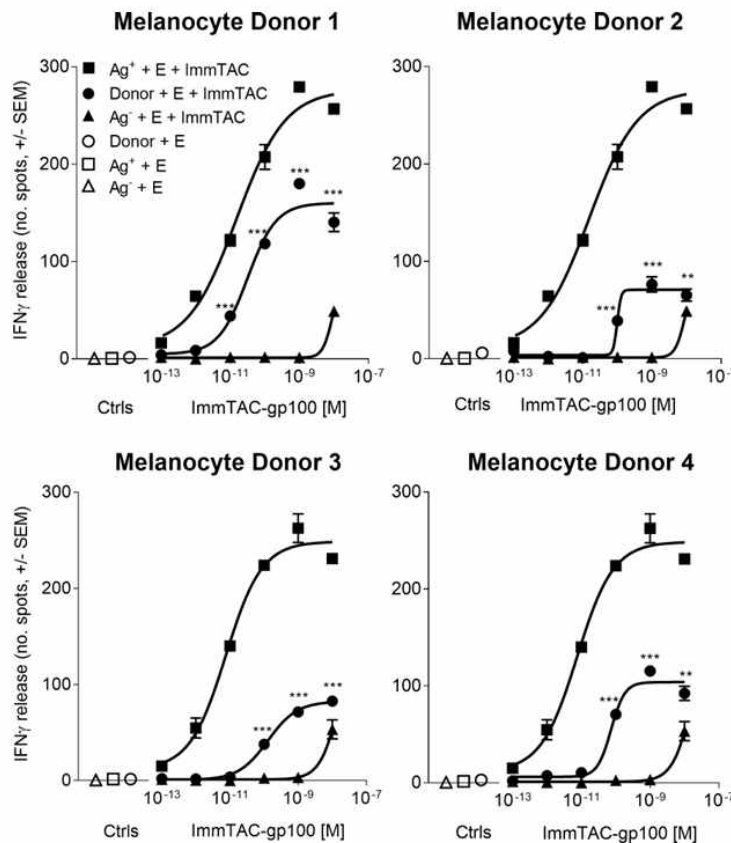


Fig 2. ImmTAC-mediated T cell activation and cytotoxicity.

<그림-2>. ImmTAC 매개 T세포 활성화 및 세포독성. 효능 세포(E = PBMCs)는 흑색종 환자 (ImmTAC-gp100용) 또는 건강한 기증자(ImmTAC-nybr1, ImmTAC-mageA3 및 ImmTAC-nyeso용)로부터 얻어졌으며, 표적 펩타이드-HLA를 제시하는 항원(Ag+) 세포주 또는 HLA(관련성이 있으나 표적 펩타이드를 제시하지 않는 항원(Ag-) 세포주와 함께 배양되었음. 세포는 ImmTAC 분자의 유무 하에서 배양되었음. IFN γ 방출은 ELISpot 분석으로 평가하였음. 항원 제시 세포: ImmTAC-gp100, ImmTAC-nybr1, ImmTAC-mageA3 및 ImmTAC-nyeso에 대해 각각 Mel526, CAMA1, A2b2m, EJM 및 IM9. 항원 음성 세포: ImmTAC-gp100, ImmTAC-nybr1, ImmTAC-mageA3 및 ImmTAC-nyeso에 대해 각각 A375, MDA MB231, Colo205 및 Mel526. 효능 세포(E) + ImmTAC 존재 하에서 Ag+ 세포와 Ag- 세포 간의 통계적 차이는 양방향 분산 분석(Two-way ANOVA)을 사용하여 측정되었으며, *** p<0.0001, ** p<0.01입니다. 표시되지 않은 결과는 유의미하지 않았음.

③ **안전성 평가:** <그림-4> 피부 멜라닌 세포에 대한 ImmTAC-gp100의 표적 특이적 비종양 활성을 나타낸 것임. 안전성 평가를 위해 항원 양성 또는 항원 음성 인체 유래 1차 멜라닌 세포를 표적 세포로 확인했으며, 단일 기증자의 말초혈 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 효과 세포로 사용하여 표적/비종양 활성을 조사하였음. 표적 외 또는 종양 외 영향은 광범위한 면역 활성화 위험을 평가하기 위해 인간 전혈을 사용한 사이토카인 방출 분석(CRA, Cytokine Release Assays) 및 혈소판 활성화 분석을 통해 평가 수행. 대체 HLA 아형에 대한 인식 위험은 효과기 T 세포를 고유하고 가장 빈번한 HLA 아형을 포괄하는 광범위한 1차 인간 세포 및 세포주 패널과 공동 배양하는 동종반응성 분석을 통해 평가하였음. ELISpot 기술을 사용하여 IFN γ 방출을 정량화하였음. 분자 안전성과 특이성을 추가로 평가하기 위해 인간 게놈 내에서 표적과 높은 서열 상동성을 공유하는 펩타이드를 식별하는 보완적인 in silico 접근법을 병행하여 사용하였음. IMCgp100의 표적 조직으로 인간 1차 흑색세포를 선택한 것은 생체 내에서 gp100 표적의 발현으로 정당화되었지만, 잠재적 비표적 영향을 조사하고 비임상 안전성 평가의 폭을 넓히기 위해 다른 조직에서 유래한 인간 1차 세포도 고려될 수 있었음. 그러나 본 연구에서는 인간 1차 흑색세포와 말초혈액 단핵구(PBMCs)의 2차원 공동배양 예측력이 만족스러운 것으로 판단되었으며, 4명의 기증자로도 MABEL 기반 용량 범위 설정에 충분하였음(Boudousquie 등, 2017; Ryan 등, 2012). 또한 피부 전사체 및 HLA 리간도체를 생체 내에서 완전히 반영하지 못할 수 있는 인간 1차 흑색세포 2차원 배양을 보완하거나 대체할 수 있는 새로운 고급 피부 체외 모델이 존재함. 세포 안전성 분석의 중요한 확장으로 iPS(induced pluripotent stem) 세포 및 3차원 세포 배양의 활용을 논의하여 체외 안전성 평가 패키지의 엄밀성을 강화하고자 하였음(Harper 등, 2018).



<그림-4> 피부 멜라닌 세포에 대한 ImmTAC-gp100의 표적 특이적 비종양 활성화. HLA-A * 02 양성 건강한 기증자 4명(멜라닌 세포 기증자 1-4)의 정상 인간 표피 멜라닌 세포(NHEM, Normal Human Epidermal Melanocytes), gp100 양성(항원 양성) 흑색종 세포 (Mel526 세포주) 및 gp100 음성 (Ag-) 대조 흑색종 세포(A375 세포주)를 대상으로, 다클론성(비종양 특이적) 말초혈액 단핵구(PBMC) 효과기 세포(E)와 함께 배양한 후, gp100 특이적 ImmTAC 분자(ImmTAC-gp100)의 농도를 증가시키며 유무에 따라 측정하였음. 표시된 결과는 가장 반응성이 높은 기증자 PBMC를 나타냄. 효과기 세포(E) + ImmTAC 분자 존재 하에서 기증자 NHEM 세포와 항원 처리 흑색종 세포 간 IFN γ 방출의 통계적 차이는 양방향 분산분석(Two-way ANOVA)을 통해 측정되었음. 여기서 * $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$. 표시된 경우 결과는 유의하지 않았음.**

4. 결론

4-1) 포도막 흑색종 치료제인 IMCgp100을 통한 시스템 수준 통합 예시에 대한 결론

- 동물 개체 실험을 배제하는 NAM의 광범위한 채택을 가로막는 가장 큰 장애물은 FIH을 위한 MRSD를 산출하는 것임. 합성의약품과일부 바이오의약품인 경우 MRSD는 반복투여 독성시험을 통한 NOAEL을 기반으로 추정됨.
- 반면에 성장호르몬, 사이토카인, 단클론항체, 면역강화제 등의 바이오의약품인 경우에는 수용체와 리간드의 상호작용을 통한 최소약리작용 용량인 MABEL을 이용하여 $MRSD = MABEL/RO \text{ ratio}$ 로 추정됨.
- **IMCgp100의 경우에는 환자 및 정상인으로 분리된 T세포의 IFN γ 방출에 대한 용량-반응 곡선으로 이루어졌음.** 따라서 안전계수인 사람과 동물의 항체-단백질의 ratiofn 산출되는 안전계수 적용이 불필요. 이와같은 결과로 $MRSD = MABEL$ 인 1 pM로 결정됨. 특히 IFN γ 방출은 포화되어 특이성이 사라지는 $10^{-9}M$ 즉, 1 nM까지 치료 안전 영역이라고 할 수 있음. 따라서 임상시험에서 1 pM부터 시작하여 dose escalation 방법으로 1 nM까지 투여 가능할 것으로 추정됨.
- 이와 같이 합성의약품의 NOAEL과는 다르게 항체(단백질)의약품은 표적과의 결합에 의한 최소 약리효능을 in vitro에서 추정되는 MABEL로 MRSD 추정이 가능함. **따라서 성장호르몬, 사이토카인, 단클론항체, 면역강화제 등의 바이오의약품인 경우에는 in vitro NAM으로 시스템 수준 통합의 가능하다는 것을 입증됨.**

4-2) NAM의 5요소에 대한 결론

- NAMs(신규 접근 방법론 또는 신규 접근법)은 규제 결정을 지원하고 신약 개발을 촉진하기 위해 **인간 관련성(human-relevant)**, 신뢰성(reliable) 및 재현성(reproducible)이 보장된 데이터와 더불어 다음과 같이 5가지 요소에 적합한 방향으로 발전이 필요함. 본 보고서를 통해 인간 관련성(Human Relevance)과 **기전적 통찰력(Mechanistic Insight)** 그리고 **변동성 감소(Reduced Variability)**은 대략적으로 설명되었다고 사료되며 다음과 같이 요약됨.

- ① 인간 관련성(Human Relevance)
- ② 기전적 통찰력(Mechanistic Insight)
- ③ 시스템 수준 통합(Systems-Level Integration)
- ④ 변동성 감소(Reduced Variability)
- ⑤ 고속 스크리닝(High-Throughput Screening)

- 그러나 NAM(New Approach Methodologies, 신규 접근 방법론)의 5가지 중 ① **인간 관련성(Human Relevance)**, ② **기전적 통찰력(Mechanistic Insight)** 그리고 ③ **시스템 수준 통합(Systems-Level Integration)** 등 3가지가 규제기관 및 개발자 사이에 중요한 요점이며 다음과 같은 3가지 질문을 기반으로 자료에 대한 논의가 이루어질 것으로 사료됨.

1. 독성 및 약리 자료가 **인간과의 관련성**을 어떻게 설명할 것인가?
2. 독성 및 약리 자료가 어떻게 분자-세포 수준의 **기전을 설명할** 것인가?
3. 세포 또는 기관 등의 부분별 시험으로 구성된 **독성과 약리 자료가 개체 수준**에서 어떻게 설명이 가능한가?

<참고문헌>

Boudousquie, C. et al. Polyfunctional response by ImmTAC (IMCgp100) redirected CD8 + and CD4 + T cells. Immunology 152, 425–438 (2017).

Harper, J. et al. An approved in vitro approach to preclinical safety and efficacy evaluation of engineered T cell receptor anti-CD3 bispecific (ImmTAC) molecules. PLoS ONE 13, e0205491 (2018)

Howlett, S., Carter, T. J., Shaw, H. M. & Nathan, P. D. Tebentafusp: a first-in-class treatment for metastatic uveal melanoma. Ther. Adv. Méd. Oncol. 15, 17588359231160140 (2023).

Boudousquie, C. et al. Polyfunctional response by ImmTAC (IMCgp100) redirected CD8 + and CD4 + T cells. Immunology 152, 425–438 (2017).

Ryan, P. C. et al. In vitro MABEL approach for nonclinical safety assessment of MEDI-565 (MT111). ALTEX Proceedings, 1/12, Proceedings of W8. https://proceedings.altex.org/data/2012-01/085087_Ryan31.pdf (2012).

Williams-Gray CH, Mason SL, Evans JR, et al. The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013; 84: 1258–1264.

95. 현대약품의 임신중절 약물-미프지미소정의 Human relevance-독성학적 고찰

(본 글은 학문적인 측면에서 고찰한 것임)

1. 미프지미소정에 대한 기사

- 불법으로 구하던 임신 중지 약물 '미프진'...입법 공백 속 4년째 도전 나선 현대약품(입력 2025.11.18. 09:12. 조선비즈)
- 현대약품, 임신중절 약 '미프지미소정' 국내 품목허가 신청. 국내 품목 허가 후 시판 예정 (입력 2025.01.02. 10:59; M메디 소비자 뉴스)

1) 조선비즈 기사(홍다영 기자)

정부가 임신 중지 약물 도입을 국정 과제로 확정하면서 현대약품(11,030원 ▼ 990 -8.24%)의 미프진(미프지미소)이 주목받고 있다. 미프진은 '먹는 낙태약'으로 현대약품이 4년째 국내 도입을 추진하고 있다.

미프진은 임신을 유지하는 호르몬을 억제하고 자궁 수축을 유도하는 원리로 임신을 중지한다. 세계보건기구(WHO)가 2005년 필수 의약품으로 지정해 미국, 영국, 프랑스 등 100개국에서 판매한다. 국내에선 불법이라 중국에서 생산한 복제약이 밀수입돼 수십만원에 암암리에 거래되고 있다.

◇현대약품, 英 제약사에서 판권 계약

현대약품은 지난 2021년 영국 제약사 라인파마 인터내셔널과 미프진에 대한 국내 판권을 독점 계약했다. 현대약품은 미프진을 국내에 도입하기 위해 그해 7월 식품의약품안전처에 품목 허가를 신청했다. 식약처는 자료 보완을 요청했고 현대약품이 일부 자료를 구비하지 못해 허가를 취하했다.

현대약품은 2023년 3월 다시 식약처에 품목 허가를 신청했으나 마찬가지로 자료 문제로 품목 허가 절차가 잠정 중단됐다. 현대약품은 지난해 12월 미프진 품목 허가를 3번째로 신청했다. 품목 허가 심사 결과는 아직 나오지 않았다.

식약처는 관련 관련 법 개정이 필요하다는 입장이다. 식약처 관계자는 "임신 몇주까지 약물을 사용할 수 있는지 등을 정해야 품목 허가 절차를 진행할 수 있다"면서 "법 개정이 처리돼야 하기 때문에 품목 허가 결과가 미뤄지고 있다"고 했다.

2) M메디 소비자 뉴스 기사(방수진 기자)

현대약품은 임신 중절 약 '미프지미소정(사진 · 미페프리스톤 · 미소프로스톨)'에 대한 품목허가를 식품의약품안전처에 신청했다고 2일 밝혔다.

현대약품에 따르면, 임상은 총 3건으로 미국 및 멕시코에서 실시됐는데 미페프리스톤과 미소프로스톨 투여의 자궁 내 임신 중절에 대한 유효성과 안전성을 평가했다.

임상시험에서 임상적 유효성(임신 중절 성공률)은 외과적 개입 없이 완전한 유산이 이루어진 경우로 정의됐다.

3건의 연구에서 임신 중절 성공률은 각 임상시험별 94.9%, 96.2%, 97.3% 이었다.

현대약품은 이러한 결과가 200mg의 경구용 미페프리스톤 복용 후 800mcg의 미소프로스톨을 복용하는 요법이 임신 63일(9주) 이하인 임신을 종료하는데 효과적임을 나타낸다고 설명했다.

3건의 주요 임상시험에서 가장 흔하게 보고된 이상반응들은 통증(93.4%), 메스꺼움(70.8%), 설사(59.5%), 쇠약(55.7%) 등이었다고 회사는 전했다.

현대약품은 "미프지미소정은 미페프리스톤 200mg 1정과 미소프로스톨 200μg(mcg) 4정으로 구성된 콤비팩 형태로 세계보건기구(WHO)에서도 필수약품으로 지정한 경구용 임신 중절 약물"이라며 "임신 유지에 필수적인 프로게스테론의 작용을 억제하는 안타-프로게스테론인 미페프리스톤 1정을 먼저 복용하고 1~2일 후에 자궁 수축을 촉진하는 미소프로스톨 4정을 복용하는 것을 용법으로 한다"고 했다.

이어 "이 또한 세계보건기구(WHO)에서 권장하는 임신 63일(9주)까지의 의료적 임신중절 방법으로 안전성과 유효성을 검토 받고 허가 받은 의약품을 국내에 소개해 안전하게 허가 승인된 의약품으로 사용이 가능할 것으로 기대된다"고 덧붙였다.

회사는 국내 품목 허가 후 국내 시판 예정이다.

2. 미프지미소정의 약리 작용과 복제약(Generics) 동향

1) Mechanism of action

1-1) 원성분: 미프지미소정의 원물질은 미페프리스톤(Mifepristone)으로 2000년 FDA로부터 수술적 낙태의 대안으로 승인됨(FDA, 2025)..

1-2) Mifepristone에 의한 낙태의 Mechanism of action: 주요 작용 기전은 Figure 15.9에서 처럼 항프로게스테론제인 Mifepristone이 자궁내막 프로게스테론 수용체(progesterone receptor)에 결합하여 모체 용모막의 퇴행을 유발하고(Libraries, 2024), 결국 배아가 자궁내막에서 분리되도록 하는 것임. 또한 미페프리스톤은 또한 자궁경부를 연화시키는데, 이는 일차적 효과이거나 배아 분리에 따른 프로스타글란딘 방출로 인해 낙태 작용을 촉진할 수 있음. 미페프리스톤은 임신중절을 위해 미소프로스톨(misoprostol, 프로스타글란딘 유사체)과 병용하여 사용되며 미페프리스톤 투여 후 1~2일 후에 미소프로스톨을 투여함. 미소프로스톨은 자궁경부 숙화(cervical ripening, 자궁 경부가 부드러워지고 팽창하는 과정)를 유도함. 두 번째 구성 성분인 미소프로스톨을 복용하지 않은 여성의 경우, 임신이 지속되어 출산에 이를 가능성이 있음. 임신 9주 이내의 임신 종결에 효과적임(Cadepond 등, 1997; Baulieu 등, 1997, Davenport 등, 2017).

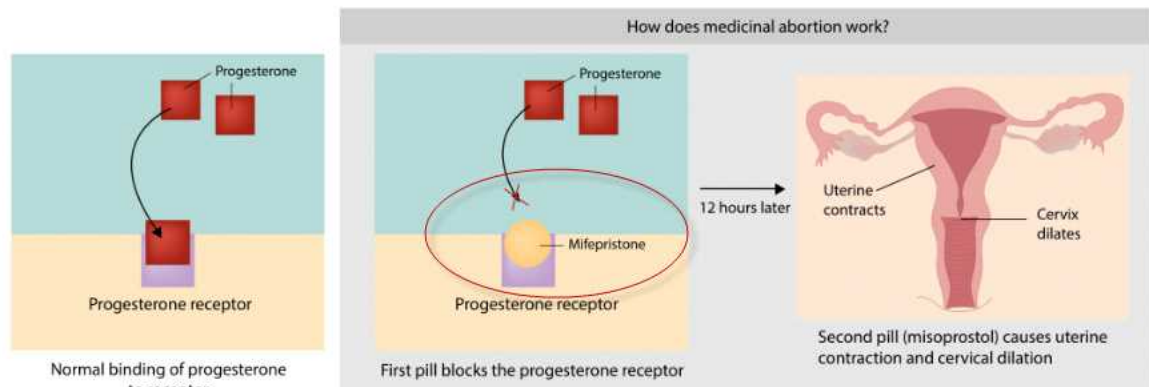


Figure 15.9 Mechanism of medicinal abortion (Mifepristone).

2) 복제약(Generics) 동향

- FDA는 2000년 9월 임신 7주까지의 의학적 임신중절용으로 미페프렉스(미페프리스톤)를 최초 승인했으며, 이는 2016년 임신 10주까지 확대되었음. 또한 FDA는 2019년 4월 미페프렉스의 제네릭 제품인 미페프리스톤 정제 200mg을 복제약으로 승인하였음. 제네릭 제품의 승인은 미페프리스톤 정제 200mg이 미페프렉스와 치료상 동등하며 안전하게 대체될 수 있다는 FDA의 판단이 반영됨. 승인된 제네릭 제품은 미페프렉스와 마찬가지로 임신 70일까지의 자궁내 임신 의학적 중절에 사용됨. 승인된 미페프렉스 제네릭 제품의 라벨링은 미페프렉스의 라벨링과 일치함(FDA, 2025).

3. 안전성에 대한 문제 제기

- 미페프리스톤은 일반적으로 임신 9~10주까지의 의학적 낙태에 사용되므로, 발생 및 장기 형성이라는 중요한 시기에 노출될 경우 발달 중인 배아/태아에 대한 모든 부작용 또는 기형 유발 효과를 고려해야 한다고 주장.
- 독성학 및 기형학 보고서는 일부 동물에서 미페프리스톤 및 미소프로스톨의 기형 유발 효과를 입증한 연구를 인용하여 teratogen(기형유발물질) 있음(Wolf 등, 1990; Tarantal 등, 1994; Pastuszak 등, 1998; da Silva 등, 2006).
- 임신 초기(1분기)에 미페프리스톤에 노출된 여성을 위한 현재 임상 지침은 인간 대상의 제한된 발표 증거를 바탕으로 기형 유발성이 확인되지 않았다고 명시되고 있음(Turner 등, 2024).

4. 미페프리스톤(Mifepristone)이 기형유발물질이 아닌 이유에 대한 독성학적 고찰

1) 미페프리스톤의 대사 경로

1-1) CYP3A4에 의한 극성(무독성)대사체 생성 경로

- 미페프리스톤의 산화에 관여하는 주요 효소는 CYP3A4, 이 효소는 약물에 의해 기전 기반으로 미페프리스톤을 비활성화 유도. CYP3A4에 의한 산화는 미페프리스톤의 항프로게스테론제 역할을 제한함(Khan 등, 2002). 또한 CYP3A5도 미페프리스톤의 탈메틸화 대사물로 전환하여 항프로게스테론제 역할을 제한함.

1-2) CYP2B6에 의한 친전자성 대사체 생성 경로

- Fig. 9는 CYP2B6에 의한 Mifepristone(RU486)의 대사활성화(metabolic activation)를 통해 1) 17-oxirene related reactive species(친전자성 대사체)과 2) the 4,5-epoxide reactive species(친전자성 대사체) 생성과 이에 의해 헤모글로빈 및 아포단백질 변형과 glutathione(GSH)-포합체(conjugate)를 생성하는 경로를 나타낸 것임(Lin 등, 2009).

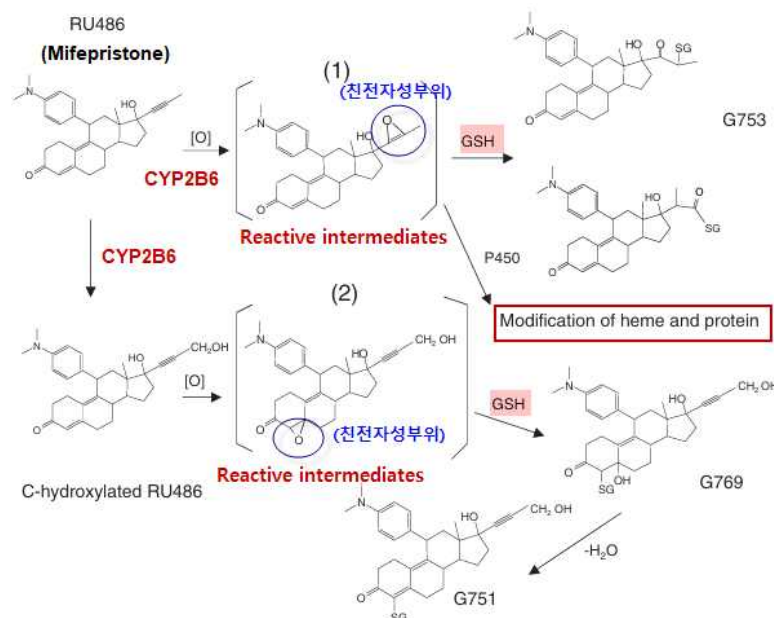


Fig. 9. Proposed scheme for the **metabolic bioactivation** of RU486(Mifepristone) by P450s leading to heme and apoprotein modification and four GSH conjugates(CYP2B6에 의한 RU486의 대사활성화<metabolic activation>를 통해 헤모글로빈 및 아포단백질 변형과 글루타티온(GSH) 포합체를 생성하는 제안된 경로)

2) 미페프리스톤의 teratogen(기형유발물질) 유무에 대한 독성학적 고찰

2-1) 인체와 동물의 cytochrome P450 효소의 차이

- <표 3-6>은 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교한 것임. 미페프리스톤의 대사에 관여하는 cytochrome P450 효소인 CYP2B6와 CYP3A4는 인체-특이적 효소이며 다른 동물에 없는 효소로 파악됨.
- 따라서 앞에서 서술된 "독성학 및 기형학 보고서는 일부 동물에서 미페프리스톤 및 미소프로스톨의 기형 유발 효과를 입증한 연구를 인용하여 teratogen(기형유발물질) 있음 (Wolf등, 1990; Tarantal 등, 1994; Pastuszek 등, 1998; da Silva 등, 2006)" 주장은 human-relevance 측면에서 인간에게 외삽될 수 없음.

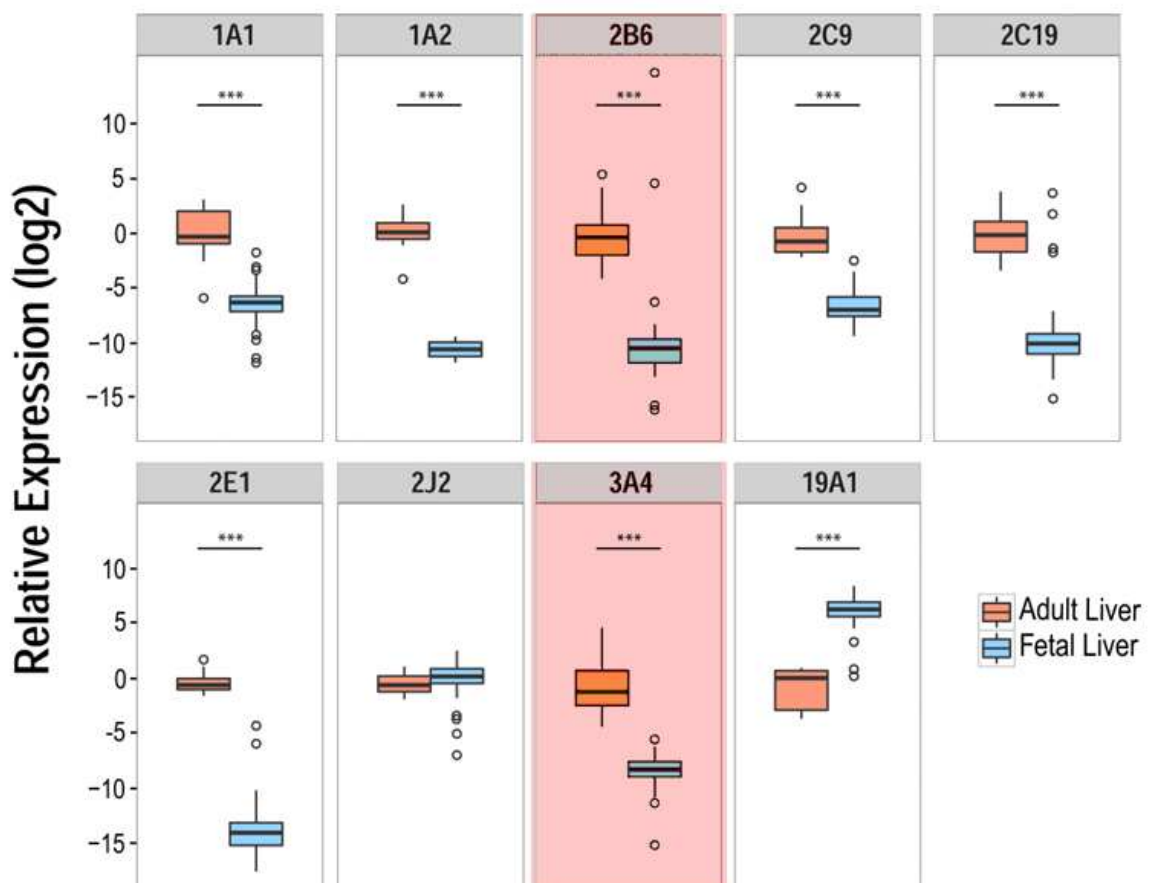
<표 3-6> 인체 및 동물종의 CYP 동질효소 종류와 일치율 비교

CYP family	CYP subfamily	CYP isozyme			
		Human	Monkey	Rat	Mouse
CYP1	CYP1A	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1	CYP1A1
		CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2	CYP1A2
	CYP1B	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1	CYP1B1
CYP2	CYP2A	CYP2A6	CYP2A23	CYP2A1	CYP2A4
		CYP2A7	CYP2A24	CYP2A2	CYP2A5
		CYP2A13		CYP2A3	CYP2A12
	CYP2B	CYP2B6	CYP2B17	CYP2B1	CYP2A22
		CYP2B7		CYP2B2	CYP2B9
				CYP2B3	CYP2B10
	CYP2C	CYP2C8	CYP2C20	CYP2C6	CYP2C29
		CYP2C9	CYP2C43	CYP2C7	CYP2C37
		CYP2C18		CYP2C11	CYP2C38
		CYP2C19		CYP2C12	CYP2C39
				CYP2C13	CYP2C40
				CYP2C22	CYP2C44
				CYP2C23	CYP2C50
	CYP2D				CYP2C50
					CYP2C55
		CYP2D6	CYP2D17	CYP2D1	CYP2D9
		CYP2D7	CYP2D19	CYP2D2	CYP2D10
		CYP2D8	CYP2D29	CYP2D3	CYP2D11
			CYP2D30	CYP2D4	CYP2D12
			CYP2D42	CYP2D5	CYP2D13
				CYP2D18	CYP2D22
					CYP2D26
					CYP2D34
					CYP2D40
	CYP2E	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1
CYP3	CYP3A	CYP3A4	CYP3A8	CYP3A1	CYP3A11
		CYP3A5		CYP3A2	CYP3A13
		CYP3A7		CYP3A9	CYP3A16
		CYP3A43		CYP3A18	CYP3A25
				CYP3A62	CYP3A41
					CYP3A44
인체 CYP에 대한 일치율			4/15 = 27%	4/28 = 14.3%	4/34 = 11.8%

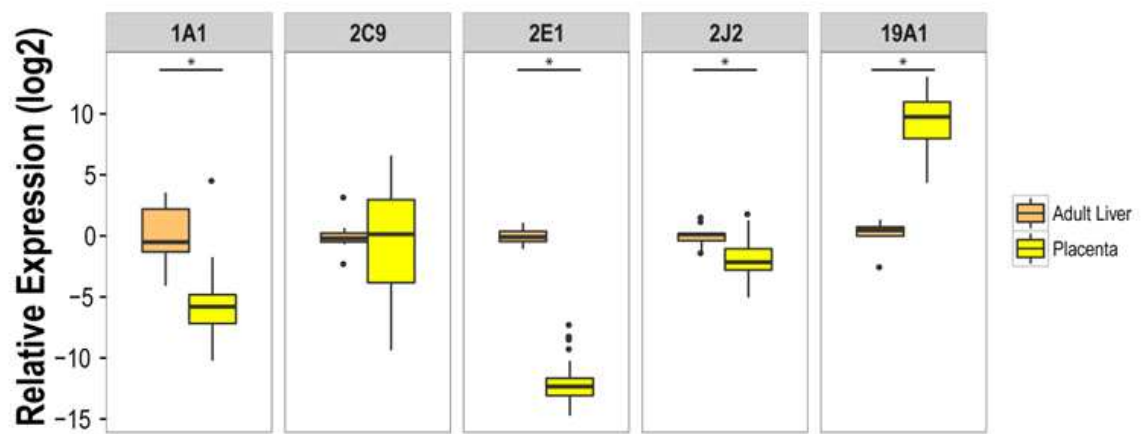
(Konstandi, 2014 & 박영철 2019)

2-2) 성인과 태아의 cytochrome P450 효소의 차이

- CYP2B6와 CYP3A4는 인체-특이적 효소임. CYP2B6와 CYP3A4의 성인과 태아에서 활성 차이를 확인할 필요성이 있음.
- <그림 4>에서처럼 독성대사체인 친전자성대사체를 생성하는 CYP2B6 발현량은 성인 간에서 태아 간보다 224배 높았음. (논문의 원문 내용: 후속 및 신규 태반(임신 2기/만삭) mRNA 평가에서 CYP2B6은 검출되지 않았거나 극히 미량 검출>. <그림 5>에서처럼 태반에서도 CYP2B6와 CYP3A4 등의 효소는 검출되지 않았거나 미량 검출됨. 무독성대사체를 생성하는 CYP3A4 발현량도 태아 간에서 현저히 낮았음(Robinson 등, 2020).
- 따라서 CYP2B6와 CYP3A4 효소는 성인-특이적 cytochrome P450이지만 태아에서는 발현이 아주 미미하거나 발현이 되지 않은 cytochrome P450 효소임이 확인되었음(Robinson 등, 2020).



<그림 4> 성인 인간 간 및 임신 2기 태아 간에서의 CYP 발현. 성인 인간 간(n=9) 및 태아 간(n=84)에서의 상대적 CYP RNA 발현(log2). 값은 조정된 log2 평균과 평균에 대한 표준 오차(SE)를 나타냅니다. 별표(*)는 유의성을 나타냅니다(t-검정, p<0.05).

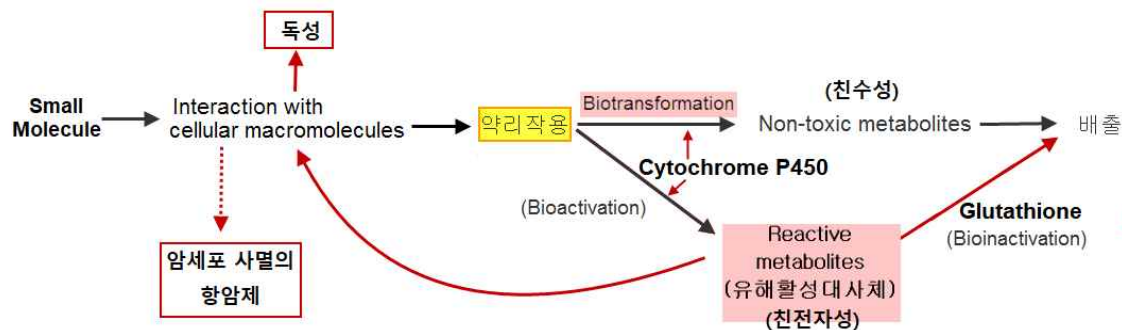


<그림 5> 성인 인간 간 및 임신 2기 태반에서의 CYP 발현: 성인 인간 간(n=9) 및 임신 2기 태반(n=47)에서의 상대적 CYP 발현(log2). 별표(*)는 유의성을 나타냄(t-검정, p<0.05).

3) 미페프리스톤의 teratogen(기형유발물질) 유무에 대한 독성학적 고찰에 대한 결론

3-1) 합성의약품 또는 유기물질의 독성 기전

- 합성의약품 또는 유기물질이 독성을 유발하기 위해서는 원물질(parent compound)의 친전자성(electrophilic)으로 전환되어 세포의 단백질 및 DNA와의 비가역적 공유결합이 이루어져야 함. 즉, 아래의 <그림>과 같이 약물의 약리작용은 대체적으로 원물질 자체에 의해 이루어지며 cytochrome P450에 의해 극성대사체와 친수성대사체로 전환되어 배출됨. 반면에 독성물질은 cytochrome P450에 의해 대사되어 전자가 부족한 친전자성대사체로 전환되어 전자가 풍부한 단백질 및 DNA에 비가역적 공유결합이 이루어짐.



<그림> 약물의 독성물질로 전환과정과 DNA 및 단백질과의 공유결합 과정

3-2) 미페프리스톤의 teratogen(기형유발물질)에 대한 판단

- 미페프리스톤(Mifepristone)은 CYP2B6에 의해 친전자성대사체로 전환되어 독성 가능성을 유발할 수 있지만 CYP2B6는 성인-특이적 cytochrome P450 효소이지만 태아에서는 발현되지 않음. 따라서 Mifepristone의 동물에서 teratogen 가능성이 있을 수 있지만 모체의 태아에서 발현되지 않아 teratogen 가능성이 없음.
- CYP2B6는 성인 간에서 1-7% 정도의 발현되는 소량 발현의 cytochrome P450임. 따라서 CYP2B6에 의한 Mifepristone 대사로 발생하는 소량의 친전자성 독성대사체 생성도 GSH에 의해 무독화될 가능성 높음. 특히 성인 간의 40%를 차지하는 CYP3A4에 의하여 Mifepristone의 무독성대사체로 전환될 확률이 높음(Robinson 등, 2020).

5. 결론: 현대약품의 임신중절 약물-미프지미소정의 Human relevance-독성학적 고찰

1) 안전성에 대한 문제 제기 내용

- 미페프리스톤은 일반적으로 임신 9~10주까지의 의학적 낙태에 사용되므로, 발생 및 장기 형성이라는 중요한 시기에 노출될 경우 발달 중인 배아/태아에 대한 모든 부작용 또는 기형 유발 효과를 고려해야 한다고 주장.
- 독성학 및 기형학 보고서는 일부 동물에서 미페프리스톤 및 미소프로스톨의 기형 유발 효과를 입증한 연구를 인용하여 teratogen(기형유발물질) 있음(Wolf 등, 1990; Tarantal 등, 1994; Pastuszak 등, 1998; da Silva 등, 2006).
- 임신 초기(1분기)에 미페프리스톤에 노출된 여성을 위한 현재 임상 지침은 인간 대상의 제한된 발표 증거를 바탕으로 기형 유발성이 확인되지 않았다고 명시되고 있음(Turner 등, 2024).

2) 독성학적 고찰

- 미페프리스톤(Mifepristone)은 CYP2B6에 의해 친전자성대사체로 전환되어 독성 및 기형 유발 가능성이 있지만 CYP2B6는 성인에서만 전체 cytochrome P450 중 1-7% 소량으로 발현되는 성인-특이적 효소임. 따라서 CYP2B6에서 발현이 되지 않거나 아주 극미한 소량으로 발현되어 태아 내 다양한 거대분자와 공유결합을 통해 독성을 유발하는 teratogen (기형유발물질) 가능성은 아주 낮음. 따라서 미페프리스톤은 태아 및 모체에 있어서 안전성이 높은 약물로 판단됨.

3) CYP2B6 활성 부존재에 따른 미페프리스톤(Mifepristone)의 태아에 작용기전 예측

- 아래 <그림>에서처럼(Libraries, 2024) 미페프리스톤은 자궁내막 progesterone receptor는 원물질 자체로 비공유결합하여 모체 용모막의 퇴행을 유발함. 비공유결합은 progesterone receptor에 가역적 결합을 의미하며 일시적 결합을 의미함. 만약 미페프리스톤 투여 후 미소프로스톨은 자궁경부 숙화가 이루어지지 않으면 미페프리스톤은 자궁 내막에서 분리되어 항프로게스테론제 역할은 중지됨. 이는 미소프로스톨을 복용하지 않은 여성의 경우, 임신이 지속되어 출산에 이를 가능성이 있다는 측면에서 설명됨.

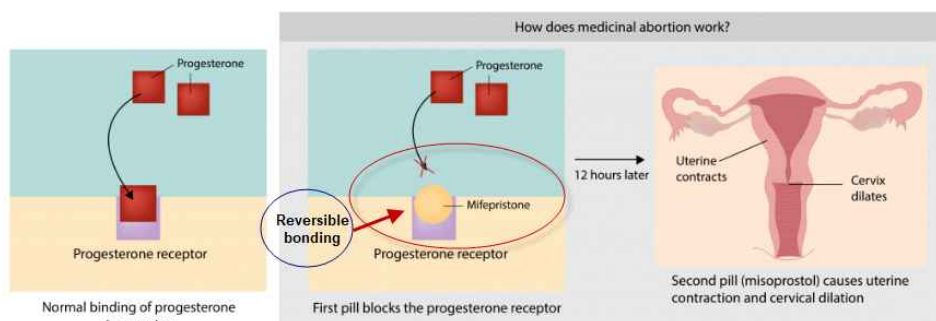


Figure 15.9 Mechanism of medicinal abortion (Mifepristone).

<참고문헌>

- Konstandi, M. (2014). Consequences of psychophysiological stress on cytochrome P450-catalyzed drug metabolism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 45:149–167.
- Lin HL, Zhang H, Hollenberg PF. Metabolic activation of mifepristone [RU486; 17beta-hydroxy-11beta-(4-dimethylaminophenyl)-17alpha-(1-propynyl)-estra-4,9-dien-3-one] by mammalian cytochromes P450 and the mechanism-based inactivation of human CYP2B6. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(1):26-37.
- Turner JV, Garratt D, Barwick A, McLindon LA, Spark MJ, Smith A. Congenital and Fetal Effects After Mifepristone Exposure and Continuation of Pregnancy: A Systematic Review. *Clin Pharmacol Ther*. 2024 Nov;116(5):1207-1216.
- Davenport M, Delgado G, Harrison MP, Khauv V. Embryo Survival after Mifepristone: A Systematic Review of the Literature. *Issues Law Med*. 2017 Spring;32(1):3-18.
- Wolf, J.P., Chillik, C.F., Dubois, C., Ulmann, A., Baulieu, E.E. &Hodgen, G.D. Tolerance of perinidatory primate embryos to RU486 exposure in vitro and in vivo. *Contraception* 41, 85–92(1990).
- Tarantal, A.F., Otiang-a-Owiti, G. & Hendrickx, A.G. Holoprosencephaly in a long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*): a case report. *J. Med. Primatol*. 23, 319–324 (1994).
- FDA, 2025. Official FDA Drug Label For mifepristone (PO)
- Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med*. 1997;48:129-56.
- Baulieu EE. RU 486 (mifepristone). A short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Sep 26;828:47-58.
- da Silva Dal Pizzol, T., Knop, F.P. & Mengue, S.S. Prenatalexposure to misoprostol and congenital anomalies: systematicreview and meta- analysis. *Reprod. Toxicol*. 22, 666–671 (2006).
- Pastuszak, A.L. et al. Use of misoprostol during pregnancy and Möbius' syndrome in infants. *N. Engl. J. Med*. 338, 1881–1885(1998)
- Khan KK, He YQ, Correia MA, Halpert JR. Differential oxidation of mifepristone by cytochromes P450 3A4 and 3A5: selective inactivation of P450 3A4. *Drug Metab Dispos*. 2002 Sep;30(9):985-90.
- Robinson JF, Hamilton EG, Lam J, Chen H, Woodruff TJ. Differences in cytochrome p450 enzyme expression and activity in fetal and adult tissues. *Placenta*. 2020 Oct;100:35-44.
- Libraries, 2024. <https://open.lib.umn.edu/evolutionbiology/chapter/15-7-abortion/>

96. NAM의 출현과 현대독성학의 새로운 정의

1. NAM의 기원과 신약 개발의 적용

1) REACH에서 FDA의 NAM 응용

- NAM(New Approach Methodologies, 신규 접근 방법론)의 기원은 비의도적 노출 화학물질에 대한 안전성 평가를 기반으로 기원한 용어임. 즉, REACH(Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, 화학물질의 등록, 평가, 허가 및 제한)에 응용되어 출현되었음(Dent 등, 2022). 약물에 적용은 1997년 Modernization Act 후 동물대체시험법이 강조된 약 25년 후인 2022년 Modernization Act 2의 전후로 NAM에 대한 적극적인 응용과 관심이 더 높아졌다고 할 수 있음(U.S. Congress. 2022; U.S. FDA, 2024). 산업물질과 같은 비의도적 노출 NAM과 약물과 같은 의도적 노출에서 NAM의 접근에서는 차이가 있음(European Medicines Agency, 2023)..

2) 산업물질 등의 비의도적 노출에서 NAM

- REACH 하의 화학 안전성 평가는 유해성 식별 및 분류, 데이터가 부족한 수천 가지 화학물질 스크리닝, 노출 수준에서의 안전성 이분법적 판단, 환경 및 직업적 노출 경로, 인구 수준 보호를 포함함.

3) 약물 등의 의도적 노출에서 NAM

- 의약품 개발은 안전성과 유효성 평가, 인간 임상 결과 예측, 개별 환자에 대한 위험-이익 분석, 장기간 치료 용량, 약동학·생체분포·면역 반응과의 통합을 모두 포함함. 예를 들면 동일한 체외 간 모델은 잠재적 간독성 산업용 화학물질을 표시하는 데는 적합할 수 있으나, 신약 후보물질의 진행 여부를 결정하는 데는 불충분할 수 있음. 이는 위험성, 규제 체계, 과학적 질문이 근본적으로 다르기 때문임(National Research Council, 2007).

4) 비의도적 노출과 의도적 노출에서 NAM의 차이

- 이와 같이 차이를 기반으로 비의도적 노출에서 NAM은 단순한 동물실험 대체에 무게를 두지만, 약물 등의 의도적 노출에서 NAM 성공은 단순히 동물실험 대체 수단이라는 사고 방식을 넘어서야 함. 즉, **NAM은 인간과 더 관련성 높은 기전 정보를 제공하며 사용 맥락(The context of Use, COU)의 신중한 정의와 규제 의사 결정 과정에서 적절한 검증 기준이 필요함.**

2. 규제 의사 결정 과정에서 NAM 평가를 위한 고려 사항과 COU

- <표-1>에서처럼 규제 의사 결정 과정에서 NAM 평가 시 주요 5가지 고려 사항으로 1. 사용 맥락(COU, the context of use), 2. NAM의 임상적 적응증에 대한 생물학적 관련성, 3. NAM의 기술적 특성 분석, 4. 데이터 무결성 및 결과의 타당성(Data integrity and validity of results), 5. 정보 투명성 등으로 구성. NAM 평가는 단순히 관료적 check box가 아니며 규제기관과 개발자 간의 임상시험의 안전성을 위한 심오한 이해가 요구되는 의사 결정 과정임. 그러나 NAM 평가 시 핵심적인 요소는 COU임을 <표-1>을 통해 알 수 있음(European Commission, 2025; U.S. FDA, 2024).

<표-1> 규제 의사 결정 과정에서 NAM 평가 시 주요 고려 사항과 COU와의 관계	
1. 사용 맥락(COU)	<ul style="list-style-type: none"> • NAM에 대한 COU가 규제 요구 사항을 충족할 수 있도록 적절히 기술되었는가? • NAM은 약물의 안전한 사용 또는 잠재적 임상적 유효성에 대한 정보를 어떻게 제공하도록 의도되었는가? • 사용된 NAM은 현재 인정된 방법을 개선하거나 대체하기 위한 것인가? • 사용된 NAM은 인정된 비임상 연구의 평가 지표와 중복되는 데이터를 생성하는가? • COU 기술의 한계점은 무엇인가?
2. NAM의 임상적 적응증에 대한 생물학적 관련성	<ul style="list-style-type: none"> • NAM endpoint(최종점)의 생물학적 관련성이 명확히 기술되고 정당화되어, NAM endpoint와 관심 생물학적 종점 간의 관계가 분명한가? • NAM endpoint가 임상적으로 의미 있는 변화 측정에 어떻게 기여하는가? • 연구 결과는 어떻게 정당화되었으며, COU에서 논의되었으며, 또는 기존 발표 문헌에 의해 어떻게 뒷받침되었는가? • 시험 결과는 연구 대상 종 또는 최종점과 관련된 기존 생체 내(in vivo) 또는 생체 외(in vitro) 데이터 또는 과거 대조군 데이터와 어떻게 비교 평가되었는가?
3. NAM의 기술적 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> • NAM의 방법론은 COU에 정보를 제공하기 위해 어떻게 특별히 설계되었는가? • NAM 연구 보고서는 연구 설계 및 시험 구성 요소에 대한 충분히 상세한 설명을 포함하여 방법론을 완전히 이해하고 데이터 및 결과를 독립적으로 해석할 수 있도록 하는가? • 선택된 평가 지표(들)에 정보를 제공하고 의도된 COU를 다루기 위해 양성 및 음성 대조군은 어떻게 정당화되었는가?
4. 정보 투명성	<ul style="list-style-type: none"> • 검토를 위해 제출된 Raw data는 무엇인가? • COU 및 방법론에 대한 과학적·규제적 신뢰를 확보하기 위해 NAM에 대한 상세 정보가 광범위한 과학계 내에서 공개적으로 peer-review를 거쳤는가?
5. 데이터 무결성 및 결과의 타당성(Data integrity and validity of results)	<ul style="list-style-type: none"> • 보고서에 연구 설계, 수행 및 감독에 대한 과학적 신뢰를 확보할 수 있을 만큼 충분한 정보가 제공되었는가(예: NAM이 미국 FDA GLP 규정 준수, OECD 연구 설계 지침 및/또는 규제 기관이 설정한 기타 기준을 따라 수행되었는가)?

3. NAM에서 COU의 정의와 검증

3-1) FDA의 COU 정의

- FDA는 COU를 "의약품 개발 도구의 사용 방법과 의약품 또는 생물학적 제제 개발 지원 목적에 대한 간결한 설명(The FDA describes context of use as "a concise description of how the drug development tool is to be used and its purpose in supporting the development of drugs or biologics)으로 정의(FDA, 2023). 즉, **신약 개발에서 COU는 약리 또는 독성에 대한 연구 수행 맥락(the context of study conduct)임.**
- 어떻게 보면 정의 자체가 관료적이라고 느낄 수도 있지만, 그 함의는 심오함. **COU는 NAM 출현 후 주목을 받고 있어 인허가의 기존 관료적 체크박스(check box)가 아님. 그러나 현재 인허가에서 수용되고 있는 NAM이 ① 어떤 목적에 유효한가? ② 어떤 COU에 서? ③ 어떤 결정을 내리기 위해? 등의 질문에 대한 답이 필요함.** 이는 NMA의 핵심 요소가 COU이며 결국 규제 당국의 수용 가속화에 영향을 주는 핵심 요소임. **즉, COU는 독성학 패키지의 보호 기준을 유지하거나 초과하면서 임상 결과 예측을 향상시키는 것을 반드시 의미해야 하며 이는 NAM이 규제 프레임 내 안착에 있어 중요함.**

3-2) ICCVAM의 COU 정의와 검증

- 미국 동물대체시험법 검증을 위한 범부처 협동위원회인 ICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)은 <그림-1>과 같이 유연하고 목적에 부합하는 NAM 검증 전략의 개발 및 실행 과정에서 고려해야 할 핵심 개념을 나타낸 것임(ICCVAM, 2024). 이러한 개념들은 다양한 목적으로 NAM을 활용하는데 광범위하게 적용될 수 있으나, 특정 시나리오와 적용 분야에 따라 필요에 맞게 조정되어야 함. **고려해야 할 포괄적인 개념 중 중요한 하나는 COU(context of use, 사용 맥락), 즉 NAM이 의도된 목적(예시: 스크리닝, 유해성 식별, 효능 평가, 정량적 위험 평가의 출발점 등)임.** COU는 검증 과정의 유연성과 특정 COU에 대한 NAM 적합성 확립 방식을 결정함. 이러한 유연하고 목적 적합(fit-for-purpose)에 부합하는 검증 과정에 관여하는 핵심 개념은 생물학적 관련성, 기술적 특성 분석, 데이터 무결성, 정보 투명성임. 즉, <표-1> 규제 의사 결정 과정에서 NAM 평가 시 주요 고려 사항과 Figure 1에서처럼 NAM의 유연하고 목적에 부합하는 NAM 검증 전략의 개발 및 실행 과정에서 COU이 구성할 요소와 다름이 없음. NAM과 COU 내의 요소는 상호 연관되고 의존적임. 특히 **검증 과정의 모든 요소들은 독립적인 검토를 받아야 함.**

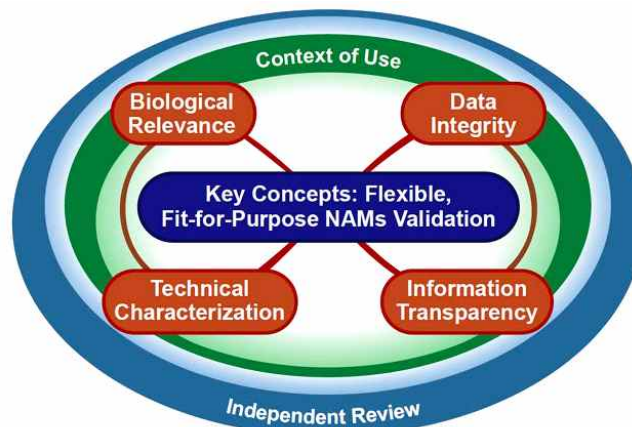


Figure 1. Key concepts to consider during development and implementation of flexible, fit-for purpose NAMs validation strategies(ICCVAM, 2024)

3-3) COU의 검증

- NAM은 다른 종으로부터 추론하기보다 인간 생물학을 직접 탐구할 수 있는 능력이므로 진정으로 과학적 진보임. 그러나 약물의 안전성 스크리닝에서 의약품 개발까지의 여정은 자동적이지 않기 때문에 특정 COU에 맞춤형된 엄격한 검증이 필요함.
- OECD TG34의 위험성 평가를 위한 신규 또는 개정 시험 방법의 검증 및 국제적 수용에 관한 지침 문서(Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment)에서 검증(validation)은 **특정 COU에서 NAM의 적합성을 판단함**으로써 과학적 신뢰도를 확립하는 견고하면서도 **유연한 과정**이어야 한다고 규정하고 있음(OECD TG4, 2005). 이러한 유연성은 의도된 것이며 필수적임.
- COU의 핵심 검증 원칙에는 관심 종말점(endpoint)에 대한 생물학적 관련성(Biological relevance to the endpoint of interest), 재현-가능한 결과를 통한 기술적 신뢰성(Technical reliability with reproducible results), 독립적 검토를 허용하는 투명한 데이터(Transparent data allowing independent review), 한계를 명시하는 정의된 적용 가능 영역(Defined applicability domain specifying limitations, **사용 맥락에 적합한 성능 기준 (Performance standards appropriate to the context of use)**이 포함되어야 함(Ball 등, 2022; NTP, 2024). **이는 결국 NAM 검증이 곧 COU 검증이라고 할 수 있음.**

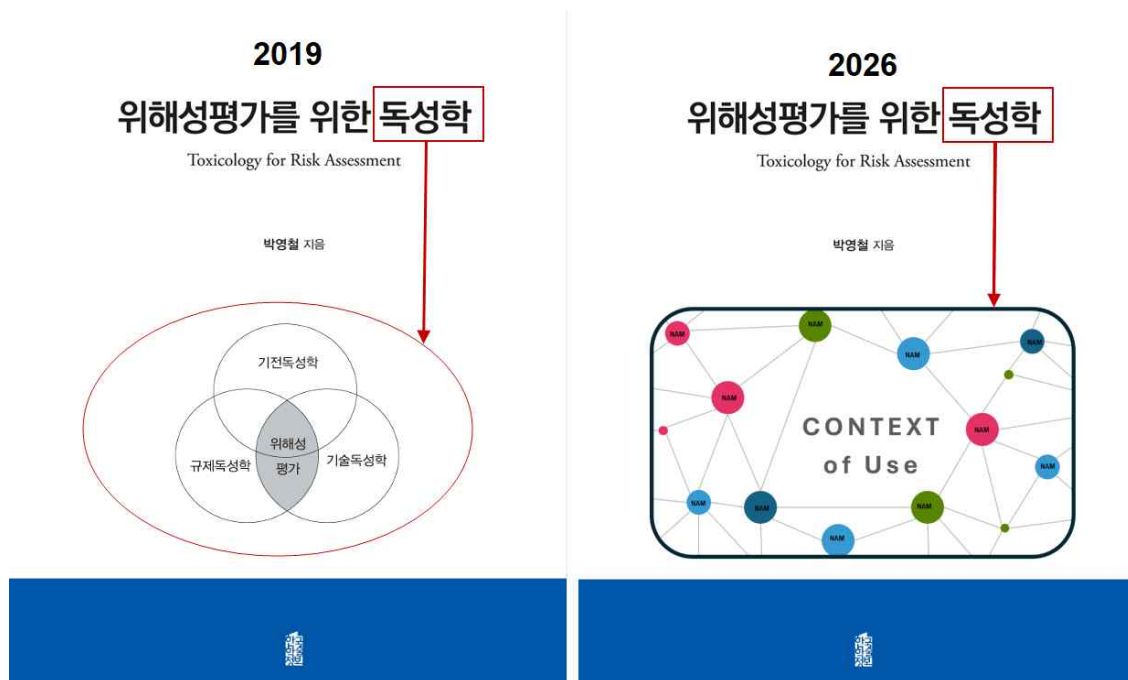
4. 현대독성학의 정의 변화와 COU

4-1) 현대독성학의 기존 정의

- 독성학은 동물실험 및 in vitro 연구를 통해 독성 기전을 파악하고 인체에 외삽하는 학문이라고 정의되었음.
- 그리고 오늘날 3대 현대독성학은 분자·세포학적 수준에서의 독성기전을 확인하는 기전독성학(mechanistic toxicology), 유해성확인을 위한 독성시험의 기술독성학(descriptive toxicology) 그리고 비임상연구와 관련된 규제독성학(regulatory toxicology) 등으로 구성.

4-2) 현대독성학의 새로운 정의

- 동물실험의 제한으로 인간-관련성(human-relevance)에 부합하는 in vitro, ex vivo 그리고 in silico 등을 기반으로 인체 독성의 예측이 규제적 측면에서 NAM이 도구가 됨. 그리고 NAM의 규제적 적합성을 COU로 설명됨. 즉, 따라서 적어도 신약 개발 분야에서 현대독성학은 기전, 기술 그리고 규제가 함축적으로 설명되는 COU로 정의됨.
- 따라서 향후 더 이상 동물실험이 허용되지 않는 상황에서 현대독성학은 아래의 <그림>에서처럼 **NAM의 사용 맥락(the context of Usage<Use>, COU)**으로 정의될 것임. 즉, **신약 개발에서 현대 독성학은** 'Toxicology is defined as the "context of use" relating to the prediction of human toxicity.



<그림> 현대 독성학의 정의에 대한 수정

5. 결론

- 독성학은 동물실험 및 in vitro 연구를 통해 독성 기전을 파악하고 인체에 외삽하는 학문이라고 정의되었음.
- 그리고 오늘날 3대 현대독성학은 분자·세포학적 수준에서의 독성기전을 확인하는 기전독성학(mechanistic toxicology), 유해성확인을 위한 독성시험의 기술독성학(descriptive toxicology) 그리고 비임상연구와 관련된 규제독성학(regulatory toxicology) 등으로 구성.
- NAM(New Approach Methodologies, 신규 접근 방법론)은 REACH(Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, 화학물질의 등록, 평가, 허가 및 제한)로 부터 출발하였지만 2022년 Modernization Act 2의 전후로 신약개발에 있어서 비임상연구의 핵심 도구가 되었음.
- NAM은 REACH에서는 동물대체법의 수준이지만 신약 개발에서는 동물 사용을 줄이기 위해 **'more human-relevant safety assessment'**로 정의됨. 좀 더 광의적인 측면에서는 NAM은 인체의 안전성뿐만 아니라 효능성 예측도 포함한 비임상연구로 정의되기도 함.
- **약물 스크리닝, 유해성 식별, 효능 평가, NOAEL 등 정량적 위험 평가의 point of departure 등을 포함하는 비임상연구로 NAM 정의될 수 있으며 COU(context of use, 사용 맥락)는 NAM이 의도된 목적임.**
- 그러나 현실에서 **NAM**은 비동물적 도구를 이용하여 인체 독성의 예측을 위한 비임상 과정이며 그 적합성은 COU로 설명됨. **따라서 적어도 신약 개발 분야에서 현대독성학은 기전, 기술 그리고 규제가 함축적으로 설명되는 COU로 정의됨. Toxicology = The context of use relevant to human's toxicity prediction.**

<참고문헌>

OECD TG34. Organisation for Economic Co-operation and Development. (2005). Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment (OECD Series on Testing and Assessment No. 34). OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264085350-en>

ICCVAM, 2024. Validation, Qualification, and Regulatory Acceptance of New Approach Methodologies. A Report of the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM, 대체 방법 검증에 관한 기관간 협의 위원회) Validation Workgroup. 2024.

Ball, N., Cronin, M. T. D., Shen, J., Blackwell, K., Booth, E. D., Bouhifd, M., Donley, E., Esdaile, D., Freedman, D., Grimm, F., Gromelski, M., Hougaard Bennekou, S., Hewitt, M., Jaworska, J., Kramer, N., Kreiling, R., Luechtefeld, T., Munn, S., Nelms, M., ... Hartung, T. (2022). A framework for establishing scientific confidence in new approach methodologies. Archives of Toxicology, 96(11), 2865–2879. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03365-4>

Dent, M., Amaral, R. T., Da Silva, P. A., Ansell, J., Bober, F., Boobis, A., Cronin, M.,; embryo, M., Endres, W., Faulhammer, F., Grignard, E., Gundert-Remy, U., Heinonen, T., Hougaard Bennekou, S., Hougaard, P., Hubesch, B., Laffont, M., Lewis, D., Lund, S., ... Yang, C. (2022). A framework for chemical safety assessment incorporating new approach methodologies within REACH. Archives of Toxicology, 96(3), 743–766. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03215-9>

European Commission. (2025). Roadmap towards phasing out animal testing. https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/chemicals/reach/roadmap-towards-phasing-out-animal-testing_en

European Medicines Agency. (2023). Regulatory acceptance of new approach methodologies (NAMs) to reduce animal use in testing. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/ethical-use-animals-medicine-testing/regulatory-acceptance-new-approach-methodologies-nams-reduce-animal-use-testing>

National Research Council. (2007). Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11970>

National Toxicology Program. (2024). Validation, qualification, and regulatory acceptance of new approach methodologies. National Institute of Environmental Health Sciences. <https://ntp.niehs.nih.gov/>

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2005). Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment (OECD Series on Testing and Assessment No. 34). OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264085350-en>

U.S. Congress. (2022). FDA Modernization Act 2.0. Consolidated Appropriations Act, 2023, Public Law 117-328.

U.S. FDA(Food and Drug Administration). (2024). Roadmap to reducing animal testing in preclinical safety studies. <https://www.fda.gov/media/186092/download>

97. FDA의 NAM 적격성 신청과 평가를 위한 ISTAND 프로그램과 승인된 NAM 현황

1. FDA 신약개발 도구 ISTAND 프로그램 안내

1-1) ISTAND 출현과 의약품 개발 도구(DDT, drug development tools)

- 미국 FDA는 기존 비임상시험 및 임상시험에서 적격성 프로그램의 범위를 벗어났지만, 신약 개발에 여전히 유용할 수 있는 신약 개발 도구의 혁신을 장려하기 위해 2020년 **신약 개발을 위한 혁신적 과학 기술 접근법**(ISTAND, Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs) 시범 프로그램을 설립
- 시범 프로그램에서 고려될 수 있는 접근법인 NAM(new approach methodologies, 신규 접근 방법론)은 다음과 같으며 매년 ISTAND 프로그램에 2~4건 접근법의 제출을 접수하였음.
 - 안전성 또는 효능 문제를 평가하기 위한 미세생리학적 시스템 활용
 - 새로운 비임상 약리학 또는 독성학 분석법 개발
 - 환자 평가, 새로운 평가 지표 개발 또는 연구 설계 정보 제공을 위한 인공지능 기반 알고리즘 활용
- 그러나 FDA는 혁신적인 의약품 개발이 환자 및 소비자에게 신속하게 새로운 치료법을 제공하는 중요한 방법임을 인식하여 2025년 7월 31일 **ISTAND 시범 프로그램이 상설적인 의약품 개발 도구(DDT, drug development tools) 적격성 정규 프로그램으로 전환**되었음을 발표하였음(FDA Voices, 2025).

1-2) NAM의 ISTAND 적격성(Qualification) 획득의 의미

- 의약품의 경우, 적격성 획득 시 NAM은 “의약품 개발 도구(Drug Development Tool, DDT)”로 분류되며, **해당 기술의 재검토나 재확인 없이도 IND, NDA 또는 BLA에 적합한 데이터로 인정**됨.

1-3) NAM의 ISTAND 적격성 획득 과정

- 2025년 4월 발표된 전임상 안전성 연구에서 동물실험을 줄이기 위한 로드맵(FDA, 2025: Roadmap to Reducing Animal Testing in **Preclinical Safety Studies**)에서 동물에서 NAM으로의 전환을 위한 계획을 **6 가지 핵심 과학적·기술적 단계**를 제시함. **이들 중 ③ 검증 및 적격성 평가 경로 수립이 ISTAND 프로그램을 언급하는 것임.**
 - ① NAM의 평가 지표 및 적용 사례 매핑
 - ② NAM 기술 개발 지원
 - ③ **검증 및 적격성 평가 경로 수립**
 - ④ 규제 지침 및 기준 개발
 - ⑤ 교육, 소통 및 문화 변화
 - ⑥ 결과 모니터링 및 반복적 개선

2. 의약품 개발 도구(DDT, Drug Development Tool) 적격성(Qualification) 프로그램

- ISTAND 적격성(Qualification)은 의약품 개발 도구(DDT, Drug Development Tool) 적격성(Qualification) 프로그램에 이루어짐. 동물실험을 사용해야만 하는 약물에 적용되는 Animal Model Qualification을 포함하여 NAM에 대한 적격성이 결정됨.

2-1) 바이오마커 적격성 프로그램 개정

- FDA는 DDT의 핵심인 바이오마커에 대한 적격성 프로그램(BQP, Biomarker Qualification Program) 계획 내용 요소에 대한 개요를 2025년 7월에 개정판을 공개하였음. **따라서 ISTAND 적격성 프로그램 및 의약품 개발 도구(DDT, Drug Development Tool) 적격성 프로그램은 곧 바이오마커에 대한 적격성 프로그램(BQP, Biomarker Qualification Program)을 의미함.**
- 이 업데이트된 문서는 21세기 치료법 법안 제507조에 의해 제정된 의약품 개발 도구(DDT) 적격성 절차에 따라 적격성 계획 제출을 준비하는 신청자에게 포괄적인 지침을 제공함. 해당 문서는 바이오마커 신청자를 위한 자료를 다음 웹사이트에서 확인할 수 있음.

<https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/resources-biomarker-requestors>.

2-2) 바이오마커 신청자를 위한 자료

① 바이오마커 적격성 평가 프로그램(BQP) 참여 방법

- 예비 제출물, 일반 문의 사항이 있거나 회의 요청을 원하시면 BQP (CDER-BiomarkerQualificationProgram@fda.hhs.gov)로 연락.

② 자격 부여 절차

- 바이오마커 자격에 대한 적격성 부여는 제안된 사용 맥락(COU, context of use)에 대한 바이오마커 개발을 위해 점진적으로 상세한 정보를 제공하는 3단계 과정임.
- 본 자료는 신청자가 FDA 바이오마커 자격의 적격성 부여 프로그램에 완전한 제출을 할 수 있도록 지원하기 위한 자료임.
- 신규 FD&C법 제507조에 따라 의약품 개발 도구 자격 부여 절차가 어떻게 변경되는지에 대한 설명은 [21세기 치료법\(21st Century Cures Act\)](#): DDT 자격의 적격성 부여를 참조

3. 의약품 개발 도구(DDT, Drug Development Tool) - NAM의 검증 및 적격성 평가 경로 수립 3 단계

3-1) 적격성 인증 획득의 3 단계

- <참고자료-1> Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs (ISTAND) Program Submission Process(신약 개발을 위한 혁신적 과학기술 접근법(ISTAND) 프로그램 제출 절차)에서처럼 ISTAND를 통한 적격성 인증 획득은 3 단계로 진행되며 다음과 요약됨.
- ① 제안된 COU를 포함한 간단한 LOI(Letter of Intent, 의향서)를 제출하여 프로그램 참여를 요청
- ② 접수가 승인되면, 신청자는 모든 방법론 정보, 검증 데이터 및 기타 계획된 검증 실험을 포함한 자격 인증 계획서 또는 적격성 계획서(QP, Qualification Plan)를 제출하도록 요청 받음.
- ③ 자격 인증 계획서가 승인되면, 신청자는 실험 결과 및 기타 관련 데이터를 포함한 완전한 자격 인증 패키지(FQP, Full Qualification Package)를 제출함. 이 패키지가 승인되면 FDA는 해당 NAM이 특정 COU(the context of use, 사용 맥락)에 대해 승인되었음을 알리는 서한을 발급함.
- 제출물에 포함된 특정 정보는 프로그램에 선정될 경우, 507조에 따라 공개될 예정이며, 자세한 내용은 다음의 'Drug Development Tool Qualification Process: Transparency Provision(의약품 개발 도구 자격 요건 절차: 투명성 규정)'에서 확인할 수 있음. 507조는 21세기 치료법(21st Century Cures Act) 제3011조에 의해 제정된 연방 식품, 의약품 및 화장품법(FD&C Act) 제507조를 의미함

3-2) Drug Development Tool Qualification Process: Transparency Provision(의약품 개발 도구 자격 또는 적격성 요건 절차: 투명성 규정)

- 2016년 12월 13일 제정된 21세기 치료법(21st Century Cures Act)에 따라<참고-1>, 연방 식품·의약품·화장품법(FD&C Act)에 새로운 제507조인 의약품 개발 도구(DDT)<참고-2>의 자격 부여(Qualification of Drug Development Tools)<참고-3>이 추가되었음.
- 제507조에는 신청자의 제출 자료 및 해당 제출에 대한 FDA의 공식 서면 결정에 적용되는 투명성 조항이 포함됨<참고-4>. 제507조의 투명성 조항에 따라 FDA는 아래 표에 포함된 정보를 공개 게시할 예정임.
- 제507조의 투명성 조항은 2016년 12월 13일(21세기 치료법 제정일) 이후 FDA에 제출된 의향서(LOI), 적격성 계획서(QP), 완전한 적격성 패키지(FQP)에 적용됨.

- 이 외에도 FDA는 LOI, QP 또는 FQP에 대한 모든 업데이트 및/또는 DDT(의약품 개발 계획) 수립에 중대한 영향을 미치는 기타 제출물을 공개 게시할 예정임.
- <표-1>는 제507조의 투명성 규정에 따라 LOI, QP, FQP 및 자격 결정에 대해 공개 게시될 내용에 대한 설명표

<표-1> DDT의 적격성을 위한 LOI, QP, FQP 및 자격 결정에 대해 공개 게시될 내용 설명표	
DDT Submission	Documents and/or Information FDA will post on its website, consistent with new section 507(c)
Other Documents	
Letter of Intent (LOI) <의향서>	<ul style="list-style-type: none"> • Date of receipt and status (under consideration, accepted, or declined) • Requestor Name • DDT Type (i.e. Animal Model, Biomarker, Clinical Outcome Assessment) • DDT Name/Description • Proposed Context of Use • DDT Requestor's Submitted LOI Summary • Drug development need the DDT is intended to address • Notation if FDA consulted external experts • FDA Formal Written Decision Letter (accepting or declining to accept the LOI)
Qualification Plan (QP) <자격 인증 계획서 또는 적격성 계획서>	<ul style="list-style-type: none"> • Date of receipt and status (under consideration, accepted, or declined) • Requestor Name • DDT Type (i.e. Animal Model, Biomarker, Clinical Outcome Assessment) • DDT Name/Description • Proposed Context of Use • DDT Requestor's Submitted QP Summary • Notation if FDA consulted external experts • FDA Formal Written Decision Letter (accepting or declining to accept the QP)
Full Qualification Package (FQP) <완전한 자격 또는 적격성 인증 패키지>	<ul style="list-style-type: none"> • Date of receipt and status (under consideration, accepted, or declined) • Requestor Name • DDT Type (i.e. Animal Model, Biomarker, Clinical Outcome Assessment) • DDT Name • Final Context of Use • DDT Requestor's Submitted FQP Summary • Notation if FDA consulted external experts
Qualification Determination <적격성 결정>	<ul style="list-style-type: none"> • Requestor Name • DDT Type (i.e. Biomarker, Clinical Outcome Assessment) • DDT Name • FDA Formal Written Qualification Determination Letter • FDA Executive Summary including final Context of Use and DDT use considerations • Redacted discipline-specific reviews • FDA rescission or modification letter (if applicable)

<참고-1> Further information regarding the 21st Century Cures Act can be found at <https://www.congress.gov/114/bills/hr34/BILLS-114hr34enr.pdf>. The content section pertinent to this letter is Subtitle B – Advancing New Drug Therapies, Sec. 3011 Qualification of drug

development tools, which is largely codified at section 507 of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act), or 21 U.S.C. 357.

<참고-2> The term drug refers to both human drugs and biological products unless otherwise specified.

<참고-3> Section 507 of the FD&C Act defines "drug development tool" to include biomarkers and clinical outcome assessments, and "any other method, material, or measure that the Secretary determines aids drug development and regulatory review for purposes of this section."

<참고-4> FD&C Act Sec. 507(c) (21 U.S.C. § 357(c)).

<참고-5> A biomarker can be a single concept or a panel of multiple concepts.

3-3) DDT 신청 프로그램별 제출물의 확인을 위한 방문 웹사이트

- [Animal Model Qualification Submissions](#)
- [Biomarker⁵Qualification Submissions](#)
- [Clinical Outcome Assessments \(COA\) Qualification Submissions](#)
- [CDER & CBER's DDT Qualification Project Search database](#)

4. ISTAND 프로그램 제출 절차에 대한 구체적 및 단계별 설명

4-1) 의향서(LOI) 제출과 발생할 수 있는 상황

<참고자료-1>은 IISTAND 프로그램 제출 절차를 좀 더 구체적으로 나타낸 것이며 의향서(LOI) 후 수락되지 않는 등의 상황이 발생할 수 있는 경우 및 대처 방법을 설명한 것임

<참고자료-1> Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs (ISTAND) Program Submission Process(신약 개발을 위한 혁신적 과학기술 접근법(ISTAND) 프로그램 제출 절차)

1. 제출 절차

- 21세기 치료법 법안(21st Century Cures Act)은 의약품 개발 도구(DDT, Drug development tool) 자격 부여를 위한 다단계 절차를 공식적으로 제정하였음. DDT 자격 부여는 특정 사용 맥락(COU)에 대한 것이며, 자격 또는 적격성을 부여받은 DDT는 의약품 또는 생물학적 제제 개발에 종사하는 모든 사람이 해당 COU에 사용할 수 있음.
- 자격(적격성) 부여 절차에는 다음 세 가지 제출이 포함됨.
 - 의향서(LOI),
 - 자격 부여 계획서(QP),
 - 완전한 자격 부여 패키지(FQP).

2. 의향서(LOI)

- ISTAND 프로그램 지원자는 먼저 <ISTAND@fda.hhs.gov>로 의향서를 제출. LOI의 내용 요소는 LOI 내용 요소 파일에서 확인할 수 있음<참고자료-2>.
- 완성된 LOI 접수 후, ISTAND 프로그램 담당자는 제출물을 검토하고 신청자에게 제출물이 프로그램에 접수되어 기술 검토 단계로 진행될지 여부에 대한 정보를 제공함. 접수 여부는 제출물의 질, 의약품 개발 필요성, 기술적 실현 가능성 및 주제 전문가 역량을 기준으로 결정됨.
- LOI가 검토를 위해 접수된 경우, 신청자는 검토 담당자에게 발표를 요청받을 수 있음. 모든 회의 절차는 기밀로 유지되며, 모든 논의는 구속력이 없음.

3. 다음 단계

- 주제 전문가 검토 후, DDT 위원회는 제출물의 과학적 가치, 특정 약물 개발 요구 사항 해결을 위한 DDT의 능력, 제안된 자격 부여 노력을 뒷받침하는 정보 및 자원 가용성, DDT의 실현 가능성 및 실용성 입증 등 여러 요소를 바탕으로 제출물을 프로그램에 수용할지 여부를 결정함.
- ISTAND의 목표는 신약 개발 프로그램에서 사용될 신약 개발 도구의 적격성을 인증하는 것이지만, 일부 신약 개발 도구의 경우에 인증이 최선의 방법이 아닐 수 있음. 이러한 경우 ISTAND는 신청자와 기관 주제 전문가들이 최적의 진행 경로(예: 지침 개발 또는 공개 회의)를 찾는 노력이 필요함.
- LOI 또는 QP 제출을 수락하기로 한 결정은 신청자가 결정 통지서의 권고 사항 및 의견을 해결하는 경우, 각각 다음 단계인 QP 또는 FQP로 진행할 수 있음을 의미함. 신청자는 해당 단계에서 수락되지 않는 한 LOI 또는 QP 단계에서 다음 단계로 진행할 수 없음.

4-2) 의향서(LOI)에 포함할 내용

- FDA는 신약 혁신적 과학기술 접근법(ISTAND) 프로그램 의향서(LOI)에 포함되어야 할 정보를 설명하는 모델 내용 개요를 제공. <참고자료-2>에서처럼 의향서에는 커버 레터가 첨부되어야 하며 다음 정보를 포함해야 함.
- 문헌을 인용할 경우, 번호가 매겨진 참고문헌 목록에서 해당 출처에 할당된 번호를 사용하여 인용함.
- 제출물에 포함된 특정 정보는 프로그램에 선정될 경우, 507조에 따라 공개될 예정이며, 자세한 내용은 다음의 'Drug Development Tool Qualification Process: Transparency Provision(의약품 개발 도구 자격 요건 절차: 투명성 규정)'에서 확인할 수 있음. 507조는 21세기 치료법(21st Century Cures Act) 제3011조에 의해 제정된 연방 식품, 의약품 및 화장품법(FD&C Act) 제507조를 의미함

<참고자료-2> ISTAND Qualification Letter of Intent (LOI) Model Content Elements (ISTAND 자격 의향서(LOI) 모델 내용 요소)

- 1. 제출물 제목:** 제출물에 대한 한 문장 설명.
- 2. 요청 기관:**
 - 기관명: 실제 주소; 전화번호; 웹사이트 주소
 - 주요 연락처: 이름; 직책; 주소; 전화번호; 이메일
 - 대체 연락처: 이름; 직책; 주소; 전화번호; 이메일
 - 지원 또는 참여 기관 또는 개인
- 3. 약물 개발 필요성 진술:** 본 제출물이 해결하고자 하는 약물 개발 필요성을 기술함(해당되는 경우). 유사한 사용 맥락(COU)에서 현재 사용 중인 도구 대비 제안된 이점도 포함해야 함. (최대 200단어 목표)
- 4. ISTAND 적용성 진술:** 본 프로그램은 바이오마커나 임상 결과 평가(COA, Clinical outcome assessment)가 아닌 의약품 개발 도구를 지원하기 위해 설계되었음. 의약품 개발 도구는 의약품 개발을 촉진할 잠재력을 가진 방법, 물질 또는 측정법을 의미하며, 바이오마커와 COA는 BEST 용어집에서 정의됨. 본 제출물이 바이오마커 또는 COA 정의에 부합하지 않는 의약품 개발 도구인 이유를 명시해야 함. (250단어)
- 5. 사용 맥락 진술서:** 의약품 개발 도구의 사용 방식 및 의약품 개발 관련 사용 목적을 완전하고 명확하게 기술한 진술서임. COU 진술서 예시는 <참고자료-3>의 '바이오마커 적격성 제출물' 및 '적격 바이오마커' 웹페이지에서 확인할 수 있음. 의약품 개발 도구는 의약품 개발을 지원하기 위한 도구로 인정됨을 유의하십시오. 해당 도구가 다른 목적(예: 임상적 의사 결정 지원)으로 사용될 수 있으나, 특정 의약품 개발 용도를 다루지 않는 COU는 프로그램 범위에서 제외됩니다. LOI에는 단 하나의 COU만 포함되어야 함. (250단어)
- 6. 약물 개발 용도:** 현재 상태를 배경으로 해당 도구의 구체적인 약물 개발 용도를 기술하십시오. 의사 결정 트리가 포함된 흐름도를 제공하십시오(예: 도구가 목표로 하는 약물 개발 요구사항의 현재 패러다임은 무엇인지, ISTAND 도구가 어떻게 작동되어 현재 패러다임을 변경하는지, 특정 규제 결과 변경을 포함). 예시 흐름도는 <참고자료-4> Example Drug Development Use Flow Diagrams에서 확인.
- 7. 기술적 설명:** 과학적/기술적 접근법, 작동 특성, 의약품 개발에서의 실현된 및 잠재적 활용에 대한 기술적 설명을 제공하십시오. 해당 도구의 임상적 분석적 타당성 정보 또는 타당성 확립 계획(해당 시)을 포함 <참고자료-3>
- 8. 기존 규제 기관과의 상호작용:** 본 제출과 관련하여 FDA 또는 미국 외 규제 기관(예: EMA, PMDA)과의 기존 또는 동시 진행 중인 상호작용을 설명하십시오. 상호작용의 시기, 성격 및 결과에 대한 정보를 포함 <참고자료-3>

4-3) 의향서(LOI)의 예시

- <참고자료-3>은 의향서 원본 요약이며 <별표-1>은 Knee osteoarthritis's Biomarker Qualification Letter of Intent (LOI) Template 즉, 무릎 골관절염의 바이오마커 적격성 의향서(LOI) 템플릿임.

<참고자료-3> Biomarker Qualification Letter of Intent (LOI) Template(바이오마커 적격성 의향서(LOI) 원본과 예시: <별표-1>)

- Administrative Information
- Context of Use
- Drug Development Need
- Biomarker Information
- Biomarker Measurement Information
- Additional Considerations for Radiographic Biomarkers
- Supporting Information
- Previous Regulatory Interactions
- Attachments

본 바이오마커 개발 제안과 관련된 출판물 목록을 제출해 주십시오.

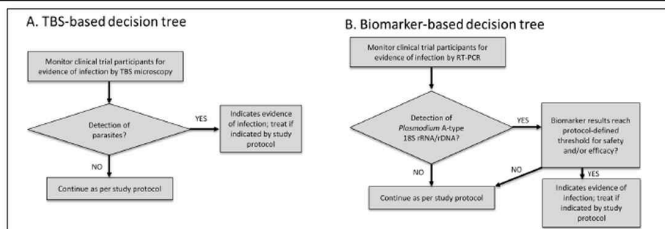
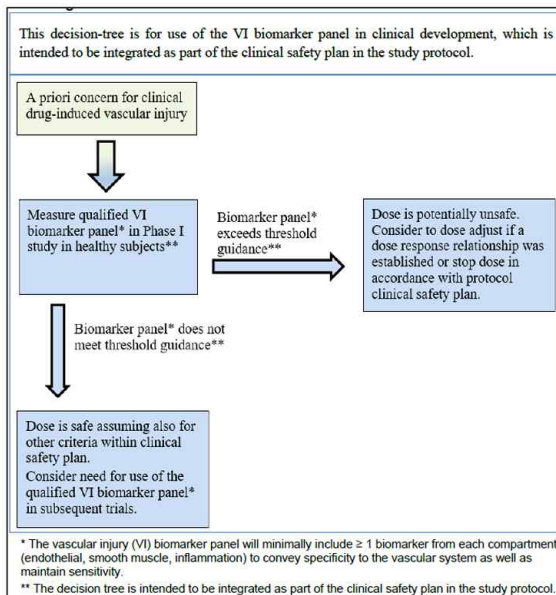
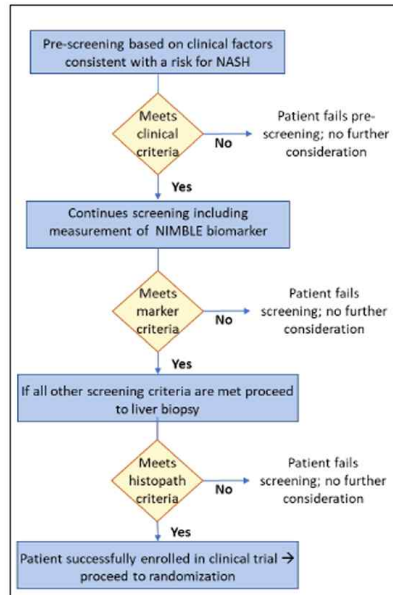
선택 사항* - 본 바이오마커 개발 노력이 장기적 목표의 일부인 경우, 장기적 목표를 요약해 주십시오.*

선택 사항* - 추가로 제출하고자 하는 지원 자료가 있는 경우, 첨부 파일로 제출해 주십시오.

*선택 사항은 공개되지 않습니다.

우편 주소 및 기타 중요한 제출 관련 지침은 바이오마커 자격 심사 담당자 및 제출 절차 안내를 참조하십시오. 제출 절차에 관한 문의 사항은 CDERBiomarkerQualificationProgram@fda.hhs.gov로 연락주시기 바랍니다.

<참고자료-4> Example Drug Development Use Flow Diagrams(출처: ISTAND Qualification Letter of Intent (LOI) Model Content Elements (ISTAND 자격 의향서))



5. 승인된 NAM의 현황과 결론

- <표>는 2025년 11월 18일 기준 FDA ISTAND 프로그램에 승인된 모든 기술의 최신 요약한 것임. ISTAND 프로그램에 공식적으로 채택된 11가지 기술 중에는 비임상 시험용 7가지 in vitro 시스템이 승인되었음. 독성예측을 위한 NAM 5가지를 포함한 비임상 NAM은 다음과 같음(CDER Statement, 1/23/2024 &(9/24/2024)
 - 4개는 미세생리학적 시스템(MPS) 또는 장기-온-어-칩 기술(4 are microphysiological systems (MPS) or organ-on-a-chip technologies)
 - 3개는 표준 2D 세포 배양 기법 사용(3 use standard 2D cell culture techniques)
 - 0개는 3D 오가노이드 또는 스페로이드(0 are 3D organoids or spheroids)
- MPS와 오가노이드 시스템은 조직 독성 예측을 위한 유사한 응용 분야를 추구하는 경우가 다수로 규제 승인을 향한 경쟁에서 MPS 기술이 현재 오가노이드보다 선호되고 있음.
- FDA에 이어 전 세계 정부 및 비정부 기관들도 NAM 검증 및 적격성 평가를 위한 자체 가이드라인을 신속히 마련 중임. 명확해진 NAM 지침은 신약 개발사에게 매력적인 제안이 될 것이며, 가장 견고하고 유익한 NAM 규제 프레임워크 개발 경쟁은 급속히 격화될 것으로 사료됨.

<표> 2025년 11월 18일 기준 FDA ISTAND 프로그램에 승인된 모든 기술의 최신 요약

NAMs in FDA ISTAND				
PRECLINICAL	SPECIFICITY	Integral Molecular	Specificity Screening Using the Membrane Proteome Array (MPA)	In Vitro
		Charles River	Retrogenix Platform for Specificity/Off-target Screening	In Vitro
	TOXICOLOGY	Fresenius Kabi	Local tolerance of epidurally/intrathecally administered leachables	In Vitro
		Emulate	Human Liver-Chip for Prediction of Drug-Induced Liver Injury	In Vitro
		Mt. Sinai	Human Kidney Chip for Assessment of Relative Nephrotoxicity	In Vitro
		Texas A&M	Human chorio-decidual organ on chip for derisking rodent DART studies	In Vitro
	DOSING	OPTin	Liver acinus microphysiological system for drug candidate dosing	In Vitro
CLINICAL	CLINICAL ENDPOINT ADJUDICATION	AstraZeneca	AI/ML-based adjudication of clinical events	AI
		Brigham and Women's Hospital	Heart Failure Natural Language Processing (HF-NLP) Model	AI
	CLINICAL OUTCOMES	Deliberate Solutions	AI-COA™ for Automated Depression and Anxiety Severity Measurement	AI
	STATISTICS	Independent	WKE to estimate survival function for time-to-event endpoints in clinical trials	Statistical Method

*As of 18 November, 2025 © 2025 InnovApproach Consulting IA

<참고문헌>

FDA Voices: "FDA Advances Drug Development Innovation by Establishing ISTAND as Permanent Qualification Program" (7/31/2025)

FDA. Roadmap to Reducing Animal Testing in Preclinical Safety Studies

CDER Statement(9/24/2024): "FDA's ISTAND Pilot Program accepts a submission of first organ-on-a-chip technology designed to predict human drug-induced liver injury (DILI)" (9/24/2024)

CDER Statement(1/23/2024): "FDA's ISTAND Pilot Program accepts submission of first artificial intelligence-based and digital health technology for neuroscience"

98. NAM(new approach methodologies, 신규 접근 방법)의 FDA 적격성 인 증과 실제 제출된 NAM 분석

1. NAM의 출현과 독성학 분야의 상황

1) 국내와 NAM에 대한 분석

- NAM(New approach methodologies 신규접근방법)은 신약 개발에서 동물실험의 중지를 위해 비임상연구의 약리 및 독성을 통한 인체 예측뿐만 아니라 임상시험에서 사용되는 새로운 접근 방법임. 가장 중요한 부분은 인체에서 독성 및 약리 예측이 기본 목적이기 때문에 NAM 개발에 있어서 human-relevance가 바탕이 되어야 함.
- 독성 분야에 30여 년 동안 7권 독성-관련 서적과 100 여편의 논문을 발표하면서 사용된 참고문헌을 경험으로 추정했을 때 미국 50%, 중국 30% 그리고 유럽 20% 그리고 나머지 지역에서 발행된 논문이었음. 미국은 독성학 분야의 리더 국가라고 치더라도 중국의 독성학 수준은 우리나라와 질적 및 양적 측면에서 비교조차 불가할 정도로 앞섰다고 할 수 있음. 이와 같은 차이에 있어서 근본적인 문제는 학계 및 규제기관에서 독성학에 대한 기본 원리와 지식의 부재한 측면에서 세계적인 흐름에 사상누각적 접근이라고 사료됨. 약물 개발과 관계된 것이라면 대학의 약대와 규제기관에 대한 허상적이고 뿌리가 없는 독성학 교육과 규제 제도에 기인이라고 사료됨. 더 독하게 평가한다면 신약 개발에 반하고 국민 안전성의 핑계로 망국적인 비논리-권위적 고자세의 규제 제도와 눈먼 연구비에 기반한 논문 점수 채우기 집착에 기인한다고 할 수 있음. 이에 기반한 국내의 비임상의 낮은 수준과 글로벌 신약이 없다는 것은 자명한 일임. 또한 식품공전에 존재하는 식품을 좀 더 추출·농축하여 건강기능성식품을 개발하는데 유전독성시험을 요구하거나 3개월 독성시험을 요구하는 것은 유전독성 및 아만성 독성을 유발하는 식품을 공전에 올렸다는 자기모순 사례로 앞서 평가한 약대와 규제기관의 무개념 제도 설정이라고 할 수 있음. 이러한 주장에 대해 자기가 먹는 물에 침을 뱉는다고 할 수도 있지만 비임상 및 독성학의 글로벌 수준을 기원하면서 노력한 것을 생각하면 안타까울 따름임. 이제 신약 개발을 위한 비임상 및 임상연구에서 FDA에 이어 전 세계 정부 및 비정부 기관들도 NAM 검증 및 적격성 평가를 위한 **신약 개발을 위한 혁신적 과학 기술 접근법(ISTAND, Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs)**와 같은 가이드라인을 신속히 마련 중임. 이는 신약개발의 비임상 규제제도가 전면적으로 변화된다는 것을 의미하기 때문에 우리나라의 규제기관 역시 글로벌 수준으로 올리는 기회로 삼을 수 있다는 것을 의미함.
- 이와 같은 기원을 하는 마음으로 **NAM에 대한 정보 제공 및 세계적 흐름에 대해 지속적으로 제공하려고 합니다. 특히 NAM은 비임상의 독성과 약리 그리고 임상시험 등의 모두를 포함하기에 누구나 사용하고 있는 개발 프로그램을 ISTAND에 제출할 수 있으며 이는 연구과제의 최종 목적점으로 제시하여 신약개발에 도움이 되는 도구 개발의 중요한 수단**이 될 수 있습니다.

2) NAM 개발을 위한 구체적 절차

- 미국 FDA는 기존 비임상시험 및 임상시험에서 적격성 프로그램의 범위를 벗어났지만,

신약 개발에 여전히 유용할 수 있는 신약 개발 도구의 혁신을 장려하기 위해 2020년 **신약 개발을 위한 혁신적 과학 기술 접근법(ISTAND, Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs)** 시범 프로그램을 설립하였음.

- 그러나 FDA는 혁신적인 의약품 개발이 환자 및 소비자에게 신속하게 새로운 치료법을 제공하는 중요한 방법임을 인식하여 2025년 7월 31일 **ISTAND 시범 프로그램이 상설적인 의약품 개발 도구(DDT, drug development tools) 적격성 정규 프로그램으로 전환**되었음을 발표하였음(FDA Voices, 2025).
- FDA ISTAND 프로그램을 통해 적격성을 평가 및 승인되면 해당 기술의 재검토나 재확인 없이도 IND, NDA 또는 BLA에 **적합한 데이터로 인정**됨.
- NAM(new approach methodologies, 신규 접근 방법)의 FDA 적격성을 인증받기 위해서는 IISTAND 프로그램에 **DDT 적격성**을 받아야 함.
- NAM의 적격성의 과정을 간단히 요약하면: LOI 제출 → FDA의 주제 전문가에 의한 초기 평가: 수용 가능성 결정 통보와 더불어 구체적인 고려사항, 권고사항과 데이터 요청 사항 등에 대한 요청 → 신청자의 적격성 자격 계획서(QP, Qualification Plan) 작성 및 제출 → FDA 심사 → 최종 적격성 부여 패키지(FQP, Final Qualification Plan) 요청 및 제출 → FDA 최종 결정 → NAM의 DDT Qualification

2. ISTAND 프로그램에서의 NAM 적격성 승인 과정

2-1) 의향서(LOI) 제출과 발생할 수 있는 상황

- <참고자료-1>은 IISTAND 프로그램 제출 절차를 좀 더 구체적으로 나타낸 것이며 의향서(LOI) 후 수락되지 않는 등의 상황이 발생할 수 있는 경우 및 대처 방법을 설명한 것임

<참고자료-1>Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs (ISTAND) Program Submission Process(신약 개발을 위한 혁신적 과학기술 접근법(ISTAND) 프로그램 제출 절차)

1. 제출 절차

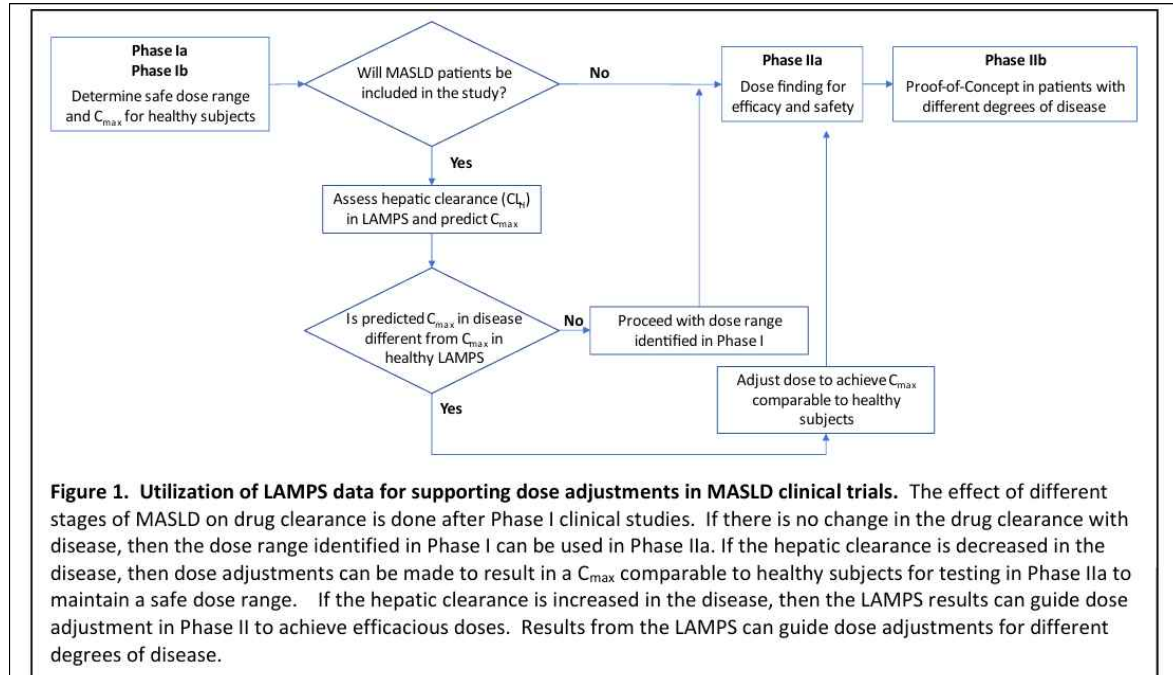
- 21세기 치료법 법안(21st Century Cures Act)은 의약품 개발 도구(DDT, Drug development tool) 자격 부여를 위한 다단계 절차를 공식적으로 제정하였음. DDT 자격 부여는 특정 사용 맥락(COU)에 대한 것이며, 자격 또는 적격성을 부여받은 DDT는 의약품 또는 생물학적 제제 개발에 종사하는 모든 사람이 해당 COU에 사용할 수 있음.
- 자격(적격성) 부여 절차에는 다음 세 가지 제출이 포함됨.
 - 의향서(LOI),
 - 적격성 자격 부여 계획서(QP),
 - 완전한 자격 부여 패키지(FQP).

2. 의향서(LOI)

- ISTAND 프로그램 지원자는 먼저 <ISTAND@fda.hhs.gov>로 의향서를 제출. LOI의 내용 요소는 LOI 내용 요소 파일에서 확인할 수 있음

3-2) DDT-IST-000034의 최초 LOI 내용

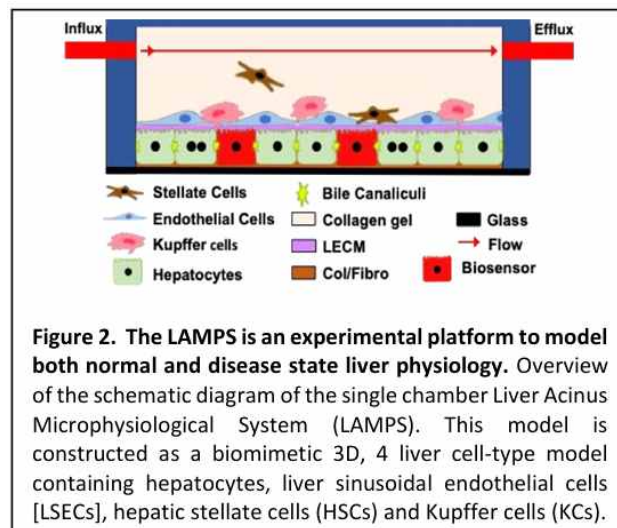
<p style="text-align: center;">ISTAND Qualification Letter of Intent(ISTAND 적격성 의향서)</p> <ul style="list-style-type: none"> Submission Title: Liver acinus microphysiological system (LAMPS) for determining drug candidate dosing in clinical trials of liver disease.
<p>CONTEXT OF USE Statement</p> <ul style="list-style-type: none"> LAMPS는 대사이상 지방간질환인 MASLD(Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease) 환자에서 약물 후보물질의 간 대사 제거율을 확립하고, 대사이상 지방간질환(MASLD, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease) 환자가 포함된 임상시험에서 약물 후보물질의 투여량 결정에 도움을 주기 위한 DDT(drug development tool)임. <p style="text-align: center;">Drug Development Use</p> <ul style="list-style-type: none"> MASLD 치료제 개발에 관한 FDA 지침은 약물의 약동학 특성이 규명될 때까지 비정상 간 기능을 가진 환자를 1상 및 초기 개념 증명 임상시험에서 배제하도록 규정(FDA, 2018). 그러나 대사성 기능 장애 관련 지방간염(MASH, Metabolic dysfunction-Associated Fatty Liver Disease) 간 질환 전반에 걸친 적절한 용량 조정을 뒷받침하기 위해, 약물 개발 프로그램 초기 단계에서 간 기능 장애에 대한 전용 연구를 통해 그 영향을 연구할 것을 권장함(FDA, 2003). 전용 간 기능 장애 연구의 경우, 간 손상 정도를 평가하기 위해 Child-Pugh 점수를 사용하여 장애 정도를 평가할 것을 권장함. 그러나 Child-Pugh 점수는 간 질환의 병기를 분류하기 위해 고안된 것이 아니며, Child-Pugh 분류와 MASLD(병기 간 상관관계는 확립되지 않았음). LAMPS는 관류 매질의 주요 구성 요소를 조작하여 MASLD의 다양한 단계를 유도할 수 있으며, 이는 젖산 탈수소효소(LDH)/알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 누출, 간 지방증, 프로콜라겐 1A1 분비 지표 등 여러 지표를 모니터링하여 정량화할 수 있음. 이러한 지표들은 비침습적 임상 바이오마커인 ALT 및 간 경직도 또는 간 지방 함량에 대한 영상 기반 평가와 연관될 수 있으며, 이는 MASLD에 대한 개념 증명 (proof-of-concept) 종결점으로 인정받고 있음. 따라서 LAMPS DDT는 1상 임상시험 이후 약물 개발 파이프라인 초기 단계에서 다양한 MASLD 정도에 따른 용량 조정을 위한 지원 데이터를 제공하여, 간 질환 환자를 대상으로 한 시험에서 안전한 용량 범위를 유지하는 2상 시험 설계에 도움을 줄 수 있음(Figure 1).



<Figure 1의 설명> MASLD 임상시험에서 용량 조정을 지원하기 위한 LAMPS 데이터 활용을 나타낸 것임. MASLD의 다양한 단계가 약물 제거율에 미치는 영향은 1상 임상 연구 이후에 평가됩니다. 질환에 따른 약물 제거율 변화가 없다면, 1상에서 확인된 용량 범위를 2a상에 그대로 적용할 수 있음. 질환으로 인해 간 제거율이 감소한 경우, 2a상 시험에서 건강한 피험자와 유사한 C_{max} 를 달성하도록 용량을 조정하여 안전한 용량 범위를 유지할 수 있음. 질병 상태에서 간 청소율이 증가한 경우, LAMPS 결과를 바탕으로 2상에서 유효 용량을 달성하기 위한 용량 조정이 가능함. LAMPS 결과는 다양한 질병 단계에 따른 용량 조정을 안내할 수 있음.

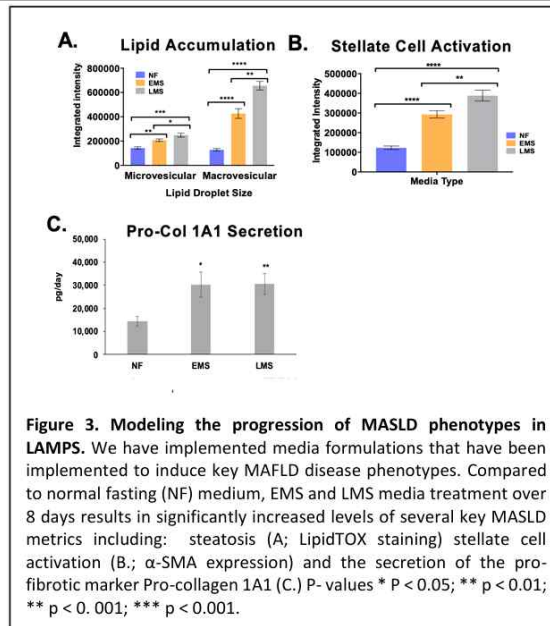
Technical Description

- 간 소엽 미세생리학적 시스템(LAMPS)은 정상 및 질병 상태의 간 생리학을 모델링하기 위한 구조화된 생체모방체임. LAMPS는 간세포, 간 정맥 내피세포(LSECs), 간성상세포(HSCs), 쿠퍼 세포(KCs) 등 4가지 주요 간 세포 유형 간의 순차적 세포 적층 및 세포 간 자가 조직화를 결합하여 구축된 3차원 적층 간 모델임(Lee-Montiel 등, 2017; Vernetti 등, 2016).
- 칩은 먼저 콜라겐과 피브로넥틴 매트릭스로 장치를 코팅한 후 간세포를 접종하여 조립됨. 다음으로, 탈세포화된 돼지 세포외 기질(ECM)을 간세포 층 위에 도포하고, 이어서 간소혈관내피세포(LSECs)와 쿠퍼세포(KCs)를 추가한 후, HSCs를 함유한 콜라겐 I 용액으로 칩을 덮음(Figure 2). 산소 구역화는 간 기능과 대사의 핵심 요소임. 본 실험의 LAMPS에서 개별 장치의 산소 장력을 배지 유속 조절로 제어함으로써 구역 1(12–15%)의 높은 산소 장력과 구역 3(3–6%)의 낮은 산소 장력 미세환경을 확립 및 유지할 수 있음을 규명하였음. 15 μ /h 및 5 μ /h의 유속은 각각 12–15%와 3–6%의 산소 분압을 생성하였음(Lee-Montiel 등, 2017). LAMPS는 정상 간 생리학 평가, ADME-Tox 연구, 전이성 간 종양 미세환경 모델링, MASLD 진행 연구 및 MASLD 약물 효능 시험 플랫폼으로 구현되었음(Vernetti 등, 2016; Lefever 등, 2014; Miedel 등, 2019; Xia 등, 2024; Saydmohammed 등, 2021).



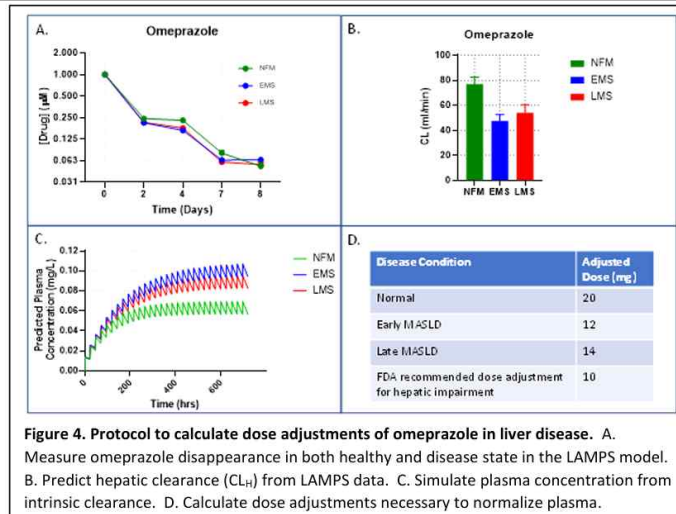
<Figure 2. 설명> LAMPS는 정상 및 질환 상태의 간 생리학을 모델링하기 위한 실험 플랫폼임. 단일 챔버 간 소엽 미세생리학적 시스템(LAMPS)의 개략도 개요. 본 모델은 간세포, 간 정맥 내피세포 [LSECs], 간성상세포(HSCs), 쿠퍼 세포(KCs)를 포함한 생체모방 3차원, 4종 간세포 유형 모델로 구축되었음.

- LAMPS는 간 기능 및 MASLD 표현형 유도에 있어 재현성이 입증되었음(Xia 등, 2024; Sakolish 등, 2021). 미국 국립전환의학연구센터(NCATS, National Center for Advancing Translational Sciences) 지원 조직칩 시험센터 프로그램의 일환으로, 텍사스 A&M 조직칩 시험센터(Tex-Val TCTC)는 알부민 및 요소 분비, CYP3A4 대사 등 LAMPS 기초 간세포 기능의 실험실 간 재현성을 입증하였음(Liver MPS Platforms, 2025). 본 실험 결과와 일관되게, Tex-Val TCTC는 9일 동안 낮은 기초 젖산 탈수소효소 누출을 보였으며, 톨카폰, 트로바플록사신 및 카페인의 약물 유도 효과가 그들의 실험실에서 재현되었음(Sakolish 등, 2021). 본 실험에서 LAMPS가 본질적인 간 청소율을 예측할 수 있는 능력을 확립했음(Schurdak 등, 2020). 이와 같은 능력은 Tex-Val TCTC에 의해 여러 약물에 대해 확인되었으며, 체외 청소율과 알려진 임상 청소율을 비교한 피어슨 상관 계수는 0.77(p-값 <0.05)이었음(Sakolish 등, 2021).
- MASLD 진행과 관련된 여러 주요 표현형 및 기능적 변화를 유도하는 배지 구성을 개발했음(Verneti 등, 2016; Lefever 등, 2014; Xia 등, 2024). 대조군인 정상 공복 배지(NF)는 정상 혈당 및 인슐린 수치를 포함함. 초기 대사증후군 배지(EMS)는 단순 지방증 및 성상세포 활성화의 분자적 유발인자인 증가된 유리 지방산(올레산 및 팔미트산), 포도당, 인슐린을 포함함. 후기 대사증후군 배지(LMS)는 지방산, 고농도 포도당, 인슐린 및 두 가지 섬유화 촉진 인자(변형성장인자 $\beta 1$; TGF- β)와 지질다당류(LPS)를 함유하여 MASLD 표현형의 중증도를 증가시킴. EMS와 LMS는 MASLD 진행과 연관된 간 지방증, 성상세포 활성화 및 섬유화를 증가시키며(Figure 3), 이는 LAMPS에서 정량화됨(Saydmohammed 등, 2021). MASLD 표현형의 유도는 MASLD 발병 위험도가 서로 다른 유전적 변이를 가진 환자를 포함한 다섯 가지 다른 환자 간세포 배양군에 대해 여러 연구에서 높은 재현성을 보인 것으로 입증되었음(Xia 등, 2024).



<Figure 3 설명> LAMPS에서 MASLD 표현형 진행 모델링. 주요 MAFLD 질환 표현형을 유도하기 위해 구현된 배지 조성을 적용하였습니다. 정상 공복(NF) 배지에 비해, 8일간 EMS 및 LMS 배지 처리는 다음과 같은 여러 주요 MASLD 지표의 수준을 유의미하게 증가시킵니다: 지방증(A; LipidTOX 염색), 별세포 활성화(B; α -SMA 발현), 그리고 섬유화 촉진 표지자인 프로콜라겐 1A1 분비(C)가 유의하게 증가하였다. P-값 * $P < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. * $P < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

- LAMPS를 DDT로 활용하는 목적은 간 질환 환자의 용량 조정 필요성 평가를 지원하고 변경 사항을 권고하기 위함임. 본 접근법은 건강한 모델과 MASLD LAMPS 모델 모두에서 화합물의 내인성 클리어런스 변이를 측정하고, 계산 모델링을 활용하여 적절한 조정 용량을 결정하는 것을 포함함. 예를 들어, LC-MS/MS 분석을 통해 오메프라졸 처리된 LAMPS 모델에서 수집된 유출 매체 내 오메프라졸 농도의 시간 의존적 감소를 입증하였음. 이 데이터를 활용하여 내재적 클리어런스를 계산한 결과, MASLD에서 오메프라졸의 혈장 농도를 잠재적 독성 임계치 이하로 유지하기 위해 용량 조정이 필요할 수 있음을 보여주었음 (Figure 4). 건강한 간 비교 모델과 함께 MASLD 유도 모델에서 오메프라졸을 시험한 결과, 당사 EMS 배지에서 감소된 내재적 청소율을 고려할 때 약 40%의 용량 감량이 필요함을 나타냈음. 이 결과는 간 기능 장애 환자에 대해 FDA 오메프라졸 제품 모노그래프에서 권장하는 50% 용량 감량과 일치함.



<Figure 4 설명> 간 질환 시 오메프라졸 용량 조정 계산 프로토콜. A. LAMPS 모델에서 건강한 상태와 질환 상태 모두에서 오메프라졸 소실 측정. B. LAMPS 데이터로부터 간 청소율(CL_H) 예측. C. 내인성 청소율로부터 혈장 농도 시뮬레이션. D. 혈장 농도 정상화를 위한 필요한 용량 조정 계산.

Biological/Clinical Validity

- 간 내인성 청소율 변화에 따른 용량 조정의 필요성을 평가하기 위한 MASLD 유도형 LAMPS 모델의 적합성을 검증하기 위해, 실험을 통해 8개 약물의 시험을 제안함. 이들 약물 중 간기능 장애 환자를 대상으로 한 임상시험에서 용량 조정이 필요하다고 확인된 4개 약물과, Child-Pugh C 등급 미만 환자에게 용량 조정이 불필요하다고 판단된 4개 약물이 포함됨. 선정된 화합물은 <Table 1>에 기재되어 있음.

Table 1. Proposed Compounds for Determining Dose Adjustments Due to MASLD.		
Compound	Dose Adjustment for Hepatic Impairment	Reference
Omeprazole	20 → 10 mg	21
Paclitaxel	135 → 100 mg/m ²	22
Acetaminophen	↓ max daily dose by 50%	22, 23
Resmetirom	C _{max} ↑ 170% in moderate hepatic impairment	24
Metformin	No dose adjustment for Child Pugh A, B	22
Azithromycin	No dose adjustment	22
Atorvastatin	No dose adjustment	25
Ciprofloxacin	No dose adjustment	25

Previous Regulatory Interactions

본 제출과 관련하여 기존 또는 동시 진행 중인 규제 기관 협의 사항은 없음

3-3) FDA의 DDT-IST-000034에 대한 초기 검토 및 권고 사항

- FDA는 2025년 1월 9일 CDER 혁신적 신약 과학기술 접근법(IST) 시범 프로그램(ISTAND)에 제출된 의향서(LOI) DDT-IST-000034에 대한 검토를 완료하였음.
- FDA는 2025년 6월 23일 ISTAND 시범 프로그램에 제출된 의향서(LOI)에 대한 검토를 완료 후 접수하기로 결정.
- 적격성 자격 계획서(QP, Qualification Plan) 작성 시, 첨부된 부록<참고자료-2>에 명시된 구체적인 고려사항 및 권고사항과 데이터 요청 사항을 QP 본문 내에서 각각 서술하였음.
- 부록 항목과 제출물 내 해당 응답 위치 간의 상호 참조를 포함한 요약본을 제공 요청. 본 DDT 개발 노력이 구체화됨에 따라, 제출된 데이터, 귀사의 사용 맥락 세부사항 및 DDT 검증에 사용된 연구 설계가 궁극적으로 이러한 고려사항 및 권고사항 중 어느 것이 가장 적용 가능한지를 결정할 것으로 통보함.
- 제출물 및 QP 내용 요소 개요에 대한 자세한 내용은 바이오마커 다음 웹페이지: <https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/resourcesbiomarker-requestors>

<참고자료-2> DDT-IST-000034에 대한 FDA의 고려 및 권장 사항 제시와 AITOX의 의견

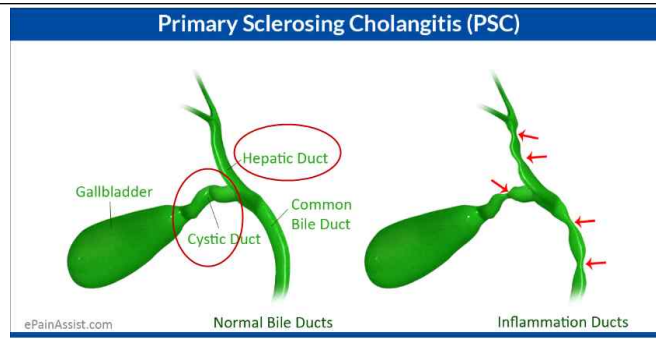
Context of Use (COU)에서 고려 사항

"LAMPS는 대사성 기능 장애 관련 지방간 질환(MASLD) 환자의 약물 후보물질 간 대사 제거율을 확립하고, MASLD 환자가 포함된 임상시험에서 약물 후보물질 투여량 결정에 도움을 주는 DDT입니다."

FDA의 질문 및 권장 사항과 이에 대한 의견

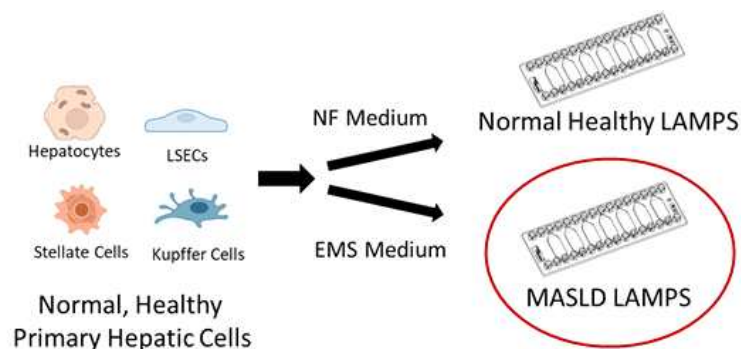
FDA Q1. LAMPS가 질병 중증도가 다양한 원발성 담즙성 담관염(PBC, Primary Biliary Cholangitis) 및 원발성 경화성 담관염(PSC, Primary sclerosing cholangitis) 환자의 용량 조정에 적용될 수 있습니까?

<AITOX의 의견>: 대사이상 지방간질환(MASLD, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease) 환자가 포함된 임상시험에서 약물 후보물질의 투여량 결정에 도움을 주기 위한 DDT(drug development tool)임. 아래의 <그림>에서처럼 PBC 또는 PSC는 간관(hepatic duct) 및 담관 염증을 유도하여 혈류의 변화를 초래할 수 밖에 없음(iDiseases.com, 2024). 따라서 중증도에 차이가 있을 수 있지만 LAMPS의 PBC 및 PSC에 응용이 가능할 것으로 사료됨(Steinberg 등, 2025; Peiseler 등, 2022; iDiseases.com, 2024)



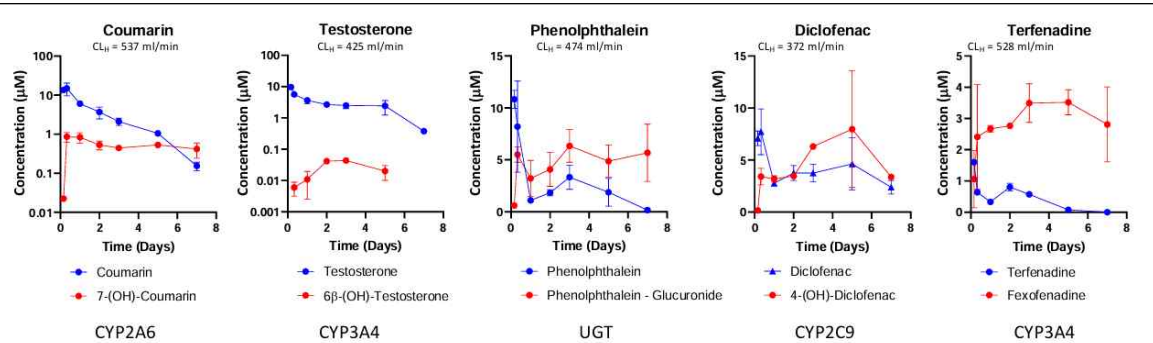
FDA Q2. LAMPS(Liver acinus microphysiological system)가 간경변증(보상성 및 비보상성 간경변증) 환자의 약물 간 클리어런스 정보 제공에도 유용할 수 있습니까?

<AITOX의 의견>: LAMPS는 ADME-Tox 연구에서 대사 기능 장애 관련 지방간 질환(MASLD) 진행을 입증하는 도구로, 컴퓨터 예측 MASLD 치료제의 안전성과 효능을 시험하는 수단으로, 그리고 임상 시험 코호트 선정에 도움을 주기 위해 MASLD 진행 및 약물 치료 반응에서의 유전자형 특이적 차이를 규명하는 정밀 의학 플랫폼으로 활용되어 왔음(Vernetti 등, 2016; Lefever 등, 2014; Miedel 등, 2019; Xia 등, 2024; Saydmohammed 등, 2021). 아래의 <그림>에서처럼 정상적인 간 세포에 질환모델별로 미디움을 달리함으로써 표적 질환 LAMPS의 유도가 가능함.



FDA Q3. LAMPS는 약동학(PK)뿐만 아니라 약력학(PD), 특히 우려 수준이 높은 특정 환자 집단에서 약물 독성을 평가할 때도 유용할 수 있습니까?

<AITOX의 의견>: 약물 유발 간독성은 약리학적 안전성 평가에서 여전히 중요한 과제이지만, 세포 유형별 간독성 반응을 구별할 수 있는 분석 도구의 부족으로 독성 경로의 메커니즘에 대한 이해가 부족한 상태임. 그러나 한편으로 실질 세포와 비실질 세포를 결합한 3D 공동 배양 시스템은 간세포 기능성, 알부민/요소 분비 및 cytochrome P450 활성을 향상시켜 간독성 예측을 개선 중에 있음(Yuan 등, 2025). 특히 신청자인 Schurdak 등(2024)의 발표에서 아래의 <그림-1>에서처럼 LAMPS를 이용한 약물들의 대사에 따른 원물질 및 대사체의 PK 및 TK의 지표 확인이 가능함을 발표하였음(Schurdak 등, 2024). 특히 <표-1>에서처럼 DDT인 본 LAMPS에서 표적질환인 MASLD 환자에서 간의 Phase I & II reaction과 관련된 효소들의 활성이 변화한다는 것을 확인되었으며 이러한 변화도 반영하여 PK 지표가 추정됨. 최근에서는 6가지 서로 다른 세포 모델을 통합한 면역능 간-온-어-칩 플랫폼을 활용하여 약물 후보물질의 간독성 프로파일을 신속하게 평가하는 원리 증명(proof-of-principle)을 제시됨(Yuan 등, 2025). 또한 <그림-2>에서처럼 면역능 간-온-어-칩 플랫폼에 통합된 표적 세포 제거 전략을 확립하여 간독성 결정 인자의 신속한 식별을 가능하게 하였음.

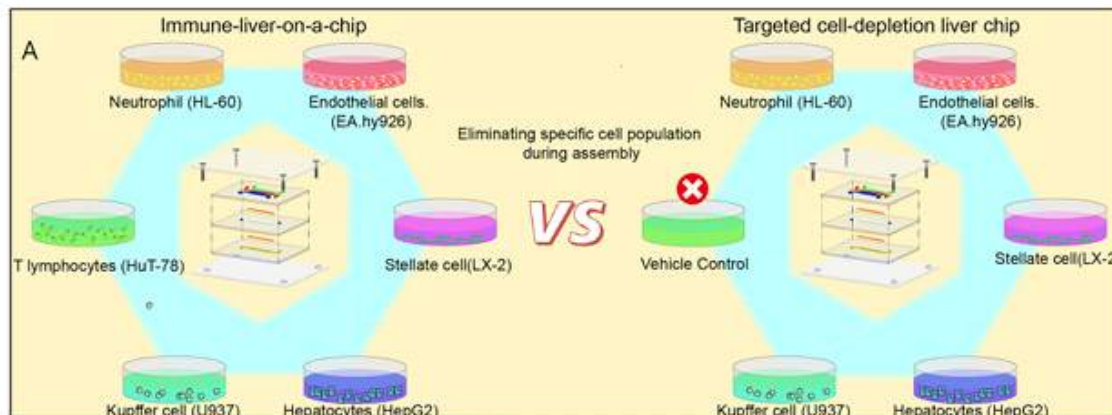


<그림-1> LAMPS를 통한 약물 및 cytochrome P450 효소별 혈중 크리언스의 변화

<표-1> 대사이상 지방간질환인 MASLD(Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease) 환자에서 Phase I & II reaction과 관련된 효소들의 활성 변화

• MASLD affects CYP isoform activity differently

Liver metabolic enzymes affected by MASLD		
Phase	Activity	Enzyme/co-factor
I	Decreased	CYP1A2 (70%) CYP2C19 (75%) CYP3A4/5 (33%)
	Increased	CYP2A6 (100%) CYP2C9 (40%)
	No change	CYP2E1 CYP2B6 CYP2C8 CYP2D6
II	Decreased	SULT1A1 GST GSH



<그림-2> Targeted depletion methodology(표적 제거 방법론): 조립 과정에서 표적 세포를 생략하여 세포 유형 특이적 간 칩을 생성하였음. 예시: T 세포 제거 칩의 경우, 조립 시 T 세포가 없는 배양 배지를 사용함. 독성 변화는 제거된 시스템과 완전한 시스템을 비교하여 평가함.

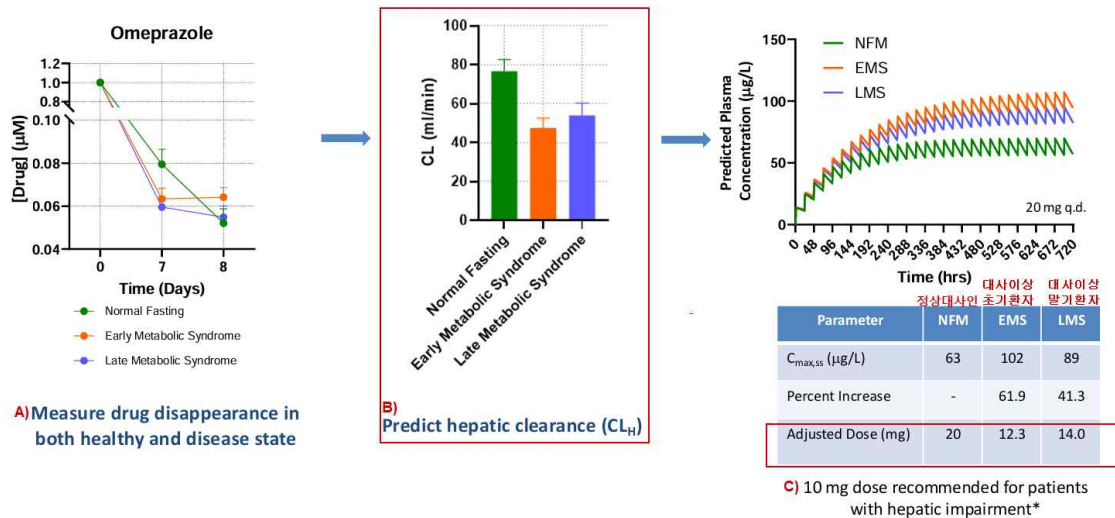
FDA Q4. MASLD로 인한 간경변증 환자를 대상으로 임상시험을 시작하기 전에 전용 간기능 장애(HI) 연구가 필요합니다. 현재 LAMPS 분석법은 다중 약물에서 일관되고 고품질의 성능을 입증하기 전까지는 간기능장애 연구를 대체할 수 없습니다. 그러나 신뢰성과 효능에 대한 충분한 증거가 확보된다면, 향후 체외 분석법 또는 복합 분석법이 대안이 될 가능성을 배제하지 않습니다. 제한된 COU를 정확히 반영하기 위해 흐름도 업데이트가 필요합니다.

<AITOX 의견> 생략

분석적 및 임상적 고려사항

FDA Q5. 간기능 장애에 따른 용량 조정을 결정하는 과정의 각 단계에 대해 실험/계산 데이터와 실제 임상 데이터(기준값) 간의 포괄적인 비교를 제시하십시오. 다음 요소를 포함하십시오: a) 플랫폼에서 얻은 원약물 농도, b) 예측 간 청소율(CL_H), c) 시뮬레이션된 약물 혈장 농도, d) 계산된 용량 조정량. 상세한 실험 설정(예: 투여 일정 및 계산 방법)을 포함하십시오.

<AITOX 의견> 전체 약물에 대한 검색은 찾기가 어려웠고 환자의 질병 정도에 따른 투약 용량 결정은 아래의 <그림>의 C에서처럼 확인이 되었음.

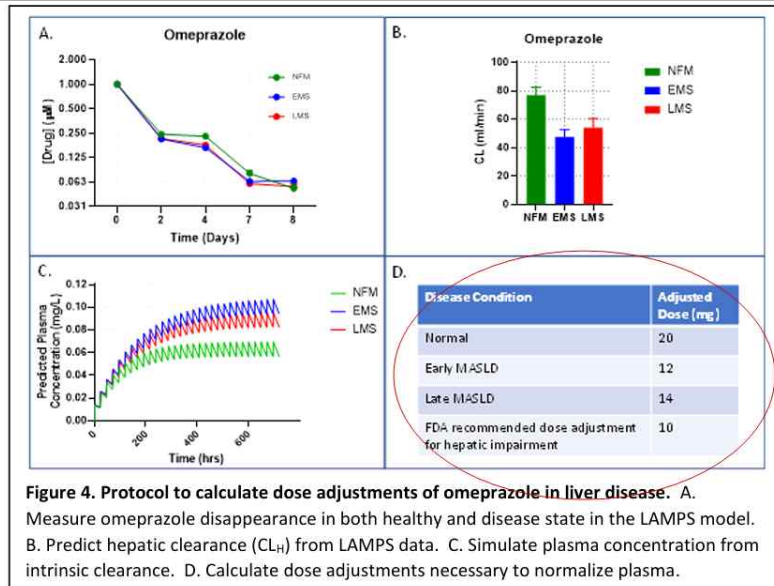


<그림> MASLD 환자에서 약물 후보물질 용량 결정 지침에 LAMPS 사용 방법이 적용되는 예시

FDA Q6. 그림 4에서 설명된 바와 같이, 배출 매체에서의 시간 의존적 약물 손실이 내재적 청소율 및 예상 혈장 농도 계산에 사용된다고 명시하였습니다. 그러나 LOI의 <Figure 4>에서 **파트 A의 곡선들은 중첩** 가능해 보입니다. 파트 A에 표시된 결과가 파트 B 및 C에 표시된 계산된 청소율 및 예측 혈장 농도를 어떻게 뒷받침하는지 설명하십시오.

<AITOX 의견> LOI에 있는 <그림-1>과 검색을 통해 찾은 자료의 비교를 통해 <표-1>과 동일한 실험의 결과로 추정됨. 동일한 실험의 결과이지만 <그림-1>의 D와 <그림-2>의 PK 지표 및 보정 절차의 표기 유무에 대한 차이가 있음. 따라서 <표-1> 및 사용된 자료로 질문에 충분히 설명이 가능할 것으로 사료됨.

<그림-1> LOI의 자료



<표-1> Schurdak 등(2024)의 자료

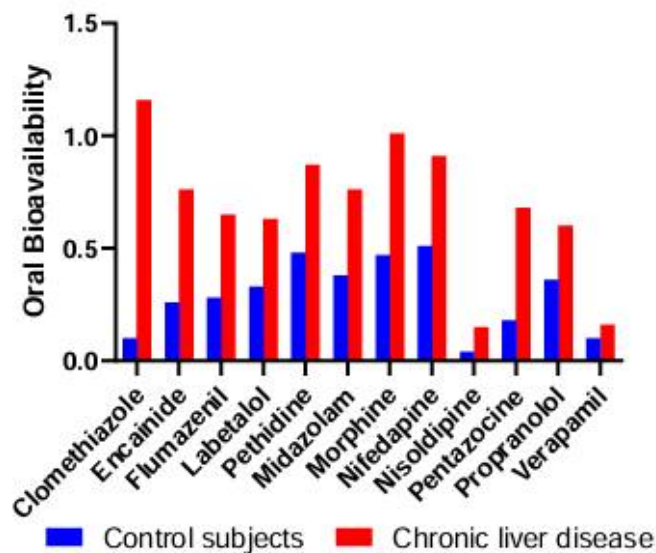
Parameter	NFM	EMS	LMS
$C_{max,ss}$ ($\mu\text{g/L}$)	63	102	89
Percent Increase	-	61.9	41.3
Adjusted Dose (mg)	20	12.3	14.0

10 mg dose recommended for patients with hepatic impairment*

FDA Q7. 제안된 8개 시험 화합물의 수와 선정 근거를 제시하십시오. **용량-의존적 간독성**을 보이는 것으로 알려진 약물을 포함하고, **LAMPS를 통해 용량-의존적 독성을 입증한 약물**로 목록을 확장하십시오. 또한 **더 넓은 용량 조정 범위(예: 20%, 40%, 60%)**가 필요한 약물도 포함해야 합니다.

<AITOX 의견> <Table 1>은 MASLD 유도형 LAMPS 모델의 적합성을 검증하기 위해 통해 8개 약물의 시험을 의향성에 제출된 약물임. 먼저 실제로 인체 간 독성을 유발하는 약물을 검색할 필요성이 있음. 이를 바탕으로 MASLD를 포함한 간 질환은 <표-1>과 같이 간독성 물질에 대한 민감도를 변화시킬 수 있다는 자료를 고려하거나(Massart 등, 2017), <그림-1>에 서처럼 간 질환 환자에게서 약물의 PK 지표인 생체이용률 증가에 대한 자료를 고려할 필요성이 있음(Delcò 등, 2005).

Table 1. Proposed Compounds for Determining Dose Adjustments Due to MASLD.		
Compound	Dose Adjustment for Hepatic Impairment	Reference
Omeprazole	20 → 10 mg	21
Paclitaxel	135 → 100 mg/m ²	22
Acetaminophen	↓ max daily dose by 50%	22, 23
Resmetirom	Cmax ↑ 170% in moderate hepatic impairment	24
Metformin	No dose adjustment for Child Pugh A, B	22
Azithromycin	No dose adjustment	22
Atorvastatin	No dose adjustment	25
Ciprofloxacin	No dose adjustment	25



<그림-1> 간 질환 환자에서 약물의 생체이용률 증가에 대한 자료

<표-1> 간질환 민감도에 대한 간독성 약물 또는 물질 용량에 의한 변화

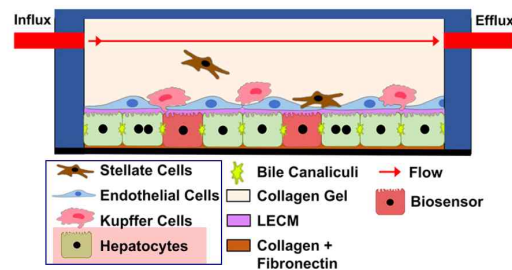
Drug	Altered Hepatotoxicity in MASLD
Acetaminophen	Increased risk of acute liver injury
Halothane, Isoflurane	Increased risk of hepatotoxicity
Fosinopril	Increased risk of hepatitis
Losartan	Increased risk of hepatitis
Omeprazole	Increased risk of hepatitis
Piperacillin	Increased risk of hepatitis
Telithromycin	Increased risk of hepatitis
Ticlopidine	Increased risk of hepatitis

Massart, 2017 PMID: 28691103

FDA Q8. 간세포 외 추가된 세 가지 세포 유형의 역할을 설명하십시오. 간세포만을 사용한 단순화된 모델로도 간 약물 클리어런스를 적절히 예측할 수 있을까요?

<AITOX 의견> <그림-1> LOI에 제출된 LAMPS 도식도와 사용된 세포 4종류(붉은 네모 내)를 나타낸 것임. 간 소엽 미세생리학적 시스템(LAMPS)은 구조화된 생체모방체로, 간세포를 이용한 순차적 세포 증화 및 세포 간 자가 조직화를 결합한 후 1차 간 소엽 내피세포

(LSECs), 간성상세포(HSCs), 쿠퍼세포(Kupffer cells) 등 비간질세포(NPCs)를 추가하여 구축된 3차원 층상 모델임. 물론 간세포(hepatocyte)sms diranf 대사와 밀접한 세포이므로 약물의 클리어런스에 가장 중요한 영향을 줌. 그러나 간조직을 구성하는 세포들은 질병에 의해 약물 대사 및 약물의 이동 등에 영향을 줌(Delcò 등, 2005).



<그림-1> LOI에 제출된 LAMPS 도식도와 사용된 세포 4종류(붉은 네모 내)

통계적 고려사항

FDA Q9. QP 제출물에 통계적 분석 계획(SAP)을 포함하십시오. SAP에는 다음을 포함하되 이에 국한되지 않아야 합니다: 스폰서가 제안한 의도된 용도(COU): LAMPS는 MASLD 환자에서 약물 후보물질의 간 클리어런스를 확립하고, MASLD 환자가 포함된 임상시험에서 약물 후보물질의 투여량 결정에 도움을 주는 DDT(의도된 용도)입니다.

- ① LAMPS를 통한 체외 간 클리어런스와 시험 약물의 알려진 임상 클리어런스 간의 상관관계에 대한 계획된 분석.
- ② 2상 임상시험 등록을 위한 MASLD 환자 선정 기준 포함.
- ③ 선택된 시험 약물의 용량 조정 필요성 예측에 있어, LAMPS 및 기존 임상 연구에서 도출된 MASLD 환자 대상 시험 약물 용량 조정 관련 정성적 결론 비교를 위한 통계적 접근법.
- ④ 임상 연구 권고사항 대비 LAMPS 기반 용량 조정 권고사항의 정량적 분석을 위한 통계적 접근법.

<AITOX 의견> 임상관련 자료임

4. 결론

4-1) ISTAND Qualification Letter of Intent(ISTAND 적격성 의향서)와 FDA 요청의 분석 견해

- LOI 제출과 이에 대한 FDA 초기 검토 요청 내용에 대한 분석 결과, 다음과 같은 결론을 얻었음.
- ① LOI에서 철저하게 Human-relevance와 관련된 시스템을 사용하였고 자료를 제출하는 것으로 확인됨.
- ② LOI에서는 주로 특정 질병에 대한 비임상의 PK와 관련된 것이지만 FDA에서는 사용의 타당성으로 확장성과 동시에 약리 PK와 독성의 용량-반응을 함께 요구하는 경향이 있음.
- ③ 하나의 질병에 대한 약물의 인체 용량 예측 및 보정에 재한 NAM이지만, 여러 조건에서도 예측이 가능하도록 다양한 약물에 대한 PK를 통해 중증도 차이에 따른 환자에게 적절한 약물 투여 시스템 요구.

4-2) ISTAND 프로그램에서의 최초 적격성 승인을 받은 Michael Phelan의 경험

- Michael Phelan은 FDA ISTAND 프로그램에 최초로 승인된 기술인 Integral Molecular Inc.의 막 단백질체 배열(Membrane Proteome Array)의 책임자였음(Integral Molecular, 2025). 프로그램 최초 신청자로서 FDA와 정기적으로 소통하며 프로그램 구조와 기대 사항에 대한 상당한 통찰력을 얻을 수 있었다고 함. 이 모든 경험을 글로 압축할 수는 없지만, 세 가지 핵심 교훈을 제시. 특히 문항 3은 우리나라 규제기관의 인적 구성이 얼마나 높은 전문성을 가져야 하는지를 보여줌.
- ① **사용 맥락(Context of Use, COU)**은 모든 제출 자료의 기초입니다. COU는 규제 당국에게 정확하고 유용해야 합니다. 모든 데이터와 실험은 COU 충족에 초점을 맞춰야 합니다.
- ② **투명성(Transparency)**은 절대 타협할 수 없습니다. 요약 보고서(Executive Summary)를 제외하고, QP(Qualified Plan) 및 FQP(Functional Qualified Plan)의 세부 내용은 기밀입니다. 규제 당국은 독점적 방법 및 모든 한계 사항 공개를 포함한 완전한 투명성을 기대합니다.
- ③ **과학적 엄밀성(Scientific rigour)**은 성공에 필수적입니다. **제출 자료는 임상의, 약리학자, 독성학자, 생물통계학자, NAMs 연구 과학자를 포함한 FDA 인력에 의해 광범위하게 검토 될 것입니다.** 생물학부터 통계학에 이르기까지, 제출 자료는 철저한 검증을 견뎌낼 수 있어야 합니다.

<참고문헌>

Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, Kubes P, Heikenwälder M, Tacke F. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease - novel insights into cellular communication circuits. *J Hepatol*. 2022 Oct;77(4):1136-1160.

Steinberg, Gregory R. et al. Integrative metabolism in MASLD and MASH: Pathophysiology and emerging mechanisms. *Journal of Hepatology*, 2025. Volume 83, Issue 2, 584 – 595.

iDiseases.com, 2024. Primary Sclerosing Cholangitis – Symptoms and Treatment

Yuan, S., Zhang, P., Yang, S. *et al*. Targeted cellular depletion in an immune-liver-on-a-chip platform elucidates cell-type-specific heterogeneity in drug-induced hepatotoxicity. *Commun Biol* **8**, 1560 (2025).

Schurdak et al., Qualification of Patient-derived Biomimetic Liver MPS as Drug Development Tools for Drug Metabolism, Toxicity, Drug Efficacy Testing, and Clinical Trial Cohort Selection. C-Path CIVM Workshop. 2024.

Sakolish, Courtney et al., Analysis of Reproducibility and Robustness of a Human Microfluidic Four-Cell Liver Acinus MicroPhysiology System. *Toxicology*. 2021 January 30; 448: 152651.

Aleman, J., K, R., Wiegand, C. *et al*. A metabolic dysfunction-associated steatotic liver acinus biomimetic induces pancreatic islet dysfunction in a coupled microphysiology system. *Commun Biol* **7**, 1317 (2024).

Massart J, Begriche K, Moreau C, Fromenty B. Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity. *J Clin Transl Res*. 2017 Feb;3(Suppl 1):212-232.

Delcò F, Tchambaz L, Schlienger R, Drewe J, Krähenbühl S. Dose adjustment in patients with liver disease. *Drug Saf*. 2005;28(6):529-45.

99. NAM의 FDA-ISTAND 적격성 접수 현황과 인증 실패에 대한 예시 분석

1. 2026년 2월까지의 NAM의 FDA-ISTAND 프로젝트 접수 현황

1-1) DDT와 관련한 자료의 공개와 제한성

- 미국 FDA CDER(Center for Drug Evaluation and Research) 및 CBER(Center for Biologics Evaluation and Research)의 의약품 개발 도구(DDT, Drug development tool) 적격성 심사 프로젝트 검색 데이터베이스는 일반 이해관계자가 제출 단계, 적격성 심사 상태, 질환 및 치료 영역별로 DDT 적격성 심사 프로그램을 검색할 수 있음. 이 요건은 투명성을 위해 FDA에 제출된 STAND Qualification(ISTAND 적격성), LOI(Letter of Intent, 의향서), LOS(Letter of support, 지지서), QP(Qualification Plan, 적격성 자격 계획서), FQP(Final Qualification Plan, 최종 적격성 부여 패키지) 등에 적용됨.
- 그러나 DDT 신청자와 FDA 사이 모든 문서가 공개되는 것은 아니고 LOI를 비롯한 비공개로 제출된 FDA의 반응에 대한 자료들임. 이에 STAND 프로그램에서의 최초 적격성 승인을 받은 Michael Phelan은 규제 당국이 독점적 방법 및 모든 제한적인 사항 공개를 포함한 완전한 투명성을 요청하였음.

1-2) NAM의 FDA-ISTAND 프로젝트 목록과 특성

- FDA가 2020년 ISTAND(Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs, 신약 개발을 위한 혁신적 과학 기술 접근법)을 시범 프로그램, 그리고 2025년 정식 프로그램 후 2026년 후 현재까지 접수된 **ISTAND project는 <표>에서처럼 DDT-IST-000061이 최종적 프로젝트로 61건 NAM이었음.**
- ISTAND Qualification(ISTAND 적격성), 의향서(LOI, Letter of Intent, 의향서), 적격성 자격 계획서(QP, Qualification Plan), 최종 적격성 부여 패키지(FQP, Final Qualification Plan) 등의 자료 제출 및 결정 과정임. 비록 61개의 NAM project가 제출되어 모든 과정을 거치는 것은 아니며 FDA는 "Accept, N/A Not Accept, Qualified, Not qualified, Modified, Rescinded, Issued, Not issued, Withdrawn" 등으로 update함. 이와 같은 이유로 61건 중 다수의 프로젝트가 목록에 list up되지 않았다는 것을 알 수 있음. 이는 신청자가 자진으로 Rescinded(자진 취소) 또는 Withdrawn(FDA에 의한 취소)된 것으로 추정되어 제출된 61건 중 27건 약 44% 정도가 심사가 이루어진 것으로 파악됨.
- <표>에서 ISTAND NAM Project를 위해 제출한 원천지를 보면 대부분 DDT-IST-000047의 텍사스 대학교 DDT-IST-000028의 개인 자격을 제외하면 대부분 신약과 관련된 제약 회사, CRO 그리고 의료기기와 관련된 회사임.
- 단순히 비임상의 약리와 독성 예측 관련된 것뿐만 아니라 임상시험 관련된 프로젝트 등도 확인 할 수 있음.

- 심사가 이루어진 NAM 프로젝트 27 중 LOI 수준에서 'Not accept'는 6건이었으며 특히 6건 중 human-relevant 플랫폼을 이용하지 않은 유일한 1건은 제프라피쉬를 이용한 DDT-IST-000035이었음. **결과적으로 27건 NAM 프로젝트 27건에서 DDT-IST-000035건을 제외한 모든 플랫폼은 human-relevant 플랫폼이라는 것을 인식할 필요성이 있음.**

<표> 2020년부터 현재까지 ISTAND 인증을 위해 제출된 DDT 또는 NAM 목록			
ISTAND project number	ISTAND-DDT project name	Latest submission stage & status	Organization name
DDT-IST-000006	Specificity Screening of Biotherapeutics for Improved Safety Profiling in IND Applications Using the Membrane Proteome Array (MPA)	QP - Accept	Integral Molecular, Inc.
DDT-IST-000013	Prognostic Covariate Adjustment (PROCOVA™) as an Efficient Statistical Methodology, Intended to Improve the Efficiency of Phase 2 and 3 Clinical Trials by Using Trial Subjects' Predicted Control Outcomes (Prognostic Scores) in Linear Covariate Adjustment	LOI - Letter of Intent -- Not Accept	Unlearn.AI, Inc
DDT-IST-000014	AI-COA™ for Automated Depression and Anxiety Severity Measurement	LOI - Letter of Intent -- Accept	Deliberate Solutions, Inc.
DDT-IST-000015	Local tolerance of epidurally/intrathecaly administered leachables in vitro	LOI - Letter of Intent -- Accept	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
DDT-IST-000016	Human Liver-Chip for Prediction of Drug-Induced Liver Injury	QP - Qualification Plan -- Accept	Emulate
DDT-IST-000019	In-Vitro 3D Human Model for Screening and Prioritization of NASH Clinical Candidates	LOI - Letter of Intent -- Not Accept	InSphero AG
DDT-IST-000020	Automating Identification, Detection, and Adjudication (AIDA) of Clinical Events using Artificial Intelligence (AI) and Machine Learning (ML)	QP - Qualification Plan -- Reviewable	AstraZeneca
DDT-IST-000027	The Heart Failure Natural Language Processing (HF-NLP) Model	LOI - Letter of Intent -- Accept	Brigham and Women's Hospital
DDT-IST-000028	Interval-Specific censoring set adjusted Kaplan-Meier estimator (WKE) to estimate the survival function for the time-to-event endpoints in clinical trials.	LOI - Letter of Intent -- Accept	Yaoshi Wu
DDT-IST-000030	PTSDx+	LOI - Letter of Intent -- Not Accept	Senseye, Inc.
DDT-IST-000032	Use of Retrogenix Platform to Enhance Specificity/Off-target Screening to Biotherapeutic Safety Assessment	LOI - Letter of Intent -- Accept	Charles River Laboratories, Inc.
DDT-IST-000034	Liver acinus microphysiological system (LAMPS) for determining drug candidate dosing in clinical trials of liver disease.	LOI - Letter of Intent -- Accept	Organ Pathobiology and Therapeutics Institute
DDT-IST-000035	FDA Qualification and Regulatory Validation of a Zebrafish-Based Preclinical Model for Dravet Syndrome	LOI - Letter of Intent -- Not Accept	Zefit, Inc.

DDT-IST-000037	Binary dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) Screening Tool for Exclusion of High-Toxicity Patients in Phase II Metastatic Colorectal Cancer Trials	LOI - Letter of Intent -- Not Accept	PGxAI, Inc.
DDT-IST-000041	An in-vitro, high throughput, 3D primary human spheroid model to assess Drug Induced Liver Injury (DILI)	LOI - Letter of Intent -- Not Accept	InSphero AG
DDT-IST-000043	Microphysiological Systems to Investigate Clinical Drug Induced Liver Injury Risk	LOI - Letter of Intent -- Accept	3Rs Collaborative
DDT-IST-000044	Quantifying hepatotoxicity using the liver acinus microphysiological system (LAMPS) for determining drug candidate dosing in clinical trials of liver disease	LOI - Letter of Intent -- Accept	Organ Pathophysiology and Therapeutics Institute
DDT-IST-000045	Human Kidney Chip for Assessment of Relative Nephrotoxicity	LOI - Letter of Intent -- Accept	Icahn School of Medicine at Mt. Sinai
DDT-IST-000046	Remote Disease Severity Assessment for Psoriasis Drug Clinical Trials: At-Home Image Collection and Artificial Intelligence-Based Scoring Models	LOI - Letter of Intent -- Accept	Johnson and Johnson
DDT-IST-000047	Human chorio-decidual interface organ on chip for derisking positive rodent DART studies for new modality investigational new drug candidates	LOI - Letter of Intent -- Accept	Texas A&M University
DDT-IST-000049	Human iPSC-Cardiomyocyte MEA Assay for Prediction of Clinical Cardiovascular Repolarization Risk	LOI - Letter of Intent -- Accept	Axion BioSystems
DDT-IST-000050	The MetaHeps technology for ex vivo drug causality assessment in immune-mediated drug-induced liver injury (DILI)	LOI - Letter of Intent -- Reviewable	TransHeps AG
DDT-IST-000051	Human -on-a-Chip Neuromuscular Junction Assay for Botulinum Toxin Potency Testing	LOI - Letter of Intent -- Reviewable	Hesperos, Inc.
DDT-IST-000053	AI-Driven Digital Liver Model for Prediction of Drug-Induced Liver Injury	LOI - Letter of Intent -- Reviewable	Absentia Labs, Inc.
DDT-IST-000054	Human neuromuscular junction-on-a-chip platform as a tool for botulinum toxin potency testing and medical countermeasure development	LOI - Letter of Intent -- Reviewable	Ananda Devices
DDT-IST-000057	Quantitative assessment for clinical drug-drug interaction (DDI) risk of new chemical entities (NCEs) using human liver chip	LOI - Letter of Intent -- Reviewable	Javelin Biotech, Inc.
DDT-IST-000061	AI-Driven Digital Cardiac Model for Prediction of Drug-Induced Cardiotoxicity	LOI - Letter of Intent -- Reviewable	Absentia Labs, Inc.

2. ISTAND NAM Project의 실패 원인과 분석: DDT-IST-000041

2-1) DDT-IST-000041의 LOI 접수와 FDA 판단

- 웹사이트처럼 DDT-IST-000041은 **약물-유도 간 손상(DILI) 평가를 위한 체외 대량처리량 3차원 1차-인간 세포배양 구상체 모델**로 원제목은 **An in-vitro, high throughput, 3D primary human spheroid model to assess Drug Induced Liver Injury (DILI)**임. LOI는 2025년 5월 13일에 제출되었으며 2025년 5월 19일에 FDA로부터 초기 검토 가능하다는 접수가 되었음. 그러나 2025년 11월 05일 검토 의견을 근거로 CDER ISTAND 프로그램에 대한 LOI 접수 불가로 결정되었음.

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION				
Home	Food	Drugs	Medical Devices	Radiation-Emitting Products
				Vaccines, Blood & Biologics
				Animal & Veterinary

DDT-IST-000041, An in-vitro, high throughput, 3D primary human spheroid model to assess Drug Induced Liver Injury (DILI)

> ISTAND

> Context of Use

▼ Documents and Dates

Iteration Number	Stage	Document Type	FDA Determination	Date
1	LOI - Letter of Intent	LOI Determination Letter	Not Accept	2025-11-05
1	LOI - Letter of Intent	LOI Reviewability Status Memo	Reviewable	2025-05-19
1	LOI - Letter of Intent	LOI Submission		2025-05-13

2-2) DDT-IST-000041의 LOI 내용

● Letter of Intent: Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs (ISTAND) : Pilot Program

- Title:** An in-vitro, high throughput, 3D primary human spheroid model to assess Drug Induced Liver Injury (DILI)

● Requesting Organization

- Organization Name:** InSphero AG, Wagistrasse 27A, 8952 Schlieren, Switzerland

a) Primary Point of Contact: Madhu Nag, Chief Scientific Officer,
madhu.nag@insphero.com

b) Alternative Point of Contact: Bruno Filippi, VP Liver Safety,
bruno.filippi@insphero.com

Drug Development Need Statement(신약 개발 필요성 진술서)

- 약물 유발성 간 손상(DILI)은 여전히 중대한 과제로, 안전성 관련 임상시험 실패의 약 13%, 시판 후 약물 회수의 21%를 차지함. 전임상 시험의 발전에도 불구하고, 기존 방법들은 임상적으로 관련 있는 간독성을 예측에 실패하고 있음.

- 인스페로의 1차 인간 간 스페로이드/미세조직(hLiMT, primary human liver

spheroids/microtissues)은 다용도적이고 민감하며 생리학적으로 관련성 높은 체외 플랫폼을 제공함. 이 실질 및 비실질 1차 간 세포의 공동 배양체는 대규모로 재현성 있게 제조될 수 있으며, 96- 및 384-웰 플레이트 형식으로 최대 35일까지 배양 가능함. 이는 일상적 사용, 장기 치료 및 국제 운송에 이상적임. hLiMT는 과학적 동료 검토 문헌에서 광범위하게 인용됨.

- 최근 FDA 승인 약물 152종을 대상으로 한 연구에서 hLiMT는 **간독성 우려 약물을 72%의 민감도와 89%의 특이도로 정확히 식별하였음**. 특히 이 모델은 이후 간독성으로 인해 시판이 중단된 10개 약물 중 8개를 스크린을 통해 독성 예측력을 입증하였음. hLiMT는 이미 다수의 중소 및 국제 제약 개발사들이 초기 발견 단계에서 세포 독성을 선별하고, 조건부 처리 및 전사체 분석과 같은 기법을 활용하여 개발 과정 중 선도 화합물을 평가하는 데 채택하고 있음. hLiMTs는 간 독성을 더 빠르고 정확하게 탐지함으로써 약물 개발의 중요한 공백을 메우고, 안전성 평가를 개선하며 궁극적으로 환자 치료 결과를 향상시킴.

ISTAND Applicability Statement (적용성 진술서)

- InSphero의 인간 간 미세조직(hLiMT) 플랫폼은 FDA의 ISTAND 시범 프로그램 하에서 특히 약물 개발 도구(DDT)로 자격을 부여받기 위해 제안되었음. 이 플랫폼은 비간질성 간 세포와 공동 배양된 1차 인간 간세포로 구성된 생리학적으로 관련성 있는 3차원 세포 배양 구상체를 특징으로 함. 세포주 및 1차 간세포의 평면 배양과 달리, hLiMT는 최대 35일 동안 알부민 분비 및 약물 대사 등 간 특이적 핵심 기능을 유지하여 생체 내 인간 간 생리학을 근접하게 모사하고 장기적 반복 치료를 가능하게 함.
- hLiMT 플랫폼은 소분자 치료제의 고효율 전임상 스크리닝을 위해 특별히 설계되어, 약물 개발 초기 단계에서 잠재적 간독성 위험을 예측함. 최근 FDA 승인 약물 152종을 활용한 검증 결과, "vMost-DILI-concern"으로 분류된 화합물 식별에 대해 높은 민감도(72%)와 특이도(89%)를 보여주었으며, 이는 세포주 및 1차 인간 간세포의 평면 배양을 이용한 분석법을 크게 능가하는 수치임. 본 모델의 예측 성능은 엄격한 5중 교차 검증(5-fold cross-validation)을 통해 확인되었으며, 이는 다수의 간세포 기증자 로트에 걸쳐 재현성과 견고성을 입증함.
- 정확하고 고처리량이며 확장 가능한 간독성 예측 능력을 갖춘 이 도구는 임상 결과 평가나 바이오마커 검증과 명확히 구분되는 독보적인 신약개발도구(DDT)로 자리매김함. 이는 결과 생성 보고서나 임상 상태를 나타내는 생리학적 바이오마커가 아니기 때문임. 이 도구의 적용은 동물 모델 의존도를 낮추고 간독성으로 인한 후기 임상시험 실패를 완화함으로써 약물 안전성 평가에 상당한 이점을 제공하며, 이는 FDA의 목표인 약물 개발 효율성 향상 및 환자 안전 증진과 직접적으로 부합함.

Context of Use Statement(사용 맥락 진술서)

- 이 도구는 정확하고 대량 처리 가능하며 확장 가능한 간독성 예측 능력을 바탕으로 독보적인 신약개발도구(DDT, drug development tool)로 자리매김하며, 결과 생성 보고서나 임상 상태를 나타내는 생리적 바이오마커가 아닌 점에서 임상 결과 평가나 바이오마커 검증과 명확히 구분됨. 이 도구의 적용은 동물모델에 대한 의존도를 줄이고 간독성으로 인한 후기 임상시험 실패를 완화함으로써 약물 안전성 평가에 상당한 이점을 제공하며, 이는 FDA의 목표인 약물 개발 효율성 향상 및 환자 안전 증진과 직접적으로 부합함.
- 인스페로의 인간 간 미세조직(hLiMT) 플랫폼은 소분자 치료제의 전임상 간독성 위험 평가를 용이하게 하는 약물 개발 도구(DDT)로 제안됨. hLiMT 플랫폼은 비간질 간세포와 공배양된 1차 인간 간세포로 구성된 생리학적으로 관련성 있는 3차원 스페로이드로 이루어짐. 이 미세조직은 약물 대사, 알부민 분비, 간 수송체 발현 등 중요한 간 특이적 기능을 배양 환경에서 최대 35일간 유지함. 고효율 스크리닝을 위해 특별히 설계된 이 시스템은 치료 후보물질 노출 후 **ATP 함량 변화**를 측정하여 세포독성 영향을 평가함.
- 사용 배경은 FDA 승인 약물의 광범위한 테스트에서 도출된 **C2C(Cytotoxicity to-Cmax)** 비율을 활용하여 잠재적 간독성을 조기에 식별하는 것임. 입증된 민감도와 특이도를 바탕으로 hLiMT 플랫폼은 기존 2차원 세포 배양 분석법을 크게 능가하여 간독성 용량과 안전한 용량을 보다 정확하게 구분함. 다양한 간세포 기증자 배치와 실험 실행 간에 보여주는 강력한 재현성은 예측 모델로서의 신뢰성을 더욱 부각시킴. 이 플랫폼을 약물 개발 초기 단계에 도입함으로써 기업들은 예측 정확도를 높이고, 간 손상과 관련된 후기 임상시험 실패를 최소화하며, 궁극적으로 환자 안전을 개선하고 규제 승인 절차를 간소화할 수 있음.

Drug Development Use (약물 개발 활용)

- 현재 약물 후보물질의 간독성 잠재력을 평가하는 패러다임(Figure 0)은 간 세포주 또는 1차 간세포의 평면 배양을 이용한 초기 스크리닝으로 시작되며, 이후 설치류 및 비설치류 종에서 확인을 위한 생체 내 시험을 진행함. 이후 컴퓨터 시뮬레이션과 생체 내 동물 데이터를 기반으로 한 약동학(PK) 및 약력학(PD) 모델링을 통해 최대권장시작임상용량(MRSD, Maximum recommended starting dose)을 결정함. 그러나 평면 세포 배양과 동물 모델 모두 인간 간독성 반응에 대한 예측 정확도가 낮은 등 상당한 한계가 있음. 이는 종종 임상 적용 실패로 이어지며, 임상 시험 중 간독성으로 인한 높은 약물 탈락률의 원인이 됨.
- IStand 인증 hLiMT를 활용한 새로운 패러다임을 제안함. 이는 임상 시험 전 단계에서 확장 가능하고 고처리량이며 인간 관련성을 지닌 체외 도구를 제공함으로써 이러한 한계를 해결함. 화합물 합성 시, 세포독성-Cmax(C2C) 비율은 확립된 in silico PK/PD 모델과 결합된 hLiMTs에서의 세포독성 측정을 통해 결정되며, 이후 설치류 및 비설치류 종에서 **확인적 in vivo 시험이 수행됨**. 그런 다음 컴퓨터 시뮬레이션과 생체 내 동물 데이터를 모두 통합한 개선된 PK/PD 모델링을 hLiMTs의 세포 독성 측정과 결합하여 **정밀한 C2C 비율을 계산하고, 이를 사용하여 최대 권장 시작 용량(MRSD)을 결정함**.

- 이 새롭게 제안된 패러다임은 기존 패러다임 대비 네 가지 이점을 제공함.
1. hLiMT의 생리학적 관련성은 후속 동물 실험을 위한 인간 안전성 프로파일이 개선된 약물 후보물질 선별로 이어져, 결국 인간에게 간독성을 보일 화합물 시험에 사용되는 동물 수를 감소시킴.
 2. hLiMT의 생리학적 관련성은 MRSD 결정 정확도 향상을 통해 임상 현장에서의 간 관련 이상반응 발생률을 감소시킴.
 3. hLiMT의 생리학적 관련성은 현재 불리한 안전성 프로파일을 가진 약물 후보물질에 대한 신뢰도를 높일 것임. 간독성 위험이 높고 효능을 위해 더 높은 치료 용량이 필요한 물리 화학적 특성을 가진 물질이라도 C2C 비율이 충분히 높다면 가능함. 이는 신약 개발을 위한 새로운 화학적 공간을 확대하고 불리한 PK/PD 프로파일로 인해 잠재적으로 가치 있는 약물 후보물질이 조기에 중단되는 것을 방지할 수 있음.
 4. 초기 PK/PD 컴퓨터 모델링 이후 동물 실험을 수행함으로써, 보다 정교한 생체 내 실험 프로토콜을 가능하게 하고 사용되는 동물 수를 줄일 수 있을 것임.

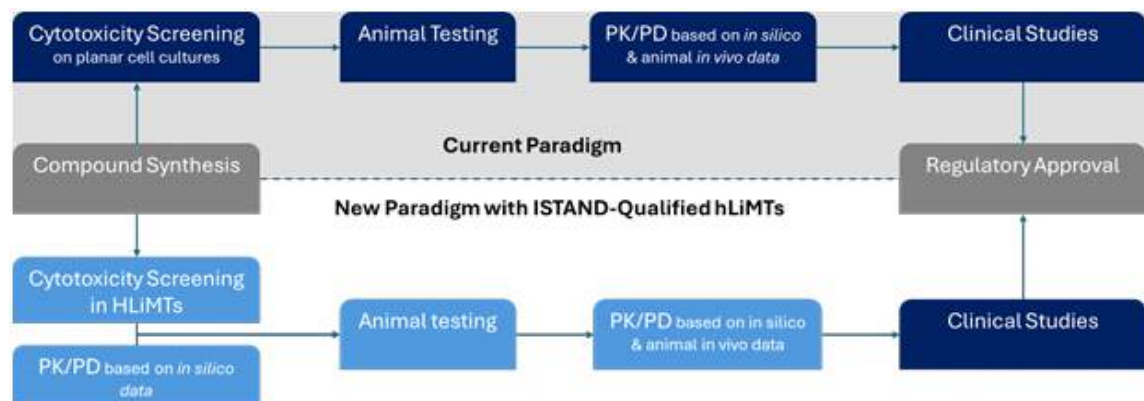


Figure 0: Current hepatotoxicity assessment paradigm and proposed ISTAND-Qualified hLiMTs alternative (현재 간독성 평가 패러다임과 제안된 ISTAND 인증 hLiMTs 대안)

Technical Description (기술적 설명): General description of the Human Liver Microtissues technology (인간 간 미세조직 기술에 대한 일반적 설명)

- 인간 간 미세조직(hLiMTs)은 신뢰할 수 있는 상업적 공급업체로부터 공급받은 냉동 보존된 1차 인간 간 세포를 사용하여 대규모로 안정적으로 제조됨. 이 세포들은 이식에 부적합하다고 판단된 기증자 간에서 분리도미(Messner 등, 2013). hLiMT는 InSphero가 재현성 있고 균일한 구상체 생산 및 수동 피펫 또는 완전 자동화 액체 처리기를 사용한 편리하고 견고한 취급을 위해 특별히 개발한 Akura™ 96- 및 384-스페로이드 마이크로플레이트에서 제조, 배양 및 분석됨. Akura™ 스페로이드 마이크로플레이트의 웰은 "SureXchange" 레지가 적용된 테이퍼형 디자인으로, 일상적인 세포 배양 작업 중 세포

스페로이드 흡입 또는 손실 위험을 최소화함. Akura™ 스페로이드 마이크로플레이트의 세포 반발성 표면은 스캐폴드 없이도 응집이 가능하며, 장기적인 스페로이드 형태 및 기능을 유지함. 평평한 바닥과 1mm 직경은 웰 내 세포 구형체의 신속한 위치 확인과 고해상도 공초점 이미징을 가능하게 함[Figure 1].

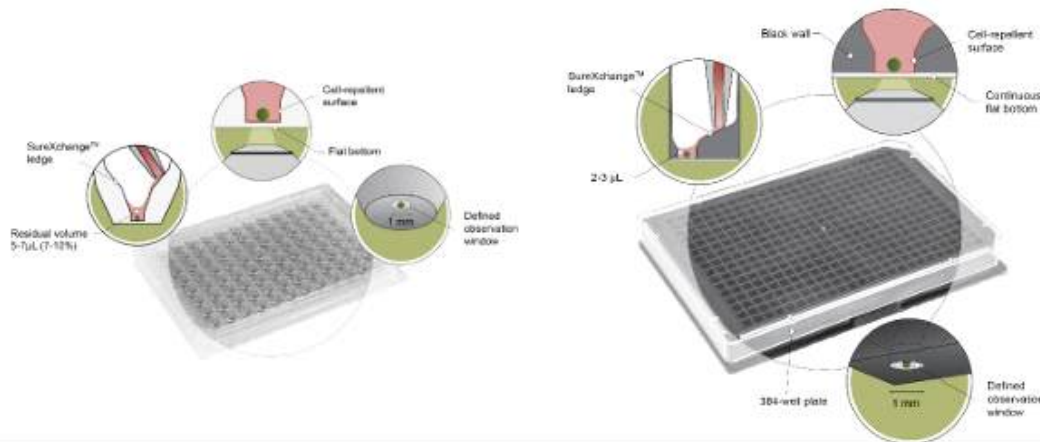
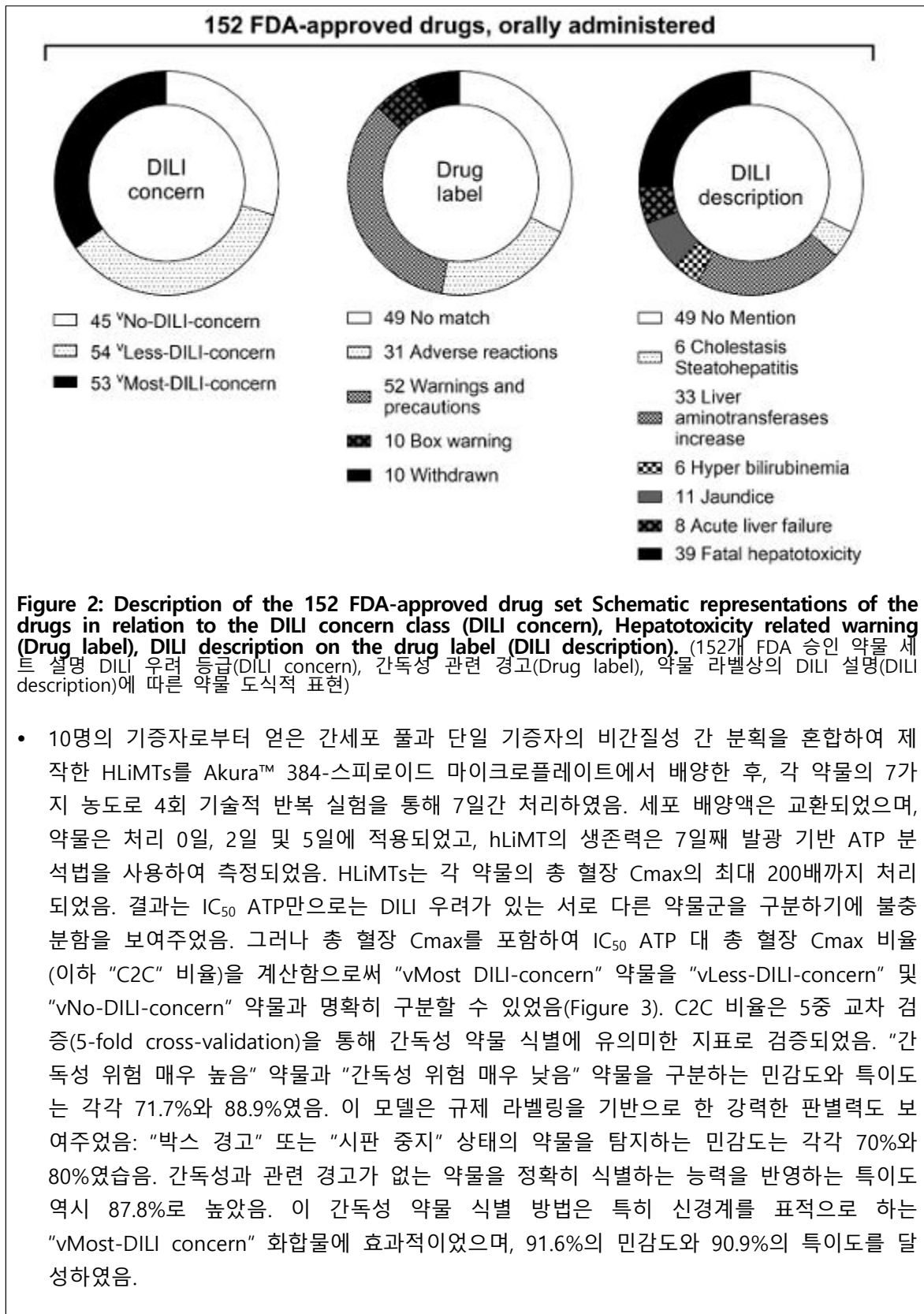


Figure 1: Akura™ 96 & 384 Spheroid Microplates

- 각 hLiMT는 약 2,000개의 간세포를 포함하며, 직경 약 200µm로 간세포, 쿠퍼 세포, 간 내피 세포 등 다양한 간 세포 유형으로 구성됨(Messner 등, 2013; Messner 등, 2018). HLiMT는 배양 35일 동안 안정적인 생존율과 알부민 분비를 보이며, 담관 소관을 형성하고 리포폴리사카라이드(LPS) 처리 시 IL-6 분비를 반응함. HLiMT는 특정 조건에 의해 유도될 수 있는 1상, 2상 및 3상 대사 관련 유전자를 안정적으로 발현하며 유기 화합물을 대사함(Messner 등, 2018).

Realized uses in drug development (신약 개발에서의 활용 사례)

- hLiMT의 안정적인 생존력과 지속적 간 기능은 시험 물질의 잠재적 간독성을 평가하기 위한 장기적 처리 가능성을 제공하며, 이는 1차 인간 간세포의 평면 배양보다 높은 민감도를 보임(Proctor 등, 2018). 세포독성 스크리닝을 넘어, hLiMT의 표준화, 확장성 및 생리학적 특성은 더 복잡한 독성학적 연구를 위한 유용한 체외 도구로 활용될 수 있음. 예를 들어, per- 및 poly-플루오로알킬 물질(PFAS)이 간에 미치는 영향 연구(Addicks 등, 2023; Rowan-Carroll 등, 2025; Reardon 등, 2021), 전임상 중에서 발견된 결과를 연구하고 인간에 대한 관련성을 평가(Bajaj 등, 2025), 또는 약물 및 후보 약물의 임상적 부작용 연구(Shinozawa 등, 2025; Bruderer 등, 2015; Subbiah 등, 2023; Paech 등, 2017) 등이 있음.
- 최근 연구(Fäs 등, 2025)에서는 경구 투여되는 저분자량 유기 약물의 임상적 간독성 평가에 hLiMT의 효과성을 평가하였음. FDA 승인 경구 투여 소분자 약물 152종을 선정하였음. 시험 약물 선정은 간 손상 유발 가능성에 따라 균형 있게 이루어졌으며, 45개 약물은 "간독성 우려 없음(vNo-DILI-concern)", 54개 약물은 "간독성 우려 낮음(vLess-DILI-concern)", 53개 약물은 "간독성 우려 높음(vMost-DILI-concern)"으로 분류되었음(Figure 2).



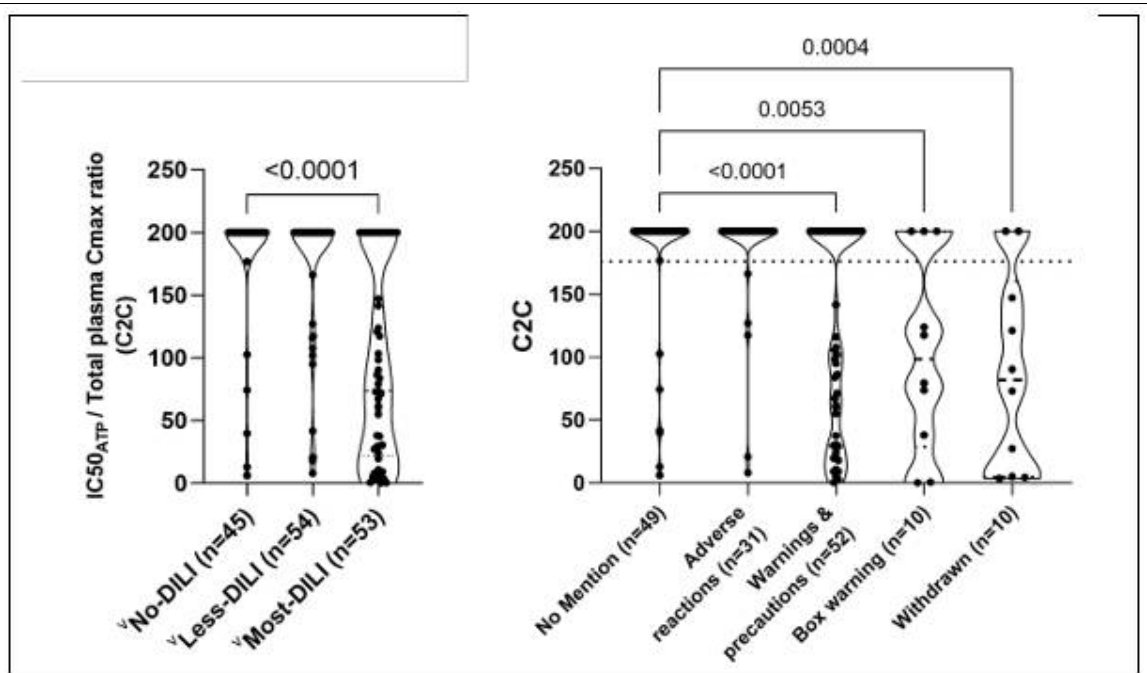
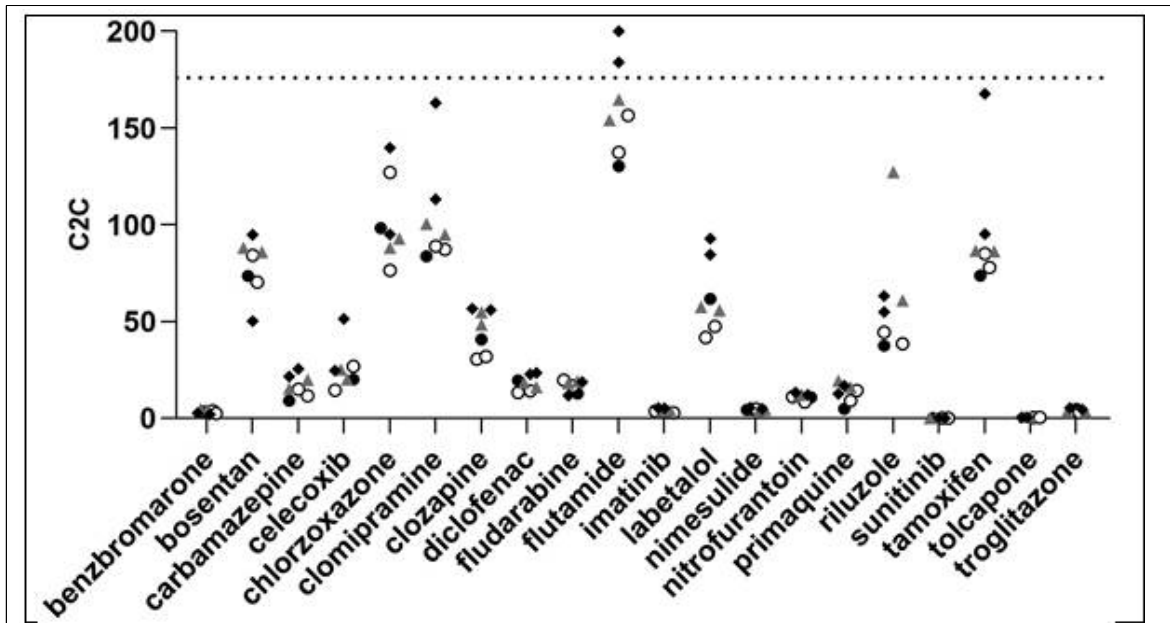


Figure 3: C2C ratio in relationship with clinical hepatotoxicity. (Left panel) C2C ratio of 152 FDA-approved drugs plotted against their DILI concern class. (Right panel) C2C ratio of 152 FDA-approved drugs plotted against their hepatotoxicity safety warning. Statistical differences between groups using Dunn's multiple comparisons tests are denoted, along with their p-values. A dotted line is drawn at C2C = 176. (임상적 간독성과의 관계에서 C2C 비율. (좌측 패널) 152개 FDA 승인 약물의 C2C 비율을 DILI 우려 등급에 대해 플롯한 그래프. (우측 패널) 152개 FDA 승인 약물의 C2C 비율을 간독성 안전성 경고에 대해 플롯한 그래프. Dunn의 다중 비교 검정을 사용한 그룹 간 통계적 차이는 p-값과 함께 표시됨. **점선은 C2C = 176 지점에 표시됨**)

- 1차 세포 배치 간 재현성은 10명의 기증자로 구성된 간세포 풀을 서로 다른 세 가지 조합으로 제조한 hLiMT에서 20개 약물 하위 집합을 테스트하고, 단일 기증자의 비간질성 간 분획과 공동 배양하여 평가했음. 결과는 20개 약물 중 19개에 대해 모든 세포 배치에서 일관되었음. 한 가지 예외는 플루타미드였는데, 한 세포 배치에서는 음성으로 나타났지만 다른 두 배치에서는 양성으로 나타났음(Figure 4).
- 실험 실행 간 재현성은 10명의 기증자로 구성된 간세포 풀과 단일 기증자의 비간질성 간 분획을 공동 배양한 세 가지 다른 조합 각각에서 20개 약물 하위 집합을 두 번 독립적으로 테스트하여 평가했음. 각 세포 배치에 대해 모든 실험 실행 간 결과가 일관되었음(Figure 4).



<Figure 4> Reproducibility across experimental run and hepatocyte lot. C2C ratios of 20 FDA-approved drugs measured twice in hLiMTs made with 3 different 10 donor hepatocyte lots: Lot IPHH_32 (open circles), lot IPHH_24 (black diamond), and lot IPHH_18 (gray triangle). The initial measurements made in lot IPHH_32 are depicted as full black circles. A dotted line is drawn at C2C = 176. (실험 실행 및 간세포 배치 간 재현성. 3가지 다른 10기증자 간세포 배치(배치 IPHH 32: 빈 원, 배치 IPHH 24: 검정 마름모, 배치 IPHH 18: 회색 삼각형)로 제작된 hLiMT에서 2회 측정된 20개 FDA 승인 약물의 C2C 비율. IPHH_32 로트에서 수행된 초기 측정값은 검은색 원으로 표시되었음. 점선은 C2C = 176 지점에 그렸음)

Previous Regulatory Interactions

- With respect to this particular submission, we have not had any contact with regulators at either the US FDA or any Ex-US regulatory bodies.

3. DDT-IST-000041의 FDA 접수 거부 결정문과 이유에 대한 AITOX의 평가

3-1) FDA 접수 거부 서신

- 다음은 FDA가 Appendix section에 서술된 내용의 이유로 **DDT-IST-000041에 대한 LOI를 접수 거절한 서신**임.

• Drug development Letter of intent(DDT-IST-000041) – FDA’s Determination letter
<ul style="list-style-type: none"> • FDA has completed its review of the Letter of Intent (LOI) for Drug Development Tool (DDT), DDT-IST-000041, received on May 13, 2025, by the CDER Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs (ISTAND) Program, submitted under section 507 of the Federal Food, Drug, and Cosmetic (FD&C) Act.1 • The LOI is for “An in vitro, high throughput, 3D primary human spheroid model to assess Drug Induced Liver Injury (DILI),” with proposed Context of Use (COU) as a Drug Development Tool (DDT) to facilitate preclinical hepatotoxicity risk assessment of small molecule therapeutics. • The FDA has made a determination to not accept the LOI into the CDER ISTAND Program based on the review comments provided in the Appendix section of this letter. (FDA는 본 서신의 부록 섹션에 제시된 검토 의견을 근거로, 해당 LOI를 CDER ISTAND 프로그램에 접수하지 않기로 결정) • As stated in section 507(a)(2)(B) of the FD&C Act, an LOI submission may not be accepted based upon several factors, including scientific merit. A not accept determination is not a final determination for a DDT and its context of use. • The primary utility of this tool is as a preclinical screening tool and does not meet a regulatory need for the FDA as specified in the context of use (COU). As such, your tool does not address a specified drug development need that fits within our regulatory framework and may be more suitable for internal decision-making by interested sponsors. • Should you choose to resubmit, FDA has provided you with comments and recommendations in the Appendix to help improve an amended LOI. Fully address each of the relevant comments, recommendations, and any data requests in your resubmission and in a separate addendum to your LOI resubmission, referencing the numbered list. (재제출을 선택하는 경우, FDA는 수정된 LOI 개선을 돕기 위해 부록에 의견 및 권고사항을 제공하였음. 재제출 시 관련 의견, 권고사항 및 모든 데이터 요청 사항을 번호가 매겨진 목록을 참조하여 LOI 재제출 문서와 별도의 부록에 각각 충분히 반영 하길 바람)

3-2) FDA의 접수 거부 이유에 대한 Appendix section 내용

FDA's COMMENTS AND RECOMMENDATIONS
<p>Context of Use Considerations:</p> <p>1. 제출된 도구는 선도물질 최적화 과정에서 간독성 가능성을 평가하기 위한 전임상 스크리닝 도구로 규정되었음. FDA는 신약 개발 전략을 규제하지 않으며, 제안된 사용 맥락은 규제 의사 결정 과정에 직접 적용될 수 없음. 본 도구가 신약 개발 초기 단계에서 내부적인 진행/중단 결정에 도움이 될 수 있음을 인정하나, 이러한 사용은 FDA 규제 권한 범위를 벗어남. ISTAND 프로그램의 적격성 자격을 얻기 위한 약물 개발 도구는 규제 결정을 내리기 위한 규제 제출 과정에서 도구가 어떻게 사용될지 설명하는 사용 맥락을 제공해야 함. 특정 약물 개발사와 협력하여 귀하의 도구를 그들의 약물 개발 과정에 통합하거나, 이 도구 사용이 FDA 의사 결정에 관련성 있는 데이터를 생성할 수 있는 대체 사용 맥락을 식별할 것을 권장함.</p> <p>Pharmacology/Toxicology Considerations (약리학/독성학 고려 사항)</p> <ul style="list-style-type: none"> FDA는 귀사의 기술 플랫폼의 과학적 가치를 인정하나, 현재 사용 맥락은 직접적인 규제 적용성이 부족함. ISTAND 프로그램 자격 심사팀의 평가를 거쳐, 귀사의 제출물에 대한 규제 관련 사용 맥락을 수립하기 위해 ISTAND 범위 내에 포함될 수 있는 잠재적 시나리오 예시로 다음을 제안함. <p>1. De-risking Clinical Hepatotoxicity Signals(임상 간독성 신호 위험 완화): 임상 바이오마커가 잠재적 간 손상을 시사할 때 간독성 우려를 완화하는 도구로 플랫폼을 활용할 수 있음. 예를 들어, 임상 연구에서 알려진 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 또는 기타 간 손상 지표가 상승하고 전임상 동물 데이터가 부정적인 경우, 해당 분석법은 임상 시험 관리 결정에 필요한 추가적인 기전 정보를 제공할 수 있음.</p> <p>2. Disease-State Hepatotoxicity Assessment(질환 상태 간독성 평가): 기저 간 병리를 가진 대상 환자 집단을 더 잘 반영하는 질환 특이적 세포 모델을 통해 플랫폼의 유용성을 높일 수 있음. 예를 들어, 대사 기능 장애 관련 지방간염(MASH), 간경변증 또는 기타 간 병리를 가진 기증자로부터 유래한 간세포를 활용하면 임상적으로 관련성 있는 질환 환경에서 약물 효과를 평가할 수 있음. 이러한 질환 상태 모델은 적절히 검증될 경우, 해당 집단에서의 용량 최적화, 효능 평가 및 대사산물 안전성 평가에 정보를 제공하여 간 기능 저하 시 치료 지수에 관한 중요한 규제적 의문점을 해결할 수 있음. 따라서 정상 및 질환 간세포를 사용한 시험 약물의 효과 비교는 잠재적 DILI 우려 회피나 환자 모니터링 필요성 증가 방지 등 임상 시험에서의 용량 확립에 도움이 될 수 있음.</p> <p>3. Cross-Species Mechanistic Investigation(종간 기전 연구): 비교 가능한 동물-인간 구형체 시스템 개발은 전임상 연구와 임상 연구 간 상충되는 결과를 해결할 수 있음. 예를 들어, 초기 임상 연구에서 일부 피험자에게 간독성이 관찰될 경우, 병행된 동물 및 인간 세포 모델을</p>

통해 종 특이적 독성 기전을 규명하고 위험 평가 전략을 수립할 수 있음. 이 접근법은 특히 동물 연구에서 양성 결과가 나타날 때 그 인간 관련성을 이해하고, 전임상 안전성 신호가 임상적 맥락을 필요로 할 때 규제 의사결정을 지원하는 데 유용할 것임.

- 이러한 제안들은 약물 개발 과정에서 일반적인 규제 요구사항과 부합하는 적용 사례를 보여줌. FDA는 특정 약물 개발사와 협력하여 이 플랫폼을 규제 제출물에 어떻게 통합할 수 있는지, 특히 비임상 및 임상 데이터 전체를 활용한 증거의 총합 접근법을 고려할 때 FDA 의사 결정 과정 및 규제 판단에 직접적으로 관련되는 데이터를 생성할 수 있는 맥락에 중점을 두고 식별할 것을 권장함.

4. AITOX의 의견 및 결론

4-1) Context of use의 핵심 내용

- 인간 간 미세조직(HLiMTs)는 10명의 기증자로부터 얻은 간세포 풀과 단일 기증자의 비간질성 간 분획을 혼합하여 제작된 구상체임. 3차원 구상체에서 50% ATP 합성 저해 농도인 IC₅₀ ATP와 임상의 혈장 Cmax의 비(ratio)인 cytotoxicity-to Cmax(C2C) 평가로 임상적 간독성 유무를 예측하였음.
- 신청자 Insphero의 Scientific Poster(insphero.com > wp-content > uploads)를 검색하여 아래와 같이 <Figure 3>과 같이 좀 더 상세한 설명 자료를 확인. 간독성 유무를 결정하는 C2C 임계치는 176이었음. FDA 승인 경구 투여 소분자 약물 152종을 선정하여 5 종류의 간독성 중증도에 따라 분류하여 특이도와 민감도가 확인되었음.

Result – Part 2

C2C score in relation to Hepatotoxicity related warning

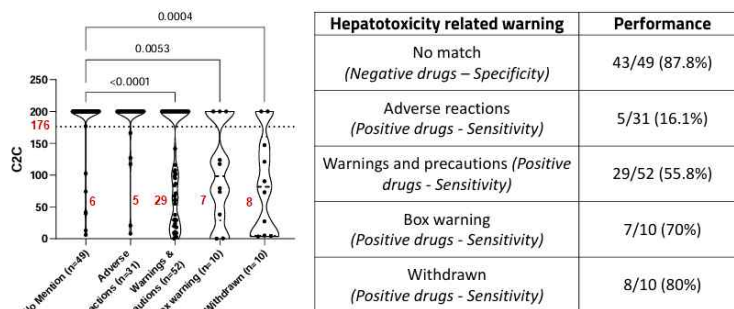


Figure 3: C2C score in relationship with drug label information
Left panel: C2C score of 152 FDA-approved drugs plotted against their hepatotoxicity safety warning (Dunn's multiple comparisons tests, p-values). Dotted line: 176. Right panel: Performance of the 176 C2C-threshold to classify drugs as positive (<176) or negative (>176). Negative drugs: number of true negative/number of drugs (% of true negative). Positive drugs: number of true positive/number of drugs (% of true positive)

(참고자료: <https://insphero.com/wp-content/uploads/2024/08/EARLYD1.pdf>)

4-2) 의견

- ISTAND는 기본적으로 비임상도구를 이용하여 인체에서의 독성과 약리의 예측 프로그램임. 만약 IND에 제출된 합성의약품 후보물질이 본 비임상 도구를 통해 간독성이 없다고 결론을 제시하면 여러분은 이를 수용할 수 있을까요?
- 사람 간세포의 3D 구상체에서 얻은 ATP 합성 50%의 합성 저해를 간독성 지표로 하여 인체의 유효성 용량으로 PK 지표인 Cmax(혈장최고농도)의 대비(ratio) 수치로 간독성 약물의 유무를 평가. In vitro/in vivo의 수치 176을 임계치로 하여 176보다 낮다는 것은 IC₅₀의 낮은 농도를 의미하여 간독성이 있다는 것을 의미함.

- 이와 같은 원리로 개발된 비임상 도구는 제한된 정보와 자료이지만 다음과 같은 문제점을 가지고 있음.

① 제출된 DDT는 인체 조직 및 인체의 Cmax를 사용하였더라도 임상시험에서 간독성 예측보다는 약물 초기의 스크리닝 수준에 적절한 플랫폼이라고 사료됨. 이와 같은 이유는 **COU**에서 제시한 **MRSD** 추정을 할 수 있는 **용량의 산술적 자료와 접근 방법이 없음**. 플랫폼의 **ISTAND** 승인을 위해서는 **정확한 COU의 제시와 여기에 일치한 과학적 정밀성에서 문제**가 있다고 사료됨.

② FDA 승인된 약물 52종을 대상으로 인체의 In vitro/in vivo에 대한 176 임계치가 설정되었음. 승인된 52종 중 간독성 유발의 가능성이 높은 항암제 등을 포함하여 다양한 약물로 구성되었다는 측면에서 176 임계치가 임상시험에서 응용되는 모든 약물에 대한 기준치가 될 수 없다는 측면에서 간독성 예측의 혼란성과 제한성.

③ 간과 hepatocyte에 의한 약물-유도 간독성 발생 기전은 약물의 친전자성 전환체에 기인하다는 점을 반영하여 플랫폼의 독성학적 이해를 기반으로 개발되었다는 설득력의 부족함.

④ 신약의 대상은 질환 치료이므로 플랫폼 개발을 위한 COU에서 특정 질병 모델을 대상으로 하는 것이 바람직하여 독성의 유무 및 중정도 등의 분류적 접근보다 산술적 접근으로 용량 설정에 초점을 두어 플랫폼 개발이 **ISTAND DDT** 승인에 더욱 도움이 될 것으로 사료됨.

4-3) <참고사항> **ISTAND 프로그램에서의 최초 적격성 승인을 받은 Michael Phelan의 경험의 참고할 필요성**

- Michael Phelan은 FDA ISTAND 프로그램에 최초로 승인된 기술인 Integral Molecular Inc.의 막 단백질체 배열(Membrane Proteome Array)의 책임자였음(Integral Molecular, 2025). 프로그램 최초 신청자로서 FDA와 정기적으로 소통하며 프로그램 구조와 기대 사항에 대한 상당한 통찰력을 얻을 수 있었다고 함. 이 모든 경험을 글로 압축할 수는 없지만, 세 가지 핵심 교훈을 제시.

① **사용 맥락(Context of Use, COU)**은 모든 제출 자료의 기초입니다. COU는 규제 당국에게 정확하고 유용해야 합니다. 모든 데이터와 실험은 COU 충족에 초점을 맞춰야 합니다.

② **투명성(Transparency)**은 절대 타협할 수 없습니다. 요약 보고서(Executive Summary)를 제외하고, QP(Qualified Plan) 및 FQP(Functional Qualified Plan)의 세부 내용은 기밀입니다. 규제 당국은 독점적 방법 및 모든 한계 사항 공개를 포함한 완전한 투명성을 기대합니다.

③ **과학적 엄밀성(Scientific rigour)**은 성공에 필수적입니다. **제출 자료는 임상의, 약리학자, 독성학자, 생물통계학자, NAMs 연구 과학자를 포함한 FDA 인력에 의해 광범위하게 검토 될 것입니다.** 생물학부터 통계학에 이르기까지, 제출 자료는 철저한 검증을 견뎌낼 수 있어야 합니다.

<참고문헌>

- Messner S, Agarkova I, Moritz W, Kelm JM. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol*. 2013;87(1):209-213.
- Messner S, Fredriksson L, Lauschke VM, et al. Transcriptomic, Proteomic, and Functional Long-Term Characterization of Multicellular Three-Dimensional Human Liver Microtissues. *Appl In Vitro Toxicol*. 2018;4(1):1-12.
- Proctor WR, Foster AJ, Vogt J, et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch Toxicol*. 2017;91(8):2849-2863.
- Fäs L, Chen M, Tong W, et al. Physiological liver microtissue 384-well microplate system for preclinical hepatotoxicity assessment of therapeutic small molecule drugs. *Toxicol Sci*. 2025;203(1):79-87.
- Addicks GC, Rowan-Carroll A, Reardon AJF, et al. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in mixtures show additive effects on transcriptomic points of departure in human liver spheroids. *Toxicol Sci*. 2023;194(1):38-52. doi:10.1093/toxsci/kfad044
- Rowan-Carroll A, Meier MJ, Yauk CL, et al. Deciphering per- and polyfluoroalkyl substances mode of action: comparative gene expression analysis in human liver spheroids. *Toxicol Sci*. 2025;205(1):124-142.
- Reardon AJF, Rowan-Carroll A, Ferguson SS, et al. Potency Ranking of Per- and Polyfluoroalkyl Substances Using High-Throughput Transcriptomic Analysis of Human Liver Spheroids. *Toxicol Sci*. 2021;184(1):154-169.
- Bajaj P, Brennan RJ, Laurent S, et al. Transcriptomic analysis in liver spheroids identifies a dog-specific mechanism of hepatotoxicity for amcenestrant. *Toxicol Sci*. 2025;204(2):228-241.
- Shinozawa T, Miyamoto K, Baker KS, et al. TAK-994 mechanistic investigation into drug induced liver injury. *Toxicol Sci*. 2025;204(2):143-153.
- Bruderer R, Bernhardt OM, Gandhi T, et al. Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three dimensional liver microtissues. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(5):1400-1410.
- Subbiah V, Chawla SP, Conley AP, et al. Preclinical Characterization and Phase I Trial Results of INBRX-109, A Third-Generation, Recombinant, Humanized, Death Receptor 5 Agonist Antibody, in Chondrosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2023;29(16):2988-3003.
- Paech F, Messner S, Spickermann J, et al. Mechanisms of hepatotoxicity associated with the monocyclic antibiotic BAL30072. *Arch Toxicol*. 2017;91(11):3647-3662.

<헤럴드경제>

신약 파이프라인 세계 3위 성적표의 이면... 'K-블록버스터' 왜 안 나오나

• (최은지 님의 스토리) 10시간

[헤럴드경제=최은지 기자] 대한민국 제약·바이오 산업이 '질적 성장'이라는 냉혹한 시험대에 올랐다. 1999년 '선플라주(SK케미칼)'를 시작으로 지난 25년간 총 38개의 국산 신약을 배출하며 외형적으로는 글로벌 선도국 수준에 진입했다. 특히 2024년 기준 국내 신약 파이프라인은 3233개로 미국과 중국에 이어 세계 3위에 등극하며 영국마저 제쳤다.

하지만 현장의 목소리는 낙관론과는 거리가 멀다. 연 매출 1조원 이상의 글로벌 블록버스터가 부재한 상황에서, 축적된 파이프라인이 실제 상업적 성공으로 이어질지는 미지수이기 때문이다. 실제로 지금까지 허가된 38개 신약 중 10개 품목은 생산 중단이나 품목허가 자진 취소 등으로 시장에서 사라졌다. 이는 한국이 신약을 '만드는' 국가를 넘어, 글로벌 시장에서 '지속 가능한 가치'를 창출하는 데 여전히 한계가 있음을 시사한다.

한국보건산업진흥원 바이오헬스정책연구센터는 '국산 신약 25년의 이정표와 블록버스터의 탄생' 보고서를 통해, 국산 신약이 글로벌 블록버스터로 도약하는 데 있어 가장 큰 걸림돌로 글로벌 빅파마와의 압도적인 '자본 격차'에서 오는 구조적 한계를 짚었다.

글로벌 신약 한 알을 개발하는 데 평균 수조 원이 투입되는 반면, 국내 신약 개발비는 평균 423억 원 수준에 머물러 있다. 이러한 자금력의 열세는 국내 기업들이 임상 후기 단계의 막대한 비용을 감당하지 못하고, 유망 후보물질을 조기에 기술 수출(L/O)하게 만드는 주요 원인이다.

이는 현장의 연구 환경마저 경직시키고 있다. 한 제약업계 대표는 "우리나라와 미국은 리소스(자본과 인력)에서 큰 차이를 보인다"며 "미국 대형 제약사는 여러 연구실을 운영해 일부만 성공해도 되지만, 한국은 제한된 자원으로 인해 한 연구실에서 반드시 성과를 내야 하는 구조"라고 지적했다. 이어 "성공할 수 있는 방향만 생각하다 보니 오히려 혁신적인 아이디어를 기업에 심기가 어려운 경향이 있다"고 현장의 고충을 털어놓았다.

전문가들은 이제 단순한 양적 확대를 넘어 정교한 '투 트랙' 대안 전략이 필요하다고 입을 모은다. 우선 대형 질환 시장에서 직접 경쟁하기보다 ① 미충족 수요가 확실한 희귀 질환을 타깃하는 '니치 버스터(Niche-buster)' 전략이다. 여기에 ADC(항체-약물접합체), 이중항체, CGT(세포·유전자 치료제) 등 기존 치료제의 한계를 극복할 수 있는 ② 차세대 '신규 모달리티(Modality)'로의 신속한 전환이 필수적이다. 보고서에 따르면 최근 국내 신약 파이프라인 중 항체 및 세포·유전자 치료제 비중이 50%에 육박하는 등 이미 기술적 변곡점은 시작됐다.

이러한 전략이 결실을 보려면 정부의 정책적 뒷받침도 패러다임이 바뀌어야 한다는 조언이 나온다. 무엇보다 기초 연구가 산업화로 이어지지 못하고 단절되는 분절 구조를 해소하기 위해 ① '임상 2상 이후의 데스밸리(Death Valley)'를 넘는 집중 지원이 시급하다.

특히 ② **규제 기관인 식약처의 역할 변화에 대한 목소리도 높다.** 보고서는 “식약처가 임상시험 진행 중 중간 단계에서 조연을 제공하는 등 단순 규제 기관을 넘어 개발 파트너로서의 역할을 강화해야 한다”고 제언했다. 심사의 문턱을 높이는 것에 그치지 않고, 글로벌 기준에 맞는 **임상 디자인**을 함께 고민하는 조력자가 되어야 한다는 뜻이다.

아울러 ③ **연구 역량과 경영 전문성을 분리해 교수는 연구에만 집중할 수 있는 전문 어드바이저 체계가 구축**돼야 한다는 목소리도 나왔다. 현장에서는 “정부가 교수 창업을 적극 추진하고 있으나, 연구와 경영을 동시에 수행하기는 어려워 실효성이 낮을 수 있다”는 우려가 제기된다. 우수한 기술이 자본 시장에서 제대로 가치를 인정받고 제품화로 이어지려면, 미국처럼 심도 있는 경영 조연을 제공할 수 있는 전문 매니지먼트 시스템 도입이 절실하다.

업계 관계자는 ④ **“디스커버리(후보물질 발굴) 단계만 달성해도 성공으로 인정하는 개념 변화**가 있어야 연구자들이 보다 과감하고 창의적인 연구를 수행할 수 있을 것”이라며 “결국 실패를 자산으로 삼는 도전적 문화와 식약처의 파트너십 같은 정교한 정책 지원이 결합될 때 비로소 세계 3위 파이프라인의 위상에 걸맞은 ‘K-블록버스터’ 탄생이 현실화될 수 있다”고 강조했다.

100. 컨설팅보고서 100회 특집 – 3가지 독성사건 이해와 첨단 신약개발의 첩경

1. 기사: 신약 파이프라인 세계 3위 성적표의 이면... 'K-블록버스터' 왜 안 나오나

- <참고기사-1>에서처럼 2026년02월10일 헤럴드경제 최은지 기자의 “신약 파이프라인 세계 3위 성적표의 이면... 'K-블록버스터' 왜 안 나오나” 기사는 신약개발에서 양적 성장은 있었지만 질적 성장은 부족하다는 점을 지적하고 전략이 결실을 보려면 정부의 **정책적 뒷받침**도 패러다임이 바뀌어야 한다는 점을 제시함

1-1) 신약 개발의 질적 성장을 위한 2가지 전략 제시

- 이와 같은 **질적 성장의 부족함**을 극복하기 위해서는 다음과 같이 **2가지 전략**을 제시함.
 - ① **미충족 수요가 확실한 희귀 질환을 타깃하는 '니치 버스터(Niche-buster)' 전략**: 여기에 ADC(항체-약물접합체), 이중항체, CGT(세포·유전자 치료제) 등의 개발을 통해 기존 치료제의 한계를 극복
 - ② **차세대 '신규 모달리티(Modality)'로의 신속한 전환이 필수적임**: 최근 국내 신약 파이프라인 중 항체 및 세포·유전자 치료제 비중이 50%에 육박하는 등 이미 기술적 변곡점은 시작되었음.

1-2) 전략 결실을 위한 정부의 정책적 뒷받침과 패러다임 변화의 필요성 제시

- ① '임상 2상 이후의 데스밸리(Death Valley)'를 넘는 집중 지원
- ② 규제 기관인 식약처의 조력자 역할로의 변화
- ③ 연구 역량과 경영 전문성을 분리해 교수는 연구에만 집중할 수 있는 전문 어드바이저 체계가 구축
- ④ 디스커버리(후보물질 발굴) 단계만 달성해도 성공으로 인정하는 개념 변화

1-3) 의견

- 희귀 질환에 미충족 수요가 확실하다는 것은 그 만큼 개발에 상당히 어렵다는 것을 의미함. 그렇지만 유수의 거대 제약업체 역시 희귀 질환 치료제 개발에 집중하고 있다는 점도 고려해야 함. 적어도 하나의 희귀질환 당 적어도 100개 이상의 연구그룹 및 빅파마가 비임상 및 임상시험 과정에 있으며 개발에 참여하고 있다는 인식을 가지고 접근의 필요성이 있음. 이에 갑작스러운 희귀질환으로의 전환은 각각의 희귀질환별 경쟁력을 가지기 어려움.
- 미국 및 영국 등의 국가에서 신약 개발을 앞서는 이유는 오늘날 수많은 약물 모달리티의 출현 계기가 된 새로운 플랫폼 기술 개발 능력과 이의 다양한 질환에의 응용성임. 우선적으로 **신약 개발의 새로운 플랫폼 기술에 정책적 지원에 집중할 필요성**이 있음.

- 비임상연구를 통한 효능과 독성에 대한 검증이 없이 임상시험을 통한 신약 개발은 없음. 2025년 12월 미국 상원을 통과된 Modernization Act 3.0은 비임상연구의 전면적이고 빠른 변화를 위해 NAM(New approach methodology, 신규 접근법)을 강조하고 있음. 즉, Modernization Act 3.0은 비임상 안전성/독성시험에서 동물 실험을 표준이 아닌 예외로 만들 것을 목표하고 있음. 특히 미국 FDA 전략은 NAM 개발을 주도하고 이를 ICH에 이입하여 세계화 전략을 추진하여 비임상 영역도 선도 및 시장 장악의 의도가 있음(참고문장: 2025년 4월에 발표된 "Roadmap to Reducing Animal Testing in Preclinical Safety Studies" 중 Updating international guidelines is also important. FDA can propose revisions to ICH guidelines (e.g. ICH S6) to reflect NAM usage, ensuring global regulatory alignment so that companies do not face different rules in different regions. An ultimate vision could be an ICH guideline on New Approach Methodologies for Drugs and Biologics Safety Testing, which FDA can champion once enough evidence has been generated.).
- 따라서 규제기관은 ICH 가이드라인이 규제기관의 기존 가이드라인과 비매치되는 영혼없는 작업보다 미국 FDA 전략과 같이 NAM 등과 관련된 비임상연구 가이드라인 개발과 더불어 ICH 제출 및 채택되는 전략이 글로벌 신약 개발을 위해 가장 필요하고 첨단 신약개발의 인프라를 형성한다는 측면에서 가장 우선적인 정책이라는 것을 인식 및 제고할 필요성. **어려운 길이지만 지속적인 블록버스터를 위해서 출발점인 비임상연구부터 선진 수준이 되어야 함.**

<참고기사-1> 헤럴드경제: 최은지 기자 2026년02월10일

"신약 파이프라인 세계 3위 성적표의 이면... 'K-블록버스터' 왜 안 나오나"

[헤럴드경제=최은지 기자] 대한민국 제약·바이오 산업이 '질적 성장'이라는 냉혹한 시험대에 올랐다. 1999년 '신플라주(SK케미칼)'를 시작으로 지난 25년간 총 38개의 국산 신약을 배출하며 외형적으로는 글로벌 선도국 수준에 진입했다. 특히 2024년 기준 국내 신약 파이프라인은 3233개로 미국과 중국에 이어 세계 3위에 등극하며 영국마저 제쳤다.

하지만 현장의 목소리는 낙관론과는 거리가 멀다. 연 매출 1조원 이상의 글로벌 블록버스터가 부재한 상황에서, 축적된 파이프라인이 실제 상업적 성공으로 이어질지는 미지수이기 때문이다. 실제로 **지금까지 허가된 38개 신약 중 10개 품목은 생산 중단이나 품목 허가 자진 취소 등으로 시장에서 사라졌다.** 이는 한국이 신약을 '만드는' 국가를 넘어, 글로벌 시장에서 '지속 가능한 가치'를 창출하는 데 여전히 한계가 있음을 시사한다.

한국보건산업진흥원 바이오헬스정책연구센터는 '국산 신약 25년의 이정표와 블록버스터의 탄생' 보고서를 통해, **국산 신약이 글로벌 블록버스터로 도약하는 데 있어 가장 큰 걸림돌로 글로벌 빅파마와의 압도적인 '자본 격차'에서 오는 구조적 한계**를 짚었다.

글로벌 신약 한 알을 개발하는 데 평균 수조 원이 투입되는 반면, **국내 신약 개발비는 평균 423억 원 수준에 머물러 있다.** 이러한 자금력의 열세는 국내 기업들이 임상 후기 단계의 막대한 비용을 감당하지 못하고, 유망 후보물질을 조기에 기술 수출(L/O)하게 만드는 주요 원인이다.

이는 현장의 연구 환경마저 경직시키고 있다. 한 제약업계 대표는 "우리나라와 미국은 리소스(자본과 인력)에서 큰 차이를 보인다"며 "미국 대형 제약사는 여러 연구실을 운영해 일부만 성공해도 되지만, **한국은 제한된 자원으로 인해 한 연구실에서 반드시 성과를 내야 하는 구조**"라고 지적했다. 이어 "성공할 수 있는 방향만 생각하다 보니 오히려 혁신적인 아이디어를 기업에 심기가 어려운 경향이 있다"고 현장의 고충을 털어놓았다.

전문가들은 **이제 단순한 양적 확대를 넘어 정교한 '투 트랙' 대안 전략이 필요**하다고 입을 모은다. 우선 대형

질환 시장에서 직접 경쟁하기보다 ① **미충족 수요가 확실한 희귀 질환을 타깃하는 ‘니치 버스터(Niche-buster)’ 전략**이다. 여기에 ADC(항체-약물접합체), 이중항체, CGT(세포·유전자 치료제) 등 기존 치료제의 한계를 극복할 수 있는 ② **차세대 ‘신규 모달리티(Modality)’로의 신속한 전환이 필수적**이다. 보고서에 따르면 최근 국내 신약 파이프라인 중 항체 및 세포·유전자 치료제 비중이 50%에 육박하는 등 이미 기술적 변곡점은 시작됐다.

이러한 전략이 결실을 보려면 정부의 **정책적 뒷받침**도 패러다임이 바뀌어야 한다는 조언이 나온다. 무엇보다 기초 연구가 산업화로 이어지지 못하고 단절되는 분절 구조를 해소하기 위해 ③ **‘임상 2상 이후의 데스밸리(Death Valley)’를 넘는 집중 지원**이 시급하다.

특히 ② **규제 기관인 식약처의 역할 변화에 대한 목소리도 높다**. 보고서는 “식약처가 임상시험 진행 중 중간 단계에서 조연을 제공하는 등 단순 규제 기관을 넘어 개발 파트너로서의 역할을 강화해야 한다”고 제언했다. 심사의 문턱을 높이는 것에 그치지 않고, 글로벌 기준에 맞는 **임상 디자인**을 함께 고민하는 조력자가 되어야 한다는 뜻이다.

아울러 ③ **연구 역량과 경영 전문성을 분리해 교수는 연구에만 집중할 수 있는 전문 어드바이저 체계가 구축**돼야 한다는 목소리도 나왔다. 현장에서는 “정부가 교수 창업을 적극 추진하고 있으나, 연구와 경영을 동시에 수행하기는 어려워 실효성이 낮을 수 있다”는 우려가 제기된다. 우수한 기술이 자본 시장에서 제대로 가치를 인정받고 제품화로 이어지려면, 미국처럼 심도 있는 경영 조연을 제공할 수 있는 전문 매니지먼트 시스템 도입이 절실하다.

업계 관계자는 ④ **“디스커버리(후보물질 발굴) 단계만 달성해도 성공으로 인정하는 개념 변화**가 있어야 연구자들이 보다 과감하고 창의적인 연구를 수행할 수 있을 것”이라며 “결국 실패를 자산으로 삼는 도전적 문화와 식약처의 파트너십 같은 정교한 정책 지원이 결합될 때 비로소 세계 3위 파이프라인의 위상에 걸맞은 ‘K-블록버스터’ 탄생이 현실화될 수 있다”고 강조했다.

2. 독성 및 안전성 3가지 사건을 통한 3가지 독성기전 이해와 신약개발

<첫번째 사례> 탈리도마이드(Thalidomide) 사건과 독성의 약리학적 통찰로의 전환

① 사건 개요

- 탈리도마이드가 최초로 시판된 것은 1957년 서독으로, 당시 일반의약품으로 구입할 수 있음(Cuthbert, 2003; Miller, 1991). 출시 당시 탈리도마이드는 **불안**, **수면 장애**, "긴장", **입덧** 치료제로 홍보되었음(Loue 등, 2004).
- 임신 중 안전하다고 여겨졌으나, 탈리도마이드가 선천적 기형을 유발한다는 사실이 밝혀져 1961년 유럽 시장에서 퇴출되었음(Cuthbert, 2003; Miller, 1991).
- 임신 중 탈리도마이드 복용으로 심각한 피해를 입은 신생아 수는 총 10,000명 이상 약 20,000명에 달하며, 이 중 약 40%가 출생 시기에 사망하였고 나머지는 팔다리 사지가 발달의 문제가 있는 **해표상지증(phocomelia)**으로 출생하였음(Miller, 1991). 그러나 1998년 미국에서 암 치료제로 사용이 승인되었음(British national formulary, 2018).
- 탈리도마이드로 인한 선천적 기형은 많은 국가에서 의약품 규제 및 감시 체계 강화로 이어졌으며 GLP(good laboratory practice) 제도가 만들어진 계기가 되었음(Cuthbert, 2003; Baldeshwiler, 2003).

② Thalidomide: 독성을 약리학적 통찰로의 전환

- 탈리도마이드의 현대적 치료 적용을 뒷받침하는 기전과 함께 독특한 다중작용성 약리학적 프로파일(unique pleiotropic pharmacological profile)을 나타냄
- 주요 작용은 면역조절, 항염증 효과, 항혈관신생. 탈리도마이드는 종양괴사인자-알파(TNF- α) 생산 억제, T세포 및 자연살해(NK) 세포 활성 증진, 사이토카인 균형 조절을 통해 면역계를 조절(Haslett 등, 1998; Corral 등, 1999).
- 탈리도마이드는 세포 내 단백질 분해에 중요한 경로인 **세레블론(cereblon, CRBN)** 의존적 **유비퀴틴화(ubiquitination)**를 방해하며, 이는 기형 유발성과 항종양 활성 등의 독성과 약리적인 양면성 모두와 관련이 있음(Ito 등, 2010; Fischer 등, 2014).

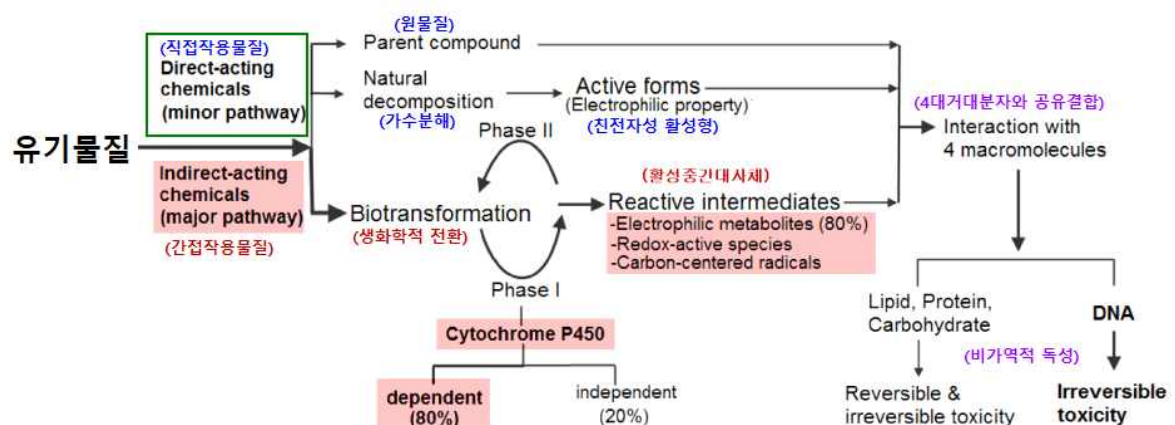
③ 탈리도마이드의 대사와 독성기전의 "Central dogma" 작성

- <참고논문-1> 논문 중 탈리도마이드는 "**비효소적 가수분해와 효소 매개 하이드록실화를 통해 생체변환(biotransformation)**"은 1994년 독성학 학위를 취득 후 독성학에 대해 새롭게 인식하게 하고 "**유기화합물의 독성기전 - "Central dogma(핵심 이론)"**"이라는 도그마를 고안하여 독성기전을 쉽게 알릴 수 있는 계기가 되었음.

<참고논문-1> Lepper ER, Smith NF, Cox MC, Scripture CD, Figg WD. **Thalidomide metabolism and hydrolysis: mechanisms and implications.** Curr Drug Metab. 2006 Aug;7(6):677-85.
Despite its controversial past, thalidomide is currently under investigation for the treatment of

several disease types, ranging from inflammatory conditions to cancer. The mechanism of action of thalidomide is complex and not yet fully understood, but there is some evidence to suggest that metabolism may play a role. Consequently, there has been a considerable effort to characterize the metabolism of thalidomide in recent years. **Thalidomide undergoes biotransformation by non-enzymatic hydrolysis and enzyme-mediated hydroxylation to form a multitude of metabolites** 탈리도마이드 Thalidomide는 비효소적 가수분해와 효소 매개 하이드록실화를 통해 생체변환을 겪으며 다수의 대사산물을 형성). **Metabolite identification and reaction phenotyping studies have been performed and will be discussed in this review in addition to interspecies differences in thalidomide metabolism.**

- 유기성 약물의 독성은 ① 생체가 대사를 통해 처리할 수 있는 용량보다 높은 과다용량 노출에 의한 과잉 약리작용, ② 원물질의 친전자성 물질(대사체)로의 전환에 기인함. ①이 독성학의 선구자 파라셀수스의 이론이지만 암을 비롯하여 대부분의 약물 및 화학물질의 원인은 ② 원물질의 친전자성 물질(대사체)로의 전환이 원인임.
- 따라서 유기성 약물의 독성은 비효소적 가수분해(자연분해) vs 효소-생체변환 (biotransformation)에 의한 친전자성 물질(대사체) 생성이 기인하고 다음과 같이 설명이 가능하며 유기화합물의 독성기전 - "Central dogma(핵심 이론)이라고 명명. 비효소적 가수분해에 의해 친전자성 물질로 전환되는 원물질을 직접작용물질 그리고 cytochrome P450과 같이 효소에 의한 biotransformation에 의한 친전자성대사체인 reactive intermediates를 생성하여 당, 단백질, 지질 그리고 단백질과 결합하여 독성을 유발하는 물질을 간접작용물질이라고 함. 이 2가지 친전자성 물질(대사체) 생성 경로에 대한 이해가 유기성 약물의 독성기전을 이해하는 독성의 기본원리를 이해하는 것임. 그래서 독성학은 이것이 기본이기에 그 어떤 학문보다 가장 쉬운 학문임.



<그림-1> 유기성 합성물질의 독성기전에 대한 Central dogma

④ 탈리도마이드의 친전자성 물질 및 대사체의 약리 기전

- 탈리도마이드가 생식·발달 독성의 원인이지만 현대적 치료 적용을 뒷받침하는 기전과 함께 독특한 **다중작용성 약리학적 프로파일**(unique pleiotropic pharmacological profile)을 나타내는 이유는 대단히 특이한 <비효소적 가수분해 vs 효소-생체변환> 등의 2가지 경로 모두를 거쳐 친전자성 물질(대사체)로 전환되기 때문임. 이와 같은 경로가 너무 복잡하여 아직 명확하게 규명되지 않았지만 <참고논문-1>의 아래 Fig.2에서처럼 독성의 2가지 경로인 비효소적 가수분해(자연분해) vs 효소-생체변환(biotransformation)에 의해 독성이 유발함. 이와 같은 경우는 대단히 특이한 약물이며 이와 같은 원인으로 탈리도마이드가 **다중작용성 약리학적 프로파일**(unique pleiotropic pharmacological profile)을 나타내는 원인임.

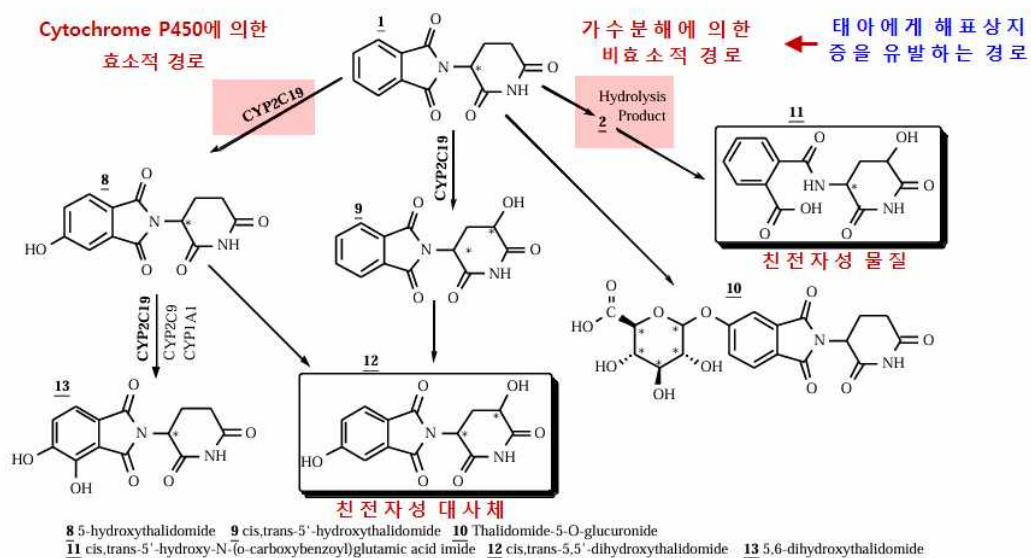


Fig. (2). Products formed by enzymatic metabolism of thalidomide. Metabolite structures that have been proposed in the literature but not yet confirmed are within a box.

⑤ 탈리도마이드에 의한 생식·발생 독성의 기전

- <그림-1>은 모체의 탈리도마이드 노출에 의해 해표상지증을 가진 유아와 성장 과정에서의 모습을 나타낸 것임.



<그림-1> 모체의 탈리도마이드 노출에 의해 해표상지증을 가진 유아와 성장 과정

- <Figure 4>에서처럼 성인과 태아의 cytochrome P450 효소의 차이를 나타낸 것임. Fig. (2)에 따르면 탈리도마이드는 CYP2C19에 의하여 친전자성 대사체로 전환되어 성인에게 독성을 유발할 수있음. 반면에 태아에서는 <그림-4>에서처럼 CYP2C19 활성이 거의 없음.
- CYP2C19가 태아에서는 활성이 없지만 Fig. 2에서처럼 가수분해에 의한 비효소적 경로를 통해 탈리도마이드가 친전자성 물질로 전환되는 것을 확인할 수 있음. 따라서 <Figure 2>에서 모체의 경구를 통해 태반에 도착한 탈리도마이드는 양수 및 태아 수분에 의해 가수분해 등의 자연분해 기전을 통해 친전자성 물질로 전환되어 태아에 독성을 유발하게 됨.

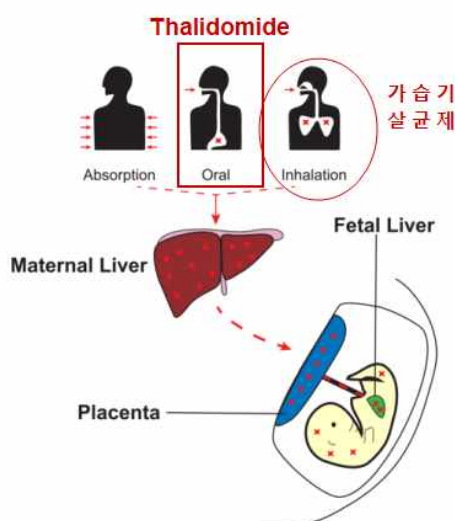


Figure 1: Routes of exposure and points of metabolism during human pregnancy.

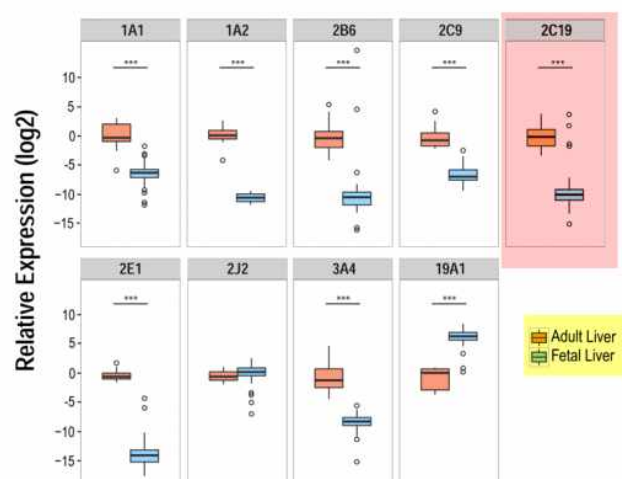


Figure 4: CYP expression in human adult livers and 2nd trimester fetal livers.

⑥ 탈리도마이드의 CYP450 대사에 의한 항암 약리기전

- Table 4는 다양한 항암제가 다양한 cytochrome P450에 의한 친전자성대사체로 전환을 통해 항암기전을 나타내는 항암지전임. 이들 물질을 이용하여 ADC(antibody-drug conjugate) 개발됨(Mittal 등, 2015). 따라서 독성기전에 대한 이해는 신약개발의 핵심 요소라는 점을 반드시 이해할 필요성 있음. 그리고 <Table 4>의 노란 부분에서처럼 탈리도마이드는 CYP2C19에 의해 친전자성 대사체로 전환되어 multiple myeloma(다발성 골수종)과 전립선암에대한 항암제로 개발됨.

Table 4 CYP450 Involved in Various Anticancer Therapies

Drug	P450 Involved	Cancer	References
Tamoxifen	CYP3A, CYP2D6, CYP1B1, CYP2C9, CYP2C19	Breast cancer	[213,214]
Cyclophosphamide	CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4	Leukemias, lymphomas, retinoblastoma, neuroblastoma	[215]
Docetaxel	CYP3A (CYP1B1)	Breast, NSCLC, prostate	[216]
Paclitaxel	CYP2C8 (CYP3A)	Ovary, breast, NSCLC, Kaposi's sarcoma	[34,217,218]
Ifosfamide	CYP3A, CYP2B6	Cervix, soft tissue sarcoma	[219,220]
Irinotecan	CYP3A	Colon, rectum	[221]
Imatinib	CYP3A	CML, GIST	[222]
Flutamide	CYP1A2	Prostate	[223,224]
Tegafur	CYP2A6, CYP2C8, CYP1A2	Colon, breast, stomach	[225]
Gefitinib	CYP3A (CYP2D6)	NSCLC	[226]
Etoposide	CYP3A4 (CYP2E1, CYP1A2)	Testicule, SCLC	[227,228]
Teniposide	CYP3A	ALL, NHL	[227,228]
Thalidomide	CYP2C19	Multiple myeloma and prostate cancer	[229]
Vincristine	CYP3A	Acute leukemia, NHL, Hodgkin's disease, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma	[230]

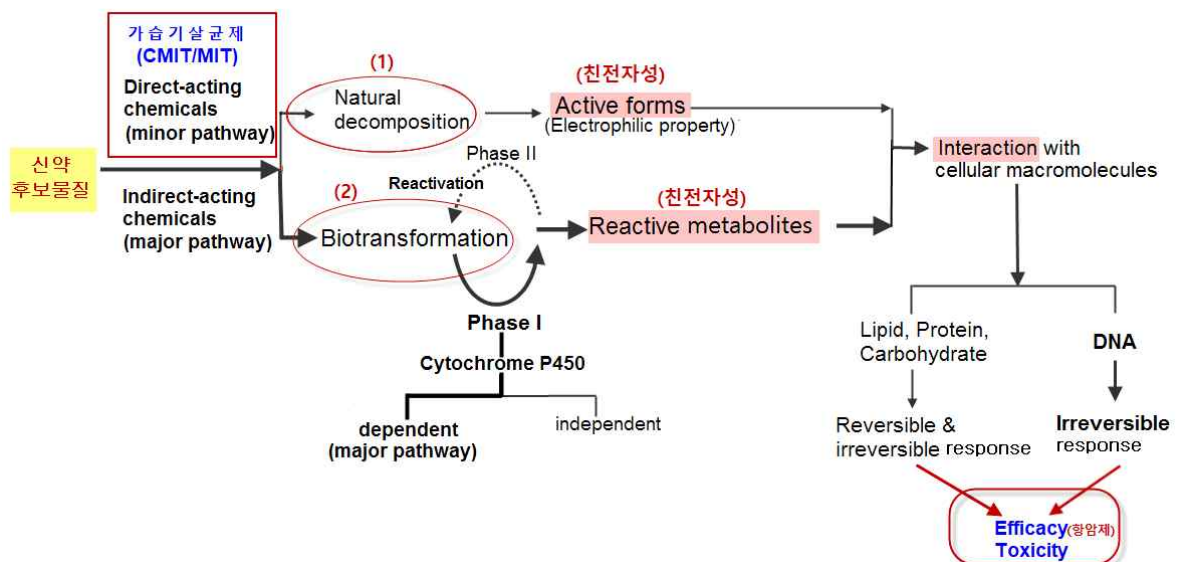
<두번째 사례> 가습기살균제 사건은 대한민국의 독성-관련 학자와 연구자 그리고 규제기관 등의 독성학 분야에서 전세계적으로 모멸적인 영원한 기록

① 가습기살균제 CMIT/MIT 노출 사건 개요

- 2011년 가습기 살균제 사건은 대한민국에서 가습기의 분무액에 포함된 가습기 살균제로 인하여 임산부와 사람들이 사망하거나 폐질환과 폐 이외 질환 등의 전신질환에 걸린 사건

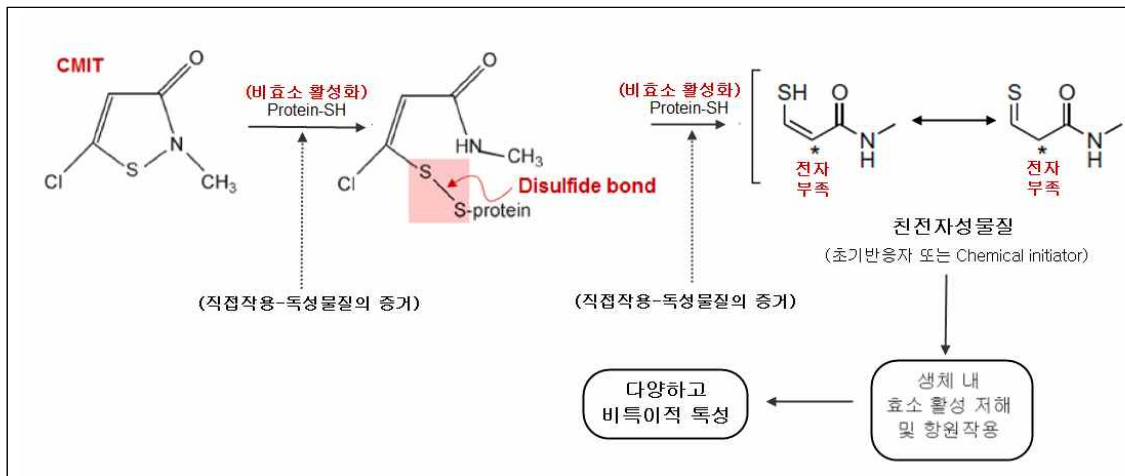
② 가습기살균제 CMIT/MIT의 독성기전

- CMIT/MIT는 <그림-1>은 유기성 합성물질의 독성기전에 대한 Central dogma와 가습기 살균제의 친전자성 물질로의 전환 경로를 나타낸 것임. 생체에 노출 되면 동물과 사람 사이 독성의 중간 차이가 없이 미생물, 동물 그리고 인체 모든 종에서 독성을 유발함(박영철, 2010).



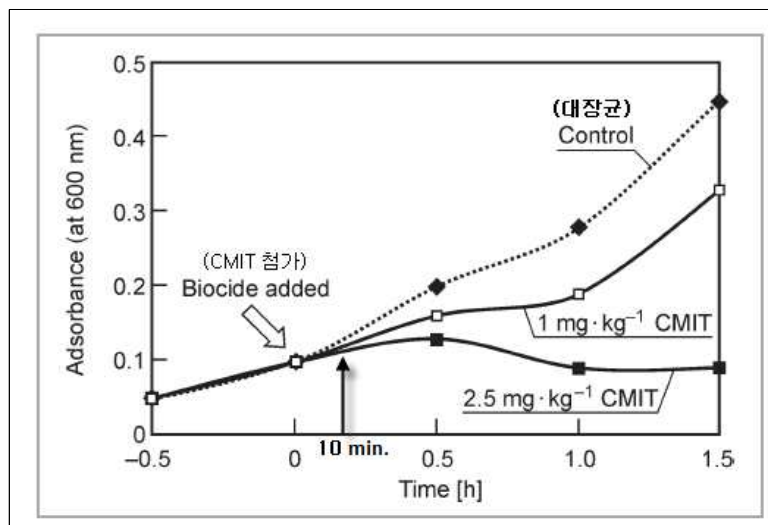
<그림-1> 유기성 합성물질의 독성기전에 대한 Central dogma와
가습기살균제의 친전자성 물질로의 전환 경로

- <그림 10-9>는 가습기살균제 CMIT는 단백질(protein)의 -SH와 반응하여 전자가 부족한 친전자성전환체로. 전환됨. CMIT의 초기반응자는 효소와 공유결합하여 효소 활성 저해 및 자가항원에 의한 면역독성을 유발함(Mutschler, 2009).



<그림 10-9> CMIT의 비효소적 활성화를 통해 독성을 유발하는 기전

- CMIT/MIT에 의한 ATP 합성저해: <그림 10-11>은 대장균(E. Coli) 배지에 CMIT/MIT를 투여 후 대장균이 10분 후부터 생장이 용량-반응 관계로 현저한 감소가 확인되었음. 살생 물제의 미생물 살균 효과를 최대한 높이기 위해 빠른 효과와 중간 차이가 없는 효과를 위해 자연분해에 의한 친전자성 물질로의 전환 기능이 필요함. 따라서 CMIT/MIT로 빠른 효과와 중간 차이가 없는 살생을 위해 친전자성 물질로의 전환됨(Williams 등, 2007).



<그림 10-11> CMIT의 대장균 배지 투여에 의한 성장곡선의 저해

③ 당시 상황과 독성 수준 파악 계기

- 화학물질 노출에 의한 발생한 집단적 질병의 발생은 그 어떤 방법보다 역학조사로 인과 관계가 끝남. 그러나 대학, 독성전문가 그리고 환경단체 등은 목적이 무엇인지 알 수 없지만 동물실험 등 다양한 연구 수행의 필요성을 제시하고 원인적 연관성에 대한 애매 모호한 태도였음. 한편으로 우리나라의 독성기전에 대해 이해가 절대 부족하다는 것을 깨달은 계기가 되었음.

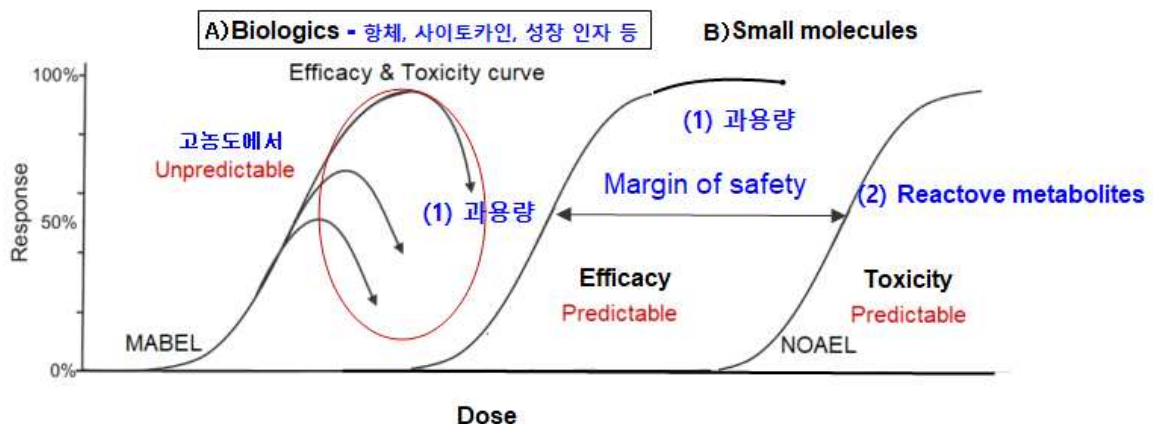
<세번째 사례> TGN1412의 단클론항체 사건

① 사건 개요

- 2006년 영국에서 백혈병 치료제인 TGN1412의 임상시험에 의한 비극을 예로 들 수 있음
TGN1412은 단일클론항체(Anti-CD28 monoclonal antibody)로 백혈구 표면의 면역계 단백질인 CD28에만 특이적 결합. 그러나 CD28은 사람에게만 존재하는 면역계 단백질임. 따라서 랫드와 NHP 동물을 이용한 독성시험에서 TGN1412의 adverse effect를 확인하기는 어려움. 결과적으로 임상시험에서 TGN1412 결합에 의한 CD28 활성화는 사이토카인(cytokine)의 과도한 분비 즉, 사이토카인 폭풍(cytokine storm)로 염증성 혈관손상과 다발성장기부전을 유도하여 혼수상태, 그리고 후에 사망이나 암도 유발됨

② 합성의약품과 바이오의약품의 독성기전의 차이를 깨닫게 한 사건

- <그림-1> 바이오의약품 중 항체, 사이토카인 성장인자 등과 합성의약품의 독성과 약리의 용량-반응관계를 나타낸 것임. 합성의약품은 과용량뿐만 아니라 친전자성대사체 생성에 의해 독성을 유발하기 때문에 약리와 독성의 용량반응곡선이 분리되었음. 반면에 바이오의약품 중 항체, 사이토카인, 그리고 성장인자 등은 약리와 독성이 하나의 용량-반응곡선에 존재함. 이에 따라 이들 물질들은 <그림-1>에서의 A)와 같이 과용량 즉, 수용체와 항체, 사이토카인, 그리고 성장인자 등의 결합이 과하게 발생하면 효능이 아니라 독성으로 전환됨. 따라서 임상안전용량인 MRSD(maximum recommended starting dose, 임상최대 권장초기용량)를 산출하는 방법에서 차이가 있음. 그러나 이들 항체, 사이토카인, 성장인자 등과 이외의 세포치료제와 유전자치료제 등과의 용량반응곡선은 또 다름(박영철, 2023)..



<그림-1> 바이오의약품 중 항체, 사이토카인 성장인자 등과 합성의약품의 독성과 약리의 용량-반응관계

③ 합성의약품과 바이오의약품(항체, 사이토카인, 성장인자 등)의 MRSD 차이점

- TGN1412 사건이 이후 바이오의약품에 대해 용량-반응관계에 대한 새로운 이해가 제시 됨. 이들 항체, 사이토카인, 성장인자 등에 대한 바이오의약품은 합성의약품에 사용해왔던 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대비독성용량) 적용이 아니라 MABEL(minimum anticipated biological effect level, 생물학적영향-최소추정용량)이라는 새로운 지표를 상용하게 됨. 즉, 이들 물질은 독성의 용량반응관계가 아니라 약리효능의 최소용량인 MABEL을 사용하여 MRSD를 추정.
- <표 8-15>는 백혈병 치료제인 TGN1412의 MRSD 추정을 위해 NOAEL과 MABEL을 사용하여 임상시험에서 실패의 원인을 용량 측면에서 확인됨. 즉 MRSD (MABEL) < MRSD (NOAEL) = 0.02 mg/kg < 3 mg/kg로 NOAEL을 이용한 MRSD이 MABEL을 이용한 MRSD보다 150배 높은 용량에 의한 독성으로 독성에 의한 임상실패로 확인됨.

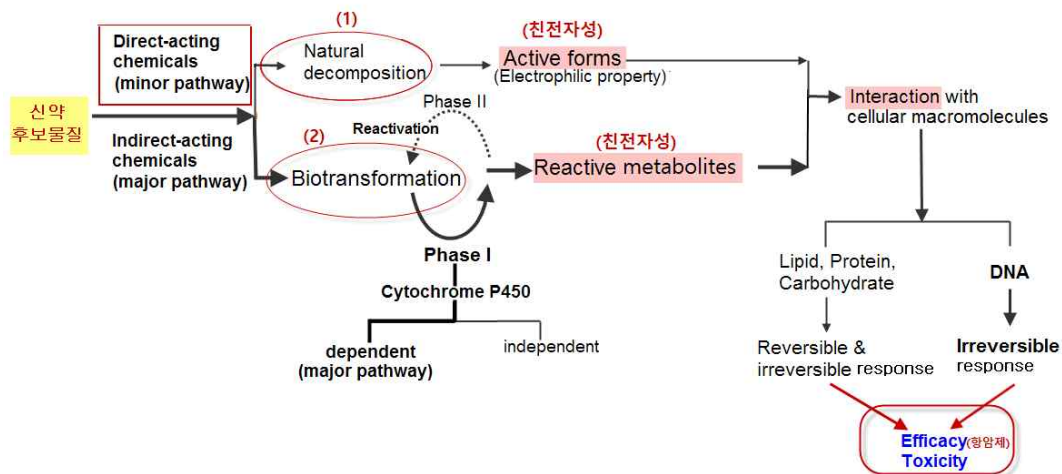
<표 8-15> 바이오의약품 TGN1412의 MRSD 산출을 위한 2가지 접근과 비교(박영철, 2019)

NOAEL을 이용한 MRSD	MABEL을 이용한 MRSD
Step 1: NOAEL	- MRSD 산출을 위한 PK/PD model 응용
(a) 원숭이: 30 mg/kg	(a) TGN1412는 단일클론 항체(monoclonal antibody)로 T-세포 고갈을 유도하는 작용제(agonist)
(b) 랫드: 100 mg/kg	
Step 2: HED (분자량이 100 kDa 이상 바이오의약품에 대한 정맥투여의 경우에 SF 및 HED가 적용되지 않음)	(b) 24시간 동안 원숭이에 있어서 표적 임파구의 10% 수용체 포화를 가져오는 용량이 0.1 mg/kg이며 이 용량이 10% 이하의 세포 최소고갈을 유도함
(a) 원숭이: 30 mg/kg	
(b) 랫드: 100 mg/kg	
Step 3: 원숭이에 대한 NOAEL 30 mg/kg을 HED로 전환을 위해 선택(높은 안전성을 위해 두 종 중 보다 낮은 NOAEL을 선택)	(c) 인체의 혈액(ex vivo)에서의 비교를 통해 원숭이 혈액(in vivo)에서 수용체 친화도 또는 RO가 5배 정도 낮음
	(d) MABEL: $(0.1 \text{ mg/kg})/5 = 0.02 \text{ mg/kg}$
Step 4: SF 10을 적용하면 MRSD = 3 mg/kg	(e) 인체 및 원숭이의 ex vivo 및 in vivo에서 RO(receptor occupancy, 수용체점유율)가 확인되어 추가적인 SF가 필요가 없음

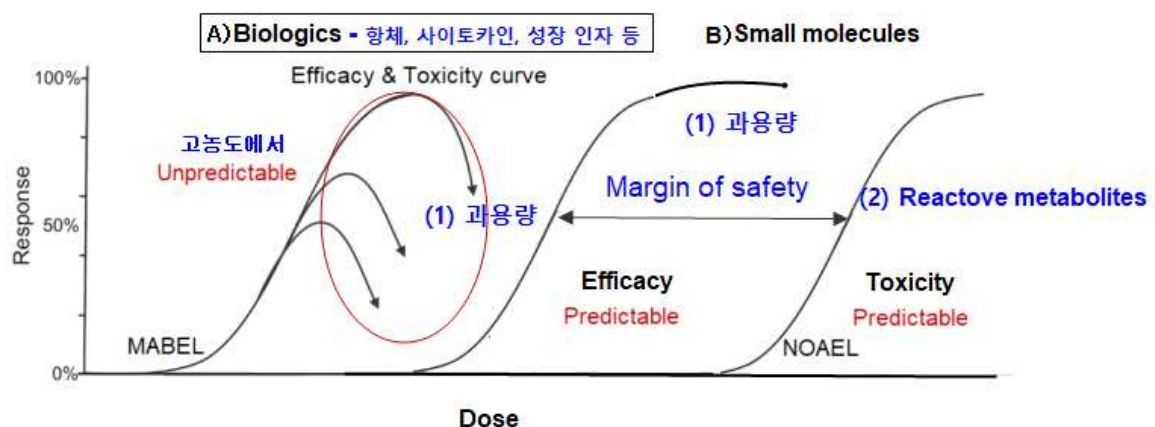
※ 결과적으로 MRSD (MABEL) < MRSD (NOAEL) = 0.02 mg/kg < 3 mg/kg로 NOAEL을 이용한 MRSD이 MABEL을 이용한 MRSD보다 150배 높은 용량. 따라서 바이오의약품은 MRSD 산출에 있어서 저분자 합성신약과의 차이가 있다는 점의 이해가 필요함.

3. 결론

- 어려운 길이지만 글로벌 블록버스터 신약을 위해서 그 출발점인 비임상연구부터 글로벌 수준에 도달할 수 있도록 현 정책 및 규제에 대한 철저한 검토와 ICH에 채택이 가능한 비임상관련 규제 연구를 위한 정책의 필요성
- 아래와 같은 독성기전의 Central dogma에 대한 이해는 가습기살균제 등의 독성학적 사건에서 원인적 연관성을 확인뿐만 아니라 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물복합체)와 같은 첨단 신약 개발에 기반이 됨. 아래 도그마만 이해하면 독성학은 너무 쉬운 학문임.



- <그림-1> 바이오의약품 중 항체, 사이토카인 성장인자 등과 합성의약품의 독성과 약리의 용량-반응관계를 나타낸 것임. 합성의약품은 과용량뿐만 아니라 친전자성 대사체 생성에 의해 독성을 유발하기 때문에 약리와 독성의 용량반응곡선이 분리되었음. 반면에 바이오의약품 중 항체, 사이토카인, 그리고 성장인자 등은 약리와 독성이 하나의 용량-반응곡선에 존재함. 이에 대한 이해는 비임상연구를 통한 성공적인 IND를 위해 큰 도움이 됨.



<그림-1> 바이오의약품 중 항체, 사이토카인 성장인자 등과 합성의약품의 독성과 약리의 용량-반응관계(박영철, 2023)

<참고문헌>

Williams TM. The mechanism of action of isothiazolone biocides. Power Plant Chemistry. 2007; 9(1):14-22의 요약:

Robinson JF, Hamilton EG, Lam J, Chen H, Woodruff TJ. Differences in cytochrome p450 enzyme expression and activity in fetal and adult tissues. Placenta. 2020 Oct;100:35-44.

Mittal B, Tulsyan S, Kumar S, Mittal RD, Agarwal G. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. Adv Clin Chem. 2015;71:77-139.

Wu L, et al. Thalidomide metabolites and clinical implications. Drug Metab Dispos. 2005;33:1666-1672.

Haslett P, et al. Thalidomide: immunomodulatory effects in disease. Br J Pharmacol. 1998;124:187-195.

Corral LG, et al. Thalidomide selectively inhibits TNF- α production by monocytes. J Exp Med. 1999;189:1159-1166.

Ito T, et al. Cereblon is a primary target of thalidomide teratogenicity. Science. 2010;327:1345-1350.

Fischer ES, et al. Thalidomide promotes degradation of Ikaros proteins through cereblon. Nature. 2014;512:49-53.

박영철 (2023). 전환기 독성시험 컨설팅. 한국학술정보(주).ISBN: 979-11-6983-817-7

박영철 (2010). 독성학의 분자-생화학적 원리, 한국학술정보(주), ISBN 978-89-268-1259-4.

박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7

101. 미국의 Tissue Chips in Space 2.0과 NAM을 위한 치밀한 사전 준비

1. 우주에서의 조직 칩 2.0(Tissue Chips in Space 2.0)의 의미와 치료제 개발

- '우주에서의 조직 칩 2.0(Tissue Chips in Space 2.0)'은 2016년 시작된 '우주에서의 조직 칩(Tissue Chips in Space)' 계획의 후속 사업임. 해당 계획은 국제우주정거장 실험실(ISS-NL, International Space Station National Laboratory)로 보낼 수 있는 **조직 및 장기-온-칩 모델(Tissue- and organ-on-chip models)** 또는 **MPS(Microphysiological systems, 미세생리시스템)**을 개발하는 것을 목표로 함. ISS-NL은 생물의학계에 노화와 노화 관련 질환 연구를 위한 독특한 환경인 우주비행을 제공함(Tissue Chip News. 2025).
- 우주 비행 중 인체는 독특한 환경에 노출되는데, 그중 하나가 미세중력(지구에 비해 중력이 감소하거나 거의 제로에 가까운 상태)임. **우주 비행은 인체의 노화 속도를 가속화하여 심장 기능 장애, 면역 노화(면역 체계 쇠퇴), 골다공증(골밀도 감소), 섬유증(세포 주변 매트릭스 물질의 과도한 축적) 등 노화 관련 기능 저하 및 노화 관련 질환을 유도함.**
- 이러한 상태들은 지구상에서 연구하기에는 오랜 시간이 소요됨. 우주에서 관찰되는 가속화된 노화 속도를 활용하면 연구자들은 질병 진행을 모델링하고 지구보다 더 빠르게 새로운 치료법을 식별 및 개발이 가능할 수 있을 것으로 추정.

2. Tissue Chips in Space 2.0 개발과 관련하여 선정된 과제 분석

2-1) Tissue Chips in Space 2.0 목적 - 조직 칩 기술을 정교화하는데 중점

- '우주 속 조직 칩 2.0'은 다중 장기 MPS(Microphysiological systems, 미세생리시스템)를 개발 및 활용하여 **전신 모델링을 개선함으로써 조직 칩 기술을 정교화하는 데 중점을 둠.** 미세생리학 시스템(MPS)은 인간 세포와 조직을 배양한 생체공학적인 미세유체 장치(미세 유체 채널)로, 연구자들이 장기 시스템과 기능을 모방-가능함. **MPS는 기존 세포 배양 및 동물 모델에 비해 많은 장점을 지님.** 이 시스템은 질병 작용 메커니즘 규명, 신약 치료법 검증, 약물 독성 평가를 위하여 보다 정확한 인체 모델을 제공함. MPS는 신약 개발, 규제 승인, 안전성 및 유효성 시험, 정밀 의학 분야에서 핵심 도구로 빠르게 자리 잡고 있음.

2-2) Tissue Chips in Space 2.0 개발과 관련하여 선정된 과제 분석

- 2025년, 미국 국립보건원(NIH)은 협력 계약을 통해 6개 연구 과제를 선정하였고 협력 계약은 두 단계로 구성된 자금 지원 방식임.
- **먼저 1단계에서 연구진은 복잡한 장기 시스템을 모방하는 MPS를 설계할 예정임.** 개발된 MPS는 지구와 우주에서 검증 및 테스트를 거쳐 정상 및 질병 상태의 인간을 정확히 재현하는 실험용 칩으로서 기능성과 지속 가능성을 입증해야 함.
- NIH 심사를 통과한 **2단계에서는 성공적인 칩을 개발한 선정 연구진이 자신들의 MPS를**

ISS-NL의 저궤도 우주정거장으로 보내 모델의 기능적 유용성을 입증할 수 있어야 함.

- 이러한 모델은 미세중력이 인간 생리학 및 노화 관련 질환에 미치는 영향을 이해하고 신약 스크리닝을 위한 새로운 표적 물질을 식별하는 데 기여할 것으로 기대하며 선정된 과제 6개는 다음과 같음.

1) 우주 노화 이해를 위한 뇌-근육 미세생리학적 시스템 기반 세포외 소포 네트워크(Brain-Muscle Microphysiological System Enabled Extracellular Vesicle Network for Understanding Aging in Space)

- 뇌와 근육 간의 상호작용은 알츠하이머병 및 파킨슨병을 포함한 노화 관련 질환에서 핵심적인 역할함. **세포외 소포(EVs, Extracellular vesicles)**는 신체 전반의 조직에 영향을 미치는 분자들을 운반하는 소형 입자임. 뇌와 근육 간 양방향 소통에서 EVs가 어떻게 활용되는지 이해하면 연구자들에게 노화 관련 질환 예방 및 회복을 위한 치료 표적을 제공할 수 있음.

2) AI 및 3D 오가노이드를 활용한 미세중력이 심혈관 노화에 미치는 영향 평가(Assessing Effects of Microgravity on Cardiovascular Aging With AI and 3D Organoids)

- 미세중력은 심장에 부정적인 건강 영향을 미칠 수 있으며, 우주 환경이 심장 기능, 대사 및 자극 반응을 어떻게 변화시키는지 이해하는 것이 중요함. 우주에서 얻은 결과를 지구 상의 실험실에서 수행된 테스트와 비교함으로써 연구자들은 우주라는 독특한 환경이 심장에 미치는 영향을 파악할 수 있음. 이 연구는 **심장 질환 및 염증성 질환에 대한 잠재적 치료 후보 물질을 식별하고 장기 우주 노출 중 우주비행사 건강을 개선하는 데 기여할 것임.**

3) 여성의 생식 건강, 노화 및 질환 평가를 위한 장기-온-칩 접근법(An Organ-on-Chip Approach to Evaluation of Reproductive Health, Aging and Disease in Women)

- **자궁 노화는 암 발병 위험 증가 및 불임, 임신 결과 불량과 같은 생식 문제와 연관되어 있음.** 여성 생식계의 다양한 세포 유형을 **호르몬 노출과 결합하여** 연구진은 자궁 노화의 근본적 메커니즘을 규명할 것임. **인공지능 및 기계 학습과 결합하여 자궁 노화 치료를 위한 잠재적 화합물을 선별하여 향후 연구에 활용할 예정임.**

4) 심장, 장, 뇌의 복합 장기 칩 모델에서 미세중력을 이용한 염증성 노화 모델링(Using Microgravity to Model Inflammaging in Complex Organ Chip Models of Heart, Gut, and Brain)

- **손상된 단백질과 노화 세포(분열은 멈췄으나 대사 활동은 지속하는 세포)의 축적**은 심장, 장, 뇌의 정상 기능 수행 능력을 방해할 수 있음. 노화와 관련된 만성 염증(염증성 노화)은 단핵구 및 대식세포와 같은 면역 세포가 제대로 기능하지 않을 때 유발될 수 있음. 연구진은 면역 세포 노화를 가속화하고 조직 기능 장애를 유발하는 메커니즘을 규명할

계획임. 노화 세포를 표적으로 하는 화합물을 테스트하여 **세포노화를 역전시키고 인간 건강을 개선**할 수 있는 물질을 발견할 예정임.

5) 저궤도(LEO) 환경과 연관된 가속화된 노화를 활용하여 진행성 신경계 질환의 병인 및 치료법 연구(Exploiting Accelerated Aging Associated With Low Earth Orbit (LEO) Environment to Gain Insights Into Pathogenesis and Treatment of Progressive Neurological Disorders)

- 연령은 후기 발병 알츠하이머병(AD)의 가장 중요한 위험 요소임. **뇌와 심장의 상호작용을 통해 AD 및 기타 뇌 질환은 심혈관계에 영향**을 미칠 수 있음. 연구진은 뇌 기능이 저하된 환경에서 심장과 뇌 간의 교신(Cross-talk)을 연구할 것임. 노화세포를 선택적으로 표적하는 화합물을 테스트하여 뇌 및 심장 건강 문제 예방에 효과적인 치료법인지 확인할 것임.

6) 미세중력 환경에서의 노화 폐포 모델(An Aging Alveolar Lung Model in Microgravity)

- 폐에는 상피세포, 내피세포, 섬유아세포, 면역세포 등 다양한 세포 유형이 존재하며, 이들은 호흡기 건강과 기능 유지에 중요한 역할을 함. 연구진은 **섬유화와 같은 노화 관련 질환 상태와 폐 노화 간의 상호작용을 연구하기 위한 폐 모델을 제작할 예정**임. 이 모델은 3차원 환경에서 이러한 다양한 세포 유형을 활용하여 건강한 폐와 섬유화된 폐를 모두 모방하는 강력한 도구로, 다양한 폐 질환 치료법 개발에 활용될 수 있음을 보여줌.

3. 결론: Tissue Chips in Space 2.0 개발의 의미에 대한 분석

1) NAM을 위한 치밀한 사전 준비

- 신약개발의 새로운 정책으로 미국은 Modernization 3.0을 2025년 12월 발표에 앞서 NAM(New approach methodologies 신규접근방법)의 개발과 정책화를 위해 ① **2016년 시작된 '우주에서의 조직 칩(Tissue Chips in Space)'** ② **2020년에 ISTAND(Innovative Science and Technology Approaches for New Drugs, 신약 개발을 위한 혁신적 과학 기술 접근법)** 등의 수행되어 동물대체시험법과는 다른 인체-관련 비임상 연구를 치밀하게 준비하였다고 할 수 있음.

2) Tissue Chips in Space 2.0 개발의 초점은 인간 노화기전 규명과 노화-관련 질병 치료제

- 우주에서 관찰되는 가속화된 노화 속도를 활용하여 ISS-NL에서의 연구는 **노화-관련 기능 저하 및 노화-관련 질환**에 대한 임상시험을 위한 핵심 데이터와 전임상적 또는 비임상적 프레임워크를 제공하게 됨. 또한 이와 같은 틀(Framework)은 미세생리학적 기술의 발전을 촉진하여 사용 편의성을 개선하고 지구상 연구를 위한 조직 칩 플랫폼의 접근성을 확대됨. 이는 **종국적으로 다음과 같이 2가지 목적인 ① 임상적으로 의미 있는 질병 표지자를 규명하고, 질병 진행을 촉진하는 메커니즘을 정확히 파악함, ② 다양한 질환에 대한**

NAM을 통한 잠재적 치료법과 약물 개발 방법을 제공하게 됨.

- 심장 기능 장애, 면역 노화(면역 체계 쇠퇴), 골다공증(골밀도 감소), 섬유증(세포 주변 매트릭스 물질의 과도한 축적) 등과 같은 **노화-관련 기능 저하**와 신경퇴행성 질환 및 만성 퇴행성질환 등의 **노화-관련 질환**의 치료제 개발의 도움과 더불어 결국 최종적 **세포노화**를 **역전시키는 생명연장**과 관련이 있을 것으로 예상됨.

3) 노화기전에 대한 이론

- 앞서 작성한 컨설팅보고서 중에서 아래와 같이 치료제 개발이 어려운 질병 역시, 노화(natural aging) 및 조기 노화(premature aging)과 관련이 있으며 결과적으로 동물종 질환모델과 인체의 질환 환경의 차이를 극복하지 못한 이유가 큼.

83. 알츠하이머병의 치료제 개발에 대한 실패 원인과 NAMs -582
84. 파킨슨병 치료제 개발의 실패 원인과 NAMs - 589
85. 류머티즘성 관절염 치료제의 반응을 임계치와 NAMs - 597
86. 침팬지를 이용한 HIV/AIDS 백신 시험에서 인간으로의 외삽에 대한 현실성 평가 - 606
87. 호흡기 질환인 천식 치료제의 실패 원인과 NAMs - 617

- 세포노화가 곧 개체노화이라고 한다면 세포노화의 핵심인 Replicative senescence(복제의 비가역적 세포분열 중지) 현상을 인체에서 밝히는 중요한 계기가 될 것으로 예상됨. Replicative senescence는 동물실험을 통해 수많은 노화-관련 질환의 원인으로 확인되었음. 이와 관련된 oxidative stress, mitochondria에서의 uncoupling 현상, 암세포의 대사 재프로그래밍(metabolic reprogramming)과 관련된 exosome과 같은 외세포엑소(extracellular vesicles, EV), DDR(DNA-damage response), telomere 및 telomerase 등과 관련하여 중간 차이를 확인할 수 있어 Tissue Chips in Space 2.0의 관심이 높아질 듯 (Bukowska 등, 2022; Li 등, 2014; Wiley 등, 2021; Kennedy 등, 2020)
- **우리는 실제로 우주 공간에서 Tissue Chips in Space 2.0 프로그램은 할 수 없지만 최소한 이와 같은 유사한 환경에서 6개의 과제와 유사한 과제를 수행하는 것이 필요함. 이는 결과적으로 신약 개발을 위한 미국의 플랫폼을 따르는 동시에 가상 공간을 통한 미국을 앞설 수 있는 연구 과제가 될 것으로 사료됨.**

<참고 자료>

Tissue Chip News. 2025. NIH guide. Department of Health and Human Services. Tissue Chips in Space 2.0: Translational Multi-Organ Tissue Chip Systems for Drug Efficacy, Toxicity Testing, and Personalized Medicine in Human Health, Aging and Associated Diseases (UG3/UH3 Clinical Trial Not Allowed).

Bukowska B, Duchnowicz P. Molecular Mechanisms of Action of Selected Substances Involved in the Reduction of Benzo[a]pyrene-Induced Oxidative Stress. *Molecules*. 2022 Feb 18;27(4):1379.

Li B, Iglesias-Pedraz JM, Chen LY, Yin F, Cadenas E, Reddy S, Comai L. Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells. *Aging Cell*. 2014 Apr;13(2):367-78.

Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab*. 2021 Oct;3(10):1290-1301.

Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*. 2020 Oct 9;10(10):1429.

Khrantsov, V.V.; Gillies, R.J. Janus-faced tumor microenvironment and redox. *Antioxid. Redox Signal* 2014, 21, 723–729.

Li, I.; Nabet, B.Y. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Mol. Cancer* 2019, 18, 32.

102. NAM 시대와 비임상연구에서 국내 규제기관의 문제점과 향후 방향성

1. 규제의 방향성 설정에 대한 고찰의 의미

- 미국 상원은 12월 16일 만장일치로 FDA 현대화법 3.0(S.355)을 통과시켜, 의회가 2022년에 제정한 Modernization Act의 변경 사항을 반영하도록 FDA가 규정을 개정하도록 요구하는 법안을 하원으로 송부.
- 법안은 보건복지부(HHS)가 FDA 국장을 통해 법 시행 후 1년 이내에 잠정 최종 규칙을 발표하도록 지시하는 내용
- 해당 규칙은 동물실험이라는 단어 자체 사용을 제한하며 '비임상' 실험('nonclinical' tests)으로 대체할 정도로 새로운 접근법(NAMs; New Approach Methodologies)를 제시 권장함. 즉, 인체 세포-기반 모델·오가노이드·장기온칩(Organ-on-a chip)·AI-기반 독성 예측 등을 공식 평가 수단으로 반영을 의미함.
- 지난 '100. 컨설팅보고서 100회 특집 - 3가지 독성사건 이해와 첨단 신약개발의 첩경' 중 신약 파이프라인 세계 3위 성적표의 이면... 'K-블록버스터' 왜 안 나오나의 기사에서 **글로벌 기준에 맞는 임상 디자인을 함께 고민하는 조력자가 되어야 한다**는 문장은 의미하는 바가 크다. 글로벌 수준의 임상시험도 요청하지만 비임상시험에서도 더하면 더하지 않을 하지는 않다는 것이 현실임.
- NAM은 연구시스템이 **비동물(non-animal)**이라는 측면에서 동물대체시험법(animal alternative test)와 동일하지만, **인체-연관성(human-relevance)**이라는 측면에서 더 차이가 분명함. 이와 같은 이해를 통해 우리가 현재의 규제에 문제점을 확인하고 비임상시험의 글로벌 수준을 향한 방향성 설정의 필요성이 있음.

<p><참고자료> 헤럴드경제: 최은지 기자 2026년02월10일: 신약 파이프라인 세계 3위 성적표의 이면... 'K-블록버스터' 왜 안 나오나</p> <p>특히 ② 규제 기관인 식약처의 역할 변화에 대한 목소리도 높다. 보고서는 "식약처가 임상시험 진행 중 중간 단계에서 조연을 제공하는 등 단순 규제 기관을 넘어 개발 파트너로서의 역할을 강화해야 한다"고 제언했다. 심사의 문턱을 높이는 것에 그치지 않고, 글로벌 기준에 맞는 임상 디자인을 함께 고민하는 조력자가 되어야 한다는 뜻이다.</p>
--

2. 기존 비임상시험 또는 독성시험의 문제점과 NAM-기반 규제의 방향성

2-1. 용량-반응관계의 통계적 유의성과 생물학적 유의성에 대한 구별

1) 용량-반응 관계의 목적

- 용량-반응 관계를 통한 약물과 독성 및 유효성의 인과관계(causal association)를 확인하는 것이 목적

2) 용량군의 설정

- In vivo 시험에서는 대조군을 포함한 용량군 3군 등의 4군으로 수행되는 것이 일반적임. 물론 양성대조군을 사용하면 더 많은 용량군이 포함되지만 3군으로 용량-반응 관계를 in vivo에서 얻기는 쉽지 않음.
- 반면에 in vitro에서는 동물을 사용하지 않고 세포-기반 시스템이기 때문에 7개 용량군을 사용하기 때문에 훨씬 쉽게 얻을 수 있음. 따라서 NAM에서는 대부분 in vitro 또는 ex vivo 시스템이므로 용량-반응관계 얻을 수 있도록 반드시 용량군을 설정할 필요성.

3) 용량군의 용량 간격

- 용량 간격은 공비 2 정도 하는 것이 일반적이지만 독성이 강할수록 좁게 하며 반면에 독성이 약할 경우 공비 3-4정도 넓게하는 것이 일반적임. 또한 필요에 따라 특정 단위용량 100 또는 200 등의 간격으로 설정하는 공차로 수행하는 방법도 있음.

4) Statistical Significance(통계적 유의성)과 Biological Significance(생물학적 유의성)

① 차이점: 생물학적 유의성(Biological significance) 또는 생물학적 연관성(biological relevance)은 연구 결과가 in vitro 시스템에 미치는 영향 측면에서 지니는 실질적 중요성 또는 관련성을 의미함. 이는 연구 결과의 실제적 함의에 초점을 맞춤. 반면 통계적 유의성은 연구 결과가 우연에 기인하지 않았을 가능성을 측정하는 척도임. 이는 연구 결과가 신뢰할 수 있으며 더 큰 모집단으로 일반화될 수 있는지 판단하는 데 도움을 주는 수학적 개념임. 통계적 유의성은 데이터로부터 결론을 도출하는 데 중요하지만, 생물학적 유의성은 생물계 맥락에서 연구 결과의 광범위한 함의를 이해하는 데 핵심적임.

② 비교

- 아래의 <표-1>은 통계적 유의성(statistical significance) vs 생물학적 중요성(biological significance)에 대한 비교를 나타낸 것임. 생물학적 유의성과 통계적 유의성은 과학 연구에서 모두 중요한 개념으로, 각각 데이터 해석에 있어 고유한 목적을 수행한다. 생물학적 유의성은 생물학 분야에서 연구 결과의 실질적 관련성에 초점을 맞추는 반면, 통계적 유의성은 결과가 우연에 기인하지 않았을 가능성을 평가함. **연구자들은 생물학적 유의성과 통계적 유의성의 속성을 이해함으로써 데이터로부터 의미 있는 결론을 도출하고 각자의 분야에서 지식 발전에 기여함.**

<표-1> Biological Significance와 Statistical Significance

Biological significance = Biological relevance	Statistical significance
<ul style="list-style-type: none"> • 생물학에서의 실용적 관련성에 중점을 둠 • 생물학적 과정 이해에 미치는 영향 강조 • 해당 분야 전문가들에 의해 결정됨 • 새로운 발견과 통찰력에 기여 • 생물학 지식 발전에 필수적 	<ul style="list-style-type: none"> • 우연에 의한 결과가 아닌 가능성을 측정 • 데이터 내 실제 관계의 확률을 평가 • 가설 검정을 위한 통계적 검정 사용 • 결과 타당성에 대한 신뢰 제공 • 데이터로부터 신뢰할 수 있는 결론 도출 지원

③ 통계적 유의성(statistical significance)의 접근법

- **접근법:** 약물이 생체에 미치는 영향이 발생할 수 있는지에 대해서는 일반적으로 복잡한 통계적 평가가 적당함. 이 질문은 약동학 분석, 독성학 연구, 인간 또는 동물 안전성과 관련된 불순물 또는 외래물질 잔류 수준 분석의 관점에서 제기됨. 즉, **예상 효과인 치료 효과, 유효성, 독성 등의 확인과 관련된 최종 평가는 반드시 통계적 분석을 선행하며** 다음과 같은 2 단계를 통해 결정됨.

- a. 집단 간 차이의 통계적 평가
- b. 약물의 치료 효과, 유효성, 독성 등에 대한 분석 및 결정

- **문제점:** 임상시험에서처럼 환자-대조군 연구에서처럼 단순히 2개의 용량군으로 집단 간 통계적 유의성은 약물이 생물학적 영향을 유도하는 것임. 그러나 동물실험이나 in vitro, 특히 in vitro에는 약 7 단계의 용량(농도)군으로 시험 디자인이 이루어지기 때문에 보다 쉽게 용량-반응관계를 얻을 수 있음. **문제는 다음과 같은 약물에 의한 독성 양성반응으로 결정을 내리기가 어려움이 있음에도 불구하고 대부분의 국내 규제기관에서는 유전독성 양성으로 판단함.**

(예시-1) 용량-반응관계가 없지만 세포독성의 50%를 사멸을 유도하는 고용량군에서만 양성반응이 있는 경우

(예시-2) in vitro 유전독성시험에서처럼 세포독성을 나타내지는 용량군에서 용량-반응관계가 있고 세포독성이 없는 용량군에선 용량-반응관계가 없는 경우

<표-2> 용량-반응관계 유무와 유전독성 양성 결정에 대한 예시

(in vitro mg/ml)	대조군 대비 세포 사멸 비 율(%)	예시-1		예시-2	
		발생빈도	유 의 성 (P=0.05)	발생빈도	유의성 (P=0.05)
대조군	0	20	-	20	-
10	0	25	no	25	no
20	0	20	no	20	no
40	0	20	no	20	no
80	20	25	no	40	yes
160	30	20	no	60	yes
320	40	30	no	70	yes
640	50	100	yes	90	yes

④ Biological Significance(생물학적 유의성)의 중요성

- 일부 통계적 연관성에 대해서는 지침과 의사결정 트리가 개발되었다는 점은 언급할 가치가 있음(Kobayashi 등, 2014). 그러나 통계적 분석만을 기반으로 한 생물학적 영향에 대한 평가의 한계점에 대해서는 여전히 많은 논의가 진행임. 또한 명확한 접근법은 통일되지 않았지만 해당 분야 전문가들에 의해 결정되며 동시에 생물학적 유의성(Biological Significance)에 수많은 제시되고 있음(Lovell 등, 2013; Gabriel 등, 2021; Johnson, 2024; EFSA, 2017).
- 연구 결과의 생물학적 유의성은 생물학적 관련성과 관련된 별도의 분석 단계여야 하며, **기전적 생물학적/약리학적/독성학적 접근의 대상이 되어야 한다는 것**이 접근법의 핵심임(Gabriel 등, 2021). 이와 같은 기준으로 <표-2> 용량-반응관계 유무와 유전독성 양성 결정에 대한 예시는 다음이 <표-3>과 같이 설명되며 결과적으로 apoptosis에 의한 DNA fragment에 의한 위양성으로 판단됨. 유전독성시험 가이드라인은 적어도 200년대 이전에 작성된 것으로 현대의 독성학적 기전이 반영되지 않은 결과임. **따라서 생물학적 유의성은 새롭게 밝혀지는 생물학적/약리학적/독성학적 기전의 반영으로 전문가에 의해 결정되는 것이 타당함.**

<표-3> 용량-반응관계 유무와 유전독성 양성 결정에 대한 예시

(in vitro mg/ml)	대조군 대비 세포 사멸 비율(%)	예시-1		예시-2	
		발생빈도	유의성 (P=0.05)	발생빈도	유의성 (P=0.05)
대조군	0	20	-	20	-
10	0	25	no	25	no
20	0	20	no	20	no
40	0	20	no	20	no
80	20	25	no	40	yes
160	30	20	no	60	yes
320	40	30	no	70	yes
640	50	100	yes	90	yes
		용량-반응관계가 없으며 이러한 결과는 약물의 소핵기전 또는 염색체 이상을 유도하는 정상적인 기전에 기인하는 것이 아님. 수많은 논문에 따르면 약물의 고용량 투여에 의한 세포 사멸(apoptosis)에 의해 발생하는 DNA fragment에 의해 기인함(Meintières 등, 2004; ZHANG 등, 2000; Kirkland 등, 2007). 따라서 위양성임		여기서는 용량-반응관계를 알 수 있지만 세포독성을 유발하지 않는 용량과는 용량-반응관계가 없음. 따라서 예시-과 동일한 기전에 의한 위양성으로 판단됨.	

5) 결론: 용량-반응관계의 통계적 유의성과 생물학적 유의성에 대한 구별

① 생물학적 유의성의 통계적 유의성과 구별을 위한 글로벌 스탠다드 가이드라인

- 연구 결과의 생물학적 관련성은 생리학과 관련된 별도의 분석 단계여야 하며, 기전적 생물학적/약리학적/독성학적 접근의 대상이 되어야 함. 이러한 접근법은 생물학적 유의성 정의의 일부임.
- 미국의 EPA 가이드라인에 따르면 발암 위험 평가 연구 및 규제 사례에서는 통계적으로 유의한 차이가 생물학적으로 관련될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다는 점이 강조되었음(EPA, 2005).
- FDA 및 ICH, 또한 유럽의 식품청의 EFSA Scientific Committee에 따르면 생물학적 관련성, 특히 관찰된 효과가 생물학적 관련성이 있는지 여부를 판단할 때 고려해야 할 일반적 문제점과 기준을 제시하는 지침 문서를 마련하거나 언급하였음(EFSA Scientific Committee, 2017; FDA, 2002; ICH, 2012).
- 또한 우리나라가 독성시험 가이드라인을 사용하고 있는 경제협력개발기구(OECD)는 만성 독성 및 발암성 연구 관련 가이드라인(Guidance Document for The Design and Conduct of Chronic Toxicity And Carcinogenicity Studies)에서 “통계적 분석은 생물학적 중요성 해석의 일부이지 대안이 아니다”라고 언급하였음(OECD, 2010).

② 생물학적 유의성의 다양한 유사어

- “생물학적 유의성(biologically significant)”이라는 용어는 “통계적 유의성(statistically significant)”과 구별하고, “통계적 유의성”이라는 용어만으로는 연구 결과를 적절히 검증할 수 없을 때 평가의 핵심 요소로 사용하기 위해 정의되었음. 현재 이 개념은 완전히 통일되지 않았으며, 생물학적으로 관련성 있는(biologically relevant; EFSA Scientific Committee, 2017FDA, 2002; ICH, 2012), 생물학적으로 유의한(biologically significant: Lewis, 2002; FDA, 2002), 생물학적으로 또는 독성학적으로 의미 있는(biologically or toxicologically meaningful: FDA, 2016; ICH 2012), 주목할 만한(noteworthy; ECETOC, 2002), 생물학적 중요성(biological importance: Lovell 등, 2013), 생물학적으로 비현실적인(biologically unrealistic: EPA, 2005), 임상적으로 의미 있는(clinically meaningful, ICH, 1994)] 등 다양한 용어가 사용되고 있음.

③ 규제기관의 향후 방향

- 이와 같이 어떤 경우라도 통계적 유의성만 있으면 결정하는 것은 추가적인 시험뿐만 아니라 심지어는 발암성시험까지 하여야 함. 이것이 국내 규제기관의 현실임. 이에 따른 문제점은 개발자의 수많은 정신적 고통을 수반하면서 비용과 시간 부담에 결정적인 영향을 주게 됨. 특히 **NAM은 생물학적 연관성(biological relevance)을 넘어 human-relevance에 중심을 두는 것이 핵심적인 비임상기술임.** 이러한 것을 고려할 때 통계적인 유의성 기반한 2단계에서 향후 다음과 같은 4 단계 즉, **Biological relevance(생물학적 관련성) 평가와 Human relevance(인체 관련성) 평가 단계**를 고려하지 않으면 향후 글로벌 신약은 커녕, 규제기관은 글로벌 신약의 가장 큰 장애에 망국적인 정부기관으로 박제될 수 있음.

a. 집단 간 차이의 통계적 평가

b. 약물의 치료 효과, 유효성, 독성 등에 대한 분석 및 결정

c. Biological relevance(생물학적 관련성) 평가

d. Human relevance(인체 관련성) 평가

- 이는 다음과 같은 질문과 맥락이 같이 한다고 할 수 있음.

- 통계적 유의성이 단일 용량 수준에서만 발견되었는가?
- 아니면 적어도 여러 유의한 용량 수준에 걸쳐 용량-반응 관계가 존재하는가?
- 다른 데이터 세트가 이 결과를 뒷받침하는가?
- 임상 화학, 장기 중량, 조직병리학 및 기타 부작용 지표의 여러 (잠재적) 연관 측면들이 일관성을 보이는가?
- 이 효과가 생물학적 또는 임상적으로 유의미한 효과를 나타낼 만큼 충분한가?

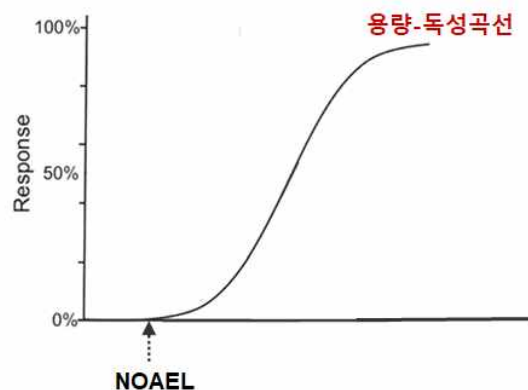
2-2. 통계적 유의성을 기반한 NOAEL 설정

1) NOAEL의 중요성

- MRSD(maximum recommended strating dose, 임상최대권장초기용량)는 임상예정용량으로 4주에서 13주 반복투여독성시험을 통해 얻는 NOAELL(no observed adverse effect level, 최대비독성용량)을 이용하여 $MRSD = NOAEL / (\text{중간 SF} \times \text{종내 SF})$ 로 산출됨. 여기서 SF는 safety factor(안전계수)임. **따라서 NOAEL을 어떻게 설정하느냐 따라 치료범위(therapeutic range)에 큰 영향을 줌. 즉, NOAEL을 낮게 잡으면 치료의 용량 범위가 상당히 좁아져 안전함에도 불구하고 약물의 소용량 투여로 인하여 임상시험에서 효능이 없거나 감소시키는 역할을 하게됨.**

2) 국내의 NOAEL 판단 규정

- 국내 규제기관에 의해 신약 개발을 가장 어렵게 하는 것이 임상예정용량인 MRSD 산출을 위한 NOAEL 결정임. 국내 규제기관은 아래의 <그림-1>에서처럼 독성시험에서 NOAEL을 독성시험에서 어떤 변화도 없는 용량으로 설정함.



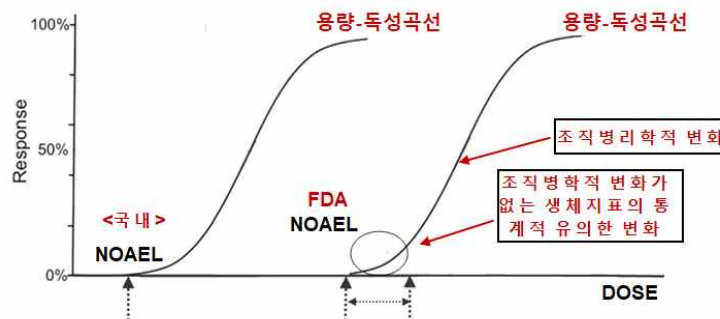
<그림-1> MRSD 산출을 위한 국내의 규제기관에 의한 NOAEL 정의

3) NOAEL 설정의 글로벌 스탠다드

- 미국 FDA는 약물의 독성학 및 독성시험에서 생체지표(biomarker) 수준 변화와 관련된 생물학적 의미 있는 변화는 조직병리학적 변화가 확인될 때 결론지을 수 있음(FDA, 2016). 조직변화가 없는 독성시험에서 생체지표는 **safety concern이 없는 것으로 판단하여 NOAEL로 결정함(FDA, 2005)**. 이와 같이 조직병리가 없는 통계적 유의한 생체지표 변화를 NOAEL로 설정하는 이유는 생체표지자 성능을 조직병리학적 변화와 연관지어 **과학적으로 엄격하게 평가하기 위한 것임**. 이는 비임상적 생체표지자 적격성 평가를 뒷받침하는 직접적 증거를 제공하거나, 제안된 사용 맥락에 대한 **임상적 생체표지자의 개발 및 적격성 평가를 지원**하기 위한 보조적 전환 연구 데이터를 제공할 수 있기 때문임(Scientifically rigorous evaluation of biomarker performance in relation to histopathologic changes is essential in these studies)

because they may provide direct evidence to support nonclinical biomarker qualification or supportive translational data to aid in the development and qualification of clinical biomarkers for a proposed context of use; FDA, 2016).

- FDA(2016)의 위와 같은 결정 이유에서 NOAEL을 통계적 유의성을 가진 생체지표를 결정하는 이유는 생체 내 homeostasis 변화를 유도하지 않은 약물은 없으며 용량-반응곡선에 존재하여야 더 높은 용량에서 독성학적 변화를 예측이 가능하기 때문임. <그림-2>에서처럼 국내 NOAEL의 정의인 아무런 변화가 없는 NOAEL 지점의 용량을 독성시험에서 정확하게 찾아내기는 불가능함. 이에 따라 국내 NOAEL은 이론적인 NOAEL 지점의 용량 훨씬 이전의 용량을 설정할 수 밖에 없으며 이는 MRSD 용량을 감소시켜 임상시험에서 약리작용을 나타나지 않게 할 수 있는 신약개발의 어려움을 가져오는 심각한 결과의 원인임.



<그림-2> 국내 NOAEL과 글로벌 NOAEL 설정의 차이점

4) NOAEL 설정의 최초 기준

- 조직변화가 없는 독성시험에서 생체지표는 **safety concern이 없는 것으로 판단하여 NOAEL로 결정한다는 것은 2005년 FDA에 의해 제시되었음.** (The NOAEL is not the same as the no observed effect level (NOEL), which refers to any effect, not just an adverse one, although in some cases the two might be identical. The definition of the NOAEL, in contrast to that of the NOEL, reflects the view that some effects observed in the animal may be acceptable pharmacodynamic actions of the therapeutic and **may not raise a safety concern.** The NOAEL should also not be confused with lowest observed adverse effect level (LOAEL) or maximum tolerated dose (MTD). 물론 여기서 safety concern이란 전문가에 따라 차이가 있을 수 있지만 risk-benefit assessment 측면에서 바라보는 적절할 것으로 사료됨. 모든 약물은 그 자체가 대사 과정에서 산화 스트레스를 유발하며 단지 이것이 얼마나 기능적으로 문제를 하는 것인지는 극히 미미할 것으로 추정됨. 물론 여기서 약물이란 항암제 등의 DNA damage를 유발하는 물질은 제외하는 것임.
- 다음의 논문은 2005년 FDA의 가이드라인인 Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers(건강한 성인 자원자를 대상으로 한 치료제의 초기 임상 시험에서 최대 안전 시작 용량 추정 산업 지침)과 2016년 FDA가 발표한 가이드라인인 Considerations for Use of Histopathology and Its Associated Methodologies to Support Biomarker Qualification Guidance for Industry(생체표지자 적격성 평가 지원을

위한 조직병리학 및 관련 방법론 활용 고려사항 산업을 위한 지침)을 반영하여 반복투여 독성시험에서 최초로 NOAEL 설정을 위해 제시한 논문에서 발췌한 기준임(Heo 등, 2018).

- NOAEL 설정은 Table 1에서처럼 물질에 의한 변화는 세 가지 범주로 분류되었음: 비화합물 관련 변화, 경미한 화합물 관련 변화, 중요한 화합물 관련 변화. 박과 조(2011) 및 Lewis 등(2002)을 참조하여, 이들은 다시 유해 효과와 비유해 효과로 세분화되었음. 독성의 정량적 평가 지표인 NOEL, NOAEL 및 LOAEL을 통계적 유의성과 조직병리학적 변화 유무에 따라 산출하였음.

Table 1 Definitions of NOEL, NOAEL and LOAEL by three steps of weight-based classification in toxicity test.

Weight-based classification	Definitions of Criteria	Criteria of toxicity	Evaluation endpoint
Important compound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> - Statistically and biologically significant histopathological changes that are dose-dependent at all doses - Though not dose-dependent, clinical pathological changes that are accompanied by histopathological changes - Though not dose-dependent, histopathological changes that are statistically significant and that do not occur in the control group - Severe dose-dependent weight change - More than 30% change of organ weight 	Adverse effect	LOAEL
Minor compound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> - Clinical pathological and histopathological changes that are dose-dependent in certain doses or are not dose-dependent at a certain administered dose - Reversibility is anticipated or there is a histopathological change in the control group - Dose-dependent or non-dose-dependent change that is statistically and biologically significant^a and is thought to be due to the pharmacological effects of the test substance - From 10 to 20% weight loss and weight gain without hyperlipidemia - From 20 to 30% change of organ weight 	Non-adverse effect	NOAEL
Noncompound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> - Statistically significant change that is obtained through comparison with the control group results that are beyond historical data^b - Changes due to mistakes in the test process or spurious changes 	No effect	NOEL

^a Biological significance: A statistical significance between the group and control group that is beyond historical.

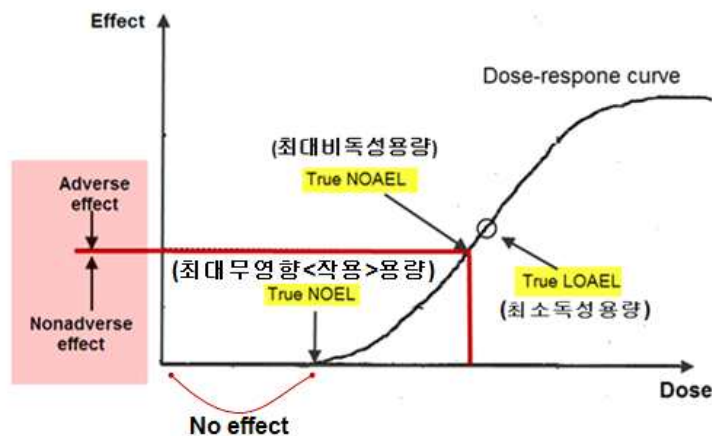
^b Historical data: Range of the control group that is obtained through testing (Mean $\pm$ SD).

Table 1 Definitions of NOEL, NOAEL and LOAEL by three steps of weight-based classification in toxicity test.

- 그러나 통계적 유의성만으로 입증된 부작용 발견으로 NOAEL을 설정하는 것은 근거가 취약하고 신뢰성이 의심이 제시되었음. 이에 통계적 유의성이 없을 경우에도 그 부작용이 심각하다면 생물학적 유의성으로 판단하여 NOAEL로 설정의 필요성을 제시(FDA, 2016; Gabriel 등, 2021)

5) 결론: 통계적 유의성을 기반한 NOAEL 설정

- Lewis(2002)는 아래의 <그림-3>에서처럼 통계적 유의성을 가진 생체지표를 독성(adverse effect)이 아닌 non-adverse effect(비독성)을 NOAEL로 설정. 그리고 아무런 영향이 없는 용량을 NOEL(no observed effect level, 최대무영향용량). adverse effect가 추정되는 용량을 LOAEL(lowest observed adverse effect level, 최소독성용량) 판단.



<그림-3> 반복독성시험에서 NOEL, NOAEL 그리고 LOAEL의 차이

- 조직변화가 없는 독성시험에서 생체지표는 **safety concern**이 없는 것으로 판단하여 **non adverse effect**(통계적 변화는 있지만 비독성)을 **NOAEL**로 결정한다는 것을 2005년 **FDA**에 의해 제시되었음. 또한 FDA(2016)는 약물의 독성학 및 독성시험에서 생체지표(biomarker) 수준 변화와 관련된 생물학적 의미 있는 변화는 조직병리학적 변화가 확인될 때 결론지을 수 있음(FDA, 2016). 따라서 조직병리학적 변화가 없는 모든 약물에 의한 통계적 유의한 변화는 **NOAEL**로 판단함.
- **NOAEL** 설정은 Table 1에서처럼 물질에 의한 변화는 세 가지 범주로 분류되었음: 비화합물 관련 변화, 경미한 화합물 관련 변화, 중요한 화합물 관련 변화. 박과 조(2011) 및 Lewis 등(2002)을 참조하여, 이들은 다시 유해 효과와 비유해 효과로 세분화되었음. **독성의 정량적 평가 지표인 NOEL, NOAEL 및 LOAEL을 통계적 유의성과 조직병리학적 변화 유무에 따라 산출하였음.**

3. 결론: NAM 시대와 비임상연구에서 국내 규제기관의 문제점과 향후 방향성

- NAM은 연구시스템이 **비동물(non-animal)**이라는 측면에서 동물대체시험법(animal alternative test)와 동일하지만, **인체-연관성(human-relevance)**이라는 측면에서 동물대체 시험법과 차이가 있음. 이와 같은 이해를 통해 우리가 현재의 규제에 문제점을 확인하고 비임상시험의 글로벌 수준을 향한 방향성 설정에 있어서 2가지가 필요함.

① 정성적인 지표를 얻기 위한 독성시험에서 통계적 유의성보다 생물학적 유의성이 판단 근거가 됨 - **통계적 분석은 생물학적 중요성 해석의 일부이지 대안이 아니다** (OECD, 2010).

② 정량적인 지표를 얻기 위한 독성시험에서 조직병리학적 변화가 없고 동시에 통계적 유의성이 있는 생체지표가 NOAEL로 설정된다는 점 - Lewis(2002)는 아래의 <그림-3>에서처럼 통계적 유의성을 가진 생체지표를 독성(adverse effect)이 아닌 non-adverse effect(비독성)을 NOAEL로 설정. 따라서 현재 국내 규제기관에서 사용하는 NOAEL을 최대무독성용량이 아닌 최대비독성용량으로 전환하여야 올바른 판정이 가능함.

- 비임상시험에서 마지막으로 통계적 유의성과 생물학적 유의성에 대한 이해를 기반으로 모든 가이드라인을 수정 및 신설이 필요하다고 할 수 있음. 특히 규제기관이 이에 대한 이해가 이루어져야만 아래의 참고자료에서처럼 '**글로벌 기준에 맞는 임상 디자인을 함께 고민하는 조력자가 되어야 한다**'에서 조력자의 뜻을 이해할 수 있다고 사료됨.

<p><참고자료> 헤럴드경제: 최은지 기자 2026년02월10일: 신약 파이프라인 세계 3위 성적표의 이면... 'K-블록버스터' 왜 안 나오나</p> <p>특히 ② 규제 기관인 식약처의 역할 변화에 대한 목소리도 높다. 보고서는 "식약처가 임상시험 진행 중 중간 단계에서 조연을 제공하는 등 단순 규제 기관을 넘어 개발 파트너로서의 역할을 강화해야 한다"고 제언했다. 심사의 문턱을 높이는 것에 그치지 않고, 글로벌 기준에 맞는 임상 디자인을 함께 고민하는 조력자가 되어야 한다는 뜻이다.</p>
--

- 비임상시험에서 통계적 유의성과 생물학적 유의성은 임상시험에서 **통계적 유의성과 임상적 유의성**과 연결되어 있다는 것을 참고자료의 Sharma 등(2021) 논문에서 확인할 수 있음.

<참고자료> Sharma H. Statistical significance or clinical significance? A researcher's dilemma for appropriate interpretation of research results. Saudi J Anaesth. 2021 Oct-Dec;15(4):431-434.

It is incredibly essential that the current clinicians and researchers remain updated with findings of current biomedical literature for evidence-based medicine. However, they come across many types of research that are nonreproducible and are even difficult to interpret clinically. Statistical and clinical significance is one such difficulty that clinicians and researchers face across many instances. In simpler terms, the P value tests all hypothesis about how the data were produced (model as whole), and not just the targeted hypothesis that it is intended to test (such as a null hypothesis) keeping in mind how reliable are the of the research results. Most of the times it is misinterpreted and misunderstood as a measure to judge the results as clinically significant. Hence this review aims to impart knowledge about "P" value and its importance in biostatistics, also highlights the importance of difference between statistical and clinical significance for appropriate interpretation of research results.

현재의 임상 의와 연구자들이 근거 기반 의학을 위해 최신 생의학 문헌의 연구 결과를 지속적으로 업데이트하는 것은 매우 중요하다. 그러나 그들은 재현 불가능한 연구를 비롯해 임상적으로 해석하기조차 어려운 다양한 유형의 연구를 접하게 됩니다. **통계적 유의성과 임상적 유의성은 임상의와 연구자들이 다양한 상황에서 마주하는 어려움 중 하나이다.** 간단히 말해, P 값은 연구 결과의 신뢰도를 고려하여 데이터가 생성된 방식(모델 전체)에 대한 모든 가설을 검증하며, 단순히 검증하려는 특정 가설(예: 귀무가설)만을 대상으로 하지 않는다. 대부분의 경우 P 값은 연구 결과를 임상적으로 유의미한지 판단하는 척도로 오해되고 잘못 해석됩니다. 따라서 본 리뷰는 생물통계학에서 ' P '값과 그 중요성에 대한 지식을 전달하고, 연구 결과를 적절히 해석하기 위해 **통계적 유의성과 임상적 유의성의 차이를 강조하는 필요성이 있다.**

<참고논문>

Hye Seon Heo, MinJi An, Ji Sun Lee, Hee Kyong Kim, Yeong-Chul Park, Repeated dose 90-day oral toxicity test of G-7% NANA in rats: An application of new criterion for toxicity determination to test article-induced changes, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 95, 2018, Pages 260-269,

FDA (2016) Considerations for Use of Histopathology and Its Associated Methodologies to Support Biomarker Qualification Guidance for Industry pp. 1-18

FDA. (2005). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacology and Toxicology.

EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment 1-166.

OECD (2010) OECD Guidance Document for The Design and Conduct of Chronic Toxicity And Carcinogenicity Studies, Supporting Tg 451, 452 and 453 pp. 2-44

ICH (2012) ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Pp. 1-28.

FDA (2002) Guidance for Industry Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs pp. 1-38.

FDA (2016) Considerations for Use of Histopathology and Its Associated Methodologies to Support Biomarker Qualification Guidance for Industry pp. 1-18

Kobayashi K, Pillai KS, Michael M, Cherian KM, Ono A, et al. (2014) Transition of JapaŽ s statistical tools by decision tree for quantitative data obtained from the general repeated dose administration toxicity studies in rode

Gabriel da Costa Duriguetto, Ronaldo Chigre Araujo. Between Biological Relevancy and Statistical Significance - Step for Assessment Harmonization. Am J Biomed Sci & Res. 2021 – 13(5). ISSN: 2642-1747

EFSA Scientific Committee, Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen HK, More S, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rychen G, Schlatter JR, Silano V, Solecki R, Turck D, Younes M, Bresson J-L, Griffin J, Hougaard Benekou S, van Loveren H, Luttik R, Messean A, Penninks A, Ru G, Stegeman JA, van der Werf W, Westendorf J, Woutersen RA, Barizzzone F, Bottex B, Lanzoni A, Georgiadis N and Alexander J, 2017. Guidance on the assessment of the biological relevance of data in scientific assessments. EFSA Journal 2017;15(8):4970, 73 pp.

Alexander Johnson. What is the difference between statistical significance and biological relevance? 2024. <https://scienceoxygen.com/>

Lovell DP. Biological importance and statistical significance. J Agric Food Chem. 2013 Sep 4;61(35):8340-8. doi: 10.1021/jf401124y. Epub 2013

Meintières S, Marzin D. Apoptosis may contribute to false-positive results in the in vitro

micronucleus test performed in extreme osmolality, ionic strength and pH conditions. Mutat Res. 2004 Jun 13;560(2):101-18. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.02.003.

ZHANG, J., XU, M. DNA fragmentation in apoptosis. Cell Res, 10;205–211 (2000)

Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, Kasper P, Kirchner S, Lynch A, Marzin D, Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thybaud V, Tice R, van Benthem J, Vanparys P, White P. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. Mutat Res. 2007 Mar 30;628(1):31-55.

Committee ES, Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, et al. (2017) Guidance on the assessment of the biological relevance of data in scientific assessments. EFSA Journal 15: e04970

Lewis RW, Billington R, Debryune E, Gamer A, Lang B, et al. (2002) Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. Toxicol Pathol 30: 66-74.

ECETOC (2002) Recognition of, and differentiation between, adverse and non-adverse effects in toxicology studies 1-50.

Lovell DP (2013) Biological importance and statistical significance. Journal of agricultural and food chemistry 61(35): 8340-8348.

ICH (1994) ICH Topic E4 Dose Response Information to Support Drug Registration. European Medicines Agency science Medicines health Pp.1-10.

FDA. (2005). Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacology and Toxicology.

103. FDA, 신약 승인에 필요한 2건의 임상시험 요건 폐지 - One Pivotal Clinic Trial로 변경

1. 근거 및 핵심내용

- <참고자료-1>에서처럼 이 논문은 FDA 승인의 기본 요건이 두 번의 임상시험이 아닌, 하나의 강력한 중추적 임상시험과 확인적 증거로 변경된다는 새로운 FDA 정책을 발표하였음. FDA는 약물 승인을 위한 기본 기준을 전환하며, 일반적으로 적절하고 잘 통제된 단일 임상시험으로도 승인이 가능할 것이라고 발표하였음.
- FDA는 특정 의료 제품의 가용성을 가속화하려는 명백한 노력의 결과로 신약 승인을 위한 두 건의 중추적 연구라는 오랜 요구사항을 폐기함. 앞으로 FDA는 신약 및 기타 의료 제품 승인을 위해 확인 증거로 뒷받침되는 적절하고 잘 통제된 임상 시험 1건만을 요구할 예정임. FDA Commissioner Marty Makary 및 고위 관계자들이 공개한 이 조치는 수십 년 만에 가장 중대한 규제 정책 변화 중 하나로, 기관 지도부의 심사 간소화 지속 노력을 반영할 것으로 예상되며 핵심내용은 다음과 같이 5가지로 요약됨.
 - FDA는 사실상 요구되던 두 차례의 중추적 임상시험 기준을 폐지하고, 승인 근거로 한 차례의 적절하고 잘 통제된 연구와 확인적 증거를 요구할 계획.
 - 과학적 근거는 생물학적 유의성(biological significance) 향상, 바이오마커(biomarker) 지원, 정교한 설계, 중복 중추적 시험 없이도 효능을 입증할 수 있는 통계적 접근법에 중점을 둠.
 - 이중 연구 기준은 1960년대 허위양성률을 완화하기 위한 해석에서 비롯되었으나, 1997년 이후 법적 권한으로 단일 임상시험과 보강 증거를 통한 승인이 가능해졌음.
 - 검토 중점은 효과 크기, 대조군, 평가 지표, 검정력, 맹검, 누락 데이터, 바이오마커 일치성 등 임상시험 품질 지표로 전환될 전망이다.
 - 실질적 영향은 역사적으로 두 건의 시험을 요구해 온 흔한 질환에 가장 클 수 있으나, **종양학 및 희귀질환**은 단일 시험 유연성 하에서 평가된 경우가 빈번하였음.

<참고자료-1> Prasad V, Makary MA. One Pivotal Trial, the New Default Option for FDA Approval - Ending the Two-Trial Dogma. N Engl J Med. 2026 Feb 19;394(8):815-817.

<Abstract>

This Sounding Board announces a new FDA policy that the default requirement for FDA approvals will be one robust pivotal trial plus confirmatory evidence, rather than two trials.

<Key Takeaways>

- FDA plans to drop the de facto two-pivotal-trial expectation, requiring one adequate and well-controlled study plus confirmatory evidence to support approval.
- Scientific justification centers on improved biological plausibility, biomarker support, sophisticated designs, and statistical approaches that can corroborate efficacy without duplicative pivotal trials.

- The two-study norm emerged from 1960s interpretations to mitigate false positives, yet statutory authority since 1997 has allowed single-trial approval with corroboration.
- Review emphasis is expected to pivot toward trial quality parameters, including effect size, controls, endpoints, power, blinding, missing data, and biomarker alignment.
- Practical impact may be greatest for common conditions historically held to two trials, whereas oncology and rare diseases have frequently been evaluated under single-trial flexibility.

2. FDA의 신약 승인 요건에 대한 변경 결정의 이유 추정

- 2025년 4월 FDA에 부임한 이후 마카리 국장은 '국가 우선 바우처 프로그램' 도입 및 '국가적 이익'에 부합하는 의약품에 대한 1개월 심사 제공 등 심사 기간 단축을 위한 일련의 정책을 추진해왔음.
- <참고자료-1>처럼 정책 기고문에서 FDA Commissioner Marty Makary와 FDA 백신 담당 책임자인 Vinay Prasad는 생물학, 임상시험 방법론, 통계학의 발전으로 인해 기존에 요구되던 두 차례의 중추적 임상시험 기준에서 벗어날 수 있다고 주장했다.
- "이러한 환경에서 두 차례 임상시험에 대한 과도한 의존은 더 이상 타당하지 않다"고 그들은 밝혔다. "2026년에는 제약사가 제품을 다시 시험하도록 요구하는 것보다, 우리 제품이 사람들의 수명 연장과 삶의 질 향상에 기여한다는 확신을 얻을 수 있는 강력한 대안적 방법들이 존재할 것이다." 주장함
- 특히 이번 변경이 "신약 개발의 급증"을 촉진할 것으로 기대.

3. FDA의 신약 승인을 위해 두 건의 연구를 요구한 역사

- 두 건의 임상시험 기준은 1960년대 초로 거슬러 올라감. 당시 의회는 신약 승인을 위해 "적절하고 잘 통제된 연구"를 요구하였음.
- 수십 년간 FDA는 이 조항을 최소 두 건의 독립적인 연구를 요구하는 것으로 해석해왔다. 이는 단일 긍정적 임상시험 결과가 통계적 우연일 위험을 줄이기 위한 안전장치였음(U.S News, 2026).
- 통계적 관점에서 두 차례 시험 요구는 단순히 후원사가 성공을 한 번 이상 입증해야 한다는 점에서 위양성(false positive) 결과 가능성을 줄일 것으로 기대됨. 그러나 규제 당국은 현대적 신약 개발이 생물학적으로 비현실적인 화합물 시험을 거의 포함하지 않았으며, 대신 치료법은 일반적으로 상세한 기전적 과학, 바이오마커 데이터, 점점 정교해지는 시험 설계로 뒷받침된다고 주장하고 있음(Prasad 등, 2026).
- 1997년 이후 FDA는 단일 적절하고 잘 통제된 연구와 확인 증거를 결합하여 약물

을 승인할 수 있는 명시적 법적 권한을 보유하고 있습니다. 이러한 증거에는 사전 데이터, 관련 적응증 결과, 동물 모델, 계급 효과, 실제 세계 증거 또는 경우에 따라 두 번째 임상시험이 포함될 수 있습니다(Prasad 등, 2026).

4. 향후 심사 과정에서 영향 예상

- 앞으로 심사관들은 임상시험의 수보다는 효과의 크기, 대조군의 적절성, 종료점 선정, 통계적 검정력, 맹검 처리, 누락 데이터 처리, 생물학적 타당성, 중간 바이오마커와의 연계성 등 시험의 질에 집중할 것으로 예상됨.

5. 규제 전문가의 입장

- 2024년 은퇴 전 약 20년간 FDA 의약품 센터를 이끌었던 Dr. Janet Woodcock는 이러한 전환의 과학적 근거가 타당하다고 평가하였음. "생물학과 질병에 대한 이해가 깊어짐에 따라 항상 두 번의 임상시험을 수행할 필요가 없다는 과학적 주장은 충분히 설득력 있다."(U.S News, 2026)
- Dr. Janet Woodcock는 종양학 및 희귀질환 분야는 이미 단일 임상시험 유연성 하에서 운영되어 왔으며, 역사적으로 두 번의 연구 기준을 충족해야 했던 더 흔한 질환 치료제에 더 큰 영향이 있을 수 있다고 지적하였음(U.S News, 2026).
- Dr. Janet Woodcock는 "이번 변경으로 영향을 받는 것은 암이나 희귀질환이 아니다"라며 "해당 기관은 이미 단일 임상시험으로 이를 승인해 왔다"고 설명하였음.
- Marty Makary와 Vinay Prasad는 새 정책이 기준을 약화시킨다는 비판을 일축하였음. 두 관계자는 설계가 부실한 두 건의 임상시험이 유효한 결론을 보장하지 않으며, 단일하고 엄격하며 잘 설계된 연구에 심사 자원을 집중하는 것이 오히려 규제 심사를 강화할 수 있다고 주장. "연구의 질을 검토하지 않으면 두 건의 임상시험이 오히려 허위 보증을 제공할 수도 있다"고 논문에서 주장하였음.

<참고논문>

- U.S News. FDA Will Drop Two-Study Requirement for New Drug Approvals, Aiming to Speed Access February 18, 2026
<https://www.usnews.com/news/business/articles/2026-02-18/fda-will-drop-two-study-requirement-for-new-drug-approvals-aiming-to-speed-access>
- Prasad V, Makary MA. One Pivotal Trial, the New Default Option for FDA Approval - Ending the Two-Trial Dogma. N Engl J Med. 2026 Feb 19;394(8):815-817.
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMs2517623>

104. Liver-on-a-chip의 기반 IVIVE(In vitro to in vivo extrapolation)와 독성 예측

- 고찰 의미: 2025년 12월 미국의 modernization 3.0은 동물실험의 가능한 줄이면서 중국적으로 약 2-3년 이내 더 이상 동물 희생이 없이 비임상연구 자료가 요구됨. 이는 in vitro 및 in silico 시스템을 이용한 독성 및 동태의 비임상연구 결과를 어떻게 정확하게 인체로 정성적 및 정량적으로 외삽 및 예측하는 것이 핵심 이슈가 된다는 것을 의미함. 따라서 현재 in vitro 시스템으로 가장 개발이 앞서 있는 Organoid vs Organoid-on-a chip vs Organ-on-a chip에 의한 인체 약물동태학적 및 독성학적 현황에 대한 파악은 향후 지향할 방향을 이해할 수 있을 것으로 예상됨.

Part 1. Organoid vs Organoid-on-a chip vs Organ-on-a chip

1. Modernization 3.0 출현에 의한 독성 및 IVIVE의 의미

- 2025년 12월 미국의 modernization 3.0은 동물실험의 가능한 줄이면서 중국적으로 약 2-3년 이내 더 이상 동물 희생이 없이 비임상연구의 수행. 이는 in vitro 및 in silico 시스템을 이용한 독성 및 동태의 비임상연구 결과를 어떻게 정확하게 인체로 전환하는가에 대한 방법의 개발이 지속적으로 요구됨.

① **독성:** 대체 시험 방법 개발에 대한 요구에 부응하기 위해, 점점 정교해지는 in vitro 실험들은 이제 수학적 모델에 통합될 수 있는 다수, 복잡하고 도전적인 데이터를 수집. 이를 기반으로 <Figure 5>에서처럼 in vitro에서 확인된 POD(point of departure)인 in vivo 및 인체에 적용되는 POD로 전환하여 임상예정용량을 추정함. 독성학에서 POD(point of departure, 출발점)은 실험 데이터나 관찰 데이터로부터 확립된 독성학적 용량-반응 곡선상의 지점으로, 일반적으로 추정된 낮은 영향 수준 또는 무영향 수준에 해당됨(Han 등, 2024). 참고로 독성학에서 출발점(POD, point of departure)은 실험 데이터 또는 관찰 데이터로부터 확립된 독성학적 용량-반응 곡선상의 지점으로, 일반적으로 추정된 저영향 수준인 NOAEL 또는 무영향 수준에 해당하는 NOEL을 의미함.

② **동태:** IVIVE(in vitro to in vivo extrapolation)는 좀 더 구체적인 측면에서는 in vitro to in human extrapolation으로 표현되어야 함. 이유는 궁극적으로 in vitro는 인체-유래 세포이며 또한 동물실험을 대신하기 때문에 in vivo는 곧 human을 의미함. 특히 FDA ISTAND에서 승인된 NAM 기술은 비임상 및 임상시험을 위한 기술개발은 human-relevance에 중점됨 두어 승인되고 있음. 따라서 POD 추정을 위한 아래의 접근 방법은 Human relevance와 연관하여 방향성을 설정하여 NAM을 개발할 필요성이 있음.

- IVIS: In vitro-in silico methodology - 체외-컴퓨터 시뮬레이션 방법론
- PBTK: Physiologically-based toxicokinetic model - 생리학적 기반 독성동태학 모델
- PBPK: Physiologically-based pharmacokinetic model - 생리학적 기반 약동학 모델



- IVIVE: In vitro to in vivo extrapolation - 시험관 내 결과의 생체 내로 외삽
- QIVIVE: Quantitative in vitro to in vivo extrapolation - 정량적 시험관 내-생체 내 외삽법

- 2023년 12월 22일 Web of Science 데이터베이스에서 IVIVE 관련 논문을 검색하였으며, IVIVE 관련 논문 추이는 **Figure 2.**에 제시됨(Han 등, 2024). IVIVE, PBTK 모델 기반 IVIVE, ML 모델 기반 IVIVE에 대해 각각 총 190건, 76건, 122건의 관련 논문이 확인되었음. 다소 특이한 점은 **IVIS: In vitro-in silico methodology - 체외-컴퓨터 시뮬레이션 방법론으로** ML 모델 기반 IVIVE 산출방법이 PBTK 및 PBTK 모델기반과 더불어 급격히 추이가 증가 되고 있다는 점임.

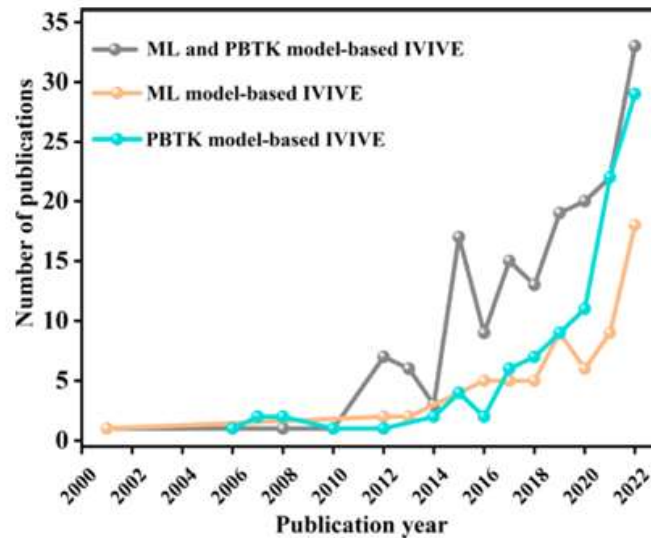


Figure 2. IVIVE 관련 출판물의 동향. IVIVE 연구의 경우, 문헌 검색 시 검색어로 ("IVIVE" 또는 "QIVIVE") AND ("독성")을 사용함. PBTK 모델 기반 IVIVE 연구의 경우, ("생리학적 기반 독성동태학 모델" 또는 "생리학적 기반 약동학 모델" 또는 "생리학적 기반 생체동태학 모델" 또는 "생리학적 기반 동태학 모델" 또는 "PBTK" 또는 "PBPK" 또는 "PBK") AND ("IVIVE" 또는 "QIVIVE") AND ("독성")을 문헌 검색의 검색어로 사용합니다. ML 모델 기반 IVIVE 연구의 경우, ("인공 지능" 또는 "기계 학습") AND ("생체 내" 및 "생체 외") AND ("독성")을 문헌 검색의 검색어로 사용함

③ POD(Point of Departure)

- 결국 in vitro 또는 in silico로 동물-인체 예측이거나 인체 in vitro 및 in silico 자료를 통하여 인체 대한 독성 및 동태학적 지표의 예측이 요구됨

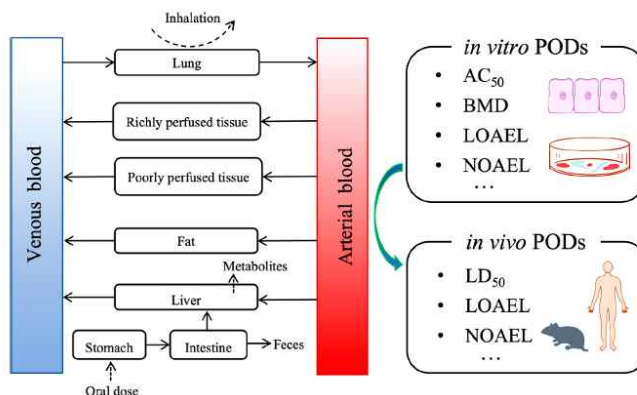
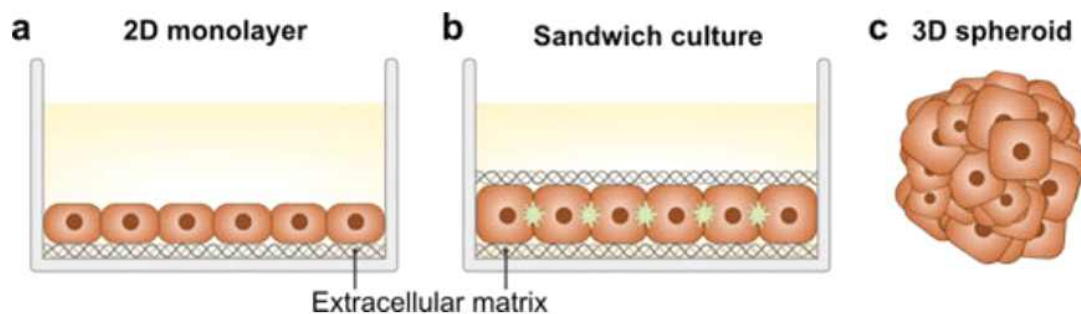


Figure 5. 생체 내 독성 예측을 위한 PBTK 모델 기반 IVIVE 개념도. POD: point of departure. AC₅₀ Review: activity concentration at 50% of maximal activity. BMD: benchmark dose. NOAEL: no observed adverse effect level. LD₅₀: lathal dose fo 50% death

2. 예측을 위한 in vitro system 비교

2-1. 2D monolayer vs Sandwich culture vs 3D spheroid

- 인간 간-관련성 시스템의 비교:** 현재의 전임상 모델은 인간에서의 간독성 및 DILI을 제대로 예측하지 못함. 동물 모델의 종간 차이와 기존 간 세포 배양의 제한된 생체 내 관련 생리학으로 인해 임상 적용성이 떨어지며 아래 <표-1>에서 확인할 수 있음. 인간 간 칩은 3차원 다세포 구조 및 혈관 흐름과 같은 핵심 미세환경 특성을 통해 인체 내 간 생리 기능을 충실히 재현함. 이러한 특성 덕분에 인체의 liver chip은 <그림-1>에처서럼 기존의 샌드위치 배양(Sandwich-Cultured Hepatocytes), 구상체(spheroid: 3D spheroid cultures of primary human hepatocytes 또는 organoid), 동물 모델과 비교하여 인간 간을 더 적절히 모델링할 수 있는 인간 관련성이 높은 간 모델을 제공함(Emulate | Organ-Chips for Research & Development, 2025). 구체적으로 <그림-1>의 (a)는 간세포를 ECM 단백질로 코팅된 표면에 배양하는 전통적인 2차원 단층 배양, (b)는 세포 상부에 두 번째 ECM 층을 추가하는 샌드위치 구조, (c) 간세포가 응집하여 소형 구상 미세조직을 형성하는 3차원 구상 배양체임(Ölander, 2019)



<그림-1> 인간 간세포를 이용한 간 내 약물 분포 및 독성 연구를 위한 배양 구조 예시.

2-2) 3D spheroid vs Organoid

- Spheroid vs organoid의 차이: 스피로이드와 오가노이드는 다수의 세포로 구성된 3차원 구조체임. 그러나 <표-1>과 같이 각각 3차원 세포 연구에 유용하지만, 생성 방식이 달라 활용 방식도 다름(Londoño-Berrio 등, 2022).
- ① **Spheroid**는 종양 조직, 배아유사체, 간세포, 신경 조직, 유선 조직 등 **다양한 세포의 단순한 집합체**임. 3차원 배양을 형성하기 위해 **지지대(scaffold)가 필요하지 않으며**, 단순히 서로 달라붙어 형성됨. 그러나 스피로이드는 자가 조립이나 재생 능력이 없어 오가노이드만큼 진보된 형태는 아님
- ② **Organoid**: 위, 간, 방광과 같은 장기 특이적 세포들의 복잡한 집합체임. 이들은 줄기세포나 전구세포로 만들어지며, 코닝® 매트리지엘® 매트릭스나 **콜라겐과 같은 지지대 역할을 하는 세포외 환경이 주어진다면 자가 조립**됨. 이 과정에서 오가노이드는 3차원 연구에 활용 가능한 모 장기의 미세 버전으로 성장함.

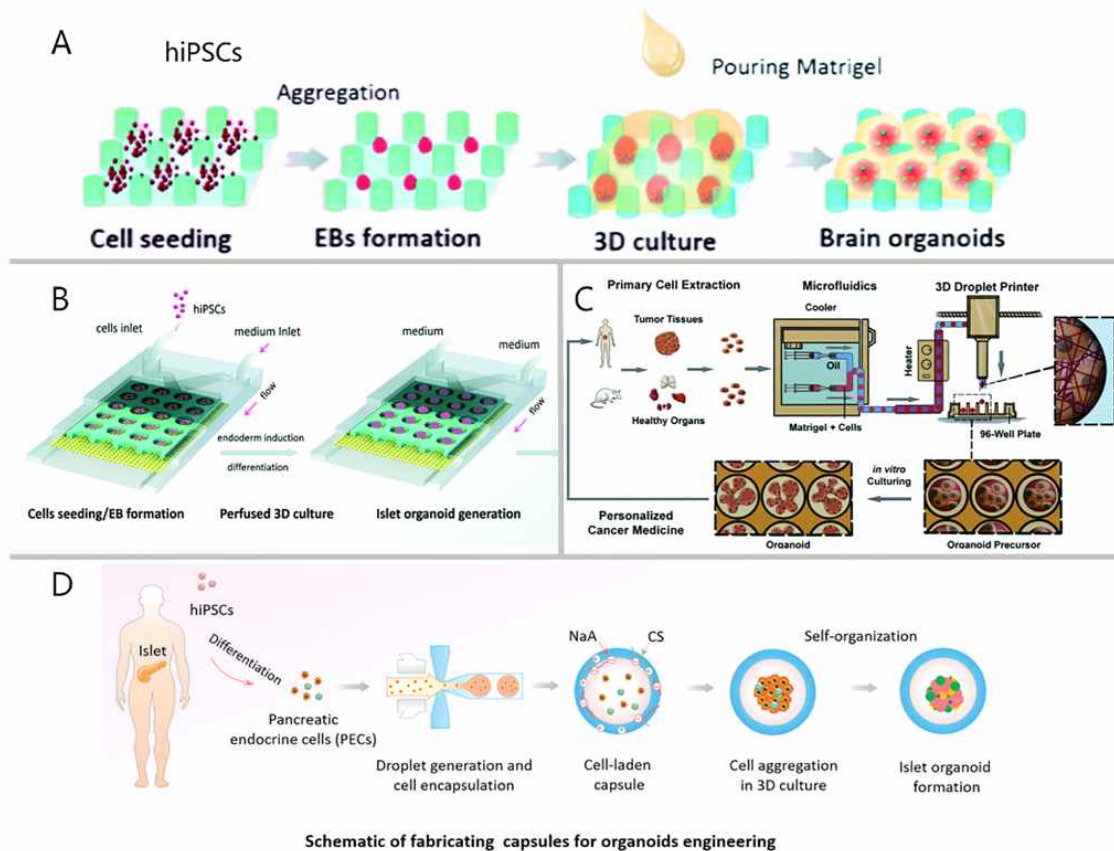
<표-1> Spheroid와 Organoid의 차이

	SPHEROID	ORGANOID AND TUMOROID
		
Complexity	It is made up of a single type of cells, they do not have multicellular identity.	Made up of multiple differentiated cells that mimic the organ or tumor of origin.
Organization	Organized cell-to-cell adhesion in 3D, with physicochemical properties similar to the tissue they represent.	Its complex organization leads to form an ordered structure in 3D
Origin	Primary cultures or immortalized cell lines	Embryonic stem cells, somatic adult stem cells and induced pluripotent stem cells,
Applications	Drug and biomarker discovery	High clinical relevance: drug and biomarker discovery, testing combinations of drugs, and for precision medicine

2-3) Organoid vs Organoid-on-a chip

- ① **Organoid:** 오가노이드 개발은 성인 줄기세포(adult stem cells) 또는 유도만능줄기세포(iPSC, induced pluripotent stem cells)와 같은 줄기세포의 자가조립 능력에 의존함. 특히 iPSC는 세포 다양성이 높아 복잡한 조직 모델 제작에 유리합니다. 이러한 줄기세포는 세포외 기질을 모방하고 구조적 지지를 제공하는 주로 Matrigel과 같은 젤 형태의 기질(gel-like matrix)에서 배양됨. 비부착성 마이크로웰 플레이트(Non-adherent microwell plates)와 팁 끝에 샘플 방울을 매달아 배양하는 행잉 드롭 배양법(hanging drop cultures)도 3차원 성장을 촉진하기 위해 사용됨. 오가노이드 배양 환경은 장기 유형에 맞춰 특정 배지 조제법이 필요하며, 세포 분화를 돕기 위해 종종 여러 성장 인자와 신호억제제를 포함함. 이러한 정교한 설정 덕분에 오가노이드는 상피층, 선 구조, 신경망과 같은 조직 특이적 특징을 발달시킬 수 있음.
- 체외에서 오가노이드를 생성하기 위해 세 가지 주요 기법이 채택됨. 첫 번째이자 가장 간단한 방법은 Matrigel이나 콜라겐 젤과 같은 생체 적합성이 높은 물질로 구성된 세포외 기질(ECM) 스캐폴드임(Patel 등, 2021). 두 번째 전략은 주로 체외 인간 신경 세포 성장 조건을 조성하기 위한 회전식 생물반응기를 이용한 배아줄기세포(ESC, embryonic stem cells) 또는 유도만능줄기세포(iPSC, induced pluripotent stem cells) 배양임(DiStefano 등, 2021). 세 번째 접근법인 공기-액체 계면(ALI)은 주로 위장관 오가노이드 구축에 활용됨(Li 등, 2016). <Fig. 2>는 오가노이드 배양 효율을 개선하기 위해 미세유출

(microfluidics)를 이용하여 제작한 오가노이드임. 특히 <Fig. 2>의 B) 배아체 형성, 신경상피 유도 및 신경상피 확장 포함한 마이크로필러(극미세기둥구조물) 기반 뇌 오가노이드 제작법(Micropillar-based method for brain organoids)임(Li 등, 2023).

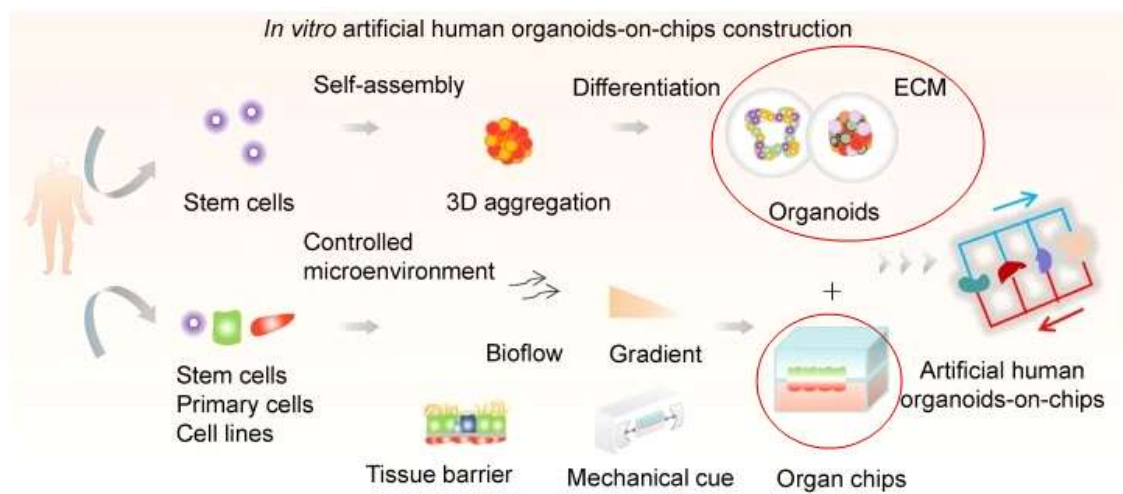


<Fig 2>는 미세유출(microfluidics)을 이용한 오가노이드 배양 효율 개선. (a) 배아체(embryoid body, EBs) 형성, 신경상피 유도 및 신경상피 확장을 포함한 뇌 오가노이드용 마이크로필러 기반 방법. (b) 관류 조건에서 hiPSC의 칩 상 섬유소 오가노이드 현장 분화 (c) 액적(droplet) 마이크로유체학을 이용한 중양 오가노이드의 자동화 배양. (d) 액적 미세유체 기술을 이용한 hiPSC 유래 섬(islet) 오가노이드의 대량 생산.

- ② **Organoid-on-a chip**(칩 위의 오가노이드): 칩 위의 오가노이드 개념은 <Fig. 1>에서처럼 기존 오가노이드 및 장기-온-어-칩 시스템의 한계를 극복하는 획기적인 접근법을 제시함. 오가노이드를 미세유체 플랫폼에 통합함으로써 연구자들은 **조절된 관류, 기계적 자극, 생화학적 농도 구배**를 갖춘 **생리학적으로 더 관련성 높은 미세환경**을 제공할 수 있음. 이러한 통합을 통해 **혈관 조직**과 같은 장기 특이적 기능을 더 잘 모델링할 수 있으며, 동적 환경에서 **장기 간 상호작용** 연구를 용이하게 함. 칩 상의 오가노이드 플랫폼은 높은 재현성, 향상된 확장성, 복잡한 생리학적 과정 포착 능력을 제공함으로써 약물 시험 및 질병 연구를 혁신할 준비가 되어 있음. 이러한 하이브리드 시스템의 개발은 인간 장기를 밀접하게 모방하는 체외 모델 구축에 있어 중요한 진전을 의미하며, 맞춤형 및 정밀 의학 실현에 한 걸음 더 다가서게 할 것임.

- 일반적으로 오가노이드-온-어-칩의 구축은 표적 장기의 단순화된 분석 설계 원칙을 따르며 <Figure 1>에서처럼 다음은 개략적 개발의 수순임(Li 등, 2023).

- ① 표적 장기의 해부학적 구조를 이해
- ② 특이적인 세포 유형 및 장기 특이적 미세환경과 같은 핵심 생물학적 특징을 식별
- ③ 미세유체 채널(microfluidic channel)과 조직 구획이 마이크로 디바이스에 통합되어 오가노이드에 영양분을 공급하고 세포 대사 폐기물을 제거함.



<Fig. 1> Human organoid-on-chips for biomedical research and applications(Wang 등, 2024)

3. 마이크로유체 기술을 기반으로 한 장기-온-어-칩(Organ-on a chip)

3-1) Organ-on-a chip에 대한 이해

- **장기 칩**(Organ on a chip, OoC)은 전자회로가 놓인 칩 위에 살아있는 특정 장기를 구성하는 세포를 배양함으로써, 해당 장기의 기능과 특성뿐만 아니라, 역학적, 생리적 세포반응을 모방하는 기술임. 특정 장기의 세포운동이나 물리 화학적 반응의 메커니즘을 상세하게 연구할 수 있고, 또 신약개발이나, 독성평가에 대한 모델로서 이용될 것으로 기대받고 있는 소재임.
- 전자회로는 장기 칩의 종류에 따라 역할이 다르지만, 공통적으로 장기내부의 모세혈관을 모방해주는 역할과, physiological response를 sensing하여 데이터로 표출하는 역할을 수행함. 예를 들어 폐칩(Lung on a chip)에서는 media fluid system으로 체액과 공기의 흐름을 전자회로를 이용하여 체내를 모방하고 눈 칩(Eye on a chip)에서는 세포 종류 별로 구획화 하면서, 인공눈물을 정기적으로 공급하는데 전자회로가 이용됨.

3-2) 마이크로유체 칩 개념과 2D·3D와 비교

- 마이크로유체(미세유체) 기술을 기반으로 한 장기-온-어-칩(microfluidic chip technology for Organ-On-A-Chip, OoC)을 약어로 **마이크로유체 칩(microfluidic chip)**이라고 하며 혁신적인 in vitro 분석법 개발에서 기존 기술을 뛰어넘는 중대한 진보를 의미함.
- 조직 공학과 결합될 때, 이러한 칩은 다양한 인간 조직 및 장기의 생리학적 기능성을 모사할 수 있는 고도로 전문화된 도구인 OoC 장치로 진화하였음. OoC 장치는 표적 장기를 대표하는 생물학적 구성 요소와 혈류를 모방하는 마이크로유체 구성 요소를 통합한 첨단 기술임. 이와 같은 구성 요소의 통합을 통해 마이크로유체 칩은 미세 채널을 통해 유체를 미세 규모 수준에서 정밀하게 제어하는 특수 장치로, 물리적 및 화학적 조건의 재현을 가능하게 함. 즉 재현 불가능한 시스템의 완전한 관찰 및 제어라는 장점을 지님 (Farhang 등 2024)
- 그 결과, Fig. 4에서처럼 in vitro 연구를 위한 새로운 마이크로유체 모델은 **기존의 2D 및 3D 정적 세포 배양의 한계를 극복**하여, 신약의 효능, 안전성, 약력학 및 약동학에 대한 보다 신속한 임상 적용과 보다 정확한 예측을 가능하게 함(Ying-Jin 등, 2025). 예를 들어 신약 개발은 약물 화합물의 합성과 이후 복잡한 체외 및 생체 내 시험을 통한 효능 평가를 포함하는데, 기존 기술은 일반적으로 살아있는 인체로 이식되었을 때 발생할 반응을 정확히 반영하지 못함.

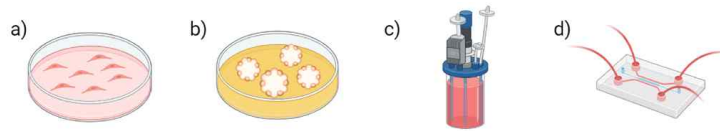


Fig. 4. 다양한 세포 배양 방법의 표현. a) 단일층 세포를 이용한 2차원 세포 배양. b) 오가노이드를 이용한 정적 3차원 세포 배양. c) 세포 배양/오가노이드를 위한 DASbox(병렬 작동) 바이오리액터. d) 보다 생리적인 세포 미세환경을 모사하는 동적 유동과 연결된 장기-온-칩.

- Table 1에서처럼 기존의 2차원 세포 배양은 살아있는 장기에서 세포가 경험하는 3차원 구조, 기계적 특성 및 생화학적 미세 환경을 모방할 수 없는 반면, 정적 3차원 세포 배양은 이러한 한계 중 일부를 극복할 수 있음(Ying-Jin 등, 2025).

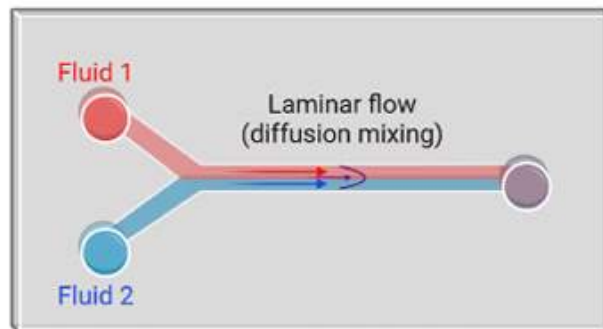
Table 1 Advantages and disadvantages of different cell culture methods.		
Cell Culture Methods	Advantages	Disadvantages
2D cell culture (Petri dishes)	<ul style="list-style-type: none"> Well established protocols Easy to manage and quantify Cost-effective Faster production speed High feasibility Easy analysis 	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneous cell layer No cell-cell and cell-ECM interactions No 3D tissue structure Uniformity of nutrients and compounds Low biological relevance
3D cell culture (Organoids)	<ul style="list-style-type: none"> High resemblance to <i>in vivo</i> conditions Self-organization in different cell types Solubility gradient Increased physiological relevance Higher physiological relevance (size and shape similar to <i>in vivo</i> cases) 	<ul style="list-style-type: none"> Lack of fluid flow perfusion and diffusion leading to internal cell death Absence of immune cells Static conditions No control over cell structure Impossible to separate cells Limited observation and control High variability Low <i>in vivo</i> relevance High sample volume High cost
Microfluidic chips (Organ-on-chip)	<ul style="list-style-type: none"> Different cell types Control of cell structure and cell maturation Increased precision and control over the microenvironment Vascularization Gradient diffusion of nutrients and drugs Control of temporal and spatial activity Low sample volume Easy integration with sensors and mechanical stimulation Real-time analysis Low variability and high <i>in vivo</i> relevance Customised device 	<ul style="list-style-type: none"> Non-standard protocols Increased cost and difficulty in manufacturing Complex design Bubble formation or clogging of channels by cells

- 미세유체학 기반 세포 배양 플랫폼의 개발은 생체 미세환경의 동적, 물리화학적, 생화학적, 미세구조적 특성을 더욱 정밀하게 재현하여 생체 장기 기능을 더 잘 모방할 수 있게 함. 이러한 미세유체 장치의 사용은 약물 합성 및 유통부터 약물 평가에 이르기까지 전체 약물 개발 과정을 개선하여 기존 방법에 비해 전임상 연구의 비용과 시간을 절감할 수 있음.

3-3) 마이크로유체 칩(Microfluidic chips)의 미세 채널과 제조공정

3-3-1) 마이크로 채널의 특성

- 마이크로유체 칩은 미세 채널을 통해 흐르는 극소량의 유체를 정밀하게 활용하고 제어하는 기술 장치(Wu 등, 2020). 마이크로미터 단위 규모에서 작동함으로써 층류 조건, 빠른 확산, 신속한 열전달, 높은 상대 표면적을 유리하게 함. 이러한 특성 덕분에 마이크로유체 칩의 응용 분야는 에너지 수확, 분석 생화학, 세포 분리, 분자 생물학 등으로 확장됨(Gale 등, 2018).
- <Fig. 1>에서처럼 채널 직경의 소형화와 층류는 **병렬 유체 흐름과 확산 혼합을 가능하게 하여 분자의 공간적·시간적 활동 제어력을 향상시킴**. 이러한 마이크로유체 시스템의 높은 표면적 대 부피 비율은 중력과 관성력이 무시할 수 있을 정도로 작고 표면 장력이 우세함을 의미함. 이러한 특징은 적은 시료량으로 충분하며, 휴대성이 우수하고, 여러 동시 및 병렬 분석과 신속한 검사가 가능하다는 장점을 제공함. 또한 이러한 마이크로유체 칩은 시료 전처리, 반응, 분리, 검출 등 다양한 화학 합성 수행에 활용될 수 있음.



<Fig. 1> 마이크로유체 칩 상의 층류. 두 유체의 혼합은 확산에 의해 점진적으로 발생함.

3-3-2) 칩의 구조와 조직 공학 재료

① **칩의 구조:** 마이크로유체 칩 제조 공정에서는 장치에 견고하고 신뢰할 수 있는 구조를 제공할 수 있는 재료를 선호. 초기에는 안정성과 내구성 때문에 실리콘과 유리가 기본 구조 제작에 사용되었으나, 복잡한 생산 공정과 높은 비용으로 인해 사용이 제한될 수 있음. 이후 액체 유리, 폴리머, 종이, 하이드로겔 등 다른 재료들이 개발되었음. 그러나 고강성과 비용 효율성으로 인해 현재 폴리머(polymer)가 가장 널리 사용되는 소재임. 제조할 칩의 특성에 따라 다양한 유형의 폴리머를 사용할 수 있음(Ruihua Dong 등, 2019; Ren 등, 2013)

- 탄성 중합체(elastomeric polymers)
- 열가소성 중합체(thermoplastic polymers)

② **조직 공학(tissue engineering)의 재료:** OoC 시스템에서 조직 형성 과정에서는 세포 배양과 함께 조직의 생체 내 구조를 제공하는 세포외 기질(ECM, extracellular matrix)의 발달을 촉진하는 것이 필수적임. 이를 위해 복제 대상 조직에 맞춤형된 다양한 임시구조물(scaffold)이 설계되어 왔음. 이상적으로 이러한 스캐폴드는 세포와 생체적합성을 가지며, 생리적 환경을 재현하는 데 필요한 기계적 특성을 지녀야 하고, 자연적 ECM으로 대체될 수 있도록 생

분해성이 있어야 함. 따라서 최적의 스캐폴드 특성을 달성하기 위해서는 적절한 생체재료 선택이 중요하며 조직 공학용 스캐폴드 제작에는 천연 및 합성 고분자 등 다음과 같이 3가지 재료가 사용됨(Os'orio 등, 2023).

- 천연 생체재료(natural biomaterials)
- 합성 생체재료(synthetic biomaterials)
- 하이브리드 생체재료(hybrid biomaterials)

③ **OoC의 제조 방법(fabrication methods of OoC):** OoC에는 응용 분야와 선택된 생체재료에 따라 다양한 미세 제조 기술이 활용되어 왔음. 선택된 방법은 칩의 요구되는 기하학적 구조와 치수를 고려해야 할 뿐만 아니라 최적의 유동 제어, 마이크로유체 채널 막힘 최소화, 칩 내 통합 센서를 통한 특정 분자 모니터링을 가능하게 해야 함(Tajeddin 등, 2021). 칩 미세구조 제조에는 다양한 기술이 존재하며, 가장 흔히 사용되는 방법은 소프트 리소그래피, 핫 엠보싱, 사출 성형 및 3D 프린팅 등 4가지가 있음.

- 소프트 리소그래피(Soft lithography)
- 핫 엠보싱(Hot embossing)
- 사출 성형(Injection molding)
- 3D 프린팅(3D printing)

3-4) 다양한 조직 모델에서의 OoC 적용(Applications of OoC in different tissue models)

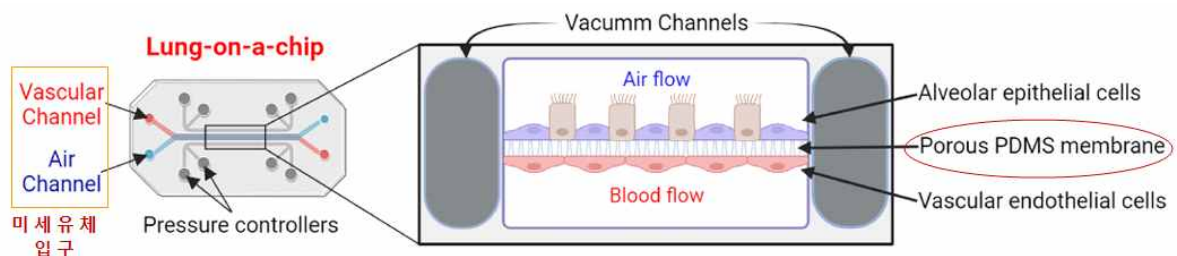
- OoC 시스템은 모델링하는 장기에 따라 분류될 수 있으며, 연구 대상인 특정 질환에 따라 추가로 세분화됨. **OoC 기술의 주요 목표는 생체 내 생리적 조건을 밀접하게 모방한 미세환경에서 표적 장기를 재현하여 보다 쉽고 효율적인 처리가 가능하도록 하는 것임.** 이를 통해 장기와 조직이 다양한 내외부 요인에 노출되었을 때 나타낼 수 있는 다양한 행동 양상을 연구할 수 있음.
- 결과적으로 OoC 시스템은 **표현하는 장기와 특정 응용 분야에 따라 지속적으로 설계 및 개선되고 있음.** Table 2에는 다양한 조직을 모방하는 OoC에 관한 정보가 요약되어 있음(Ying-Jin 등, 2025). 또한 이러한 시스템은 인간 유도 만능 줄기세포(iPSC, induced pluripotent stem cells)를 활용하여 특정 환자 집단에 맞춤형된 개인 맞춤형 의학 개발을 용이하게 함(Cao 등, 2023). 주목할 만한 사례로는 맞춤형 세포 면역치료법의 개발 및 평가가 있으며, 여기서 환자 유래 종양 세포를 포함한 3D 프린팅 OoC를 활용하여 면역치료제에 대한 림프구 반응을 실시간으로 모니터링함(Beckwith 등, 2019).

Table 2 Summary of OoC models.

Organ	Tissue Mimicking Type	Most commonly used cells	Most commonly used Materials	Applications
Bone	Osteogenic tissue	Osteoblasts, Osteoclasts, Endothelial cells	PDMS, Hydrogels (Collagen, Alginate)	Bone formation, Drug testing, Osteoporosis studies, bone metastasis
Musculoskeletal	Muscle-tendon interface	Myocytes, Fibroblasts, Tendon cells	PDMS, Gelatin, Collagen, Gelatin methacrylate (GelMA)	Muscle repair, muscular dystrophy, tendon regeneration
Blood Brain Barrier	Endothelial barrier	Human Brain Endothelial cells, Astrocytes, pericytes	PDMS, ECM proteins	Drug penetration, BBB permeability, Disease modeling, cell migration and metastasis, infection brain models
Kidney	Glomerular, Tubular tissue	Podocytes, Tubular epithelial cells, glomerular endothelial cells,	PDMS, Collagen, Alginate	Kidney filtration, Toxicology studies, Drug screening, cancer models
Gut	Intestinal epithelium	Intestinal epithelial cells, Goblet cells	PDMS, Matrigel, Collagen, intestinal mucus model (I-Bac3Gels)	Gut absorption, Microbiome studies, Disease modeling, cancer, allergies
Blood Vessels	Vascular endothelium	Endothelial cells (eg. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)), Smooth muscle cells	PDMS, Collagen, Alginate	Vascular disease modeling, angiogenesis, atherosclerosis, Drug testing, ischemia, reperfusion
Lung	Alveolar epithelium	Alveolar epithelial cells, Endothelial cells	PDMS, Gelatin, Collagen, lung proteins, extracellular matrix F127-DA hydrogel membrane	Lung function, Airway diseases, Inhalation toxicology
Liver	Hepatic tissue	Hepatocytes, Kupffer cells, Endothelial cells	PDMS, Matrigel, Collagen	Drug metabolism, Liver toxicity, Disease modeling
Skin	Epidermal layer	Keratinocytes, Fibroblasts, Melanocytes	PDMS, Collagen, Hydrogel	Skin permeability, Drug testing, Disease modeling, wound healing, aging
Body-on-a-Chip	Multi-organ integration	Various primary cells, Stem cells	PDMS, Gelatin, Collagen, Hydrogels	Multi-organ toxicity screening, Drug development

3-5) 마이크로유체 칩의 예시: Lung-on-a-chip 구축을 위한 단순화된 기본 폐 구조

- 가장 잘 알려진 체외장기는 폐-온-어-칩(lung-on-a-chip)으로, 인간 폐의 기능적 폐포-모세혈관 환경을 재현하도록 설계된 장치이임. 폐 다층 OoC는 콜라겐이나 피브로넥틴과 같은 ECM 단백질로 코팅된 다공성, 유연하고 얇은($\approx 10 \mu\text{m}$) PDMS(Polydimethylsiloxane) 막으로 분리된 두 개의 평행한 미세 채널을 가진 미세 유체 시스템을 특징으로 함(Liu 등, 2021). 이 모델에서는 폐포 상피 세포가 가스 채널과 접촉하는 막의 상부 표면에 배양되는 반면, 혈관 내피 세포는 혈액을 모방한 배양 배지가 흐르는 혈관 채널에 인접한 하부 표면에 배양됨. 또한, 이 장치는 채널 양측에 주기적인 압력 변화를 가하여 막이 팽창 및 수축하도록 함으로써 생리적 호흡 운동을 모방함(Fig. 5)(Kimura 등, 2018).
- 이 모델은 폐의 생리적 및 병리적 미세환경을 재현할 뿐만 아니라, 폐 염증(천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐부종), 폐섬유증, 폐암, 폐혈전증, 폐 감염, 폐 손상 등 다양한 질환 모델에 대한 체외 연구를 통해 효과적인 치료법과 진단 바이오마커를 식별하는 데 활용될 수 있음(Francis 등, 2022; Li 등, 2019). 일부 연구에서는 기도 채널을 통한 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) 노출에 대한 염증 반응을 조사(Barkal 등, 2017), IL-13 관류법을 이용한 천식 모델링(Nesmith 등, 2014), 환자 유래 세포를 직접 사용하여 COPD를 표현(Benam 등, 2016).



<Fig. 5> Lung-on-a-chip 구축을 위한 단순화된 기본 폐 구조.

- 그러나 이 폐 모델은 유연하고 초박형의 다공성 PDMS 막 제조의 어려움과, 임상시험에서 약물 효능 결과에 영향을 미칠 수 있는 소분자 흡착 성향 등 몇 가지 한계가 있음(Li 등, 2022). PDMS의 대안으로 부드러운 콜라겐-엘라스틴(CE) 막을 사용할 수 있는데, 이는 흡착이 적고 우수한 광학적 특성, 생분해성 및 신축성을 제공하여 생물학적 막과 더 유사함(Zamprognio 등, 2021). 다른 단점으로는 전체 장기를 재현할 수 없다는 점과 연구의 가용성과 특정 목표에 따라 적절한 세포 유형을 선택하기 어렵다는 점이 있음(Francis 등, 2019).
- 이러한 한계에도 불구하고, 이 OoC 모델은 장 연동 운동을 시뮬레이션하기 위해 유사한 접근법을 사용하는 장-온-어-칩(Gut-on-a-Chip)과 같은 다른 유형의 OoC 개발을 위한 가치 있는 기반 역할을 함. 또한 이러한 모델들은 PLGA 나노섬유 막 및 미세다공성 실리콘 막과 같은 폐 칩 구축을 위한 대체 생체재료의 발전과 적용에 기여함(Li 등, 2019).

3-6) Body-on-a-chip (BoC)

3-6-1) 인체내-장기-모사체의 개념

- 낭포성 섬유증이나 당뇨병과 같은 전신성 질환, 병리생리학적 과정 및 약리학적 효과는 여러 장기를 관여시키므로 서로 다른 유형의 OoC를 사용하여 개별적으로 연구할 수 없음(van Berlo 등, 2021). **Body-on-a-chip**(BoC, 인체내-장기-모사체)는 체외 모델을 사용하여 서로 다른 장기 간의 상호작용을 표현하도록 제안되었으며, 다양한 전신 질환 모델과 약물 투여 경로와 관련된 ADME(흡수, 분포, 대사 및 배설) 과정과 같은 약동학 과정을 분석하고 **약물 효능 및 독성**을 예측할 수 있게 함(Kimura 등, 2018). BoC를 사용하면 장(GUT)에서의 약물 흡수, 간에서의 대사, 신장에서의 배설을 종합적으로 고려하여 약물의 약동학 프로파일을 완전히 조사할 수 있음(Sung 등, 2018).
- BoC는 환자 특이적 세포를 사용하여 모델을 재현할 경우, 약물 스크리닝, 질병 모델링 및 맞춤형 의학에 적용될 수 있음. Fig. 12에서처럼 BoC는 채널로 연결되거나 단일 칩 상에서 서로 다른 장기의 공동 배양을 통해 연결된 두 개 이상의 OoC로 구성된 다중 장기 온 칩 플랫폼임. 이 모델은 일반적으로 관심 대상 표적 장기(예: 종양, 염증), 약물 대사와 배설에 관여하는 장기(예: 간, 신장), 그리고 독성이 발생할 수 있는 장기를 포함함(Vunjak-Novakovic 등, 2021).

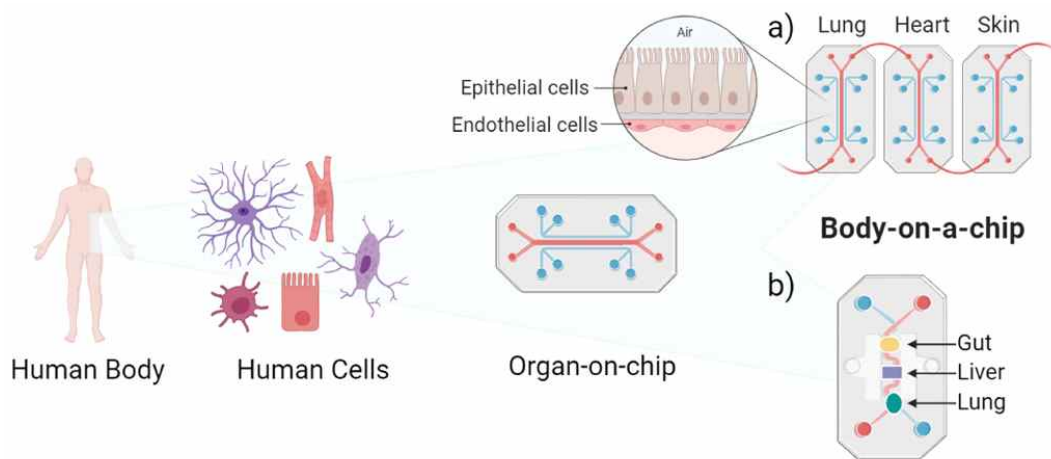


Fig 12. 바디-온-어-칩(Body-on-a-chip)의 개발 과정. 주요 내용: a) 다중 OoC의 연결; b) 단일 칩 내 다양한 장기의 결합.

3-6-2) Body-on-a-chip (BoC)의 보완 필요성

- BoC 모델들은 치료법이나 환경적 요인이 신체 전체에 미치는 영향을 보다 종합적으로 파악할 수 있게 해주므로, 신약 개발, 질병 모델링 및 맞춤형 의료 분야에서 큰 가능성을 지님. 그러나 BoC 시스템에 신경 분포와 혈관 조직을 통합하는 것은 이러한 모델들이 완전한 잠재력을 발휘하기 위해 반드시 해결해야 할 중대한 과제를 다음과 같이 제기됨 (Fig. 13).

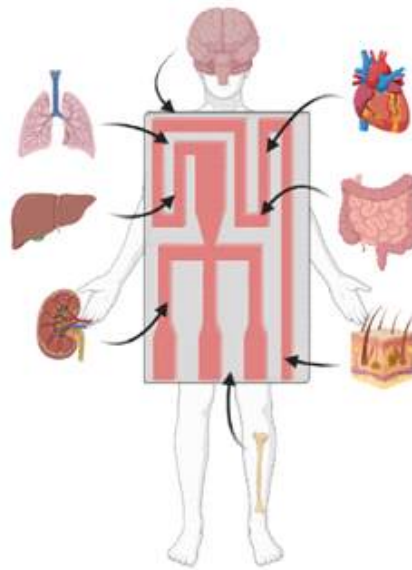


Fig. 13. Schematic representation of a Body-on-a-chip.

- ① **영양분과 성장 인자 등의 장기에 적절한 미세환경:** BoC 설정을 위해 BoC의 서로 다른 구성 요소 사이를 순환할 공통 배지가 선택되며, 서로 다른 세포들은 기능성을 유지해야 함. 그러나 각 조직마다 영양분과 성장 인자에 대한 요구 사항이 다르기 때문에 공통 배지 사용은 어려움이 있음. 이는 표현형 변화, 연결부에서의 기포 및 누출, 오염 위험 증가로 이어질 수 있음(Li, 등, 2020). 반면, 장치를 제작하는 데 사용되는 생체재료는 다양한 세포 유형에 맞게 미세환경을 조정하고, 장치 내부 표면에 화학 물질이 흡착 및 흡수되어 실험 결과를 왜곡하는 것을 방지하기 위해 신중하게 선택의 필요성이 있음. 또한 유체 전단 응력, 장기 크기 스케일링, 유체 속도, 배지 내 세포 부피와 유체의 균형을 고려하여 최대한 생리학적 모방 효과를 달성하는 것이 중요함(Crunkhorn 등, 2019).
- ② **기능적 연결을 구축하는 복잡성을 극복하는 미세환경(pH, 산소 수준, 영양분 농도 구배 등):** 신경 조직과 혈관 조직을 BoC 시스템에 통합할 때 가장 복잡한 문제 중 하나는 서로 다른 조직 유형 간의 연결과 기능적 소통임. 생체 내에서 조직들은 고립되어 있지 않고 혈관, 신경, 신호 전달 경로의 복잡한 네트워크를 통해 상호 연결되어 있음. BoC 시스템에서는 조직들 간에 적절한 생리적 상호작용이 가능하도록 이러한 연결을 재현하는 것이 과제임(Park 등, 2020). 예를 들어, 심장, 장, 피부와 같은 장기의 신경 분포는 기능 조절에 매우 중요하지만, 이러한 연결을 체외에서 재현하는 것은 극히 어려움. 신경망은 미세유체 채널에 신중하게 통합되어 신경세포와 표적 조직 간 정확한 신호 전달을 보장해야 함. 신경세포는 전기적 자극과 화학적 신호를 통해 다양한 신체 기능을 조절하는 복잡한 상호 연결 시스템의 일부임. 도전은 기능하는 신경망 구축뿐만 아니라 신경계와 그 신경이 분포하는 조직 사이의 전기적/화학적 신호 전달이 정확히 재현되도록 하는 데에도 있음. 예를 들어, 심장-온-어-칩 모델에서 적절한 신경 분포는 심장 조직의 리드미컬한 수축을 조절하는 데 필수적임. 마찬가지로, 장-온-어-칩 모델에서 자율신경계는 운동성과 분비 조절에 중요한 역할을 함. 이러한 기능적 연결을 구축하는 복잡성은 칩 내 미

세환경(pH, 산소 수준, 영양분 농도 구배 등)을 제어해야 하는 필요성으로 인해 더욱 가중됨. 이러한 요소들은 신경 조직과 혈관 조직 모두의 활동에 영향을 미칠 수 있음.

- ③ **혈관과 적절한 미세유체 흐름과 미세환경:** 장기의 혈관화는 영양분과 산소 수송 및 대사 폐기물 제거에 필수적임. 기능적인 혈관이 없으면, BoC 시스템 내 조직은 빠르게 필수 자원을 상실하게 되어 세포 사멸과 모델 실패로 이어짐(Aazmi 등, 2022). OoC 플랫폼 내에서 기능적 혈관 네트워크를 구현하는 것은 가장 어려운 과제 중 하나로 입증되었음. 단순한 모세관 유사 구조 생성에는 일부 진전이 있었지만, 생체 내 혈액의 역동적 흐름을 재현하는 완전 기능적이며 관류 가능한 혈관 네트워크는 여전히 달성하기 어려움. 혈관 시스템을 통한 유체 흐름은 적절한 압력을 유지하기 위해 세심하게 제어되어야 하며, 이는 소규모 미세유체 시스템에서 특히 어려움. 유체 흐름으로 인해 발생하는 내부 압력은 신중하게 조절되지 않을 경우, 조직 변형을 유발하거나 섬세한 미세혈관 네트워크를 붕괴시킬 수 있음. 더욱이 혈관과 주변 조직 간의 상호작용은 전단 응력, 압력 구배, 화학적 신호 전달의 균형을 요구하는 매우 복잡한 과정으로, 마이크로유체 환경에서 재현하기 어려움.
- ④ **마이크로유체 채널 내에서 신경 시냅스의 무결성과 축삭 성장 유지의 미세환경:** 마이크로유체 칩 내에서 이러한 조직의 장기 생존성을 유지하는 것은 또 다른 도전 과제임. 신경 및 혈관 조직은 다른 조직 유형과 비교해 성장 및 유지 관리 요구 사항이 다르며, 정적 또는 동적 마이크로유체 환경에서 장기간 생존성과 기능성을 보장하는 것은 어려움. 신경 조직은 특정 성장 인자가 필요하며, 마이크로유체 채널 내에서 신경 시냅스의 무결성과 축삭 성장을 유지하는 것은 상당한 장애물임. 반면 혈관 조직은 기능을 유지하기 위해 혈액 유사 유체의 지속적인 관류가 필요하며, 유체 역학의 어떠한 교란도 시스템 안정성을 빠르게 저해할 수 있음(Leung 등, 2022).
- ⑤ **프로토콜 표준화, 재현성, 시스템 검증과 관련된 문제에 대한 해결:** 산업적 응용을 위한 고처리량 스크리닝을 위해 이러한 복잡한 모델을 확장하는 것은 여전히 상당한 도전 과제임. 연구 목적상 칩 위의 소형 분리 조직 모델은 가능하지만, 특히 신경 및 혈관 구성 요소를 포함한 다중 조직 유형의 통합은 신중한 설계와 정밀한 공학이 필요함. 다중 조직 층 전반에 걸쳐 일관된 유체 흐름, 영양분 공급 및 노폐물 제거를 유지하는 복잡성으로 인해 상업적 사용을 위한 시스템 확장은 매우 어려움. 또한 프로토콜 표준화, 재현성, 시스템 검증과 관련된 문제들은 약물 개발 및 임상 적용에서 BoC 시스템의 광범위한 채택을 가로막는 장벽임.

3-6-3) Body-on-a-chip (BoC)의 결론

- **결론:** 신경 분포 및 혈관 조직을 바디온어칩 모델에 통합하는 것은 생리학적으로 더 관련성 높고 포괄적인 체외 시스템을 창출하는 데 막대한 가능성을 지니지만, 도전 과제도 상당함. 이러한 과제를 극복하려면 기능적이고 재현 가능한 모델을 구축하기 위해 미세유체 공학, 조직 공학, 생체재료 과학 분야의 진전이 필요함. 완전히 통합된 BoC 시스템의 성공적 개발은 현재의 생체 내 모델에 비해 더 정확하고 확장 가능한 대안을 제공함으로써 약물 개발, 질병 모델링, 맞춤형 의학에 혁명을 일으킬 수 있음. 그러나 조직 연

결, 압력 조절, 장기 생존성 등의 문제를 해결하는 것이 이러한 시스템의 잠재력을 완전히 실현하는 데 필수적임.

4. Organoid vs Organoid-on-a chip vs Organ-on-a chip 장단점

4-1) 3가지 모델에 대한 장단점 비교

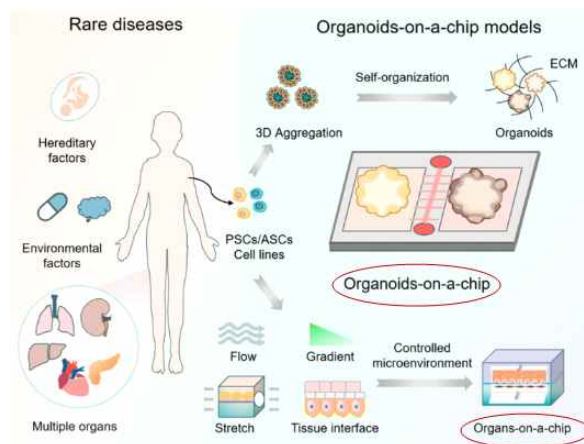
- <Table 1>은 오가노이드, 오가노이드-온어칩 그리고 장기-온어칩의 3 종류의 장단점을 비교분석한 것으로 **조직 장벽/경계면 연구** 그리고 세포-세포/기질/바이러스/약물 상호작용 연구에 있어서 장기-온어칩이 유리함. 반면에 공간의 제한과 유량의 측면에서 제한점이 있음.

<Table-1> Organoid vs Organoid-on-a chip(OrgOC) vs organ-on-a chip(OOC)

Models	Benefits	Limitations
Organoid	<ul style="list-style-type: none"> • 인체 장기 또는 조직의 고충실도 시뮬레이션 • 다양한 오가노이드로의 분화 • 세포 표현형 및 유전형의 장기적 보존 • 오믹스 분석 및 약물 스크리닝 • 신약 개발 및 치료법 지침 지원 • 다양한 연구에 적합 	<ul style="list-style-type: none"> • 생화학적/물리적 신호 제어 불량 • 복잡한 세포 미세환경 부재 • 동물 유래 매트릭스(예: Matrigel) 의존성 • 환자 유래 오가노이드의 낮은 성공률 • 환자 유래 종양 오가노이드의 이질성 • 개인 차이로 인한 불안정한 결과
OrgOC	<ul style="list-style-type: none"> • 복잡한 미세환경 구성 요소 통합 • 오가노이드의 높은 성숙도와 충실도 • 실시간 모니터링 및 현장 관찰 • 약물 시험/질병 모델링을 위한 동물 모델 대체 • 비용 효율적이고 시간 절약 • 전신 반응 및 장기 독성 예측 • 가속화된 오가노이드 간 소통/상호작용 • 정확한 약물 반응 예측 • in vitro와 in vivo 상태 간 격차 좁히기 	<ul style="list-style-type: none"> • 동일 조건 하에서 다중 오가노이드 구축의 어려움 • 장기 만성 질환 모사 과제 • 질환 상태에 대한 지도/평가 시스템 부재 • 오가노이드 형태/표현형 식별을 위한 AI/컴퓨터 시뮬레이션 필요 • 정의된 하이드로겔도 여전히 기존 재료 대체 불가 • PDMS 흡수 문제로 인한 약물 검출 정확도/정밀도 저하
OOC	<ul style="list-style-type: none"> • 생체 내(in vivo) 유사 미세환경 요소 • 장기 수준의 생리학적/병리학적 특징 재현 • 조직 장벽/경계면 연구 • 세포-세포/기질/바이러스/약물 상호작용 연구 • 실시간 영상 및 온라인 모니터링 • 다중 기술 통합 	<ul style="list-style-type: none"> • 낮은 처리량 • 공간당 제한된 세포 유형 • PDMS가 소수성 분자를 흡수함 • 상용화 기준이 없음 • 약물 스크리닝을 위한 낮은 유량

4-2) Organoid-on-a chip vs organ-on-a chip의 제작 측면에서 차이

- 성체 또는 다능성 줄기세포를 이용하여 인간 장기를 모방한 **3차원 조직 유사체**인 오가노이드(organoid) 통합을 통해 제작한 다중 오가노이드 모델을 직렬 또는 병렬로 구축하여 서로 다른 장기(예시: 간과 장) 간의 근본적인 상호작용을 연구하는 것이 오가노이드-온-칩(organoid-on-a chip, OrgOC). 반면에 전자회로가 놓인 칩 위에 살아있는 특정 장기를 구성하는 세포를 배양 또는 장기 사이 통합을 활용하여 상호 연결된 미세유체(microfluidic) 구획을 통해 장기 기능을 시뮬레이션하는 기술이 장기-온-칩(OoC, organ on a chip)임.



<그림-1> 다기능 줄기세포(PSC) 및 성체 줄기세포(ASC)를 이용하여 organoid-on-a chip과 organ-on-a-chip의 제작 상의 차이를 보여주는 묘사도

- Fig. 1은 생물학적 조직 및 장기의 생리적 미세환경을 시뮬레이션할 수 있는 생체모방 시스템의 구성을 보여주는 장기-온-칩(OoC) 장치의 묘사도임(Nayak 등, 2024). organoid-on-a chip이 서로 다른 오가노이드의 통합이 미세유체로 이루어지는 반면에 organ-on-a chip는 자연적 생리적 환경을 모방한 미세유체 환경에서 배양 및 세포외 기질은 정상적인 생리 기능에 필요한 구조적 지지와 생화학적 신호를 제공하는 측면에서 차이가 있음

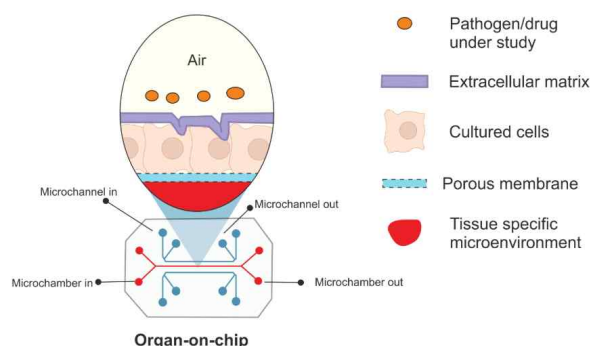


Fig. 1 An illustration of organ-on-chip simulating the biological microenvironment

4-3) In vitro 시스템과 동물모델과의 차이

- 현재의 전임상 모델은 인간에서의 간독성 및 DILI을 제대로 예측하지 못함. 동물 모델의 종간 차이와 기존 간 세포 배양의 제한된 생체 내 관련 생리학으로 인해 임상 적용성이 떨어지며 아래 <표-1>에서 확인할 수 있음. 인간 간 칩은 3차원 다세포 구조 및 혈관 흐름과 같은 핵심 미세환경 특성을 통해 인체 내 간 생리 기능을 충실히 재현함. 기존의 샌드위치 배양(Sandwich-Cultured Hepatocytes), 구상체(spheroid: 3D spheroid cultures of primary human hepatocytes 또는 organoid), 동물 모델과 비교하여 인간 간을 더 적절히 모델링할 수 있는 인간 관련성이 높은 간 모델을 제공함([Emulate | Organ-Chips for Research & Development](#), 2025)..

<표-1> 인간 간 칩, 기존의 샌드위치 배양, 구상체, 동물 모델과의 다양한 요소 비교 분석

Category	Feature	Liver-Chip	Sandwich Cultures	Spheroids	Animal Models
Human Relevance	Human Cells	Yes	Yes	Yes	No
	Physiologically Relevant Biomarkers & Morphology	+++	+	+	++
	Accurate Prediction of Human Hepatotoxicity	+++	-	++	+
Microenvironment Complexity	Multi-cellular Complexity	++	+	+	+++
	Vascular / Media Flow	Yes	No	No	Yes
	Tissue-specific ECM	Yes	No	No	Yes
Experimental Design	Tunable Dosing Parameters	++	++	++	+
	Duration of Experiment	++	-	++	+++
	Clinically Relevant Assays	+++	+	+	++
Convenience	Speed to Insight	++	+++	+++	+
	Ease of Learning Curve	++	+++	+++	+
	Cost-effectiveness	++	+++	+++	+

5. 장기-온-어-칩(Organ-On-A-Chip)의 규제, 승인된 기술 그리고 미래

5-1) 규제 과제

- 미국 식품의약국(FDA)과 유럽의약품청(EMA)은 OoC(in vitro to in vivo)와 같은 새로운 방법론(NAM, new approach methodologies)을 포함한 의약품 및 의료기기의 안전성과 효능을 보장할 책임이 있음. 두 규제기관 모두 동물 모델에 대한 의존도를 줄이면서 신약 승인을 가속화할 수 있는 OoC 기술의 잠재력을 인정하고 있음. 그러나 이를 규제 체계에 통합하는 데에는 몇 가지 과제가 존재함. 그러나 OoC 시스템이 널리 수용되기 위해서는 인간 약물 반응을 정확히 예측하는 신뢰할 수 있고 재현 가능한 결과를 제공한다 는 점을 보장하기 위해 표준화 및 검증되어야 함. 이는 특히 인간 대사, 독성 및 효능 측면에서 OoC 모델이 기존 시험 모델과 최소한 동등한 성능을 발휘함을 입증하는 것을 포함함(Teixeira 등, 2023; Piergiovanni 등, 2024).
- 미국에서는 FDA의 21세기 치료법 법안(21st Century Cures Act)이 신약 승인을 가속화하기 위한 OoC와 같은 혁신적 기술의 사용을 촉진해 왔으며, 비동물 시험 및 체외 모델의 중요성을 강조하고, OoC 데이터를 의약품 개발 제출 자료에 통합할 가능성을 포함한 비임상 데이터 사용에 관한 구체적인 지침 문서를 제공하고 있음(Goble 등, 2018).
- FDA는 FDA Critical Path Initiative와 같은 프로그램을 통해 신약 개발 도구를 검토하기 위한 메커니즘을 구축하였음. 2024년 9월, FDA 의약품평가연구센터(CDER, Center for Drug Evaluation and Research)는 특정 후보 약물에 대한 약물 유발 간 손상을 연구하기 위한 OoC 기술(4가지 인간 간 세포 유형으로 구성된 미세생리학적 시스템의 일종)에 대해 신약 혁신 과학기술 접근법(ISTAND) 시범 프로그램에 대한 첫 번째 의향서를 접수하였고 정규 프로그램으로 변경되었음(FDA's ISTAND Pilot Program, 2024; FDA Voices, 2025). 마찬가지로 유럽의약품청(EMA)은 신약 개발 및 규제 과학 개선을 위해 OoC를 포함한 신기술 연구에 자금을 지원하는 혁신의약품이니셔티브(IMI)와 같은 계획을 지원해 왔음. 또한 해당 기관은 유연한 적응형 허가 절차를 장려하여 OoC 데이터가 초기 승인 단계에서 역할을 수행할 수 있도록 하였음(EMA regulatory framework, 2024).
- 그러나 양 기관 모두 OoC 모델이 규제 제출 및 임상시험 설계에 활용될 만큼 충분히 견고함을 보장해야 하는 과제에 직면하고 있음. 이는 다양한 질병 모델과 장기에 걸친 광범위한 검증과 더불어, 이러한 시스템에서 생성된 복잡한 데이터를 해석하기 위한 프레임워크 구축을 의미함.
- FDA와 EMA가 OoC 시스템을 수용하기 위해서는 학계, 제약사, 기술 개발사와의 지속적인 협력을 통해 신뢰성을 입증하는 것이 핵심임. 양 기관 모두 동물 실험 감축의 중요성을 인식하기 시작했으며, OoC 모델을 의약품 개발 경로에 통합하는 방안을 모색하고 있으나, 이러한 기술의 규제 과정 완전 통합에는 지속적인 연구와 검증이 필요함(EMA regulatory framework, 2024).

- FDA의 재생의학 선진치료제(RMAT) 지정 및 EU의 호라이즌 2020 프로그램과 같은 맞춤형 의학, 적응형 임상시험 설계, 재생치료에 대한 강조가 증가함에 따라, 규제 과학에 OoC를 통합하는 데 유망한 미래가 열리고 있음. OoC 기술에 대한 과학적 이해가 진전됨에 따라 FDA와 EMA는 공식적인 활용 경로를 개발하여 인간 관련성이 높은 데이터로 약물 안전성 및 효능 시험을 강화할 가능성이 높음(Ishida 등, 2021).

5-2) FDA ISTAND 프로그램과 organ-on-a-chip technologies

- <표>는 2025년 11월 18일 기준 FDA ISTAND 프로그램에 승인된 모든 기술의 최신 요약한 것임. ISTAND 프로그램에 공식적으로 채택된 11가지 기술 중에는 비임상 시험용 7가지 in vitro 시스템이 승인되었음. 독성예측을 위한 NAM(new approach methodologies, 신규접근 방법론) 5가지를 포함한 비임상 NAM은 다음과 같음(CDER Statement, 1/23/2024 & 9/24/2024)
 - 4개는 미세생리학적 시스템(MPS) 또는 장기-온-어-칩 기술(4 are **microphysiological systems(MPS)** or **organ-on-a-chip technologies**)
 - 3개는 표준 2D 세포 배양 기법 사용(3 use standard 2D cell culture techniques)
 - 0개는 3D 오가노이드 또는 스페로이드(0 are 3D organoids or spheroids)
- MPS와 오가노이드 시스템은 조직 독성 예측을 위한 유사한 응용 분야를 추구하는 경우가 다수로 규제 승인을 향한 경쟁에서 MPS 즉, **organ-on-a chip 기술이 현재 오가노이드보다 선호되고 있음.**
- FDA에 이어 전 세계 정부 및 비정부 기관들도 NAM 검증 및 적격성 평가를 위한 자체 가이드라인을 신속히 마련 중임. 명확해진 NAM 지침은 신약 개발사에게 매력적인 제안이 될 것이며, 가장 견고하고 유익한 NAM 규제 프레임워크 개발 경쟁은 급속히 격화될 것으로 사료됨.

**<표> 2025년 11월 18일 기준 FDA ISTAND
프로그램에 승인된 모든 기술의 최신 요약**

NAMs in FDA ISTAND				
PRECLINICAL	SPECIFICITY	Integral Molecular	Specificity Screening Using the Membrane Proteome Array (MPA)	In Vitro
		Charles River	Retrogene Platform for Specificity/Off-target Screening	In Vitro
	TOXICOLOGY	Fresenius Kabi	Local tolerance of epidurally/intrathecal administered leachables	In Vitro
		Emulate	Human Liver-Chip for Prediction of Drug-Induced Liver Injury	In Vitro
		Mt. Sinai	Human Kidney Chip for Assessment of Relative Nephrotoxicity	In Vitro
		Texas A&M	Human chorio-decidual organ on chip for denesting rodent DART studies	In Vitro
	DOSING	OPTin	Liver acinus microphysiological system for drug candidate dosing	In Vitro
CLINICAL	CLINICAL ENDPOINT ADJUDICATION	AstraZeneca	AI/ML-based adjudication of clinical events	AI
		Brigham and Women's Hospital	Heart Failure Natural Language Processing (HF-NLP) Model	AI
	CLINICAL OUTCOMES	Deliberate Solutions	AI-COA™ for Automated Depression and Anxiety Severity Measurement	AI
	STATISTICS	Independent	WRE to estimate survival function for time-to-event endpoints in clinical trials	Statistical Method

*As of 18 November, 2025 © 2025 InnoApproach Consulting

5-3) Organ-on-a-chip(OoC)의 미래 전망 및 결론

- 기술 발전의 현 시대에 **마이크로플루이드 칩(microfluidic chip)**은 의료 분야의 전문 도구로 부상하며 폐, 간, 피부, 장 등을 모방하는 체외 장기 모델 개발을 주도하고 있음.
- 이러한 OoC 모델은 생체 내 인간 장기의 생리적 조건을 모방하도록 설계되어 기존 약물 시험 방법보다 더 정확하고 신뢰할 수 있는 대안을 제공함. 여러 OoC 모델이 이미 연구에 활용되고 있지만, 설계 개선과 제조 기술 최적화를 위한 상당한 노력이 여전히 필요함. 현재 **소프트 리소그래피(lithography)**; 주로 반도체 제조와 인쇄 공정에서 사용되는 기술)가 가장 널리 사용되는 제작 방법이지만, 향상된 맞춤형과 복잡성을 제공하는 3D 바이오 프린팅이 점차 보완되고 있음. 또한, 유연성과 투명성으로 인해 칩 제작의 표준 재료인 **폴리디메틸실록산(Polydimethyl siloxane, PDMS)**은 단백질 및 약물 흡착과 같은 한계로 인해 대량 생산에 적합한 새로운 생체 적합성 재료 개발을 촉진하고 있음. 이러한 혁신은 **고효율 스크리닝과 비용 절감이 중요한 제약 산업에서 더 광범위한 채택을 위해 필수적인, 인간 생리학을 더 잘 재현하는 복잡하고 현실적인 체외 시스템으로 이어질 수 있음.**
- 마이크로플루이드 기술은 글로벌 헬스케어 시장에서 빠르게 주목받고 있으며, 특히 OoC 플랫폼이 실시간 모니터링과 함께 더 정확하고 신뢰할 수 있는 결과를 제공할 것으로 기대되면서 그 중요성이 부각되고 있음.**
- 그 결과, OoC 시스템은 동물 실험을 줄일 수 있는 실용적인 대안으로 점점 더 인식되고 있으며, 이는 동물 사용을 최소화하라는 업계의 윤리적·규제적 압박과도 부합함. 또한 OoC 모델은 **다양한 질병 상태 연구에 있어 질병 메커니즘에 대한 새로운 통찰력을 제공하고 맞춤형 의학 및 표적 치료법 개발을 지원함으로써 그 가치를 입증하고 있음.** 보다 효율적이고 신뢰할 수 있는 약물 개발 프로세스에 대한 필요성에 힘입어 제약 산업은 OoC 시스템을 개발 기간 단축, 임상시험 비용 절감, 임상 결과 예측성 향상 도구로 인식하기 시작하였음.
- 산업계에서 OoC 기술의 특히 주목할 만한 응용 분야는 나노입자, 리포좀, 미립자 등 새로운 나노 및 미립자 약물 제형의 시험임. 이러한 제형은 생체이용률을 높이고 특정 조직을 표적화하는 능력으로 인해 **약물 전달 분야에서 중요성**이 커지고 있음(Anaya 등, 2025; Ongoren 등, 2024; de Pablo 등, 2023)
- 기존 시험 방법은 이러한 복잡한 제형이 인체 조직과 상호작용하는 방식을 정확히 모델링하는 데 종종 어려움을 겪어 임상시험 중 잠재적 비효율성과 위험을 초래할 수 있음. OoC 플랫폼은 생체 내 시험으로 넘어가기 전에 **이러한 제형의 약동학, 세포 내 흡수 및 독성을 연구하기 위한 보다 정확하고 관련성 높은 시험관 내 환경을 제공함.** 제약 산업에 있어 이는 제형의 인체 내 행동을 더 정확히 예측할 수 있게 하여 실패 위험과 고비용 동물 실험의 필요성을 줄여주므로, 약물 개발 최적화의 핵심 단계로 작용함. 이러한 정밀성과 비용 효율성은 혁신을 추구하면서도 **위험과 규제 장벽을 효과적으로 관리하려는 제약사들에게 점점 더 매력적으로** 다가오고 있음.

- 이러한 장점에도 불구하고, 제약 산업에서 OoC 기술의 광범위한 도입은 여러 가지 과제에 직면해 있음. **산업적 관점에서 주요 장애물 중 하나는 OoC 기술에 대한 초기 투자 비용임.** 기업들은 새로운 인프라를 도입하고, 새로운 재료를 통합하며, 모델이 고처리량 응용을 위해 확장 가능하도록 보장해야 하기 때문임. **또한 표준화된 OoC 모델의 부재는 상당한 장벽으로 작용함.** 산업계가 이러한 시스템을 완전히 수용하기 위해서는 과학계가 OoC 모델이 재현이 가능하고 신뢰할 수 있는 결과를 제공하도록 보장하기 위한 **표준화된 프로토콜과 검증 기준을 수립**해야 함.
- 더욱이 제약 산업은 새로운 기술을 완전히 도입하기 전에 **입증된 성공 실적과 규제 기관의 수용을 요구하는 경우가 많음.** 이는 특히 위험 부담이 크고 엄격한 생체 내 연구를 통한 검증이 여전히 표준으로 인정받는 대규모 임상 시험에서 더욱 그러함.
- FDA 및 EMA와 같은 규제기관은 OoC 데이터를 의약품 승인 절차에 통합하는 방법에 대한 프레임워크를 설정하는 데 **핵심적인 역할을 할 것임.** 규제 환경은 OoC에서 도출된 데이터가 어떻게 평가될지에 대한 명확한 지침을 제공하여 이러한 모델이 인간 반응의 신뢰할 수 있는 예측 도구로 인정받을 수 있도록 진화해야 함.
- **앞으로 인공지능(AI)을 OoC 시스템에 통합하면 제약 산업에서의 가치를 크게 높일 수 있을 것으로 예측됨(Serrano 등, 2024).** AI 기반 알고리즘은 복잡한 생물학적 데이터를 실시간으로 분석하여 OoC 플랫폼을 최적화함으로써 약효, 독성, 약동학에 대한 예측 정확도를 향상시킬 수 있다. 머신러닝 모델을 활용하면 데이터 내 상관관계와 패턴을 식별하여 놓칠 수 있는 정보를 포착함으로써 후보 약물 선별을 더욱 효과적으로 수행할 수 있음. 또한 AI는 모니터링 및 테스트 프로세스의 자동화를 간소화하여 OoC 시스템을 고처리량 응용 분야에 더 확장 가능하고 효율적으로 만들 수 있음. 이는 업계에 더 빠른 의사 결정, 비용 절감, 임상 시험에 활용할 수 있는 더 신뢰할 수 있는 데이터를 의미함.
- Microfluidic chips, AI, 첨단 생체재료가 계속 발전함에 따라 차세대 OoC 시스템은 더욱 정교해지고 신뢰성이 높아지며 인간 생리학의 복잡성을 재현할 수 있는 능력을 갖추게 **으로 예상됨.** 제약 산업에 있어 OoC 기술의 미래는 특히 나노입자 및 미세입자와 같은 신약 제형에 대한 보다 정확한 전임상 시험을 제공할 수 있는 능력과 생체 내 시험 필요성을 줄일 수 있는 잠재력에 달려 있음.
- 그러나 OoC 기술의 광범위한 채택 성공은 이러한 **시스템의 표준화, 예측 능력 검증, 규제 지침과의 조화 능력에 달려 있음.** 연구자, 산업 관계자, 규제기관 간의 협력이 기술적·경제적·규제적 장벽을 극복하고 OoC 플랫폼이 신약 개발 파이프라인에 효과적으로 통합되도록 하는 데 핵심적일 것임.
- 결론적으로, 장기-온-어-칩 기술은 생체 내 연구로 넘어가기 전에 특히 신개념 나노·미세입자 시스템을 포함한 약제 제형을 더 정확하고 효율적으로 시험할 수 있는 방식을 제공함으로써 제약 산업에 막대한 잠재력을 지님. **재료, 제조 기술, AI 통합 및 규제 지원의 지속적인 발전으로 OoC 플랫폼은 약물 개발 과정을 혁신할 수 있는 유리한 위치에 있**

음. 산업계가 이러한 기술을 수용함에 따라 향후 더 신뢰할 수 있고 비용 효율적인 약물 테스트로의 전환을 목격하게 될 것으로 예상됨. 궁극적으로 새로운 치료법의 개발을 가속화하고 이를 시장에 더 효율적으로 출시할 수 있을 것으로 기대됨.

Part 2. 장기-온-어-칩(Organ-On-A-Chip)에 의한 IVIVE 예측

1. NAM과 약물의 인체 용량 예측에 대한 필요성

1-1) IVIVE 개념

- IVIVE는 in vitro to in vivo extrapolation의 약어로 **시험관 내 결과를 생체 내로 외삽하는 것을 의미함**. 즉, in vitro에서 얻은 실험 결과나 관찰을 생물학적 유기체인 in vivo, 특히 인체 현상을 예측하기 위해 정성적 또는 정량적으로 전환하는 것을 의미함.
- 시험관 내 결과를 전환하는 문제는 동물 실험이 단계적으로 폐지되고 동물대체법 특히 human-relevance를 기반으로 하는 비동물 비임상시험인 NAM(new approach methodologies, 신규 접근 방법론)의 등장으로 독성시험 및 독성학 등의 분야에서 특히 심각함.
- 이는 in vitro 실험에서 얻은 결과는 in vivo에서 화학 물질 노출에 대한 생물체의 생물학적 반응을 예측하는 데 직접 적용하기 어려운 경우가 많기 때문임.
- 따라서 일관되고 신뢰할 수 있는 IVIVE를 구축하여 임상시험에서 MRSD(maximum recommended starting dose, 임상최대권장초기용량) 포함하여 동태학적(pharmacokinetic) 또는 독성동태학적(toxicokinetic) 지표 산출에 응용될 수 매우 중요함.

1-2) 2가지 IVIVE 방법

- 현재 IVIVE의 도구로 다음과 같이 2 가지 해결책이 일반적으로 인정받고 있음. 두 접근법을 동시에 적용할 수 있으며, 이를 통해 in vitro 시스템은 수학적 모델 개발에 적합한 데이터를 제공할 수 있음(Aravindakshan 등, 2025; Herland 등, 2020; Sung 등, 2010; Quignot 등, 2013).
 - ① **실제 조직 내 세포 간 상호작용을 재현하는 방법:** 여러 세포가 상호작용할 수 있는 in vitro 시스템의 복잡성을 높이는 방법(예시: human organ on a chip 시스템).
 - ② **수학적 모델링을 활용하여 복잡한 시스템의 행동을 수치적으로 시뮬레이션하는 방법:** 이때 in vitro 데이터는 모델 개발을 위한 매개변수 값을 제공(예시: PBPK)
- 즉, 아래 <표-1>와 같이 **IVIS, PBTK, PBPK 등의 원리를 새롭게 개발되고 있는 NAM인 spheroid, organoid, organoid-on-a chip, organ-on-a chip에 적용하여 IVIVE 및 QIVIVE가 이루어짐.**

<표-1> IVIVE의 추정 과정

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • IVIS: In vitro-in silico methodology - 체외-컴퓨터 시뮬레이션 방법론 • PBTK: Physiologically-based toxicokinetic model - 생리학적 기반 독성동태학 모델 • PBPK: Physiologically-based pharmacokinetic model - 생리학적 기반 약동학 모델 <p style="text-align: center;">↓</p> <ul style="list-style-type: none"> • IVIVE: In vitro to in vivo extrapolation - 시험관 내 결과의 생체 내로 외삽 • QIVIVE: Quantitative in vitro to in vivo extrapolation - 정량적 시험관 내-생체 내 외삽법 |
|---|

1-3) IVIVE의 현재 문제점

- 대체 시험 방법 개발에 대한 요구에 부응하기 위해, 점점 정교해지는 in vitro 실험들은 이제 수학적 모델에 통합될 수 있는 다수, 복잡하고 도전적인 데이터를 수집이 필요함. 일반적으로 생리학적 기반 PK(PBPK) 모델, 즉 특정 화학 물질의 흡수, 분포, 대사 및 배설을 포함한 모델이 시험관 내(in vitro)와 생체 내(in vivo) 추론의 핵심임. 약리학에서 IVIVE는 약동학(PK, pharmacokinetics) 또는 약력학(PD, pharmacodynamics) 평가에 활용됨. 독성동태학 평가는 시험관 내에서 관찰된 부작용을 추론하는 것으로 생체 내 PK 모델의 정량적 모델에 통합됨.
- 초기 효과나 세포 간 통신이 없는 경우, 동일한 세포 노출 농도가 실험적으로나 정량적으로 in vitro와 in vivo 모두 동일한 효과를 유발한다고 가정함. 이러한 조건에서는 (1) in vitro에서 관찰된 용량-반응 관계에 대한 간단한 약력학 및 독성동태학 모델을 개발하고 (2) 이를 변경 없이 in vivo 효과 예측에 적용함(Louisse 등, 2010).
- 그러나 약물에 따른 생물학적 교란은 표적 부위에서의 후보 약물(모분자 또는 대사산물)의 독성 물질 농도와 노출 기간에 따라 달라지므로, 생체 내 조직 및 장기 효과는 in vitro 에서 관찰된 것과 완전히 다를 수도 있고 유사할 수도 있음.
- 결론적으로 약물의 동태는 투과성과 분배 등과 같은 수동적 생물학적 과정과 대사(metabolism)와 같은 능동적 생물학 과정이 있음. 기존 접근법은 수동적 및 능동적 생물학적 과정을 고려하지 않고 clearance(제거)와 같은 단일 과정으로 통합하여 PBPK parameter 예측

2. IVIVE 예측을 위한 논문의 선택 이유

- Part 1의 5. 장기-온-어-칩(Organ-On-A-Chip, OoC)의 규제, 승인된 기술 그리고 미래 중 6-3) OoC)의 미래 전망 및 결론에는 다음과 문장이 있음: '**AI 기반 알고리즘은 복잡한 생물학적 데이터를 실시간으로 분석하여 OoC 플랫폼을 최적화함으로써 약효, 독성, 약동학에 대한 예측 정확도를 향상시킬 수 있음**'
- 따라서 OoC 단독 시스템에 의한 약물의 동태학적 예측보다 AI의 통합은 인체 예측에서 훨씬 더 정확성을 높일 수 있다는 것을 의미함

● 6-3) OoC)의 미래 전망 및 결론

- 앞으로 인공지능(AI)을 OoC 시스템에 통합하면 제약 산업에서의 가치를 크게 높일 수 있을 것으로 예측됨(Serrano 등, 2024). **AI 기반 알고리즘은 복잡한 생물학적 데이터를 실시간으로 분석하여 OoC 플랫폼을 최적화함으로써 약효, 독성, 약동학에 대한 예측 정확도를 향상시킬 수 있음.** 머신러닝 모델을 활용하면 데이터 내 상관관계와 패턴을 식별하여 놓칠 수 있는 정보를 포착함으로써 후보 약물 선별을 더욱 효과적으로 수행할 수 있음. 또한 AI는 모니터링 및 테스트 프로세스의 자동화를 간소화하여 OoC 시스템을 고처리량 응용 분야에 더 확장 가능하고 효율적으로 만들 수 있음. 이는 업계에 더 빠른 의사 결정, 비용 절감, 임상 시험에 활용할 수 있는 더 신뢰할 수 있는 데이터를 의미함.

3. DigiLoCS: A leap forward in predictive organ-on-chip simulations.

3-1) 분석 논문

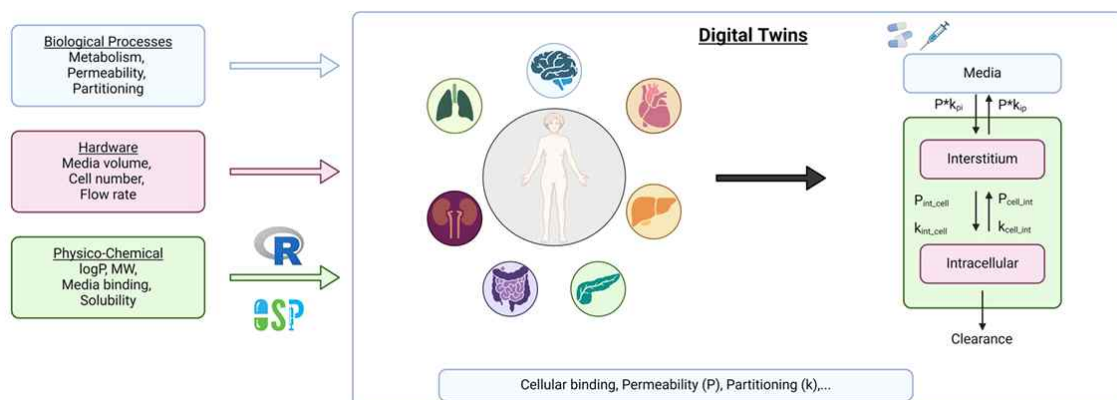
- Aravindakshan MR, Mandal C, Pothan A, Schaller S, Maass C. **DigiLoCS: A leap forward in predictive organ-on-chip simulations.** PLoS One. 2025 Jan 9;20(1):e0314083.

3-2) DigiLoCS: Liver-on-a-chip + digital twin의 이론적 설명

① **개념:** OoC-digital twin model(DigiLoCs)은 약물 소실 동역학에 대한 정량적 장기-온-칩 (organ on a chip, OoC) 및 세포 기반 분석을 통합하였으며, 인간에서의 약물 소실 동역학을 시뮬레이션하기 위해 **OoC-디지털 트윈 모델을 추가로 도입하여 강화된 모델**. 간-온-칩의 디지털 트윈 모델을 활용해 32개 약물의 체외 간 클리어런스를 예측했으며, 시계열 PK 데이터(time series PK data)를 통해 체외에서 체내로의 외삽(IVIVE)을 평가한 모델임

② **구성요소 및 절차:** DigiLoCs는 본 연구에서 개발된 소프트웨어 도구이며 임상적 제거율 예측을 위해 사용 환경에서 칩 내 복잡한 생물학적 과정을 보다 정확하게 묘사함. 이 소프트웨어는 다음의 3가지 요소를 포함하며 <그림-1>과 같이 묘사됨. 모델에서 고려된 간 칩의 세 가지 주요 구성은 배지, 간질, 세포 내 공간으로, 약물이 분포되고 대사되며 간세포와 상호작용하는 동적 환경 역할을 함. 이러한 구체화는 인간 전신 PBPK 모델링에 적용된 개념을 기반으로 하며 소프트웨어 도구는 오픈소스 프로그래밍 언어 R Core Team(2021)에 개발되었으며, 자체 개발 기능을 통해 PK-Sim (<https://www.open-systems-pharmacology.org/>)과 원활하게 소통함.

- 복잡한 생물학적 과정(제거율, 투과성, 분배) 모델링
- 연구된 체외 시스템의 하드웨어 특정 정보
- 화합물 특정 정보



<그림 1> 디지털 트윈(DT) 접근법. 기존 접근법과 달리 DT 접근법은 생물학적, 하드웨어적, 물리화학적 정보를 활용하여 간 칩 상의 생물학적 과정을 보다 정확하게 가상 환경(in silico)에 매핑함으로써 활용되는 정보를 극대화함. 이를 통해 활성(대사) 과정과 수동(투과성, 분할) 과정이 분리됨.

③ DigiLoCS의 구성에 대한 구체적 설명

1. 하드웨어 사양 구현(Implementation of hardware specifications): DigiLoCs는 칩 내 화합물의 시간 의존적 분포를 설명하기 위해 칩 구조를 구획 모델로 매핑함. 구획 모델은 시간 의존적 보통미분방정식(ODEs, ordinary differential equations)을 사용하며 구획 내 완전 혼합을 가정함. 이는 일반적으로 외인성 및 내인성 화합물과 분자의 분포를 설명하는 데 널리 인정됨. 막으로 분리되거나 유동으로 다른 구획과 연결된 물리적 공간은 소프트웨어에서 구획으로 표현됨. 직렬 구획들은 구획 간 매질 유속(일반적으로 ml/min 단위)을 통해 연결되며, 이는 농도 구배와 확산을 통한 질량 전달을 설명하고 원점 구획의 부피로 정규화됨.

2. 생물학적 사양 구현(Implementation of biological specifications): 생물학(더 정확하게는 연구 대상 생물학적 기능을 수행하는 세포 유형, 여기서는 metabolism)은 연구 대상 생물학의 간질 및 세포 내 공간을 나타내는 두 개의 추가 구획으로 매핑됨(그림-1). 세포 배양액에서 간질 및 세포 내 환경으로의 수송 속도는 두 가지 핵심 과정으로 설명됨.

- 수동 확산(구획 간 농도 구배에 의해 유도됨)
- 열역학적 평형(두 상 사이의 화합물 분포)
- 이러한 과정은 계산 모델에서 두 가지 주요 매개변수, 즉 투과성(화합물이 얼마나 빨리 흡수되는가?)과 분할(화합물의 얼마나 많은 양이 세포에 흡수되는가?)로 설명됨. 마지막으로, 대사 속도는 세포 내 구획으로 재할당되며 세포 내 구획에서 화합물의 미결합 분율로 보정됨. 마찬가지로 약동학에서 화합물의 분포는 종종 구획 모델링 프레임워크를 사용하여 설명되는데, 이는 시스템을 별개의 구획으로 나누고 이들 사이의 화합물 이동을 지배하는 과정을 모델링하는 것을 포함함.

3 화합물 특이적 정보 구현(Implementation of compound-specific information): 조사된 화합물의 다음 물리화학적 특성이 소프트웨어에 사용됨.

- i) 친유성(logP),
- ii) 분자량(MW),
- iii) 미결합 분율(fu)
- 이를 통해 최대 6개의 종속 하류 매개변수(아래 목록 참조)를 계산함. 이 매개변수들은 주 매질 구획에서 간질 공간으로의 분배 및 수분 분획과 간질 공간 및 세포 내 공간 간의 분배를 설명함. 또한, 내피 장벽을 통한 투과성과 간질 공간과 세포 내 공간 사이의 투과성도 계산됨.
 - 분배: i) K_{int_med} ii) K_{water_cell} iii) K_{water_cell}
 - 투과성: i) $P_{endothelial}$ ii) $PA_{cell-int}$ iii) PA_{int_cell}
- 여기서 int는 간질 공간(interstitial space), med는 매질(media), water는 물 교환 분획(water exchange fraction), cell은 세포 내 공간(intracellular space)을 의미함. 이러한 매개변수는 전신 PBPK 모델링을 위한 포괄적인 소프트웨어 도구인 PK-Sim 소프트웨어(Thelen 등, 2011)에 구현된 확립되고 문서화된 방정식을 기반으로 계산됨. 이 소프트웨어는 모델 구축 및 매개변수화를 위한 통합 데이터베이스에 포함된 인간 및 일반 실험동물의 모든 관련 해부학적 및 생리학적 매개변수에 대한 신속한 접근을 가능하게 함. PK-Sim에 구현된 것과 동일한 분할 계수 계산 방법도 쉽게 이용 가능하며 조사할 수 있음:
 - PK-Simstandard
 - Poulin and Theil
 - Rodgers and Rowland
 - Schmitt
 - Berezhkovskiy
- 또한, 화합물의 결합되지 않은 분획만이 세포에 흡수되어 세포에 의해 대사될 수 있음. 세포 배양액 내의 결합되지 않은 분획은 일반적으로 생물학적 실험을 통해 확인됨. 그러나 세포 내 결합되지 않은 분획은 흔히 이용 가능하거나 측정되지 않음. 따라서, 조사 대상 화합물의 물리화학적 특성에 따른 세포 내 미결합 분율을 예측하기 위해 소프트웨어에 두 가지 확립된 QSAR 모델(정량적 구조-활성 관계)이 구현되었음(Poulin 등, 2013; Austin 등, 2024).

4. 매개변수 추정: 매개변수 추정은 계산 모델 내 알려지지 않은 매개변수를 찾는 것을 목표로 하며, 잘 정의되고 표준화된 조건에서 수집된 실험 데이터를 사용하여 추정됨. 이론적 함수값과 실험적으로 알려진 데이터 간의 거리를 최소화함으로써 모델 내 매개변수 집합을 추정할 수 있음. 직접 측정할 수 없는 매개변수는 최소 제곱법이나 기타 적합 방법을 사용하여 모델을 정량적으로 분석함으로써 추정할 수 있음. 명목상 매개변수 값은 PK-Sim 소프트웨어에서 얻음.

5. 소프트웨어 구현: 방법론적으로 DigiLoCs는 자체 패키지를 갖춘 오픈소스 프로그래밍 환경 R로 구현됨. 두 가지 일반적인 칩 구조와 두 가지 세포 유형, 그리고 여섯 가지 서로 다른 칩별 설정을 포함한 라이브러리가 이미 구현되었음.

1. 단일 챔버, 매체 유동 없음
2. 이중 챔버, 재순환 유동
3. 장기-온-칩(간세포)

- a. CnBio
- b. Hurel 1
- c. Hurel 2
- d. Dynamic42
- e. Javelin

3-3) DigiLoCS 분석의 의미

- 약물의 동태는 투과성과 분배 등과 같은 수동적 생물학적 과정과 대사(metaboism)과 같은 능동적 생물학 과정이 있음. 기존 접근법은 수동적 및 능동적 생물학적 과정을 고려하지 않고 clearance(제거)와 같은 단일 과정으로 통합하여 PBPK parameter 예측.
- DigiLoCS 모델은 수동적 생물학적 과정(화합물 투과성 및 분배)와 능동적 생물학적 과정(metabolism)을 고려하여 IVIVE 예측 시도임. 따라서 organ-on-a-chip에 의한 clearance(제거)의 단일 과정보다 훨씬 더 정확한 인체의 PBPK parameter 예측이 가능함.
 - i) 인간 클리어런스 예측에 사용된 연구 데이터
 - ii) 간-온-칩(liver-on-chip)의 디지털 트윈인 DigiLocs,
 - iii) DigiLocs의 수학적 모델, 매개변수 추정 및 민감도 분석,
 - iv) 인간으로의 전환 및 인간 약동학 예측.

3-4) Conventional data 출처

- 여기서 conventional data는 단순히 Liver-on-a-chip 및 3D Spheroid에만 의존하여 32개 약물의 약동학(대사) 또는 독성학 연구에 관한 공개된 데이터를 사용하여 인간 약동학을 예측한 자료임(Table 1 참조). 즉, 수동적 생물학적 과정(화합물 투과성 및 분배)을 특별히 고려하지 않고 단일 과정(즉, 제거)으로 통합하여 PBPK parameter 예측한 자료임.
- IVIVE를 위해 비교 검토된 In vitro 시스템은 Table 1에서처럼 CnBIO Liver-chip, Javelin Liver-chip 그리고 Hurel사의 3D spheroid 등임.

Table 1

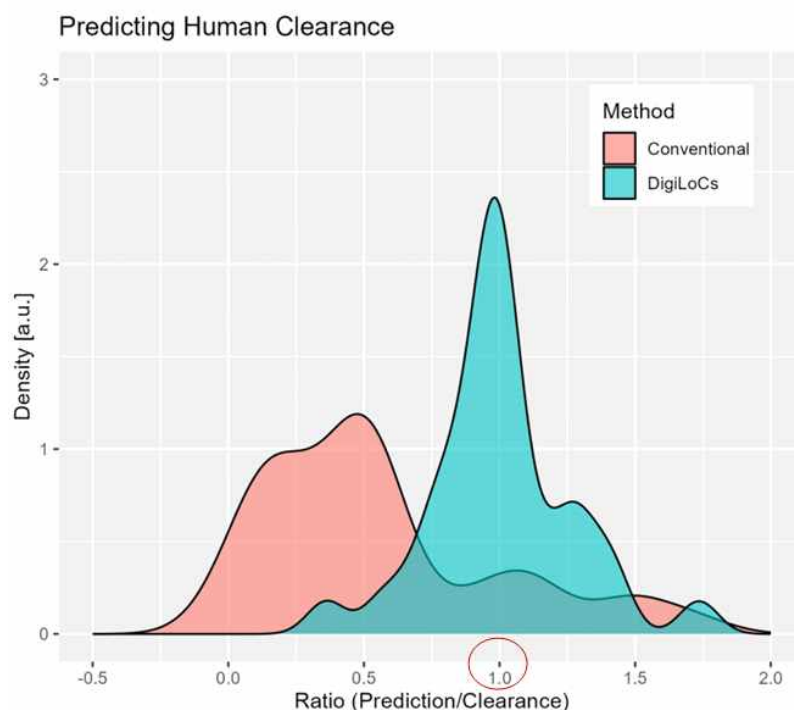
Overview of literature reports providing on-chip pharmacokinetic information on compound clearance.

Study	Drugs	Used in this study	In vitro system	cell number [a.u.]	Media volume [ml]	Flow	On-chip compartments
Docci et al. 2022 [13]	9	9	CnBio Liver-Chip	3E5	1.60	Recirculation	1
Tsamandouras et al. 2017 [17]	6	3	CnBio Liver-Chip	3E5	1.60	Recirculation	1
Rajan et al. 2023 [20]	12	8	Javelin Liver-Chip	2.15E5	1.30	Recirculation	2
Kanebratt et al. 2021 [18]	4	4	3D Spheroid (Hurel)	6E3	0.05	No	1
Bonn et al. 2016 [19]	8	8	3D Spheroid (Hurel)	3E4	0.10	No	1
Total	38	32					

3-5) 결과 - 인체 클리어런스 예측(Predicting human clearance)

- 칩 상 추정된 청소율 값은 총 인체 청소율(total human clearance)로 변환되었음. 마찬가지로, 조사된 연구들(Table 1에서처럼 CnBIO Liver-chip, Javelin Liver-chip 그리고 Hurel사의 3D spheroid 등)에서 체외 미결합 청소율 값을 확보하여 인체 등가치(human equivalent)로 환산하였음. 기존 접근법은 단일 미분방정식(ODE, ordinary differential

equations)을 사용하는 단일 구획 모델임. 임상 관찰된 인간 청소율 값과 기존 수학적 모델링 또는 디지털 트윈 접근법을 통해 예측된 인간 청소율 값 간의 비율을 추정하고, 그래픽 시각화를 용이하게 하기 위해 밀도 함수(density function)로 변환하였음. Fig. 6에서 볼 수 있듯이, 디지털 트윈 접근법(DigiLoCs)은 기존 접근법보다 상당히 우수한 성능을 보임. **분포의 중심은 1 근처에 위치하여 임상적 제거율 값에 대한 편향 없는 예측을 나타내며, 분포 폭은 매우 좁음.** 정량적으로, 디지털 트윈 접근법의 전체 화합물 비율은 1.04 ± 0.31 이며, 변동계수는 30%임. 반면 기존 접근법(빨간색 곡선)은 클리어런스 값을 크게 과소 예측하는 동시에 넓은 분포를 유지하여 예측 불확실성을 가중시킴(0.56 ± 0.44 , CV = 79.3%). 관찰된 임상 클리어런스 값과 본 연구에서 예측된 값 간의 상관관계 플롯은 개별 약물 수준에서 DigiLoCs 접근법의 향상된 예측 성능을 부각시킴.

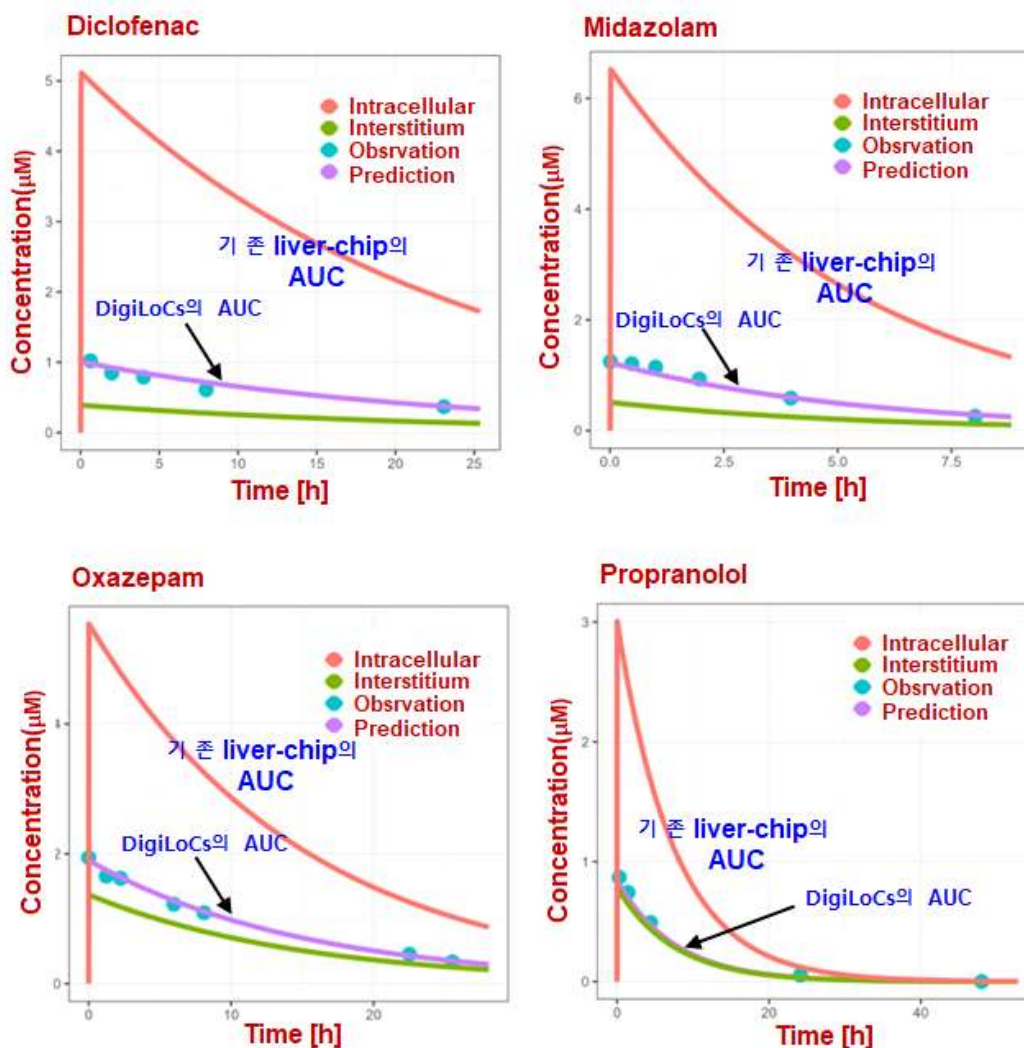


<Fig. 6>. 기존 접근법 대비 DigiLoCs의 임상적 청소율 예측 영향. 총 3가지 다른 체외 간 시스템에 걸쳐 32개 화합물 세트를 조사하였음. x축은 DigiLoCs 또는 기존 접근법을 사용한 예측/관찰된 임상적 청소율 비율을 나타내며, y축은 관찰된 비율의 빈도를 보여줌.

3-6) 결과: 인간 PK로의 전환(Translation to human PK)

- 프로프라놀롤(propranolol)을 개념 증명 사례 연구로 사용하여, 시험관 내 세포 기반 분석을 기반으로 인간 청소율 값을 정확히 예측하는 것이 인간 PK 예측에 미치는 영향을 평가하였음. 먼저, 프로프라놀롤의 인간 동태학을 설명하는 소프트웨어 도구인 인간 PBPK 모델을 (PK-Sim(<https://www.open-systems-pharmacology.org/>))에 구현하고 임상 관찰 결과로 검증하였음. 다음으로, 기존 모델링 접근법 또는 동일한 온칩 동태 데이터를 기반으로 예측된 인간 클리어런스 값을 단일 경구 투여 후 동태를 시뮬레이션하는 인간 PBPK 모델에 구현하였음. 또한 환자 간 변이를 고려하기 위해 $n = 1000$ 명의 환자 집단을 시뮬레이션하였음.

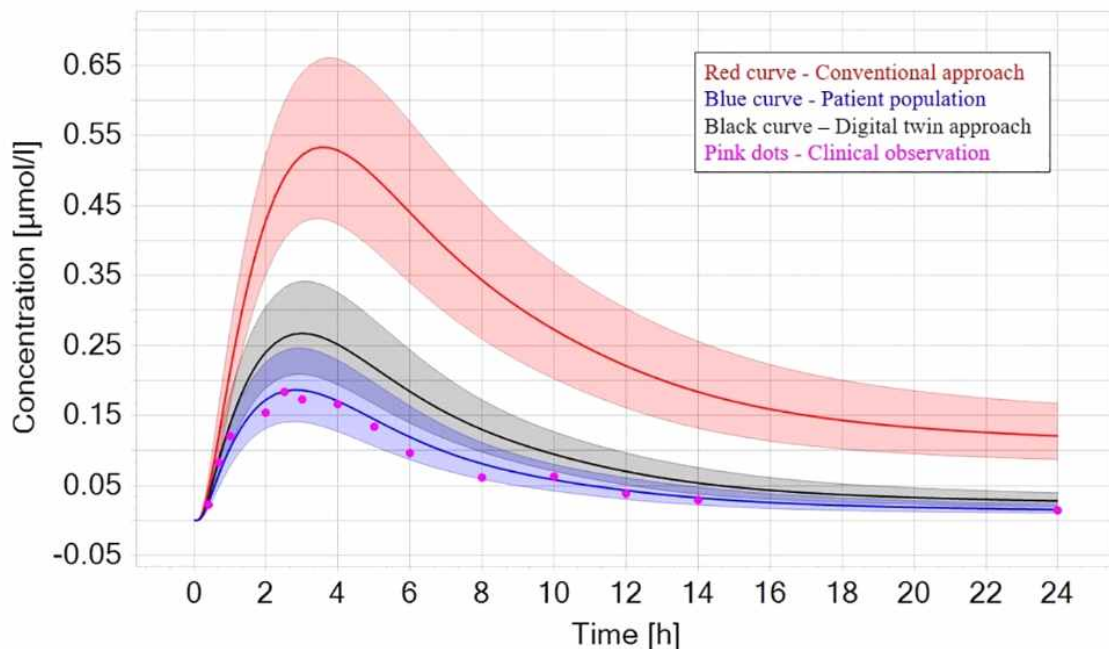
- Fig. 5에서 볼 수 있듯이, 구현된 인간 PBPK 모델은 관찰된 임상 데이터(임상 클리어런스 값 사용)를 잘 설명되었음. 기존 방식 또는 디지털 트윈 기반(DigiLoCs) 값으로 청소율 값만 대체할 경우, 인간 PK 시뮬레이션에 미치는 영향이 명백해짐. 기존 방식은 인간 PK를 과대 예측함(즉, 온칩 청소율이 과소 예측됨). 최대 혈중 농도(Cmax)는 3배, 면적 아래 곡선(AUC)은 최대 6배까지 과대 예측됨. 또한, 이 접근법은 실제로 24시간 후에도 무시할 수 없는 프로프라놀롤 농도가 남아있는 것으로 시뮬레이션함. 매일 반복 투여의 경우, 이 가상의 설정에서 프로프라놀롤이 축적되어 잠재적인 독성 또는 효능 고려 사항에 즉각적인 영향을 미칠 수 있음. 반면, 디지털 트윈 기반 접근법(DigiLoCs)은 여전히 AUC와 Cmax를 약간 과대 예측하지만, 그 정도는 1.5배에 불과하며 말기 단계를 정확하게 포착.



<Fig. 5> 선별된 화합물에 대한 매개변수 피팅 후 디지털 트윈 기반 모델(DigiLoCs) 시뮬레이션으로 얻은 온칩 동역학. 관찰 데이터는 파란색 점으로 표시되었으며, 디클로페낙, 미다졸람, 옥사제팜 데이터는 Docci 등(2022)에서, 프로프라놀롤 데이터는 Tsamandouras 등(2016)에서 각각 인용. 빨간색, 보라색, 녹색 곡선은 각각 세포내, 배지, 간질 구획의 약물 농도를 나타냄.

3-7) 결과: 인간 PK로의 전환(Translation to human PK)

- 프로프라놀롤(propranolol)을 개념 증명 사례로 사용하여 결과를 인간으로 전환함으로써 이 접근법의 임상적 영향을 입증하고자 하였음. <Fig 8>에서처럼 직접 비교를 통해 OoC의 정량적 생물학적 데이터와 디지털 트윈이 기존 접근법보다 인간 PK를 더 적절하게 예측하는 데 있어 우월한 능력을 명확히 보여주었음. 임상적 영향을 입증하기 위해 단일 화합물만 사용되었지만, 작업 흐름과 프로세스는 다른 화합물에도 쉽게 적용 가능함. 우리의 지식 범위 내에서, 본 연구는 간 청소율 활용 맥락에서 장기온칩(OoC)의 예측력을 체계적으로 평가한 가장 포괄적인 보고서로 판단됨.



<Fig 8> 단일 경구 투여(80mg) 후 프로프라놀롤의 시뮬레이션된 동역학: 분홍색 점은 임상 관찰 값(Borgström 등, 1981)에서 디지털화이며, 파란색 실선은 임상 관찰된 청소율 값을 사용한 환자 집단의 평균을 나타냄. 기존 접근법에 기반한 청소율 값(빨간색 선)을 사용할 경우, 곡선 아래 면적(AUC)이 6배 과대 예측됨. 반면 디지털 트윈 기반 청소율을 사용하면 AUC는 1.5배만 과대 예측되며, 24시간 시점의 정확한 동역학(검은색 곡선)도 시뮬레이션된다. 음영 영역은 ± 1 표준편차를 나타냄.

3-8) DigiLoCS: Liver-on-a-chip + digital twin을 이용한 PBPK 결론

- DigiLoCs(Liver-on-a-chip + digital twin)를 사용하여 32개 약물의 체외 간 청소율을 예측했으며, 프로프라놀롤에 대한 개념 증명(인간 약동학으로의 전환) 연구를 수행하였음.
- DigiLoCs는 제약 연구를 위한 의사 결정 지원 도구로 활용될 것으로 기대되며, 첫 인체 투여량 추정, 인체 약동학 평가, 그리고 무엇보다도 동물 실험 의존도 감소에 기여함으로써 보다 효율적이고 신속하며 지속 가능한 약물 개발 프로세스를 촉진할 수 있을 것으로 예상됨.

- OoC와 디지털 트윈에서 도출된 정량적 생물학적 데이터가 기존 접근법보다 인간 PK를 더 적절하게 예측하는 데 있어 우월한 능력을 명확히 보여주었음. 임상적 영향력을 입증하기 위해 단일 화합물만 사용되었으나, 해당 작업 흐름과 프로세스는 다른 화합물에도 쉽게 적용 가능할 것으로 예상됨. 따라서 Organ-on-a chip 및 spheroid 등과 같은 미분 방정식 기반 모델 시스템을 통합하고 공개된 데이터의 AI 기반 활용하는 **장기-온-칩용 디지털 트윈 개발(DigiLoCS: Liver-on-a-chip + digital twin)**은 약물 행동과 임상 결과에 대한 이해를 높일 큰 잠재력을 지님을 확인함.
- 또한 DigiLoCs 접근법은 다양한 생리학적 맥락에 일반화 가능하며, 간 대사에 국한되지 않고 장 대사 및 뇌나 태반과 같은 장벽 모델과 같은 다른 기관으로 확장될 수 있음.

Part 3. 장기-온-어-칩(Organ-On-A-Chip)에 의한 독성 예측

1. 목적

- 기존의 전임상 모델은 종종 약물 독성을 놓치는데, 이는 해당 약물이 인체에 미치는 해악이 임상 시험 단계나 시장에 출시된 후에야 비로소 드러난다는 것을 의미함. 이로 인해 제약 업계는 실패할 운명의 약물 개발에 상당한 시간과 자원을 낭비해 왔다. **장기-온-어-칩(Organ-on-a-Chip) 기술은 장기 수준의 병리생리학적 상태와 임상 반응을 재현할 수 있어 약물 개발 파이프라인의 성공률을 높일 잠재력을 지녔으나, 오르간-칩의 예측 가치에 대한 체계적이고 정량적인 평가는 아직 보고된 바 없음. 따라서 human Liver-Chip을 이용하여 간독성에 대한 정략적 예측. 특히 본 연구 결과는 FDA's ISTAND에 의해 첫 번째 organ-on-a-chip technology로 승인된 Human Liver-Chip for Prediction of Drug-Induced Liver Injury(DILI, 약물-유도 간손상)임.**

2. 분석 자료 및 liver-on-a chip 기술 묘사도

Ewart L, Apostolou A, Briggs SA, Carman CV, Chaff JT, Heng AR, Jadalannagari S, Janardhanan J, Jang KJ, Joshipura SR, Kadam MM, Kanellias M, Kujala VJ, Kulkarni G, Le CY, Lucchesi C, Manatakis DV, Maniar KK, Quinn ME, Ravan JS, Rizos AC, Sauld JFK, Sliz JD, Tien-Street W, Trinidad DR, Velez J, Wendell M, Irrechukwu O, Mahalingaiah PK, Ingber DE, Scannell JW, Levner D. **Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology.** Commun Med (Lond). 2022 Dec 6;2(1):154. doi: 10.1038/s43856-022-00209-1. Erratum in: Commun Med (Lond). 2023 Jan 12;3(1):7. doi: 10.1038/s43856-023-00235-7. Erratum in: Commun Med (Lond). 2023 Feb 2;3(1):16.

- 묘사도:** Fig. 1은 Emulate의 인간 간 칩은 3차원 다세포 구조 및 혈관 흐름과 같은 핵심 미세환경 특성을 통해 인간 간의 생리적 기능을 생체 내에서 충실히 재현한 묘사도임. 이러한 특성 덕분에 Emulate 인간 간 칩은 기존의 샌드위치 배양, 구상체 및 동물 모델과 비교하여 인간 간을 더 잘 묘사하는 모델을 제공할 수 있음. 이들 기존 모델은 각각 인간 간을 적절히 묘사하는 데 필요한 관련 특성을 갖추지 못한 것과 비교됨(Ewart 등, 2023). Fig. 1은 투명한 점탄성 고분자 재료인 유연한 polydimethylsiloxane(PDMS)으로 제작됨. 칩의 구획 챔버는 직경 7 μ m의 기공이 40 μ m 간격으로 배열된 다공성 막으로 분리된 두 개의 평행한 미세채널로 구성됨(Ewart 등, 2023). 마이크로유체 공학을 활용하여 장기별 맥락에서 생체 내 세포 및 조직 미세환경을 재현하는 장기-온-칩(Organ-Chip) 기술임. 이는 조직-조직 경계를 재현하고 유체 흐름 및 기계적 힘에 대한 정밀한 제어를 제공함으로써 달성됨. 또한 선택적으로 면역 세포 및 미생물군집과의 상호작용을 지원하고, 임상적 약물 노출 프로필을 재현함.

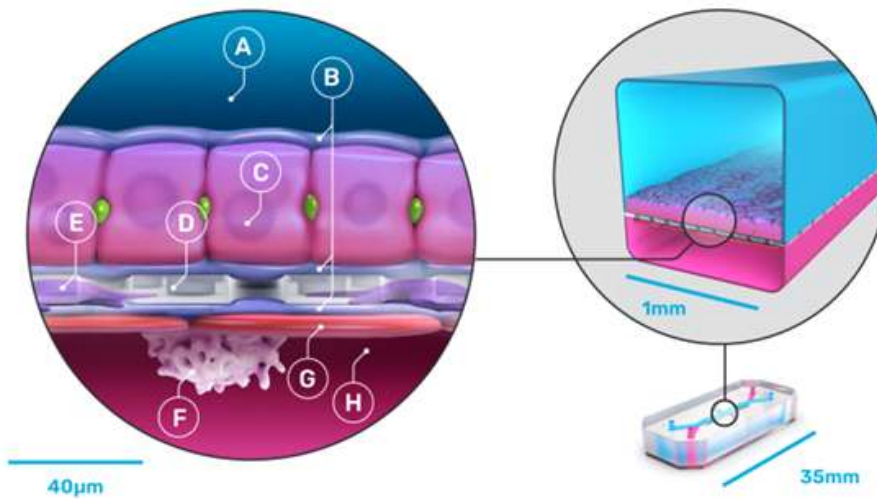


Fig. 1 Schematic of the Emulate Live chip: Fig. 1에서 상부 실질 채널(A) 내 다공성 막(D) 위에 세포외 기질(B)로 샌드위치된 1차 인간 간세포(C)를 보여주며, 인간 간 정맥 내피세포(G), 쿠퍼 세포(F), 성상 세포(E)는 막 반대편 하부 혈관 채널(H)에서 배양됨.

2. Liver-Chip의 IQMPS 가이드라인과 시험자료

- 혁신과 품질(IQ) 컨소시엄은 제약 및 생명공학 기업들의 협력체로, 신약 개발 프로그램 향상을 위한 과학 기술 발전을 목표로함. 이 목표를 추진하기 위해 컨소시엄은 신규 전임상 모델이 자격을 획득하기 위해 충족해야 할 일련의 성능 기준을 제시했음. 이 컨소시엄에는 마이크로생리학적 시스템(MPS, microphysiological systems)을 전담하는 부서가 있으며, 여기에는 마이크로유체 공학을 활용하여 장기별 맥락에서 생체 내 세포 및 조직 미세환경을 재현하는 장기-온-칩(Organ-on-a chip) 기술이 포함됨(Bhatia 등, 2014; Esch 등, 2015).
- 즉, 조직-조직 인터페이스를 재현하고 유체 흐름 및 기계적 힘을 정밀하게 제어함으로써 달성되며 선택적으로 면역 세포 및 미생물군집과의 상호작용을 지원하고 임상적 약물 노출 프로필을 재현할 수 있는 기술임. 약물 연구 및 개발에 대한 MPS의 가능성을 인식하여, IQMPS 계열사는 규제 승인 및 광범위한 산업적 채택을 촉진하기 위해 특정 사용 맥락에 대한 새로운 모델의 적격성을 평가하기 위한 지침(guideline)을 제공하였으며 이를 IQMPS guideline이라고 함.
- 간 MPS에 관한 IQMPS 제휴사의 로드맵에 따르면, 해당 지침을 충족하는 약물 유발 간 손상(DILI) 예측용 체외 모델은 그렇지 않은 모델보다 예측 타당성이 더 높을 가능성이 높음
- 이에 따라 DILI 예측 사용 맥락 내에서 상용화된 인간 간 칩(Emulate, Inc. 제품)을 엄격히 평가하였음. 본 연구에서는 Table 1에서처럼 IQ 컨소시엄이 권장하는 간독성 또는 비독성 행동이 알려진 27종의 서로 다른 약물 블라인드 세트를 사용하여 870개의 간 칩을 테스트하였음.

- 결과를 동물 모델의 기존 성과 및 제약 산업에서 이 용도(DILI 예측)에 자주 활용되는 전 임상 모델인 1차 인간 간세포의 3차원 구상체(spheroid) 배양 결과와 비교하였음.
- 27종의 소분자 약물은 IQMPS 제후 분류 및 Garside DILI 중증도 범주(**Garside DILI severity scale**) 내 순위(1은 심각한 임상적 DILI를 보이는 약물, 5는 DILI가 없는 약물에 해당)에 따라 나열. 구조적으로 유사한 독성 및 비독성 약물 쌍은 굵은 이탤릭체로 표시.

Drug	IQ MPS list	Tested in spheroid	Spheroid false negative	Garside DILI rank
Ambrisentan	Yes, matched with Sitaxsentan	Yes	No	5
Asunaprevir	Yes, no matched pair	No	No	2
Benoxaprofen	No	Yes	Yes	1
Beta-Estradiol	No	Yes	Yes	3
Buspirone	Yes, matched with Nefazodone	Yes	No	4
Chlorpheniramine	No	Yes	Yes	3
Clozapine	Yes, matched with Olanzapine	Yes	No	2
Diclofenac	Yes, no matched pair	Yes	No	2
Entacapone	Yes, matched with Tolcapone	Yes	No	4
Fialuridine	Yes, matched with FIRU	Yes	No	1
FIRU	Yes, matched with Fialuridine	No	No	5
Labetalol	No	Yes	Yes	1
Levofloxacin	Yes, matched with Trovafloxacin	Yes	Yes	2
Lomitapide	No, Mipomersen substitute	No	No	3
Nefazodone	Yes, matched with Buspirone	Yes	No	1
	Yes, matched with Clozapine	No	No	5
Pioglitazone	Yes, matched with Troglitazone	Yes	Yes	3
Simvastatin	No	Yes	Yes	2
Sitaxsentan	Yes, matched with Ambrisentan	Yes	No	1
Stavudine	No	Yes	Yes	1
Tacrine	No	Yes	Yes	2
Telithromycin	Yes, no matched pair	No	No	1
Tolcapone	Yes, matched with Entacapone	Yes	No	1
Troglitazone	Yes, matched with Pioglitazone	Yes	No	1
Trovafloxacin	Yes, matched with Levofloxacin	Yes	No	1
Ximelagatran	No	Yes	Yes	1
Zileuton	Yes, no matched pair	Yes	Yes	2

The 27 small-molecule drugs are listed according to the IQ MPS affiliate classification and their ranking in the Garside DILI severity category, where 1 corresponds to drugs with severe clinical DILI and 5 to those with no DILI^{31,50}. Structurally related toxic and non-toxic pairs are indicated as well using bold, italic text.

3. 결과 – Liver chip의 IQ MPS 제후 가이드라인에 대한 충족도

3-1) Liver-Chip에서 재현된 인간 간 구조 및 기능 - Fig. 3

- Fig. 3은 3명 기증자의 간조직을 이용하여 제작된 Liver-Chip에서 재현된 인간 간 구조 및 기능의 결과를 나타낸 것임. 간 칩 상부 채널의 간세포(a)와 하부 혈관 채널의 비간질 세포(정규 배열된 원형 구조는 막의 기공임)(b)를 나타낸 대표 위상차 현미경 이미지(척도 막대는 10μm). 대표적인 면역형광 현미경 이미지로, 팔로이딘으로 염색된 액틴 세포 골격(녹색)과 ATPB를 포함하는 미토콘드리아(자홍색)(c), MRP2를 포함하는 담관소관(적색)(d)을 보여줌.
- CD31로 염색된 간 정맥 내피 세포(녹색) 및 데스민을 포함하는 정상 세포(자홍색)(e), 그리고 데스민을 포함하는 정상 세포(자홍색)와 공존하는 CD68+ 쿠퍼 세포(녹색)(f). c-f의 모든 이미지는 DAPI로 염색된 핵(파란색)을 보여주며, 스케일 바는 100μm를 나타내고 삽입 그림은 5배 더 높은 배율임: 3명의 서로 다른 기증자(밝은 회색 막대와 어두운 회

색 막대는 각각 기증자 1과 2를 나타냄, 흰색 막대는 기증자 3을 나타냄)의 세포로 제작된 차량 대조군 간-칩 상부 채널 유출액의 알부민(g) 및 요소(h) 수준(운반체-투여 후 1일, 3일, 7일째).

- ELISA로 측정. 데이터는 평균 $\pm$ 평균 표준 오차(S.E.M.)로 제시됨. 각 조건(즉, 특정 기증자 및 일수)에 대해 통계 도출에 사용된 정확한 샘플 수는 다음과 같음: (i) 알부민: 기증자 1-1일차 (n=46), 기증자 2-1일차 (n=46), 기증자 3-1일차 (n=39), 기증자 1-3일차 (n=40), 기증자 2-3일차 (n=44), 기증자 3-3일차 (n=38), 기증자 1-7일차 (n=29), 기증자 2-7일차 (n=38), 기증자 3-7일차 (n=30); (ii) 요소: 기증자 1-1일차 (n=12), 기증자 2-1일차 (n=12), 기증자 3-1일차 (n=18), 기증자 1일차 3일 (n=8), 기증자 2일차 3일 (n=12), 기증자 3일차 3일 (n=18), 기증자 1일차 7일 (n=7), 기증자 2일차 7일 (n=12), 기증자 3일차 7일 (n=14). 차량 투여 후 3일차(밝은 회색) 및 7일차(짙은 회색)에 기증자 2(i) 및 기증자 3(j)를 사용한 대조군 간-칩에서 RNA-seq 분석으로 확인된 주요 간 특이적 유전자 수준.
- 데이터는 신선하게 해동된 간세포의 평균 발현량 대비 Log2(배율 변화) $\pm$ TPM(백만 당 전사체) 발현량의 표준 오차로 표시되며, n=4칩 기준임. 3일차와 7일차 간 값의 통계적 유의성은 쌍측 t-검정을 통해 확인되었음; *p < 0.05, **p < 0.01. 각 시간점(예: 3일차 및 7일차)에 대해 통계 도출에 사용된 표본 크기는 기증자 2의 경우 n=3, 기증자 3의 경우 n=4였음.

3-2) <Fig. 3>에서 Live microscopy of the Liver-Chips

- 간 칩의 생체 현미경 관찰 결과, 칩 상부의 '실질' 채널에서는 입방형 및 이핵성 형태를 보이는 간세포의 연속적인 단층이 관찰되었으며, 다공성 막 반대편 하부의 '혈관' 채널에서는 다각형 모양의 간내피세포(LSECs) 단층이 확인됨(Fig. 3). 공초점 형광 현미경 관찰을 통해 간 특이적 형태학적 구조가 확인되었으며, 이는 분화 표지자의 존재로 입증되었음. 여기에는 F-액틴의 극성 분포를 보이는 담관소관, 다약제 내성 관련 단백질 2(MRP2; Fig. 3), 미토콘드리아 막 ATP 합성효소 베타 서브유닛(ATPB; Fig. 3)이 풍부한 간세포, PECAM-1(CD31) 발현 LSECs, CD68+ 쿠퍼 세포 등이 포함됨. (MRP2; Fig. 3), 미토콘드리아 막 ATP 합성효소 베타 서브유닛(ATPB; 그림 3)이 풍부한 간세포, PECAM-1(CD31) 발현 LSECs, CD68+ 쿠퍼 세포, 데스민을 함유한 성상 세포(Fig. 3)의 존재를 통해 간 특이적 형태학적 구조가 확인됨. 또한, 투과형 전자 현미경 관찰을 통해 인간 간에서 발견되는 것과 유사한 세포 간 관계 및 구조의 존재가 확인되었는데, 여기에는 잘 발달된 접합부로 둘러싸인 담관과 쿠퍼 세포와 간정맥 내피 세포 사이의 접합부(접합부)가 포함됨.

3-3) <Fig. 3>에서 Liver-Chip의 가장 중요한 미세환경 - Cytochrome P450 발현 의미

- 기증자 3명 중 기증자 2의 경우 CYP2D6, CYP2C8, CYP2E1 및 MRP2에 대해, 기증자 3의 경우 MRP2에 대해서만 7일차에 3일차에 비해 유전자 발현이 현저히 낮았습니다(Fig. 3). OATP1B3, GSTA1, CYP2E1 및 CYP2D6를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 신선하게 해동된 간세포보다 낮았으며, 이러한 프로파일은 두 기증자에서 반영되었다는 것을 알 수 있음. 또한, CYP2C9 및 CYP3A4 유전자 발현이 차량 또는 약물 투여 후 7일 동안 신선하

게 해동된 간세포보다 높은 수준으로 유지된다는 사실은 고무적임. CYP2C 및 CYP3A 계열이 전체 CYP 집단의 50%를 차지하기 때문임(Tarantino 등, 2009). CYP3A4는 또한 시판되는 많은 약물을 대사하는 주요 효소임. 이 연구에서는 CYP 기능적 활성을 직접 평가하지는 않았지만, 동일한 Liver-Chip이 신선하게 분리된 인간 간세포 및 3D 간 스페로이드와 비교 가능한 1단계 및 2단계 기능적 활성을 나타내는 것으로 이전에 입증되었음(Foster 등, 2019; Jang 등, 2019). 2D 샌드위치 분석판 구성의 간세포에 비해 우수한 활성을 보였음(Jang 등, 2019). 종합하면, 이러한 데이터는 Liver-Chip이 간세포의 기능성을 유지하기 위한 우수한 미세환경을 제공한다는 개념을 뒷받침한다는 것을 의미함. 특히 **cytochrome P450에 의한 약물 대사는 아종에 따라 약물의 독성대사체 또는 무독성대사체가 결정되기 때문에 cytochrome P450의 아종이 발현이 인체의 간과의 유사성은 Liver-Chip에 의한 인체 독성 예측에 결정적인 역할을 함**(박영철, 2011)

3-4) <Fig. 3>에서 알부민 및 요소 생산

- 알부민 및 요소 생산은 배양 간세포의 기능적 지표로 널리 인정되며, 인체 내 생체 간에서 관찰되는 계산된 생산 수준(각각 10^6 간세포당 일일 약 20–105 μ g 및 56–159 μ g)에 도달하는 것을 목표로 함(Baudy 등, 2020; Ribeiro 등, 2019). 기증자 3 명의 서로 다른 간세포로 제작된 Liver-Chips는 배양 1주일 동안 생리학적으로 관련성 있는 수준의 알부민 및 요소 합성을 유지할 수 있었음(Fig. 3). 중요한 점은 IQ MPS 지침에 부합하여, 모든 기증자에서 요소의 일일 평균 생산률 변동계수는 1일차에는 항상 5% 미만이었으나 7일차에는 20%로 증가했음. 반면 알부민 생산의 경우 모든 기증자에서 1일차 변동계수가 더 높았으나 7일차에는 14~27% 사이였음. 이러한 데이터는 실험 간 간-칩의 재현성과 견고성을 입증하며, 인간에서 관찰되는 변동성과 유사한 기증자 간 변동성을 강조함. 실제로 임상 결과 예측을 위한 세포 기반 플랫폼 평가 27 또는 약물이 임상 연구 단계로 진입할 때 기증자 간 변동성을 분석하고 이해하는 능력은 중요함.

3-5) Liver chip의 IQ MPS 제휴 가이드라인에 대한 충족도에 대한 결과

- 이와 같은 결과 데이터는 Liver-Chip이 IQ MPS 가이드라인에서 규정하는 주요 구조적 특성화 및 기본 기능성 요건을 충족함을 확인시켜 주었음. 따라서 인간 모델을 DILI 예측 도구로 평가하기 위한 연구를 수행하였음. IQ MPS는 임상 연구에서 한 약물이 DILI를 유발한 것으로 보고된 7쌍의 소분자 약물을 식별하였으며, 이들 구조적 유사체는 비활성 상태이거나 낮은 활성을 보이며 임상적 DILI를 유발하지 않았음(Table 1).

Table 1 Small-molecule drugs used in the Liver-Chip evaluation.				
Drug	IQ MPS list	Tested in spheroid	Spheroid false negative	Garside DILI rank
Ambrisentan	Yes, matched with Sitaxsentan	Yes	No	5
Asunaprevir	Yes, no matched pair	No	No	2
Benoxaprofen	No	Yes	Yes	1
Beta-Estradiol	No	Yes	Yes	3
Buspirone	Yes, matched with Nefazodone	Yes	No	4
Chlorpheniramine	No	Yes	Yes	3
Clozapine	Yes, matched with Olanzapine	Yes	No	2
Diclofenac	Yes, no matched pair	Yes	No	2
Entacapone	Yes, matched with Tolcapone	Yes	No	4
Fialuridine	Yes, matched with FIRU	Yes	No	1
FIRU	Yes, matched with Fialuridine	No	No	5
Labetalol	No	Yes	Yes	1
Levofloxacin	Yes, matched with Trovafloxacin	Yes	Yes	2
Lomitapide	No, Mipomersen substitute	No	No	3
Nefazodone	Yes, matched with Buspirone	Yes	No	1
	Yes, matched with Clozapine	No	No	5
Pioglitazone	Yes, matched with Troglitazone	Yes	Yes	3
Simvastatin	No	Yes	Yes	2
Sitaxsentan	Yes, matched with Ambrisentan	Yes	No	1
Stavudine	No	Yes	Yes	1
Tacrine	No	Yes	Yes	2
Telithromycin	Yes, no matched pair	No	No	1
Tolcapone	Yes, matched with Entacapone	Yes	No	1
Troglitazone	Yes, matched with Pioglitazone	Yes	No	1
Trovafloxacin	Yes, matched with Levofloxacin	Yes	No	1
Ximelagatran	No	Yes	Yes	1
Zileuton	Yes, no matched pair	Yes	Yes	2

The 27 small-molecule drugs are listed according to the IQ MPS affiliate classification and their ranking in the Garside DILI severity category, where 1 corresponds to drugs with severe clinical DILI and 5 to those with no DILI^{11,12}. Structurally related toxic and non-toxic pairs are indicated as well using bold, italic text.

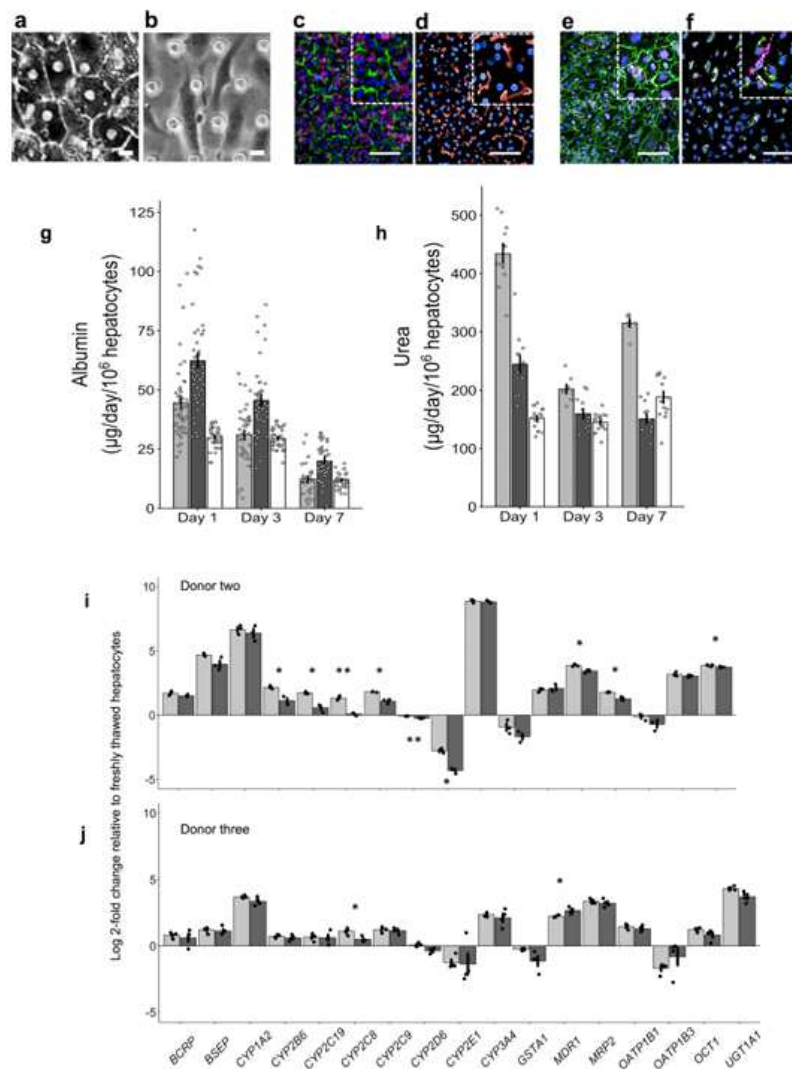


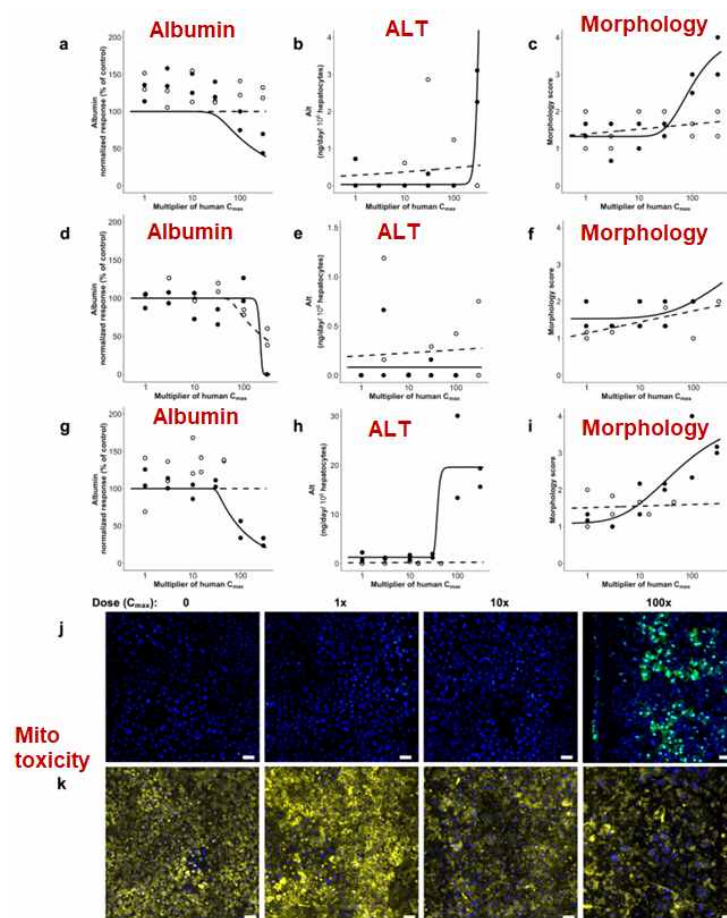
Fig. 3 Recapitulation of human liver structure and function in the Liver-Chip(Liver-Chip에서 재현된 인간 간 구조 및 기능)

4. 결과 - 약물 농도 의존적 독성 및 간 손상 검출(Detection of drug concentration-dependent toxicity and liver injury)

4-1) Liver-chip을 독성 지표 – albumin, ALT와 mitotoxicity

- 7가지 독성 약물을, 각 약물의 인간 혈장 Cmax를 둘러싼 8가지 농도(non-protein bound, <비단백질 결합> 약물 농도를 기준으로 함)로 시험했으며, 가장 높은 농도는 300× Cmax(레보플록사신의 경우와 같이 용해도 제한으로 허용되지 않는 경우 제외)로, 시험관 내 모델에 대한 임상적으로 관련성 있는 시험 농도를 나타냄. 확인된 독성 화합물들은 화합물마다 다른 명확한 농도 및 시간 의존적 패턴을 보였음. 일반적으로 알부민 생산이 억제되면 형태학적 손상 점수와 ALT 수치도 증가했지만, 클로자핀과 올란자핀, 트로글리타존과 피오글리타존, 트로바플록사신과 레보플록사신의 샘플 쌍 비교에서 보듯이, 알부민 생산 감소가 Liver-Chip에서 간세포 독성의 가장 민감한 지표임을 확인하였음

(Fig. 4). 중요한 점은, 7가지 독성 약물 모두 비독성 대조군에 비해 non-protein bound 인간 C_{max}의 낮은 배수에서 알부민 생산을 감소시키거나 ALT 단백질 또는 손상 형태학적 점수의 증가를 초래했으며, 이 결과는 3명의 기증자에서 반복적으로 확인되었음. 또한, 세포 사멸 표지자(카스파제 3/7)에 대한 면역형광 현미경 이미징과 테트라메틸로다민 메틸 에스터(TMRM) 축적 감소 시각화를 통해 측정된 미토콘드리아 손상 (mitotoxicity)(Fig. 4)은 독성을 확인해주었으며, 많은 경우 독성의 잠재적 기전에 대한 통찰력을 제공함. Liver-Chip의 면역형광 현미경 이미징은 트로바플록사신 처리 후 카스파제 3/7 염색이 농도 의존적으로 증가함(Fig. 4); 이는 독성에 잠재적인 세포사멸 성분이 존재할 가능성을 뒷받침함. 주목할 점은, 독성이 낮은 구조적 유사체인 레보플록사신은 세포 사멸을 유발하지 않았다는 점.



<Fig. 4> 약물 농도 의존적 독성 및 간 손상 검출. 클로아지핀(실선 원) 또는 올란자핀(빈 원)이 알부민 생성(a), ALT 방출(b), 형태학적 점수(c)에 미치는 영향; 트로글리타존(실선 원) 또는 피오글리타존(빈 원)의 알부민 생성(d), ALT 방출(e), 형태학적 점수(f)에 대한 영향; 트로바플록사신(실선 원) 또는 레보플록사신(빈 원)의 알부민 생성(g), ALT 방출(h), 형태학적 점수(i)에 대한 영향; 면역형광 현미경 이미지로, 트로바플록사신(0, 1, 10, 100배 단백질-미결합 인간 C_{max} 농도) 7일간 투여 후 세포사멸을 나타내는 카스파제 3/7 염색(녹색)의 농도 의존적 증가를 보여줌; 7일간 시탁센탄을 인간 단백질-미결합 C_{max}의 0, 1, 10, 100배 농도(k)로 처리 시 미토독성(mitotoxicity)을 나타내는 TMRM 염색(노란색)의 농도 의존적 감소. 스케일 바는 50μm를 나타냄.

5. 결과 - Spheroid 및 동물 모델 대비 DILI 예측 감도 향상(Improved sensitivity for DILI prediction compared to spheroids and animal models)

- Liver-Chip이 전임상 약물 개발 과정에서 DILI를 예측하는 데 적합한 도구로 인정받을 수 있다고 판단. 그러나 예측 독성학 맥락에서 Liver-Chip의 성능을 정량화가 필요함. 이를 위해, 임상적으로 간 독성을 유발하는 것으로 확인된 **8가지 추가 약물(베녹사프로펜, 베타-에스트라디올, 클로르페니라민, 라베탈롤, 심바스타틴, 스타부딘, 탁린, 시멜라가트란)**을 포함하도록 약물 시험을 확대하였음.
- 이 약물들은 인간 대상 첫 투여 전 동물 모델을 포함한 표준 전임상 독성학 패키지를 거쳤음에도 불구하고 간 독성을 유발하는 것으로 나타났음. **중요한 점은 8가지 약물의 독성이 간 스페로이드(3D spheroid cultures of primary human hepatocytes 또는 organoid)로는 예측하기 어렵다는 것이 입증되었다는 점(Proctor 등, 2017; Vorrink 등, 2018).**
- 여기서 8개 약물을 포함한 맹검 처리된 27가지 약물 세트 전반에 걸쳐 관찰된 독성을 Table 4에서처럼 안전계수(MOS, margin of safety)으로 정량화하기 위해, 관찰된 최소 독성 농도와 임상 Cmax의 비율을 계산하는 방식을 사용하였음. 최소 독성 농도는 각 주요 평가 지표에서 확인된 최저 농도, 즉 알부민 생산 감소에 대한 IC₅₀ 값, ALT(alanine transaminase) 단백질 증가를 관찰한 최저 농도, 형태학적 점수를 통해 손상을 관찰한 최저 농도를 취하여 구하였음. 최소 독성 농도는 일반적으로 3일차 값과 일치했지만, 때때로 3일차 값이 더 낮았음. 그리고 3D 간 스페로이드에 대해 이전에 보고된 것과 유사한 임계값 50을 사용하여 각 화합물을 독성 또는 비독성으로 분류하기 위해 MOS와 유사한 수치를 임계값과 비교하였음. 이러한 방식으로 분석한 결과, IQMPS 관련 분석의 일환으로 평가된 약물 외에도 Liver-Chip이 labetalol과 benoxaprofen을 간독성 물질로 정확히 판정했음을 확인하였음. 이 반응은 기증자 1과 2 모두에서 일관되게 나타났으며, 주로 알부민 생산량 감소로 나타났음. 그러나 simvastatin과 ximelagatran은 시험한 기증자 중 한 명에게서만 독성이 있는 것으로 나타났는데, 이는 위험 평가 과정에서 여러 기증자를 포함하는 것이 중요함을 다시 한번 보여주는 것임.

Table 4 Calculation of margin of safety (MOS)-like figures.

Drug	Chip MOS donor 1	Chip MOS donor 2	Chip MOS both donors	Spheroid MOS
Ambrisentan	>3	>10	>10	>127
Asunaprevir	4	-	-	-
Benoxaprofen	0.001	0.3	0.001	>0.7
Beta-Estradiol	>5	-	-	22,500
Buspirone	>15	-	-	16,300
Chlorpheniramine	>200	-	-	2141
Clozapine	1.8	5	1.8	14.5
Diclofenac	1.8	-	-	6.1
Entacapone	>6	-	-	46.5
Fialuridine	0.1	2.8	0.1	12.3
FIRU	>108	>108	>108	-
Labetalol	26	22	22	0.41
Levofloxacin	>11.3	>33.7	>33.7	>20
Lomitapide	0	-	-	-
Nefazodone	1.4	-	-	6.8
Olanzapine	>20	>2	>20	-
Pioglitazone	2.8	> 2.8	2.8	> 5.3
Simvastatin	17	45	17	460
Sitaxsentan	0.04	1.6	0.04	8.7
Stavudine	247	107	107	>144
Tacrine	>12	>12	>12	696
Telithromycin	6	-	-	-
Tolcapone	0.004	0.05	0.004	0.3
Troglitazone	0.03	0.1	0.03	2.3
Trovafloxacin	20	19	19	>24.9
Ximelagatran	30	300	30	335
Zileuton	>7	15	15	>7.7

The analysis was carried out using the free IC_{50} concentration of the drug tested in the assay divided by the total concentration of drug in human plasma at C_{max} .³¹

6. 결과 – 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)

- 전체적으로, Liver-Chip은 두 명의 기증자를 사용하여 시험한 15개의 독성 약물 중 12개에서 독성을 정확하게 예측하여, 이 약물 세트에 대해 80%의 민감도를 보였음. 이는 Table 5의 민감도와 특이도 결정에서처럼 이전에 발표된 데이터(Proctor 등, 2017; Hendriks 등, 2019; Li 등, 2020)에 기반한 동일한 약물 세트에 대한 3차원 간 구형체(현재 제약 업계에서 널리 사용되는 전임상 모델)의 민감도(42%)의 거의 두 배에 달하는 수치이며, 해당 모델은 세트 내 19개의 독성 약물 중 8개만 정확히 식별할 수 있었음.
- 중요한 점은, Liver Chip은 어떤 약물도 독성으로 잘못 표시하지 않았다는 것임(특이도 100%). 반면 3차원 간 구상체는 오탐을 보였음(특이도 67%에 불과함). 이러한 오탐은 안전하고 효과적인 화합물을 잘못 실패로 판단할 경우 심각한 결과를 초래할 수 있기 때문에 예측 스크리닝 기술의 유용성을 크게 제한할 수 있음. 흥미롭게도, 리버칩이 검출하지 못한 세 가지 약물(레보플록사신, 스타부딘, 타크린)은 구상체에서도 독성 약물로 검출되지 않았음. 이는 리버칩이 구상체의 민감도를 포괄할 수 있으며, 해당 약물의 독성이 이러한 모델에 존재하지 않는 다른 세포나 조직과 관련될 수 있음을 시사하는 것임. 검증된 각 독성 약물은 역사적으로 동물 모델을 통해 평가되었으며, 모든 경우 해당 약물의 수용 가능한 치료적 범위 확보와 임상 시험 진입을 위해 고려 사항 및 기준치가 적절하다고 판단되었음. Liver-Chip이 임상 농도에서 이들 약물의 80%를 DI_{NI} 위험으로 경고할 수 있다는 점은 모델 민감도의 놀라운 개선을 의미하며, 이는 전임상 개발 단계에서 더 나은 의사 결정을 이끌 수 있음.

Table 5 Sensitivity and specificity determination.						
Model	True positive	True negative	False positive	False negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Chip donor 1	16	5	0	6	73 [51.4-86.8%]	100
Chip donor 2	9	3	0	6	60 [35.3-80.3%]	100
Chip both donors	12	3	0	3	80 [54.2-92.8%]	100
Spheroid	8	2	1	11	42 [22.9-64.0%]	100

Predictive performance for chips and spheroids as determined by published analysis³¹, which does not account for protein binding, and setting the threshold on the MOS-like values at 50 for both chips and spheroids (a value above 50 would indicate a drug as negative for toxicity).

7. 결과 - 약물-단백질 결합을 고려하여 정확도 향상(Accuracy improved by accounting for drug-protein binding)

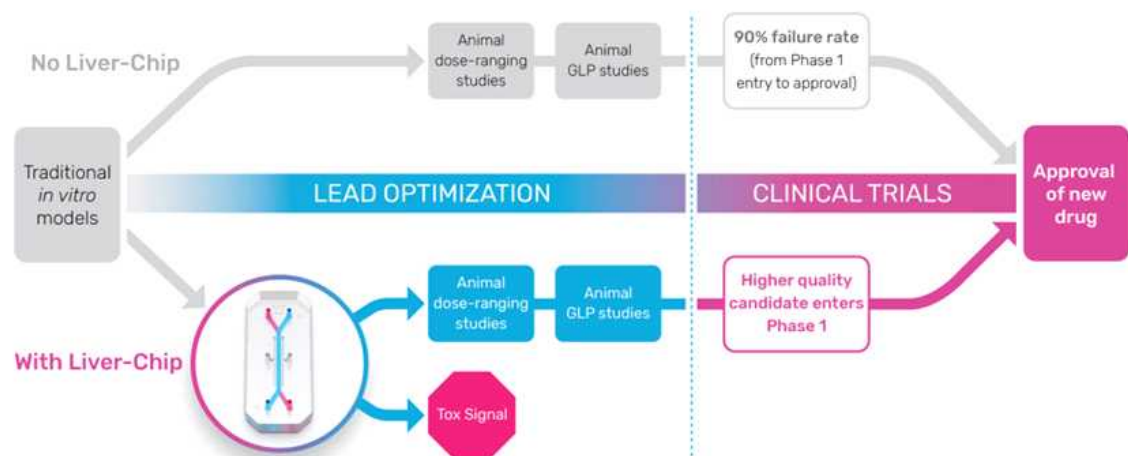
- 이전 섹션에서 MOS 유사 값을 계산할 때, 3차원 간 스페로이드 평가에 사용된 기존 방법(Proctor 등, 2017)을 따랐으나, 이는 단백질 결합을 고려하지 않음. 약물 작용의 기본 원리가 단백질-비결합 약물 농도가 약물 효과를 주도한다고 규정하기 때문에, 이전에 보고된 접근법(Waldmann 등, 2014)을 사용하여 단백질 결합을 고려함으로써 MOS 유사 값을 계산하는 대체 방법론을 탐구하였음. 이에 따라 본 연구의 27개 약물에 대해 단백질 결합을 고려하여 결과를 재분석하였음. 2% 태아 소 혈청을 함유한 배지를 사용한 Liver-Chip 내 투여된 약물 농도의 자유 분율을 혈장 C_{max}의 자유 분율과 비교하였음. 이 접근법을 사용하여 Liver-Chip 결과를 재분석하고 임계값을 375(거짓양성을 피하면서 민감도를 극대화하기 위해 선택한 값)로 설정함으로써 칩 성능이 개선되었음: 기증자 1과 2에서 각각 77%와 73%의 진양성률(민감도)과 두 기증자 모두에서 100%의 진음성률(특이도)을 얻었음(Table 6). 중요한 점은 두 기증자 모두에서 테스트한 18개 약물을 포함할 때 민감도가 87%로 증가했으며, 이는 스타부딘의 독성 검출을 가능케 했다는 것임. 동일한 분석을 spheroid에 적용하고 100% 특이도를 유지하면서 민감도를 극대화하기 위해 유사한 임계값을 선택했을 때 민감도는 47%에 불과하였음. 놀랍게도, 단백질 결합 보정 분석을 사용했을 때 두 기증자 간 간-칩 분석과 가사이드 DILI 중증도 척도(Garside DILI severity scale) 간의 스피어먼 상관관계 값은 0.78을 보인 반면, 낮은 임계값을 사용했을 때는 0.43에 불과하였음. 따라서 단백질 결합 보정 접근법은 더 높은 민감도를 제공할 뿐만 아니라, 임상에서 관찰된 DILI 중증도와 더 잘 부합하는 방식으로 약물의 상대적 독성을 순위화함. 이 관찰 결과는 본 분석 접근법의 타당성과 보정되지 않은 버전 대비 우월성을 뒷받침함. 요약하면, 이러한 결과는 Liver-chip이 높은 예측력을 지닌 DILI 모델이며 현재 사용 중인 다른 접근법보다 이 측면에서 우수하다는 확신하게 함.

Table 6 Sensitivity and specificity determination.						
Model	True positive	True negative	False positive	False negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Chip donor 1	17	5	0	5	77 [56.1-89.8%]	100
Chip donor 2	11	3	0	4	73 [47.5-89.0%]	100
Chip both donors	13	3	0	2	87 [61.5-96.0%]	100
Spheroid	9	3	0	10	47 [27.0-68.5%]	100

Predictive performance as determined by considering free (unbound) drug concentrations and setting the threshold on the MOS-like values at 375 for chips and at 2250 for spheroids. 95% confidence intervals are shown for the sensitivity values.

8. 결론 : 장기-온-어-칩(Organ-On-A-Chip)에 의한 독성 예측

- **Organ-on-a chip 활용 제한점의 원인:** 수많은 저자들이 장기칩 기술이 신약 개발 및 연구를 획기적으로 개선할 잠재력을 지닌다고 주장해왔지만, 주요 제약사 다수가 이미 해당 기술에 투자했음에도 불구하고 일상적인 활용은 제한적임(Low 등, 2021; Roth 등, 2021). 이는 여러 요인에 기인할 수 있는데, 여기에는 오가노칩이 인간의 생물학적 반응을 견고하고 반복 가능한 방식으로 재현한다는 것을 보여주는 종단간 연구의 부재, 적절한 광범위한 화합물 세트에 걸쳐 오가노칩의 성능이 기존 전임상 모델의 성능을 능가한다는 입증, 그리고 일상적인 전임상 워크플로우 내에서 이 기술을 구현하는 방법에 대한 설명 등이 원인으로 고려됨
- **연구결과를 통해 organ-on-a chip의 활용 제한점을 극복하기 위한 4가지 요소**
 - ① 후보 약물과 관련된 위험을 보다 정확하게 분류하여 임상 진입 및 1상 시작 용량에 대한 '증거의 무게' 논증을 뒷받침하는 가치 있는 데이터를 **organ-on-a chip 연구를 통한** 제공
 - ② Liver-on-a chip은 후보 약물이 될 가능성이 있는 3~5개의 화합물을 확인한 리드 최적화 단계의 신약 개발 파이프라인에 활용될 수 있음(Fig. 1): Hit compound은 잠재적 약물의 표적이 결정되면 HTS(High Throughput Screening, 초고속대량스크리닝) 통해 발견된 물질 중에서 초기 결과에서 양호한 활성을 나타내는 화합물이며 lead compound는 hit compound 중에서 상대적으로 좋은 성능을 나타내는 화합물임. 리드 최적화(Lead optimization) 과정은 화학 구조 최적화, 생물학적 활성 최적화, 안전성 평가 그리고 약물 성질 최적화로 이루어짐. 안전성 평가를 통한 최적의 후보물질을 위해 인간의 liver-on-a-Chip을 사용. Liver-on-a-Chip을 통해 간독성의 전조현상을 나타내는 biomarker를 확인하여 후보 약물 지위를 우선순위에서 제외. Biomarker로는 장기간 노출 시 미토콘드리아 기능 장애, 산화 스트레스, 지질 방울 형성 및 선천성 면역 반응 등으로 확인함. 이와 같은 간의 칩을 이용하여 높은 전임상 및 임상 탈락률로 이어질 뿐만 아니라 환자에게 심각한 건강 위험을 초래의 예방이 가능함.
 - ③ 칩 재료(PDMS)가 비특이적 결합 경향의 문제점: 간 칩 제작에 사용되는 현재의 칩 재료(PDMS)가 비특이적 결합 경향이 있는 일부 소분자 화합물에 문제가 될 수 있다는 점을 인정해야 함: 연구는 재료 결합 문제가 실제로 간 칩 DILI 모델의 예측 가치를 크게 저하시키지 않음을 입증했지만, 결합 가능성이 낮은 재료를 사용한 칩 개발 작업이 현재 진행 중임. 이러한 칩이 개발되기 전까지는 사용자들이 세포 칩을 활용해 PDMS 결합 가능성을 평가하고, 배출 채널 내 약물을 LC/MS로 측정하여 필요 시 워크플로우를 조정할 것을 권장해야 함. 또한 많은 제약사들이 포트폴리오를 다각화하여 현재 소분자 약물이 전체의 40~50%만을 차지한다는 점도 인지해야 함. 따라서 대형 분자 및 생물학적 치료제에 대한 Liver-Chip 성능에 대한 추가 연구가 수행되어야 하며 주거성 및 순환성 면역 세포의 통합은 예측 능력을 더욱 향상시킬 것임.
 - ④ 경제적 효과에 대한 기대감: 임상 결과와 일치하는 예측 모델은 주요 투자 단계에서 의사 결정 시 과학자와 기업 경영진에게 더 큰 확신을 제공할 것임. 경제 분석에 따르면, 기존 전임상 모델에 소분자 DILI 예측을 위한 인간 간 칩을 보완하면 상당한 경제적 효과를 가져올 수 있으며, 기술의 광범위한 채택은 R&D 생산성 향상으로 인해 업계 전체에 연간 약 30억 달러의 경제적 효과를 창출할 잠재력이 있음. 또한 분석 결과, 약물 개발 중단을 초래하는 가장 흔한 독성 문제를 해결하기 위해 추가로 4종의 장기칩 모델을 활용하고 이들 장기칩이 간칩과 유사한 성능을 보일 경우 생산성 향상 효과가 연간 약 240억 달러로 확대될 수 있음을 시사함



<Fig. 1> Proposed positioning of the Liver-Chip within a typical pharma preclinical workflow. Fig. 5는 일반적인 제약 전임상 워크플로우 내 간-칩(Liver-Chip)의 제안된 위치를 나타낸 것임. 일반적으로 제약사는 동물 실험 전 화학적 최적화를 안내하기 위해 일련의 체외 시험을 활용함. 유망한 약물 후보물질은 이후 규제 승인을 위한 필수 연구 단계인 임상 시험 진입 전 용량 범위 설정 연구로 진행됨. 여기서 제안된 데이터에 따르면, 간-칩은 체외 시험과 용량 범위 설정 동물 연구 사이에 배치하는 것이 가장 적합할 것으로 예상됨. 간-칩에서 독성을 보이지 않은 후보 약물은 약물-이 간 독성 경고 없이 동물 실험을 통과할 수 있으며, 임상적 간 신호 발생 가능성이 낮게 유지된 상태로 임상 단계로 진행될 수 있다는 확신을 높여줄 것임. 간-칩에서 독성을 보인 후보 약물은 과학자들이 해당 독성의 치료 적응증 관련성과, 이 결과와 임상 효능에 필요한 노출량 사이에 잠재적 여유가 있는지 재고하도록 유도할 것임. 이는, 후보 약물이 1상 임상시험 과정에 진입할 때 승인 가능성이 더 높다는 확신을 지속적으로 높일 뿐만 아니라, 용량 범위 설정 연구나 규제 연구를 수행하지 않으므로 동물 사용량도 줄일 수 있음.

Part 4. 전체 결론

- **Organoid vs Organoid-on-a chip vs Organ-on-a chip:** Microfluidic(미세유체)로 연결되는 것이 대세이며 Organoid-on-a chip는 Organ-on-a chip보다 실제 응용 측면에서 다소 낮은 편임. Organoid-on-a chip와 Organ-on-a chip는 장단점이 있지만 사용 맥락과 맞게 선택하는 것이 바람직함
- **장기-온-어-칩(Organ-On-A-Chip, OoC)에 의한 IVIVE 예측:** Liver-in-a chip으로 PK parameter를 측정하였지만, 단순히 자체적으로 인체 PK의 지표 예측에 다소 문제가 있음. 복잡한 생물학적 과정(제거율, 투과성, 분배), 연구된 체외 시스템의 하드웨어 특정 정보와 화합물 특정 정보를 담은 소프트웨어와 결합한 OoC-digital twin model(DigiLoCs) 모델은 거의 정확하게 인체 PK 지표를 예측함. Liver-in-a chip과 OoC-digital twin model의 AUC 차이 비교에서 3-5배 정도로 Liver-in-a chip 이용 PK 시험에서 높게 나오는 TK 수준임.
- DILI(drug-induced liver injury)의 예측에서 Spheroid 및 Organoid보다 정밀한 Microfluidic-기반 liver-on-a-chip에 의한 예측이 2배 정도 높은 민감도를 가짐

<참고문헌>

- Proctor, W. R. et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. Arch. Toxicol. 91, 2849–2863(2017).
- Waldmann, T. et al. Design principles of concentration-dependent transcriptome deviations in drug-exposed differentiating stem cells. Chem. Res. Toxicol. 27, 408–420 (2014).
- Low, L. A. et al. Organs-on-chips: into the next decade. Nat. Rev. Drug Discov. 20, 345–361 (2021).
- Roth, A. et al. Human microphysiological systems for drug development. Science 373, 1304–1306 (2021).
- Borgstrom L, Johansson CG, Larsson H, Lenander R. Pharmacokinetics of propranolol. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. 1981; 9(4):419–429.
- Kuepfer L, Niederalt C, Wendl T, Schlender J, Willmann S, Lippert J, et al. Applied concepts in PBPK modelling: how to build a PBPK/PD model. CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology. 2016;5(10):516–531.
- Docci L, Milani N, Ramp T, Romeo AA, Godoy P, Franyuti DO, et al. Exploration and application of a liver-on-a-chip device in combination with modelling and simulation for quantitative drug metabolism studies. Lab on a Chip. 2022; 22(6):1187–1205
- Tsamandouras N, Kostrzewski T, Stokes CL, Griffith LG, Hughes DJ, Cirit M. Quantitative assessment of population variability in hepatic drug metabolism using a perfused three-dimensional human liver microphysiological system. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2016; 360(1):95105.
- Mateus A, Matsson P, Artursson P. Rapid measurement of intracellular unbound drug concentrations. Molecular Pharmaceutics. 2013; 10(6):2467–2478.
- Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. Nat Biotechnol. 2014; 32(8):760–772.
- Rodrigues AV, Alexandre-Pires G, Vale ´rio-Bolas A, Santos-Mateus D, Rafael-Fernandes M, Pereira MA, et al. 3D-hepatocyte culture applied to parasitology: immune activation of canine hepatic spheroids exposed to leishmania infantum. Biomedicines. 2020; 8(12):628.
- Rajan SAP, Sherfey J, Ohri S, Nichols L, Smith JT, Parekh P, et al. A novel microfluidic liver tissue chip with continuous recirculation for predictive pharmacokinetics applications. The AAPS Journal. 2023; 25(6).
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing; 2021. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Thelen K, Coboeken K, Willmann S, Burghaus R, Dressman JB, Lippert J. Evolution of a detailed physiological model to simulate the gastrointestinal transit and absorption process in humans, part 1: oral solutions. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011; 100(12):5324–5345.

Poulin P, Haddad S. Hepatocyte composition-based model as a mechanistic tool for predicting the cell suspension: aqueous phase partition coefficient of drugs in in vitro metabolic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 102(8):2806–2818

Austin RP, Barton P, Mohamed S, Riley RJ. The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physiochemical properties. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004; 33(3):419–425

Stadnicka-Michalak, J.; Schirmer, K. In Vitro-In Vivo extrapolation to Predict Bioaccumulation and Toxicity of Chemicals in Fish Using Physiologically Based Toxicokinetic Models. In *In Situ Bioavailability and Toxicity of Organic Chemicals in Aquatic Systems*; Springer: New York, 2022; pp 229–258; DOI: 10.1007/7653_2019_34.

Cohen Hubal, E. A.; Wetmore, B. A.; Wambaugh, J. F.; ElMasri, H.; Sobus, J. R.; Bahadori, T. Advancing Internal Exposure and Physiologically-Based Toxicokinetic Modeling for 21st-Century Risk Assessments. *J. Expo. Sci. Env. Epidemiol.* 2019, 29 (1), 11–20.

Louisse, J.; Beekmann, K.; Rietjens, I. M. C. M. Use of Physiologically Based Kinetic Modeling-Based Reverse Dosimetry to Predict In Vivo Toxicity from In Vitro Data. *Chem. Res. Toxicol.* 2017, 30 (1), 114–125.

Lin, Z.; Aryal, S.; Cheng, Y.-H.; Gesquiere, A. J. Integration of In Vitro and In Vivo Models to Predict Cellular and Tissue Dosimetry of Nanomaterials Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *ACS Nano* 2022, 16 (12), 19722–19754.

Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 32, 760–772 (2014).

Esch, E. W. et al. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 248–260 (2015).

Chen, J.; Noorlander, A.; Wesseling, S.; Bouwmeester, H.; Kramer, N. I.; Rietjens, I. M. C. M. Integrating In Vitro Data and Physiologically Based Kinetic Modeling to Predict and Compare Acute Neurotoxic Doses of Saxitoxin in Rats, Mice, and Humans. *Environ. Sci. Technol.* 2023, 57 (30), 10974–10984

Tarantino, G. et al. Drug-induced liver injury: is it somehow foreseeable? *World J. Gastroenterol.* 15, 2817–2833 (2009).

Foster, A. J. et al. Integrated in vitro models for hepatic safety and metabolism: evaluation of a human Liver-Chip and liver spheroid. *Arch. Toxicol.* 93, 1021–1037 (2019).

Jang, K.-J. et al. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip. *Sci. Transl. Med.* 11, eaax5516 (2019).

Baudy, A. R. et al. Liver microphysiological systems development guidelines for safety risk assessment in the pharmaceutical industry. *Lab Chip* 20, 215–225 (2020).

Ribeiro, A. J. S., Yang, X., Patel, V., Madabushi, R. & Strauss, D. G. Livermicrophysiological systems for predicting and evaluating drug effects. *Clin.Pharmacol. Ther.* 106, 139–147 (2019).

Proctor, W. R. et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.* 91, 2849–2863(2017).

Vorrink, S. U., Zhou, Y., Ingelman-Sundberg, M. & Lauschke, V. M. Prediction of drug-induced hepatotoxicity using long-term stable primary hepatic 3D spheroid cultures in chemically defined conditions. *Toxicol. Sci.* 163, 655–665 (2018).

Proctor, W. R. et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.* 91, 2849–2863(2017).

Hendriks, D. F. G. et al. Mechanisms of chronic fialuridine hepatotoxicity as revealed in primary human hepatocyte spheroids. *Toxicol. Sci.* 171, 385–395(2019).

Li, F., Cao, L., Parikh, S. & Zuo, R. Three-dimensional spheroids with primary human liver cells and differential roles of Kupffer cells in drug-induced liver injury. *J. Pharm. Sci.* 109, 1912–1923 (2020).

Simon, T. et al. Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 432–437(2000).

Garside, H. et al. Evaluation of the use of imaging parameters for the detection of compound-induced hepatotoxicity in 384-well cultures of HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 28, 171–181(2014).

Levoquin (Levofloxacin) Product Monogram., 1–66. (Janssen Inc., 2011).

Kahn, J. B. Latest industry information on the safety profile of levofloxacin in the US. *Chemotherapy* 47, 32–37 (2001).

Ölander, Magnus. (2019). Proteomic and Functional Analysis of In Vitro Systems for Studies of Drug Disposition in the Human Small Intestine and Liver. 10.13140/RG.2.2.33129.03681.

Londoño-Berrio, M.; Castro, C.; Cañas, A.; Ortiz, I.; Osorio, M. Advances in Tumor Organoids for the Evaluation of Drugs: A Bibliographic Review. *Pharmaceutics* 2022, 14, 2709.

Nayak S, Sondkar A, Vinchurkar G, Shirsath S, Shintre S, Vaidhun B. Organs-on-chips Provide Insights into Molecular Mechanisms of Disease and Facilitate the Design of Newer Treatment Strategies: A Concise Review. *J Explor Res Pharmacol.* 2024;9(2):116-123.

Proctor, W. R. et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.* 91, 2849–2863(2017).

Waldmann, T. et al. Design principles of concentration-dependent transcriptome deviations in drug-exposed differentiating stem cells. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 408–420 (2014).

Aravindakshan MR, Mandal C, Pothen A, Schaller S, Maass C. DigiLoCS: A leap forward in predictive organ-on-chip simulations. *PLoS One*. 2025 Jan 9;20(1):e0314083.

Kuepfer L, Niederalte C, Wendl T, Schlender J, Willmann S, Lippert J, et al. Applied concepts in PBPK modelling: how to build a PBPK/PDmodel. *CPT:Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2016;5(10):516–531.

Docci L, Milani N, Ramp T, Romeo AA, Godoy P, Franyuti DO, et al. Exploration and application of a liver-on-a-chip device in combination with modelling and simulation for quantitative drug metabolism studies. *Lab on a Chip*. 2022; 22(6):1187–1205

Tsamandouras N, Kostrzewski T, Stokes CL, Griffith LG, Hughes DJ, Cirit M. Quantitative assessment of population variability in hepatic drug metabolism using a perfused three-dimensional human liver microphysiological system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016; 360(1):95105.

Mateus A, Matsson P, Artursson P. Rapid measurement of intracellular unbound drug concentrations. *Molecular Pharmaceutics*. 2013; 10(6):2467–2478.

Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(8):760–772.

Rodrigues AV, Alexandre-Pires G, Vale ´rio-Bolas A, Santos-Mateus D, Rafael-Fernandes M, Pereira MA, et al. 3D-hepatocyte culture applied to parasitology: immune activation of canine hepatic spheroids exposed to leishmania infantum. *Biomedicines*. 2020; 8(12):628.

Rajan SAP, Sherfey J, Ohri S, Nichols L, Smith JT, Parekh P, et al. A novel milli-fluidic liver tissue chip with continuous recirculation for predictive pharmacokinetics applications. *The AAPS Journal*. 2023; 25(6).

Wang H, Ning X, Zhao F, Zhao H, Li D. Human organoids-on-chips for biomedical research and applications. *Theranostics* 2024; 14(2):788-818.

Nayak S, Sondkar A, Vinchurkar G, Shirsath S, Shintre S, Vaidhun B. Organs-on-chips Provide Insights into Molecular Mechanisms of Disease and Facilitate the Design of Newer Treatment Strategies: A Concise Review. *J Explor Res Pharmacol*. 2024;9(2):116-123.

105. Organ-on-a-chip(OoC)의 독성학적 응용과 미래 – OoC Toxicology

1. 독성학의 당면한 문제점

1-1) 독성학의 기본 원리와 역할

- 독성학은 약물이나 독성 물질이 초래하는 위험을 평가하고 이를 완화하기 위해 **독성 메커니즘과 용량-반응 관계**의 규명하는 학문
- 인간과 환경 건강 보호, 규제 정책 수립, 약물 개발 및 화학 **안전성 평가에 필수적인 역할**을 함.

1-2) 당면한 독성시험의 문제점

- 현대 과학의 요구와 **사회적 기대를 충족시키는 데 방해**가 되는 몇 가지 근본적인 과제에 직면함.
- ① 경제협력개발기구(OECD) 화학물질 시험 지침은 급성 독성, 발암성, 생식 독성, 피부 자극성 등을 포함한 화학물질 독성 평가를 위한 표준화된 프로토콜을 제공. 이는 인간 건강 보호를 위한 규제 결정에 핵심적 역할을 하는 전통적인 평가 방법임. 그러나 **약동학(PK), 대사(metabolism) 및 면역 반응에 대한 종간 차이**는 동물에서 인간으로 데이터의 외삽에 있어 상당한 어려움을 초래함.
- ② **단순한 인간 세포 배양이나 설치류 모델에 대한 지속적인 의존으로 생물학적 기능 한계와 동물 종간 차이**로 인해 인간 반응을 정확히 예측하지 못하는 경우가 많다는 점. 이와 같은 괴리는 전통적 독성학 시험의 예측력을 약화시켜 인간 건강 결과로 외삽하는 데 실패의 원인임.
- ③ **근친 교배된 실험동물의 유전적 유사성**은 독성학에서 인구 수준 결론을 도출하는 능력을 어렵고 복잡하게 만들.
- ④ 현대의 독성학적 관점에서 주요 요소는 **장기적·저용량·다중적 건강 영향 평가의 복잡성 증가이며** 만성 노출과 화학 혼합물의 누적적 영향에 대한 심층적 이해가 요구됨.
- ⑤ 기타 동물시험법 및 대체시험법도 유전자 조작 등을 통한 분자 및 세포 수준에서 특정 독성학적 메커니즘을 탐구가 가능하였음. 그러나 이러한 모델들은 **인간과 유사한 순환, 면역 또는 대사 기능을 과장하는 것과 같은 복잡한 장기 시스템이 부족하여** 인간 특유의 독성학적 반응을 재현하는 능력이 제한된다는 점에서 상당한 한계가 존재함. 또한, 단순한 신체 구조로 인해 인간 독성학에서 중요한 다기관 상호작용을 모델링하는 능력이 제한됨.
- 결과적으로 동물 연구에서 도출된 통찰력은 종종 왜곡되어, **80% 이상의 약물이 임상 시**

험에서 안전하지 않거나 효과가 없는 것으로 입증(Alteri 등, 2018).

2. 독성학을 위한 Organoid-on-a chip vs organ-on-a chip(OoC)의 비교 분석

2-1) Organoid-on-a chip

- **개념:** 정적인 3차원 세포 배양으로 이루어지는 오가노이드는 생체 조직의 구조, 기능 및 기계적 특성을 정확히 반영하지 못할 뿐만 아니라, 신체 내의 매우 복잡하고 동적인 3차원 환경을 재현할 수도 없음. 이와 같은 정적인 3차원 오가노이드의 단점을 극복하기 위해 3차원 오가노이드에 생체 마이크로유체(microfluidic), 조직 인터페이스 및 기계적 자극을 생체모방적이고 통제된 방식으로 통합 및 Chip을 통한 모니터링하는 생체 내와 유사한 장기를 오가노이드-온-어-칩 시스템(organoid-on-a chip system)이라고 함. 이 플랫폼은 일반적으로 세포로 라이닝된 마이크로유체 설계와 체외 미세생리학계(MPS, microphysiological systems)를 활용하여 질병 모델링 및 맞춤형 의학을 가속화하는 3차원 소형화 생체모방 장기 모델로 정의됨. 간단히 정의하면 성체 또는 다능성 줄기세포를 이용하여 인간 장기를 모방한 **3차원 조직 유사체**인 오가노이드(organoid) 통합 그리고 제작한 다중 오가노이드 모델을 chip을 통해 직렬 또는 병렬로 구축하여 서로 다른 장기(예시: 간과 장) 간의 근본적인 상호작용을 연구하는 것이 오가노이드-온-칩(organoid-on-a chip, OrgOC).
- **문제점:** Organoid-on-a chip은 생체 내 생물학적 특성을 재현할 수 있지만, 생체 내 대응물의 기능성에 대한 시뮬레이션은 아직 달성하기에는 한참 멀었음.

2-2) Organ-on-a chip

- **개념:** Organ on a chip(OoC, 장기-온-칩) 전자회로가 놓인 칩 위에 살아있는 특정 장기를 구성하는 세포를 배양 또는 장기 사이 통합을 활용하여 상호 연결된 미세유체(microfluidic) 구획을 통해 장기 기능을 시뮬레이션하는 기술이 임.
- **장점:** Organoid-on-a chip은 생체 내 대응물의 기능성에 대한 시뮬레이션을 아직 달성하기 어렵지만 Organ-on-a chip는 자연적 생리적 환경을 모방한 미세유체 환경에서 배양 및 세포외 기질은 정상적인 생리 기능에 필요한 구조적 지지와 생화학적 신호를 제공하는 측면에서 생체 내 대응물의 기능성에 대한 시뮬레이션이 가능함.
- **문제점 및 해결책:** 빠른 진화에도 불구하고, 이 기술은 혈관화 부족, 다중 장기-온-어-칩 시스템 개발, 단일 칩 상에서의 인체 재현과 같은 주목할 만한 과제에 직면해 있음. 특히 낭포성 섬유증이나 당뇨병과 같은 전신성 질환, 병리생리학적 과정 및 약리학적 효과는 여러 장기를 관여시키므로 서로 다른 유형의 OoC를 사용하여 개별적으로 연구할 수 없음(van Berlo 등, 2021). **Body-on-a-chip**(BoC, 인체내-장기-모사체)는 체외 모델을 사용하여 서로 다른 장기 간의 상호작용을 표현하도록 제안되었으며, 다양한 전신 질환 모델과 약물 투여 경로와 관련된 ADME(흡수, 분포, 대사 및 배설) 과정과 같은 약동학 과정을 분석하고 **약물 효능 및 독성**을 예측할 수 있게 함(Kimura 등, 2018). BoC를 사용하면 장(GUT)에서의 약물 흡수, 간에서의 대사, 신장에서의 배설을 종합적으로 고려하여 약물의 약동학 프로파일을 완전히 조사할 수 있음(Sung 등, 2018).

- **Body-on-a-chip 개념과 보완점: Human-on-a chip**이라기도 불리는 BoC는 환자 특이적 세포를 사용하여 모델을 재현할 경우, 약물 스크리닝, 질병 모델링 및 맞춤형 의학에 적용될 수 있음. Fig. 12에서처럼 BoC는 채널로 연결되거나 단일 칩 상에서 서로 다른 장기의 공동 배양을 통해 연결된 두 개 이상의 OoC로 구성된 다중 장기 온 칩 플랫폼임. 이 모델은 일반적으로 관심 대상 표적 장기(예: 종양, 염증), 약물 대사 및 배설에 관여하는 장기(예: 간, 신장), 그리고 독성이 발생할 수 있는 장기를 포함함(Vunjak-Novakovic 등, 2021; Sung 등, 2019). 그러나 해결할 과제로 ① 영양분과 성장 인자 등의 장기에 적절한 미세환경, ② 기능적 연결을 구축하는 복잡성을 극복하는 미세환경(pH, 산소 수준, 영양분 농도 구배 등), ③ 혈관과 적절한 미세유체 흐름과 미세환경, ④ 프로토콜 표준화, 재현성, 시스템 검증과 관련된 문제에 대한 해결 등이 있음.

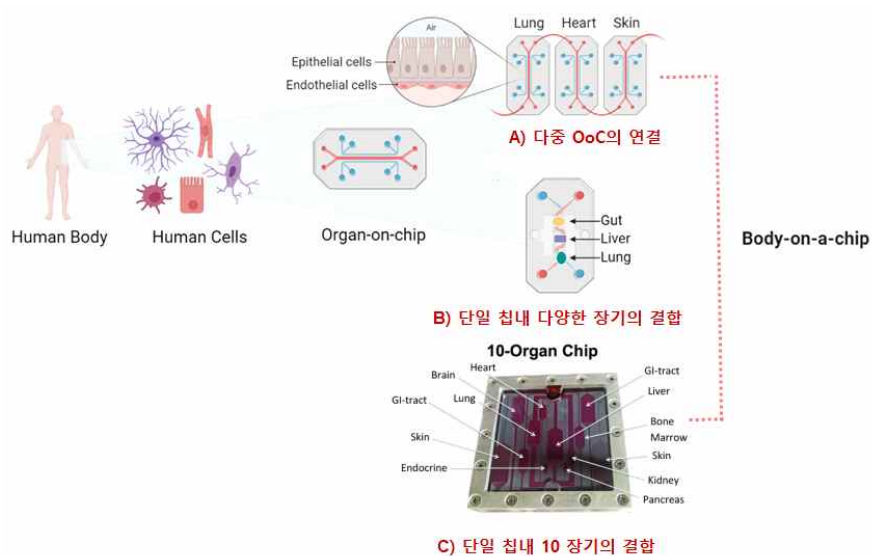


Fig 12. 바디-온-어-칩(Body-on-a-chip)의 개발 과정. 주요 내용: a) 다중 OoC의 연결; b) 단일 칩 내 다양한 장기의 결합, c) 단일 칩 내 10개 장기 칩

3. Organ-on-a chip Toxicology (OcT)

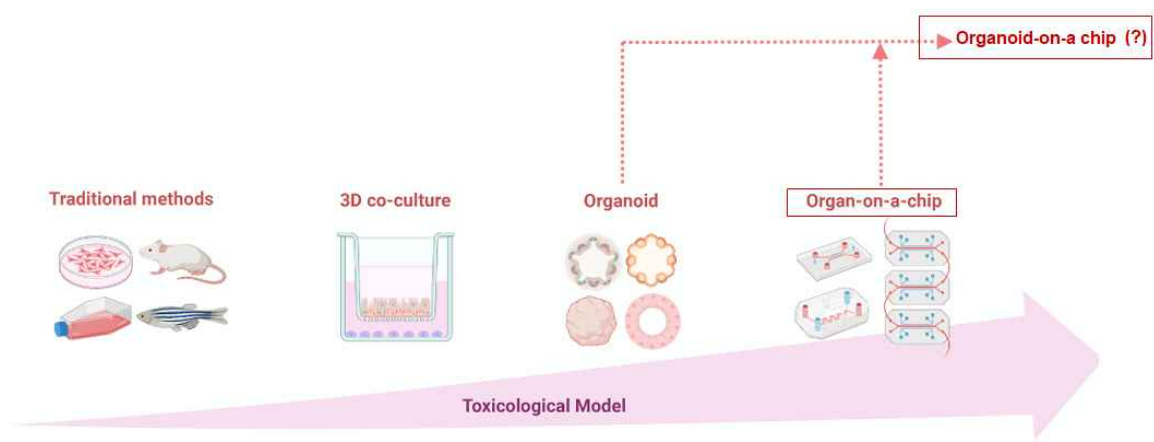
3-1) 개념

- OoC(Organ on a chip) 기술은 독성학 연구의 패러다임 전환을 의미하며, 단순한 '기술적 도구'에서 진보된 생물학적 모델링, 기전적 통찰력, 인간 관련 독성 평가를 통합한 포괄적·학제적 연구 프레임워크인 장기-온-칩 독성학(OCTs)으로 진화하고 있음.
- 여기서 OCT는 독성학 내 하위 분야로 정의되며, OoC 기술을 활용하여 주요 장기 구조와 기능을 복제함으로써 **인체에 대한 외인성 요인의 독성 효과와 메커니즘을 연구하는 독성학**

3-2) 독성학의 패러다임 전환과 Organ-on-a chip 기반 Toxicology

3-3) 독성학의 새로운 패러다임 전환

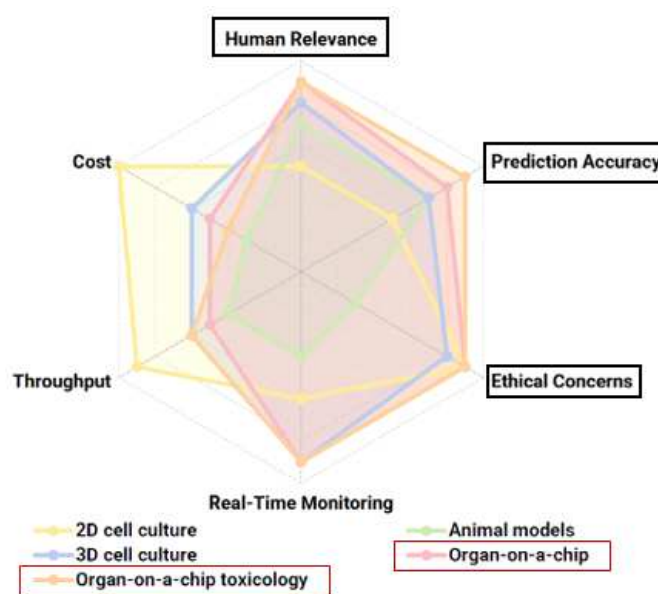
- 독성학의 새로운 패러다임은 ① **인간 관련성 향상**, ② **기전적 이해 심화를 통한 예측의 정확성**, ③ **윤리적 기준 준수**를 통해 독성시험을 개선하려는 새로운 접근 방법론(NAM, new approach methodologies)의 통합에 힘입어 근본적인 변화를 겪고 있음(Schmeisser 등, 2023).
- NAM은 첨단 체외 모델, 고속 대량 스크리닝, 계산 독성학 등을 포함한 방법론들로 인간 생물학적 반응을 모사함으로써 보다 예측이 가능하고 정확한 독성 평가를 가능하게 함(Schmeisser 등, 2023). 특히, <그림-1> 전통적인 독성예측 방법을 넘어 2D & 3D cell culture부터 organoid, organoid-on a chip과 organ-on-a chip, OoC) 등으로 인체 예측을 모델이 개발되어 진화되었고(Yang 등, 2025), 이들은 독성학 발전에 새로운 기회를 제공할 수 있는 핵심 혁신으로 부상하였음(Punt 등, 2020; D'Antoni 등, 2023).



<그림-1> 전통적인 In vivo 및 in vitro 모델에서 organoid, organoid-on a chip과

organ-on-a chip으로 전화되는 단계.

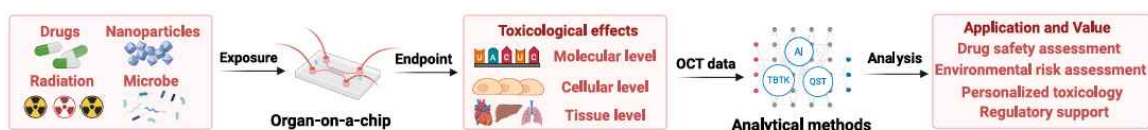
- 독성학의 새로운 패러다임은 ① **인간 관련성 향상**, ② **기전적 이해 심화를 통한 예측의 정확성**, ③ **윤리적 기준 준수**를 통해 독성시험을 개선하려는 새로운 접근 방법론(NAM, new approach methodologies)의 통합에 힘입어 근본적인 변화를 겪고 있음(Schmeisser 등, 2023). 비록 응용 및 개발의 속도 측면에서 organoid-on-a chip보다 organ-on-a-chip이 <그림-2>에서처럼 독성학의 새로운 패러다임 측면에서 일치성이 높은 것으로 확인됨(Yang 등, 2026).



<그림-2> 주요 측면별 장기-온-어-칩과 전통적 독성학 모델 비교

3-4) Organ-on-a chip (OoC) VS Organ-on-a chip Toxicology (OCT)

- **OoC와 OCT의 관계:** OoC(Organ-on-a chip) 기술은 독성학 연구의 패러다임 전환을 의미하며, 단순한 '기술적 도구'에서 진보된 생물학적 모델링, 기전적 통찰력, 인간 관련 독성 평가를 통합한 포괄적·학제적 연구 프레임워크인 장기-온-칩 독성학(OCT, Organ-on-a chip Toxicology)으로 진화하고 있음(그림-3).



<그림-3> OCT(organ-on-a chip toxicology) 파이프라인을 보여주는 워크플로우 도식.

- 장기-온-어-칩 기술과 장기-온-어-칩 독성학의 주요 차이점: <표-1>에서처럼 OCT는 독성

학 내 하위 분야로 정의되며, OoC 기술을 활용하여 주요 장기 구조와 기능을 복제함으로써 인체에 대한 외인성 요인의 독성 효과와 메커니즘을 연구함. 생물학, 공학 및 의학 분야의 지식을 통합한 OCT는 독성 효과를 설명하는 데 초점을 맞추는 뿐만 아니라 독성과 관련된 분자적 메커니즘, 동적 조직변화 및 장기 간 상호작용을 밝히는 데 중점을 두어 독성 평가, 근본적인 메커니즘 및 신약 개발의 인허가에 대한 시사점을 체계적으로 이해하는데 기여함.

<표-1> 장기-온-어-칩 기술과 장기-온-어-칩 독성학의 주요 차이점

Dimension	Organ-on-a-chip technology (OoC)	Organ-on-a-chip toxicology (OCT)
Positioning(핵심 학문)	기관 수준 생리학 및 미세환경 재현에 중점을 둔 공학 기반 플랫폼.	독성 효과 및 메커니즘 연구를 위해 생물학, 공학, 독성학을 통합하는 학제간 독성학 하위 분야.
Scientific objective(과학적 목적)	장기와 조직의 주요 기능을 시뮬레이션하는 현실적인 생리학적 미세환경 구축.	약물 또는 유해 물질의 독성학적 메커니즘을 규명하고, 인간 관련 독성 예측 모델을 수립하며, 안전성 평가의 메커니즘적 전환을 가능하게 함.
Methodological integration(방법론적 통합)	마이크로유체 장치 설계, 생체모방 미세환경, 3D 세포 배양 및 실시간 모니터링.	예측 평가를 위한 계산 및 실험 독성학 통합(AI, TK/TD, 정량적 시스템 독성학 등 포함).
Design principle(디자인 원리)	단일 또는 다중 장기를 모사하는 모델 구축.	독성학적 종말점(toxic endpoint), 분자 수준부터 전신 수준에 이르는 체계적 독성학적 평가에 중점.
Application value(응용성)	장기 생리 기능 복제, 조직 성숙 및 질병 모델링	예측 독성학, 위험 평가, 기전적 통찰력 및 규제 독성학 혁신을 강화
Future directions(향후 방향)	AI 및 첨단 제조 기술과의 통합을 통해 다중 장기, 고처리량 플랫폼 구축.	개인 맞춤형 위험 평가를 위한 AI 기반 다중 규모 독성 모델, 맞춤형 독성학 및 디지털 트윈 플랫폼 개발.

4. Organ-on-a chip Toxicology 분야를 이끄는 혁신적 요인

4-1) OCT 공학적 혁신 요소

- 다음의 4가지 사항은 **Organ-on-a chip Toxicology(OCT)**를 획기적으로 진화시켜 독성 물질에 대한 정밀하고 동적이며 생리학적으로 의미 있는 평가를 가능하게 하였음. 생체모방 소재, 첨단 제작 전략 및 실시간 감지 기술을 통합함으로써 OCT는 더욱 예측 가능하고 기존 중심적인 접근 방식으로 진화해 왔으며, 이로써 보다 안전하고 효과적인 독성 평가의 길을 열었다고 할 수 있음.

① 생체재료와 독성학적 의미

- 적절한 생체재료는 세포 미세구조와 기능을 조절하고 장기 형성과 기능성 촉진에 있어 핵심적인 역할 수행하므로 체외 조직 배양 시스템에서 필수적 요소. 특히 생체적합성 폴리머(biocompatible polymers), 생체활성 하이드로겔(bioactive hydrogels), 자극 반응성 생체재료, 나노구조 재료(nanostructured materials) 등은 세포외 기질을 모방하고 생리학적 조건을 재현하는 데 필수적인 도구를 제공.

생체재료(Biomaterials)	독성학적 의미
Polydimethylsiloxane(PDMS)	<ul style="list-style-type: none"> OoC 장치 설계에 가장 널리 사용되며 소수성 분자를 흡수하기 때문에 독성시험 결과에 잠재적으로 영향
Hydrogel membranes	<ul style="list-style-type: none"> 조직의 세포외 기질(ECM, extracellular matrix) 특성을 유사하게 모방하여, 인접 세포 간 대사산물 및 신호 분자의 교환을 촉진 세포 접착, 증식 및 조직 특이적 기능을 향상시켜 독소에 대한 세포 반응이 생체 내 행동을 보다 정확하게 반영
Stimuli-responsive biomaterials(자극 반응성 생체 재료)	<ul style="list-style-type: none"> 기계적 스트레스나 화학적 농도 구배와 같은 환경 신호에 반응하여 독소 유발 세포 손상에 미치는 영향을 반영 광결정 필름의 예시: 배양 과정에서 발생하는 세포의 힘에 반응하여 색상을 동적으로 변화시킴. 또한 OoC 시스템과 높은 호환성을 지니며, 독성학 연구에서 세포의 반응을 추적할 수 있는 강력한 플랫폼을 제공
Nanostructured materials	<ul style="list-style-type: none"> 맞춤형 나노입자 기능화 전략(tailored nanoparticle functionalization strategies)은 생체 적합성과 표적 효율성을 향상시켜, OoC의 생의학 분야 적용 범위를 확대

② 고급 3D 프린팅 기술(Advanced 3D printing techniques)과 독성학적 의미

- 고급 3D 프린팅 기술은 인체 장기의 생리적·구조적 복잡성을 재현함으로써 OoC 시스템에 대한 기존 제조 방법의 한계를 극복할 잠재력을 지니며, 이를 통해 장기 특이적 및 전신적 독성학적 효과 연구를 가능하게 함

- 예를 들면, 기존의 실험실 기능을 하나의 소형 칩에 통합한 소형화 장치인 Lab-on-a-chip(LoC) 시스템은 3D 프린팅 스캐폴드(scaffold)를 활용해 폐포 장벽을 모방함으로써 호흡기 독성 물질 연구를 위한 첨단 플랫폼을 제공함(Kim 등, 2023).

③ 미세유체 구조와 흐름 제어 전략과 독성학적 중요성

- 미세관 구조, 관류 속도 및 전단 응력(shear stress)은 영양분 공급, 대사 농도 구배 및 독성 물질에 대한 세포 반응에 직접적인 영향을 줌. 이러한 매개변수의 정밀한 제어는 생리학적으로 관련성 있는 노출 조건을 보장하며 독성 평가의 신뢰성과 재현성을 향상시킴.
- 예를 들어, 미세채널 설계는 영양분 및 산소 농도 구배에 직접적인 영향을 미치는 반면, 동적 유동 제어는 혈관 전단력(vascular shear)이나 폐 신전력(pulmonary stretch)과 같은 장기 특이적 기계적 힘의 정확한 시뮬레이션을 가능하게 함(Huh 등, 2010). 마이크로플루이딕 자동화 및 피드백 조절 관류 시스템의 통합은 안정성을 더욱 향상시킬 수 있음. 그리고 칩 운영의 확장성, 이는 특히 고처리량 및 장기 독성 평가에 중요함.

④ OoC 시스템에 통합된 센서(Sensors integrated into OoC systems)와 독성학적 의미

- OoC 시스템에 통합된 센서는 크게 기계적, 전기화학적, 광학적, 전기적 센서로 분류됨 (Sabate 등, 2023).
- **기계적 센서:** 변형계 및 압전 소자 등이 있으며 조직 강성 및 세포 견인력과 같은 물리적 특성을 측정. 이는 독성 물질의 생체역학적 영향을 평가하는 데 핵심적임(Zhang 등, 2024).
- **전기화학적 센서:** 생화학적 반응과 관련된 전기적 변화를 감지하여 생화학적 매개변수, 면역 반응 및 세포 독성 모니터링을 용이하게 함(Kim 등, 2023). 예를 들어, 통합 온라인 감지 기능을 갖춘 장-온-어-칩(gut-on-a-chip)은 나노플라스틱 노출 중 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 실시간 검출을 가능하게 하였음. 이 센서는 각각 0.0095 및 0.0020 pg mL⁻¹라는 매우 낮은 검출 한계를 달성하여 12일 동안 실시간 사이토카인 변동을 포착하였음(Han 등, 2024).
- **광학센스:** 형광 또는 분광 기술을 사용하는 센서로 분자 상호작용과 세포 역학을 비침습적으로 시각화할 수 있게 함. 예를 들면, 광섬유 산소 센서를 liver-on-a-chip 모델에 통합하여 산소 소비율(OCR, oxygen consumption rate)을 실시간으로 측정하였음(Karsten 등, 2024). 또한, 숙신산 독성을 평가함으로써, 그들은 OCR을 미토콘드리아 독성과 간 조직 손상을 알릴 수 있는 간 생존력의 핵심 지표로 확립하였음.
- **전기 생리학적 센서:** 전기 생리학적 센서는 상피/내피 전기 저항(TEER, transepithelial/endothelial electrical resistance), 세포 표면 전기 임피던스 및 세포외 전계 전위를 포함한 생체 전기 활동을 실시간으로 측정할 수 있게 함. 예를 들어, 우리 연구팀은 독소 노출 하에서 조직 장벽의 무결성과 투과성을 모니터링하기 위해 표피-온-어-칩(epidermis-on-a-chip) 및 LoC(Lab-on-a-chip)에 TEER 센서를 설계 및 통합하였음(Shaoyong 등, 2024).

5. Organ-on-a chip Toxicology에 organoid의 응용

- 오가노이드는 체외에서 자가조립된 3차원 미세조직 또는 미니어처 장기로, 줄기세포에서 유래되어 조직 또는 장기의 미세해부학적 구조와 기능을 재현함. 오가노이드 발전, 특히 오가노이드 혈관화 촉진, 기능적 성숙, 동적 미세환경 제어, 변동성 감소, 조직 간 및 다 기관 상호작용에서 OoC 기술의 역할에 중요함(Tian 등, 2024). 예를 들어 OoC가 오가노이드와 만나면, 오가노이드가 OoC 시스템에 상호 기여하는 점 또한 중요하며, 이는 생체 내 조건 모방의 전반적 능력을 향상시킴. 다음 사례를 통해 오가노이드의 OCT 역할 향상에 기여하는 것을 확인할 수 있음.

- ① **세포 표현의 한계 극복:** 현재의 OoC는 주로 불멸화된 세포주나 1차 세포에 의존하며, 이들은 미리 정의된 비율로 혼합되어 생체 조직 구성을 근사화함. 그러나 이러한 환원주의적 접근법은 제한된 수의 세포 유형만을 포함하며, 생체 조직에서 관찰되는 복잡한 세포 다양성과 자기 조직화 특성을 종종 결여됨. 오가노이드 유래 세포나 완전한 오가노이드를 마이크로플루이딕 플랫폼에 통합함으로써, OoC 시스템은 세포 표현의 현재 한계를 극복할 수 있음.
- ② **오가노이드 유래 세포로 구축된 OoC 시스템의 주요 장점:** 위, 장, 폐 등에서 유래한 오가노이드 유래 세포로 구축된 OoC 시스템의 주요 장점은 기능적 장벽 형성을 용이하게 하고 생리적 기능을 향상시키는 정단면과 기저면 모두에 직접 접근할 수 있다는 점(Jantaree 등, 2022). 예를 들어, 인간 iPSC와 마이크로플루이딕 칩을 결합하여 폐 오가노이드-온-어-칩을 개발했으며, 이를 통해 시험관 내에서 섬모 운동을 성공적으로 모사하고 일차 섬모 운동 장애의 질병 모델링을 가능하게 했음(Sone 등, 2021). 또한 다중 폐 세포 유형을 포함한 오가노이드 유래 세포를 사용하여 구축한 LoC가 상피 장벽 무결성을 향상시켜 호흡기 독성 평가를 보다 정확하게 수행할 수 있음을 입증하였음.
- ③ **조직의 핵심 기능적 특성을 재현:** 실질 조직의 기능을 재현하는 오가노이드-온-어-칩 시스템은 세포 이질성을 보완하고 표현형 충실도를 유지하며 생리학적으로 관련성 있는 복잡성을 포착함으로써 뇌, 간, 심장 조직의 핵심 기능적 특성을 재현할 수 있음. 예를 들어, 인간 중뇌 오가노이드-온-어-칩(midbrain organoid-on-a-chip)이 perfluorooctane sulfonate(PFOS)의 신경독성을 평가하기 위해 개발되었음. 3D 프린팅 홀더와 다중 전극 어레이(MEA, multiple-electrode array) 통합을 특징으로 하는 이 시스템은 실시간 신경 활동 모니터링을 가능하게 하여 용량 의존적 신경독성과 신경염증을 밝혔음(Tian 등, 2024). 또한 간과 심장의 대사 기능 및 생리 기능을 재현할 수 있는 간-심장 오가노이드 온 어 칩 시스템을 구축(Cheng 등, 2024). 이 모델은 간과 심장 간의 상호작용을 모방하여 미세플라스틱의 저용량 효과를 밝혀냈음. 또한 균질한 세포 집단에 의존하는 OoC는 개인 간 유전적 변이성을 포착할 수 없어 맞춤형 독성학 및 약물 안전성 평가에서의 적용성을 제한함. 이에 대응하여 오가노이드는 개인 유래 및 질병 관련 독성학 모델 구축을 위한 강력한 해결책을 제시하고 있음. 개별 유래 오가노이드-온-어-칩 시스템은 서로 다른 개인의 고유한 유전체 배경과 질병 표현형을 보존하여 약물 반응, 대사 및 독성에 대한 개인별 변이를 보다 정확하게 표현함(Papamichail 등, 2025).

- ④ **혈관화 종양 오가노이드 온 어 칩 모델:** 여러 환자로부터 유래한 혈관화 종양 오가노이드 온 어 칩 모델을 구축하여 종양-혈관 상호작용을 재현하고, 임상 종양 혈관의 구조적 및 기능적 이질성을 보존하였음. 이 모델은 환자별 종양-혈관 역학을 재현하여 항혈관신생 치료에 대한 임상 반응을 정확하게 시뮬레이션하였음(Du 등, 2025). 이와 같은 개인 유래 접근법은 환경 독성 물질 및 약물 유발 독성에 대한 개인간 감수성 차이를 반영할 수 있음. 기증자별 유전체 및 후성유전학적 특징을 보존함으로써 이종 생체 물질 대사, 독성 경로 및 부작용 결과 메커니즘의 변이성에 대한 귀중한 통찰력을 제공함.

6. OCT에 인공 지능 응용

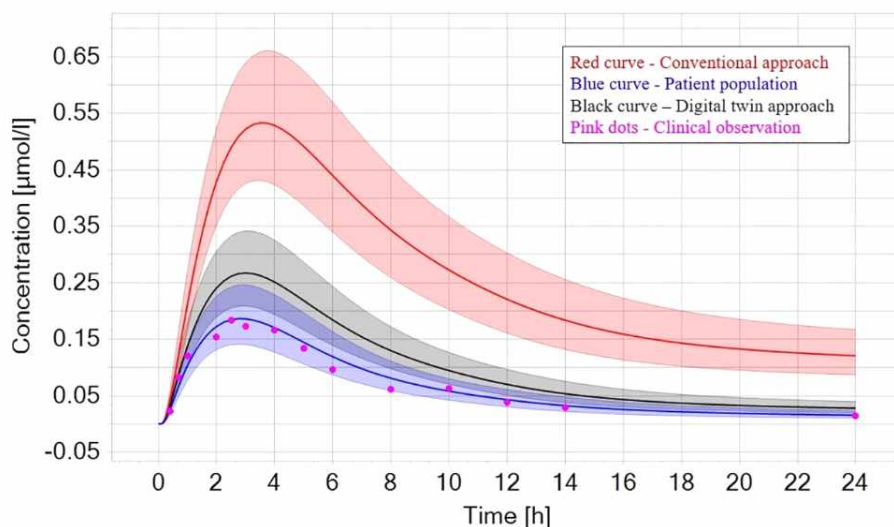
- 기계 학습(ML)과 딥 러닝을 포괄하는 인공지능(AI)은 다양한 과학 분야에서 변혁적 힘으로 부상했습니다. 대규모 다차원 데이터셋 처리, 복잡한 패턴 발견, 예측적 통찰력 생성 등 AI의 장점은 점차 OoC 시스템에 통합되고 있음.
- ① 첫째, AI는 OoC 플랫폼 설계에 혁명을 일으키고 있음. AI는 제조 결함 식별, 치수 정확도 평가, 재료 특성 예측을 통해 3D 프린팅을 지원함으로써 공정 최적화를 통해 정확성과 효율성을 향상시킴(Yu 등, 2020).
- ② 둘째, AI는 OoC 플랫폼의 복잡하고 동적인 특성상 정확하고 신뢰할 수 있는 평가를 보장하기 위해서는 실시간 모니터링, 피드백 제어 및 다차원 데이터 분석이 가능하게 함. 내장형 센서는 생물학적 및 물리화학적 매개변수를 지속적으로 모니터링하여 OoC 시스템의 자동화를 가능하게 함. 물리적, 생화학적, 광학 센서를 모듈식으로 통합한 OoC는 미세조직 행동의 자동화된 모니터링을 달성(Zhang 등, 2017). 머신러닝 알고리즘을 통합함으로써, AI 기반 모니터링은 유동 균일성 및 영양분 공급과 같은 매개변수를 자동으로 예측하고 조정하여 연구 전반에 걸쳐 생리학적 관련성이 유지되도록 보장할 수 있음. 향후 AI 기반 시스템은 최적 조건을 위한 실시간 조정이 가능한 완전 자동화 마이크로플루이딕 배양 시스템을 구현할 것으로 기대되며, 이는 OCT의 정밀도, 재현성 및 안전성을 크게 향상시킬 것임.
- ③ 셋째, AI가 결합된 OoC 시스템에 사용된 재료의 투명성과 형광 현미경과의 호환성 덕분에 풍부한 이미지 데이터를 얻을 수 있음. 기존의 염색 및 수동 분석 방법은 비효율적이고 시간이 많이 소요되며 오류가 발생하기 쉬움(Li 등, 2022). 딥 러닝 기반 이미지 인식은 세포 형태 분석, 동적 과정 추적 및 표현형 변화 식별에 탁월한 정밀도를 제공하여 OoC 내에서 세포 행동 및 구조의 미세한 변화를 더 잘 감지할 수 있게 함. 최근 OoC 시스템에서 심층 학습 접근법을 통해 세포 배양 조건을 평가하는 라벨 프리 분석이 실현되었음. 소기도관-온-어-칩을 활용한 한 연구에서는 심층 학습과 이미지 인식을 통합하여 소기도관 상피세포의 분화 능력을 분석하였음. 또한 섬모 박동 빈도를 모니터링하고 점액섬모 청소 기능의 무결성을 평가하기 위한 맞춤형 프로그램을 개발하였음(Chen 등, 2024). 마찬가지로, 다른 연구에서는 장-온-어-칩 시스템 내에서 배양된 장 상피 세포의 형태학적 변화를 평가하기 위해 AI 기반 이미지 분석 방법을 활용하였음(Kutsuzawa 등, 2025). 또한, 머신러닝과 통합된 고내용 이미징 기술은 동적 생물학적 과정을 탐구할 수 있는 새로운 기회를 제공함(Ahmad 등, 2023). 백혈구 역학 분석을 자동화하기 위해 머

신러닝 파이프라인과 통합된 혈관-온-어-칩 시스템을 개발하여 수동 주석을 크게 줄이면서 처리 시간을 현저히 단축하였음.

- ④ 넷째, AI는 **OoC 기반 디지털 트윈 개발**을 지원을 통해 시스템 독성학 및 독성동태학/독성역학(TK/TD) 모델과 연계되어 장기 수준 반응 예측, 독성 메커니즘 규명, 노출과 유해 결과 간의 인과 관계 확립 등을 비롯하여 개인별 독성 반응에 대한 통찰력을 제공할 것으로 기대됨. 따라서 AI가 OCT를 차원 높은 수준으로 끌어올릴 잠재력을 지니며, AI 기반 OCT가 점차 주류화될 것이라고 예상됨(Chen 등, 2023). <참고논문-1>은 OoC 기반 디지털 트윈 개발을 통해 동태학적 통찰력을 제공하는 것을 확인이 가능함.

<참고논문-1> Aravindakshan MR, Mandal C, Pothan A, Schaller S, Maass C. **DigiLoCS: A leap forward in predictive organ-on-chip simulations.** PLoS One. 2025 Jan 9;20(1):e0314083.

- **디지털 트윈(digital twin):** 실제와 동일한 3차원 모델을 만들고, 현실 세계와 가상의 디지털 세계를 데이터를 기반으로 연결하는 것을 디지털 트윈(digital twin)이라고 하며 현실과 가상이 마치 쌍둥이처럼 상호작용을 하게함.
- OoC-digital twin model(DigiLoCs)은 약물 소실 동역학에 대한 정량적 장기-온-칩(organ on a chip, OoC) 및 세포 기반 분석을 통합하였으며, 인간에서의 약물 소실 동역학을 시뮬레이션하기 위해 **강화된 모델** 간-온-칩의 디지털 트윈 모델을 활용해 32개 약물의 체외 간 클리어런스를 예측했으며, 시계열 PK 데이터(time series PK data)를 통해 체외에서 체내로의 외삽(IVIVE)을 평가한 모델임
- 비선택적 베타 차단제의 하나로, 심장 박동을 조절하여 고혈압, 부정맥 치료 등 심혈관계 질환Propranolol을 개념 증명 사례로 사용하여 결과를 인간으로 전환함으로써 이 접근법의 임상적 영향을 입증하고자 하였음. <Fig 8>에서처럼 직접 비교를 통해 OoC의 정량적 생물학적 데이터와 디지털 트윈이 기존 접근법보다 인간 PK를 더 적절하게 예측하는 데 있어 우월한 능력을 명확히 보여주었음. 임상적 영향을 입증하기 위해 단일 화합물만 사용되었지만, 작업 흐름과 프로세스는 다른 화합물에도 쉽게 적용 가능함. 우리의 지식 범위 내에서, 본 연구는 간 청소를 활용 맥락에서 장기온칩(OoC)의 예측력을 체계적으로 평가한 가장 포괄적인 보고서로 판단됨.
- 분홍색 점은 임상 관찰값(Borgström 등, 1981)에서 디지털화이며, 파란색 실선은 임상 관찰된 청소율 값을 사용한 환자 집단의 평균을 나타냄. 기존 접근법에 기반한 청소율 값(빨간색 선)을 사용할 경우, 곡선 아래 면적(AUC)이 6배 과대 예측됨. 반면 디지털 트윈 기반 청소율을 사용하면 AUC는 1.5배만 과대 예측되며, 24시간 시점의 정확한 동역학(검은색 곡선)도 시뮬레이션됨. 음영 영역은 ± 1 표준편차를 나타냄.



<Fig 8>단일 경구 투여(80mg) 후 프로프라놀롤의 시뮬레이션된 동력학:

7. OCT에서의 다중 스케일 및 동적 연구

7-1) 분자 수준과 조직 수준 반응의 가교

- OoC 시스템과 전통적인 2차원 세포 배양 모두 분자 및 세포 수준의 독성학 연구를 가능하게 하지만, 2차원 배양의 미세환경은 일반적으로 균질하여 조직에 내재된 복잡성을 결여하고 있음. 이러한 복잡성의 부족은 세포의 본래 형태, 극성 및 기능의 상실로 이어지며, 결과적으로 독성학 평가에 대한 2차원 배양의 예측 정확도를 제한함.
- 반면 OoC 기술은 생리학적으로 관련성 있는 **3D 미세환경과 생체역학적 신호를 재현함**으로써 이러한 한계를 해결함. 2D 모델에서는 종종 관찰되지 않는 유전자 발현, 대사체 프로파일, 단백질 수준, 신호전달 경로와 같은 중요한 분자적 변화와 세포 행동을 포착함. 예를 들어, 염증성 간-온-어-칩 모델에서 토실리주맙 치료는 CYP3A4 활성을 회복시키고 심바스타틴 하이드록시산 대사를 변화시켜, 기존 간 모델에서는 관찰할 수 없었던 환자 보고 약물-약물 상호작용을 재현하였음(Ingber 등, 2022).
- 마찬가지로, 살아있는 인간 신장 상피 세포로 덮인 신장 근위 세뇨관 온 어 칩은 생체 내 반응을 매우 정확하게 재현하여, 환자에서 관찰된 수송체 특이적 시스플라틴 독성을 재현함으로써 기존 배양 방법을 능가했음(Jang 등, 2013).
- OoC 플랫폼은 독성 시그니처 확립을 가능하게 하고 독성 평가에 중요한 장기 특이적 바이오마커 발견을 촉진함. 1차 세포를 이용한 인간 간 칩 모델은 장기 특이적 방사선 손상을 모사하여 RNA 기반 바이오마커를 식별하는 동시에 방사선 유발 간 손상의 기전을 규명하는 데 활용되었음(Martello 등, 2024). 간 칩 모델은 알코올성 간 질환을 모사하여 DNA 손상, 산화 스트레스, 지질 축적과 같은 알코올 유발 독성의 핵심 마커를 식별하고, 내독소 유발 손상을 포함한 이차적 손상에 대한 통찰력을 제공함(Nawroth 등, 2021).
- 독성의 근본적 메커니즘은 종종 세포 수준에서 기인함. 세포는 모든 생리적 과정의 기본 단위이며, 세포의 반응은 일반적으로 더 심층적인 독성학적 통찰력을 제공함. 장기-온-칩 기술은 세포-세포 및 세포-세포외기질(ECM) 상호작용에 대한 예측적 연구를 통해 독성 반응의 정확한 모니터링을 용이하게 하고, 생체 내 조건과 유사한 방식으로 이러한 과정을 재현함. 예를 들어, 혈관화된 간과 종양 미세환경을 모사하는 다중 조직 온 어 칩 (multi-tissue-on-a-chip) 시스템에서는 나노입자의 수송 및 독성에 대한 동적 평가가 가능함. ECM의 기계적 특성은 조직 투과성을 크게 조절하여 나노입자의 수송, 효능, 선택성 및 독성에 영향을 줌(Ozkan e,dm 2019). 또한 OoC 모델은 암세포와 비악성 세포 간의 상호작용, 종양-기질 상호작용, 종양-면역계 역학에 대한 심층적 이해를 제공하며, 이는 전이 형성, 질병 진행, 표적 치료의 효능 및 세포독성에 영향을 줌(Giannitelli 등, 2024).
- 마찬가지로, 면역 구성 요소를 장기 수준(LoC) 모델에 통합하여 대식세포, 상피세포, 내피세포 및 순환 단핵구 간의 동적 상호작용을 통해 장기 수준의 염증 신호를 관찰하였음. 이 시스템은 염증 반응을 증폭시켜 바이러스 및 오염 물질에 의한 폐 손상을 민감하고 신속하게 모니터링할 수 있게 함(Chen 등, 2023; Yang 등, 2023).

- 또한 장과 자궁경부와 같은 장기 내 미생물 군집은 국소 면역 반응을 조절하거나 숙주 세포와 직접 상호작용함으로써 장기 병리 및 질병 진행에 영향을 미침. 정적 트랜스웰 배양과 비교하여 자궁경부-온어-칩 모델은 생체 자궁경부에서 관찰되는 것과 유사한 점액 생성 및 호르몬 반응을 보이며, 동시에 복잡한 숙주-미생물 군집 상호작용을 분석하여 반응의 기저 메커니즘을 규명할 수 있게 하며 세균 감염에 대한 반응을 보여줌 (Izadifar 등, 2024). 따라서 난포세포(OoCs) 내 분자 및 세포 반응은 조직 수준의 역학을 충실히 재현하며, 본래의 세포 기능을 유지하고 복잡한 세포-환경 상호작용을 포착함으로써 세포 연구와 전체 장기 행동 사이의 간극을 메우고 생체 내 조건을 보다 가깝게 모방함.

7-2) 다중 OoC 모델을 통한 전신 독성 통찰

- 많은 독성학적 반응과 부작용은 단일 기관에 기인할 수 없으며, 종종 여러 생리학적 시스템 간의 복잡한 상호작용으로 인해 발생함. 단일 기관 칩이나 전통적인 시험관 내 모델과 달리, 공통 유동 채널로 상호 연결된 다기관 칩(MOC, multiorgan chip) 시스템은 생리학적으로 관련성 있는 방식으로 독소의 흡수, 분포, 대사 및 배설(ADME) 과정을 재현함. 이러한 시스템은 순차적이고 체계적인 독성학적 반응을 재현함으로써 독소 유발 전신 독성의 기반이 되는 복잡한 생리학적 과정을 보다 정밀하게 모델링함(Wang 등, 2019). 노출-표적 장기 칩은 독소와 초기 노출 부위 간의 상호작용을 재현하여 복잡한 세포 반응과 신호 전달 경로를 통합함으로써 국소적 및 하류 독성 효과에 대한 상세한 연구를 가능하게 함. 예를 들어, SARS-CoV-2에 노출된 폐-뇌-온어-칩은 폐 손상을 재현하고 염증 신호의 하류 영역으로의 전파를 규명하여 궁극적으로 더 심각한 혈액-뇌 장벽 손상을 초래할 수 있음. 피부 노출 맥락에서, 세 가지 장기 등가체를 결합한 OoC를 활용한 연구는 화장품 성분 안전성과 관련된 독성학적 종말점을 평가할 수 있는 능력을 입증하였음(Indolfo 등, 2023).
- 마찬가지로, 장-간-온어-칩 시스템은 경구 투여를 통한 아세트아미노펜 과다 복용 및 그에 따른 간독성 효과를 모델링하는 데 활용되었음(Yu 등, 2024). 간은 첫 통과 대사(first-pass metabolism)의 주요 부위로, 유해 물질을 해독할 뿐만 아니라 특정 화합물을 더 높은 독성을 지닌 중간체로 활성화시킵니다. 이러한 이중 역할로 인해 전신 독성 맥락에서 간 관련 대사를 연구하는 것이 매우 중요합니다. 간을 중심 허브로 하는 MOC 시스템은 독소 대사를 효과적으로 모델링하고 원격 장기에 이차 독성을 유발하는 능력을 평가할 수 있습니다. 예를 들어, 간, 심장, 폐 오가노이드를 통합한 MOC 시스템은 전구 약물인 카페시타빈을 활성 형태인 5-플루오로우라실(5-FU)로 대사하는 과정에서 간이 수행하는 역할을 보여주었으며, 이는 심폐 독성으로 이어졌음(Rajan 등, 2020).
- 마찬가지로 간-고환 미세유체 모델에서 사이클로포스파미드는 간 구상체 내에서 생체활성화되어 고환 오가노이드 내 생식세포 사멸을 유발했음(Baert 등, 2020). 이러한 연구들은 간 전구약물의 생체변환이 하류 장기 독성에 직접적인 영향을 미치는 간 대사의 연쇄적 효과를 강조함. 약물 독성 외에도, 아리스톨로키산 I(AA-I)을 조사한 간-신장-온어-칩 시스템을 통해 환경 독성물질 대사에서의 간의 핵심적 역할이 부각되었음. 이 모델은 간 대

사가 AA-I를 반응성 대사산물로 전환시키고, 이들이 이후 신장으로 수송되어 심각한 신 독성을 유발함을 입증하였음(Chang 등, 2017).

- 약동학(PK)과 약력학(PD)은 약물 행동을 이해하는 데 기초가 되며, 다기관 시스템에서 효과적으로 재현될 수 있어 치료적 및 독성학적 종말점 모두에 대한 포괄적 평가를 가능하게 함. 기능적 면역 시스템온어칩(Immune System-on-a-Chip)을 개발하여 아미오다론에 대한 간, 심장 및 골격근 구획의 조직 특이적 면역 반응을 평가함으로써, 조직 특이적 면역 반응 모델링 및 PK/PD 평가 통합에 대한 그 유용성을 입증하였음(Sasserath 등, 2020).
- MOC 플랫폼은 TK 및 TD를 통해 PK/PD를 독성학으로 확장하여 독소 노출부터 독성 효과에 이르는 전체 사슬 동적 과정의 시뮬레이션을 용이하게 함으로써, 독성 물질의 안전한 한계치 결정에 필요한 핵심 데이터를 제공함. 피부-간 칩은 제니스테인의 TK/TD를 규명하여 경로 특이적 대사 및 독성역학적 효과를 평가하였음. 피부 적용 시, 피부의 초회통과대사(first-pass metabolism)는 제니스테인의 전신 생체이용률을 현저히 제한하여 전신 독성역학적 효과를 최소화하였음. 반면, 반복 경구 투여는 현저히 높은 전신 농도를 유발했으며 간 장기유사체 내에서 종양 관련 유전자 발현 변화를 유도하였음(Tao 등, 2024). MOC는 점점 더 많은 장기를 통합하여 장기 간 상호작용의 더 복잡한 네트워크 시뮬레이션을 가능하게 함. 주목할 만한 예로, 순환 혈류를 통해 성숙한 인간 심장, 간, 뼈 및 피부 조직 틈새를 상호 연결하는 조직 칩 시스템이 있으며, 이는 인간에서 독소루비신의 ADME 및 PK/PD 프로파일을 재현하고 심장 독성과 관련된 miRNA 바이오마커 식별을 지원할 수 있음(Ronaldson-Bouchard 등, 2022). MOC의 궁극적인 목표는 전신 생리학을 모방하여 인간과 관련된 맥락에서 전신 독성을 평가할 수 있는 "인간 온 어 칩(human-on-a-chip)"을 만들어 OoC 기술을 단순한 도구의 역할을 넘어 완전히 수용하는 것임.

8. 규제 인정 및 글로벌 이니셔티브

- 과학 기반의 OoC 모델 검증 기반을 마련하기 위해 MPS 프로그램을 공동으로 출범시켰음 FDA 예측 독성학 로드맵(2017), 현대화법 2.0(2022), 현대화법 3.0(2025)은 의무적 동물 실험을 폐지하고 차세대 체외 실험법을 승인함으로써 이러한 전환을 더욱 제도화하였음. FDA가 OoC 데이터만을 근거로 azeliragon의 2상 임상시험 직행 승인을 내린 사례는 인간 특이적 증거로 전환하는 패러다임 변화를 잘 보여줌(ClinicalTrials.gov ID NCT05815485).
- 유럽과 아시아에서의 병행 노력도 이러한 추세를 반영하고 있음(Portela 등, 2025). 유럽 의약품청(EMA)은 혁신 테스크포스와 3R 원칙에 점진적으로 OoCs를 통합해 왔으며, 동물 실험 대체법 유럽참조실험실(EURL ECVAM)과 동물 실험 대체법 유럽 파트너십(EPAA)은 검증 프레임워크와 OECD 기준에 부합하는 시험 지침을 우선순위로 삼았음.
- 일본에서는 의학연구개발기구(AMED) MPS 국가 프로젝트(2017)를 통해 표준화된 시험 플랫폼을 구축했음(Ishida 등, 2021). 최근 몇 년간 중국 의약품평가센터(CDE)가 발표한

지침은 오가노이드 및 OoC 데이터를 규제 전임상 연구에서 유효한 증거로 공식 인정했음. 글로벌 협력 차원에서, 혁신 및 품질 컨소시엄(IQ) MPS(microphysiologic system, 미세생리시스템) 제휴(2017) 및 국제 미세생리학적 시스템 학회(iMPSS, 2022년 설립, 아시아태평양 지부 2024년)와 같은 이니셔티브는 규제 기관과 산업계 간의 데이터 조화, 경쟁 전 단계 자격 부여 및 합의 형성을 가속화했음(Devine 등, 2025).

- 이러한 노력들은 종합적으로 OoC 기술에 대한 규제 개방성을 의미할 뿐만 아니라, 과학적 엄격성, 윤리적 요구 사항 및 정책 혁신이 예측 독성학의 기초를 재정의하기 위해 수립되는 새로운 학제적 프레임워크인 OCT의 출현을 의미함.

9. 결론: OCT의 혁신적 적용 - 전임상 독성 예측의 OCT를 위한 OoC 시스템의 역할

- ④ **인간 관련성과 생리학적 대표성을 지닌 OCT:** 신약 개발 과정에서의 초기 독성 식별 신약 개발은 시간과 자원이 많이 소요되는 과정으로, 일반적으로 발견부터 시장 출시까지 10~15년이 소요되며 전체 성공률은 13.8%에 불과함(Zhou 등, 2025). 실패의 주요 원인은 불충분한 효능과 부작용으로 인한 독성 문제이며, 이로 인해 인간에서의 약물 효과를 정확히 예측하는 데 차질이 발생함. 전임상 단계에서 동물 모델의 한계로 인해 후속 임상 시험에서 예측 불가능한 간독성이나 심장독성이 발생하는 경우가 빈번함. 따라서 전임상 단계에서의 독성 평가 강화는 신약 개발 과정 가속화에 핵심적임. **인간 관련성과 생리학적 대표성을 갖춘 OoC 시스템은 전임상 단계에 통합되어 초기 독성 평가를 향상시키고, 고위험 화합물의 조기 제거를 가능하게 함.**
- ④ **MOC(multi-organ chip) 시스템을 위한 OCT:** 고처리량 간 칩은 hiPSC 유래 간 오가노이드를 활용해 DILI를 평가함(Meyer 등, 2024). 이러한 간 칩은 간 생리학적 기능과 작용을 효과적으로 보존하여 마이크로몰 농도의 약물에서도 간독성을 검출할 수 있으며, 독성 약물 후보의 초기 식별에서 기존 모델을 능가함. hiPSC 유래 심장 오가노이드와 소형 형광 현미경을 통합한 HoC(Heart-on-a-chip)는 실시간 칼슘 이미징을 가능하게 하여 약물이 심장 전기 생리학에 미치는 영향을 밝히고 심장 독성 평가의 신뢰성을 향상시킴(Tirgar 등, 2025). 또한 **MOC(multi-organ chip) 시스템은 오프 타겟 효과를 식별하는 데 적합하여 환자 위험을 최소화하고 약물 개발 비용을 절감할 수 있음.**
- ④ **환자 유래-OoC 기술을 이용한 OCT:** 최근 항폐암제의 경구 흡수 생리학적 과정을 재현하기 위해 장-간-심장-폐 암 칩이 개발되어 약물 독성을 종합적으로 모니터링할 수 있게 되었음(Zhu 등, 2024). 따라서 OoC 기술을 기반으로 한 신속 실패 접근법은 임상 시험에서 부작용 위험을 최소화하고, 후기 단계 실패 비용을 절감하며, 약물 개발 과정의 전반적인 효율성을 향상시킴. 개인 맞춤형 독성학 평가 OoC 시스템은 환자에서 유래한 1차 세포를 통합할 수 있어, 질병 상태를 정확하게 재현하는 환자별 모델을 제공함으로써 보다 정밀한 효능 평가를 가능하게 함. 예를 들어, 종양 온 어 칩(tumor-on-a-chip) 시스템을 이용한 면역요법 연구(Cui 등, 2020) 및 소기도관 온 어 칩(small airway-on-a-chip)을 이용한 항염증제 발견이 있음(Benam 등, 2016). 그러나 약물 부작용은 임상 진료와 신약 개발 모두에서 여전히 중요한 과제로 남아 있으며, 종종 치료 중단, 환자의 이환율 증가, 심지어 사망으로 이어지기도 함. 환자 간 약물 부작용의 다양성과 복잡한 병리학적 상태는 맞춤형 독성 평가를 필요로 함. 다기관 OoC 모델은 맞춤형 독성 평가를 위한 독특한 기회를 제공하여, 효능과 독성 부작용 감소를 균형 있게 조정함으로써 치료 용량을 최적화할 수 있게 함. 최근 연구에서는 환자 유래 담관암 오가노이드, 재생세포화된 간 조직편, 재생세포화된 신장 조직편을 통합한 미세유체 다기관 모델을 개발했음(Liu 등, 2025). 이 플랫폼은 항암제의 항암 효능과 간·신독성을 성공적으로 평가하였음. 그러나 표적 장기는 환자 질환 조직 유래 세포로 구축할 수 있지만, 심장 및 간과 같은 비표적 장기는 일반적으로 정상 상태이며 종종 확보가 불가능함. 기증자 특이적 유전적 특성을 보존하는 환

자 유래 다능성 줄기세포(hiPSCs)는 특정 조직으로 분화될 수 있음.

- ④ **iPSC 유래 조직의 기능적 성숙도 기술의 필요성:** iPSC 유래 조직의 미성숙한 기능적 표현형은 지속적인 과제로 남아 있음. 이러한 한계를 해결하기 위해서는 iPSC 유래 조직의 기능적 성숙도를 향상시키는 혁신적인 전략이 필요함.
- ⑤ **하위집단 특이적 OoC 모델 구축의 필요성:** 성별, 연령, 기저질환, 바이오마커, 생활습관 등에 따라 환자를 계층화하여 다양한 환자 집단을 모방하는 하위집단 특이적 OoC 모델을 구축함으로써, 가장 효과적이고 안전한 치료제가 환자에게 전달되도록 할 수 있음. 한편, AI 기반 하위집단 체계적 모델링을 통합하면 약물 부작용과 관련된 잠재적 위험을 효율적으로 식별할 수 있음.

<참고문헌>

- Liu, J., Wu, G., Wu, D. et al. (2025). Microfluidic organoid-slice-on-a-chip system for studying anti-cholangiocarcinoma drug efficacy and hepatorenal toxicity. *Lab Chip* 25:2839– 2850. DOI:10.1039/d4lc00902a
- Zhu, Y., Jiang, D., Qiu, Y. et al. (2024). Dynamic microphysiological system chip platform for high-throughput, customizable, and multi-dimensional drug screening. *Bioact. Mater.* 39:59–73. DOI:10.1016/j.bioactmat.2024.05.019
- Cui, X., Ma, C., Vasudevaraja, V. et al. (2020). Dissecting the immunosuppressive tumor microenvironments in Glioblastoma-on-a-Chip for optimized PD-1 immunotherapy. *eLife* 9:e52253. DOI:10.7554/eLife.52253
- Benam, K.H., Villenave, R., Lucchesi, C. et al. (2016). Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nat. Methods* 13:151–157. DOI:10.1038/nmeth.3697
- Tirgar, P., Vikstrom, A., Sepúlveda, J.M.R. et al. (2025). Heart-on-a-Miniscop: A Miniaturized Solution for Electrophysiological Drug Screening in Cardiac Organoids. *Small* 21:e2409571. DOI:10.1002/smll.202409571
- Meyer, S.R., Zhang, C.J., Garcia, M.A. et al. (2024). A High-Throughput Microphysiological Liver Chip System to Model Drug-Induced Liver Injury Using Human Liver Organoids. *Gastro Hep Adv.* 3:1045–1053. DOI:10.1016/j.gastha.2024.08.004
- Zhou, L., Huang, J., Li, C. et al. (2025). Organoids and organs-on-chips: Recent advances, applications in drug development, and regulatory challenges. *Med* 6:100667. DOI:10.1016/j.medj.2025.100667
- Ishida, S. (2021). Research and Development of Microphysiological Systems in Japan Supported by the AMED-MPS Project. *Front. Toxicol.* 3:657765. DOI:10.3389/ftox.2021.657765.
- Devine, P.J., Guha, M., Ekert, J.E. et al. (2025). Considerations from the pharmaceutical industry (IQ MPS Affiliate) workshop on animal microphysiological systems and 3Rs in drug development. *ALTEX* 42:451–467. DOI:10.14573/altex.2503261
- Portela, J.M.D., Paul, P., Moriarty, O. et al. (2025). Review on organ-on-chips for medicines safety assessment: A European regulatory perspective. *ALTEX* 43:98–112. DOI:10.14573/altex.2502061
- Clinical Trials.gov ID NCT05815485. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2/3 Study to Determine the Safety and Effectiveness of Azeliragon in the Treatment of Patients Hospitalized for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) or Pneumonia. 2025-03-03
- Sutherland, M.L., Fabre, K.M. and Tagle, D.A. (2013). The National Institutes of Health Microphysiological Systems Program focuses on a critical challenge in the drug discovery pipeline. *Stem Cell Res. Ther.* 4:11. DOI:10.1186/scrt361

- Tao, T.P., Brandmair, K., Gerlach, S. et al. (2024). Application of a skin and liver Chip2 microphysiological model to investigate the route-dependent toxicokinetics and toxicodynamics of consumer-relevant doses of genistein. *J. Appl. Toxicol.* 44:287–300. DOI:10.1002/jat.4540
- Ronaldson-Bouchard, K., Teles, D., Yeager, K. et al. (2022). A multi-organ chip with matured tissue niches linked by vascular flow. *Nat. Biomed. Eng.* 6:351–371. DOI:10.1038/s41551-022-00882-6
- Sasserath, T., Rumsey, J.W., McAleer, C.W. et al. (2020). Differential Monocyte Actuation in a Three-Organ Functional Innate Immune System-on-a-Chip. *Adv. Sci.* 7:2000323. DOI:10.1002/adv.202000323
- Chang, S.Y., Weber, E.J., Sidorenko, V.S. et al. (2017). Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity. *JCI Insight* 2:e95978. DOI:10.1172/jci.insight.95978
- Baert, Y., Ruetschle, I., Cools, W. et al. (2020). A multi-organ-chip co-culture of liver and testis equivalents: a first step toward a systemic male reprotoxicity model. *Hum. Reprod.* 35:1029–1044. DOI:10.1093/humrep/deaa057
- Rajan, S.A.P., Aleman, J., Wan, M. et al. (2020). Probing prodrug metabolism and reciprocal toxicity with an integrated and humanized multi-tissue organ-on-a-chip platform. *Acta Biomater.* 106:124–135. DOI:10.1016/j.actbio.2020.02.015
- Yu, Y., Sun, B., Ye, X. et al. (2024). Hepatotoxic assessment in a microphysiological system: Simulation of the drug absorption and toxic process after an overdosed acetaminophen on intestinal-liver-on-chip. *Food Chem. Toxicol.* 193:115016. DOI:10.1016/j.fct.2024.115016
- Wang, P., Jin, L., Zhang, M. et al. (2024). Blood-brain barrier injury and neuroinflammation induced by SARS-CoV-2 in a lung-brain microphysiological system. *Nat. Biomed. Eng.* 8:1053–1068. DOI:10.1038/s41551-023-01054-w
- Giannitelli, S.M., Peluzzi, V., Raniolo, S. et al. (2024). On-chip recapitulation of the tumormicroenvironment: A decade of progress. *Biomaterials* 306:122482. DOI:10.1016/j.biomaterials.2024.122482
- Izadifar, Z., Cotton, J., Chen, S. et al. (2024). Mucus production, host-microbiome interactions, hormone sensitivity, and innate immune responses modeled in human cervix chips. *Nat. Commun.* 15:4578. DOI:10.1038/s41467-024-48910-0
- Nawroth, J.C., Petropolis, D.B., Manatakis, D.V. et al. (2021). Modeling alcohol-associated liver disease in a human Liver-Chip. *Cell Rep.* 36:109393. DOI:10.1016/j.celrep.2021.109393
- Ozkan, A., Ghousifam, N., Hoopes, P.J. et al. (2019). In vitro vascularized liver and tumortissue microenvironments on a chip for dynamic determination of nanoparticle transport and toxicity. *Biotechnol. Bioeng.* 116:1201–1219. DOI:10.1002/bit.26919
- Martello, S., Ueda, Y., Bylicky, M.A. et al. (2024). Developing an RNA Signature

for Radiation Injury Using a Human Liver-on-a-Chip Model. *Radiat. Res.* 202:489–502. DOI:10.1667/RADE-24-00047.1

Jang, K.J., Mehr, A.P., Hamilton, G.A. et al. (2013). Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr. Biol.* 5:1119–1129. DOI:10.1039/c3ib40049b

Ingber, D.E. (2022). Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat. Rev. Genet.* 23:467–491. DOI:10.1038/s41576-022-00466-9

Indolfo, N.d.C., Ganzerla, M.D., Doratioto, T.R. et al. (2023). Combining a microphysiological system of three organ equivalents and transcriptomics to assess toxicological endpoints for cosmetic ingredients. *Lab Chip* 23:5092–5106. DOI:10.1039/d3lc00546a

Chen, Z., Huang, J., Zhang, J. et al. (2023). A storm in a teacup – A biomimetic lung microphysiological system in conjunction with a deep-learning algorithm to monitor lung pathological and inflammatory reactions. *Biosens. Bioelectron.* 219:114772. DOI:10.1016/j.bios.2022.114772

Ahmad, S.D., Cetin, M., Waugh, R.E. et al. (2023). A computer vision approach for analyzing label free leukocyte trafficking dynamics on a microvascular mimetic. *Front. Immunol.* 14:1140395. DOI:10.3389/fimmu.2023.1140395

Kutsuzawa, N., Goto, T., Nakamura, H. et al. (2025). Evaluation of Perfusion Cell Culture Conditions in a Double-Layered Microphysiological System Using AI-Assisted Morphological Analysis. *Micromachines* 16:327. DOI:10.3390/mi16030327

Chen, S.L., Xie, R.H., Chen, C.Y. et al. (2024). Revolutionizing Epithelial Differentiability Analysis in Small Airway-on-a-Chip Models Using Label-Free Imaging and Computational Techniques. *Biosensors* 14:581. DOI:10.3390/bios14120581

Li, J., Chen, J., Bai, H. et al. (2022). An Overview of Organs-on-Chips Based on Deep Learning. *Research* 2022:9869518. DOI:10.34133/2022/9869518

Zhang, Y.S., Aleman, J., Shin, S.R. et al. (2017). Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114:E2293–E2302. DOI:10.1073/pnas.1612906114

Yu, C. and Jiang, J. (2020). A Perspective on Using Machine Learning in 3D Bioprinting. *Int. J. Bioprint.* 6:253. DOI:10.18063/ijb.v6i1.253

Du, Y., Wang, Y.R., Bao, Q.Y. et al. (2025). Personalized Vascularized Tumor Organoid-on-a-Chip for Tumor Metastasis and Therapeutic Targeting Assessment. *Adv. Mater.* 37: e2412815. DOI:10.1002/adma.202412815

Papamichail, L., Koch, L.S., Veerman, D. et al. (2025). Organoids-on-a-chip: microfluidic technology enables culture of organoids with enhanced tissue function and potential for disease modeling. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 13:1515340. DOI:10.3389/fbioe.2025.1515340

Cheng, W., Chen, H., Zhou, Y. et al. (2025). Low dose of micro-/nano-plastics mixture

induced cardiac hypertrophy and reductive stress: The liver-heart crosstalk and hepatic-cardiac organoids-on-a-chip. *J. Hazard. Mater.* 490:137686. DOI:10.1016/j.jhazmat.2025.137686

Tian, C., Cai, H., Ao, Z. et al. (2024). Engineering human midbrain organoid microphysiological systems to model prenatal PFOS exposure. *Sci. Total Environ.* 947:174478. DOI:10.1016/j.scitotenv.2024.174478

Sone, N., Konishi, S., Igura, K. et al. (2021). Multicellular modeling of ciliopathy by combining iPS cells and microfluidic airway-on-a-chip technology. *Sci. Transl. Med.* 13:eabb1298. DOI:10.1126/scitranslmed.abb1298

Jantaree, P., Bakhchova, L., Steinmann, U. et al. (2021). From 3D Back to 2D Monolayer Stomach Organoids-on-a-Chip. *Trends Biotechnol.* 39:745–748. DOI:10.1016/j.tibtech.2020.11.013

Tian, C., Cai, H., Ao, Z. et al. (2024). Engineering human midbrain organoid microphysiological systems to model prenatal PFOS exposure. *Sci. Total Environ.* 947:174478. DOI:10.1016/j.scitotenv.2024.174478

Shaoyong, W., Sun, L., Gan, Y. et al. (2024). Sight of Aged Microplastics Adsorbing Heavy Metal Exacerbated Intestinal Injury: A Mechanistic Study of Autophagy-Mediated Toxicity Response. *ACS Nano* 18:28849–28865. DOI:10.1021/acsnano.4c08737

Karsten, R.E.H., Gier, K., Mulder, J.P.S.H. et al. (2024). Real-Time Monitoring of Oxygen Consumption Rate in Mouse Liver Slices Incubated in Organ-on-a-Chip Devices. *Anal. Chem.* 96:15871–15879. DOI:10.1021/acs.analchem.4c00355

Han, J., Wang, Y., Ding, J. et al. (2025). Gut-on-a-Chip Reveals Enhanced Peristalsis Reduces Nanoplastic-Induced Inflammation. *Small* 21:e2408208. DOI:10.1002/smll.202408208

Kim, J., Kim, J., Jin, Y. et al. (2023). In situ biosensing technologies for an organ-on-a-chip. *Biofabrication* 15. DOI:10.1088/1758-5090/aceaae

Zhang, Y., Wang, Y., Yin, H. et al. (2024). Strain sensor on a chip for quantifying the magnitudes of tensile stress on cells. *Microsyst. Nanoeng.* 10:88. DOI:10.1038/s41378-02400719-z

Sabate, D.R.J., Ro, J., Yoon, H. et al. (2023). Integrated technologies for continuous monitoring of organs-on-chips: Current challenges and potential solutions. *Biosens. Bioelectron.* 224:115057. DOI:10.1016/j.bios.2022.115057

Huh, D., Matthews, B.D., Mammoto, A. et al. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328:1662–1668. DOI:10.1126/science.1188302

Kim, W., Lee, Y., Kang, D. et al. (2023). 3D Inkjet-Bioprinted Lung-on-a-Chip. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 9:2806–2815.

Sung JH, Wang YI, Narasimhan Sriram N, Jackson M, Long C, Hickman JJ, Shuler ML. *Anal*

Recent Advances in Body-on-a-Chip Systems. *Chem.* 2019 Jan 2;91(1):330-351

Nayak S, Sondkar A, Vinchurkar G, Shirsath S, Shintre S, Vaidhun B. Organs-on-chips Provide Insights into Molecular Mechanisms of Disease and Facilitate the Design of Newer Treatment Strategies: A Concise Review. *J Explor Res Pharmacol.* 2024;9(2):116-123.

Li X, Wang H, You X, Zhao G. Organoids-on-Chips Technology: Unveiling New Perspectives in Rare-Disease Research. *International Journal of Molecular Sciences.* 2025; 26(9):4367.

Schmeisser, S., Miccoli, A., von Bergen, M. et al. (2023). New approach methodologies in human regulatory toxicology - Not if, but how and when. *Environ. Int.* 178:108082.

Punt, A., Bouwmeester, H., Blaauboer, B.J. et al. (2020). New approach methodologies (NAMs) for human-relevant biokinetics predictions. Meeting the paradigm shift in toxicology towards an animal-free chemical risk assessment. *ALTEX* 37:607–622.

Alteri, E. and Guizzaro, L. (2018). Be open about drug failures to speed up research. *Nature* 563:317–319.

D'Antoni C, Mautone L, Sanchini C, Tondo L, Grassmann G, Cidonio G, Bezzi P, Cordella F, Di Angelantonio S. Unlocking Neural Function with 3D In Vitro Models: A Technical Review of Self-Assembled, Guided, and Bioprinted Brain Organoids and Their Applications in the Study of Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023; 24(13):10762.

Yang, S., Zhang, T., Ge, Y. et al. (2023). Sentinel supervised lung-on-a-chip: A new environmental toxicology platform for nanoplastic-induced lung injury. *J. Hazard. Mater.* 458:131962. DOI:10.1016/j.jhazmat.2023.131962

106. Organ-on-a chip을 이용한 NOAEL 및 임상시험 안전용량 설정 방법

1. 목적

- 미국 상원은 12월 16일 만장일치로 FDA Modernization 3.0 을 통과시켜 대부분의 전문가는 향후 2-3년 이내 비임상 연구에서 동물을 이용한 실험이 종말의 될 것으로 예상됨. 법안은 보건복지부(HHS)가 FDA 국장을 통해 법 시행 후 1년 이내에 잠정 최종 규칙을 발표하도록 지시하는 내용임
- 규칙에는 '동물실험'을 '비임상 실험(nonclinical tests)'으로 용어를 대체하는 내용도 있음. 이 용어는 기존 동물 연구를 새로운 접근법(NAMs; New Approach Methodologies) 즉 인체 세포 기반 모델·오가노이드·장기온칩·AI 독성 예측 등 대체시험법을 공식 평가 수단으로 반영하는 것을 의미함.
- 가장 중요한 문제는 설치류 또는 비글견을 이용한 반복투여독성시험으로부터 산출한 NOAEL(No observed adverse effect level, 최대비독성용량) 대신하여 organ-on-a chip(장기온칩)으로부터 NOAEL을 추정하여 MRSD(maximum recommended starting dose, 임상 최대권장초기용량) 산출이 가능한가에 대한 고찰이 필요함.
- 현재까지 organ-on-a chip을 이용한 임상최대권장초기용량을 추정한 연구가 수행되지 않았기 때문에 여기서 MRSD 산출 과정은 국내외적으로 최초가 될 수 있음. 규제기관이 이와 같은 논리를 통해 독성평가 및 IND에 도입한다면 글로벌 규제기관으로 거듭날 수 있다는 생각이 듭.

2. ADI(acceptable daily intake, 1일 허용섭취량)와 safety factor에 대한 이해

2-1) 1일 인체노출안전기준

- 1일 인체노출안전기준을 HBGV(health based guidance value)이라고 하는데 ADI를 비롯하여 RfD(reference dose) 그리고 TDI(tolerable daily intake) 등이 있음. 대표적인 **ADI**는 식품이나 식수에 포함된 특정 물질(원래는 식품 첨가물에 적용되었으나, 이후 수의약품이나 농약의 잔류물에도 적용됨)의 양을 나타내는 지표임(WHO, 1987).

2-2) ADI 산출 방법:

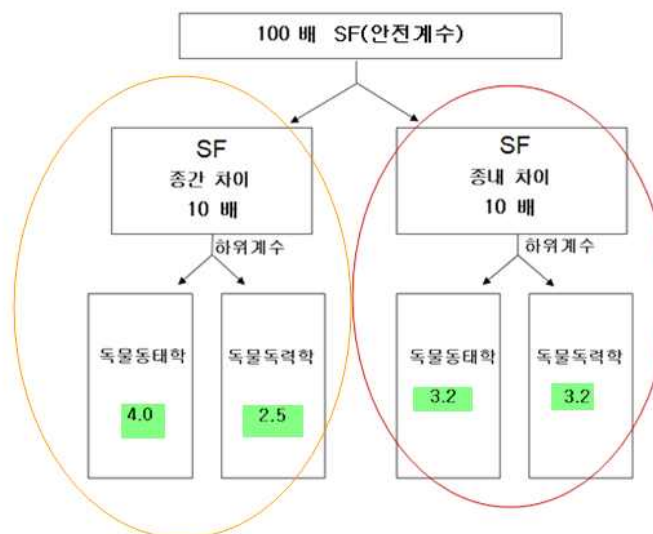
- ADI 의미는 평생 동안 매일 (경구로) 섭취하더라도 유의미한 건강상의 위험이 없는 수준임(Lu 등, 2002; Faustman 등, 2001). ADI는 일반적으로 체중 1kg당 하루 1mg(해당 물질 기준) 단위로 표시되며 <표-1>과 같이 계산됨.

<표-1> ADI(acceptable daily intake, 1일 허용섭취량) 산출 방법

인체노출 안전기준 (단위)	안전계수 종류	수치	내용
ADI (mg/kg/day)	Default safety factors (기본안전계수)	10	동물과 사람 간의 민감도 차이
		10	사람들 사이의 민감도 차이
ADI 공식		$ADI = \frac{NOAEL}{SF(10 \times 10)}$	

2-3) 안전계수(Safety factor)

- <그림-1>은 중간-종내의 기본안전계수를 추정하기 위해 독물동태학 및 독물독력학의 하위계수를 나타낸 것임. GLP-기반 독성시험이 보편화가 되어 대부분 인체노출안전기준 설정에 있어서 SF(safety factor, 안전계수) 100이 응용됨. SF 100은 종간의 10과 및 종내의 10(실제로는 10.24) 차이의 곱, 그리고 이들 계수는 다시 독물동태학(toxicokinetics) 및 독물독력학(toxicodynamics)의 하위계수 곱으로 각각 추정됨(박영철, 2019; WHO, 1994; Bernauer 등, 2018).



<그림-1> 종간-종내의 안전계수와 독물동태학 및 독물독력학의 하위계수

3. MRSD(maximum recommended starting dose, 임상최대권장초기용량) 결정 방법

- MRSD 산출은 아래의 공식과 같이 동물의 반복투여독성시험을 통해 추정된 NOAEL(no observed adverse effect level, 최대비독성용량)을 Table 1에서처럼 인체등가용량(Human equivalent dose)으로의 전환계수인 Km 및 종내 안전계수 10을 적용하여 이루어짐.

Small molecule

$$\text{HED} = \text{NOAEL} \times (\text{Animal Km} / \text{Human Km})$$

$$\text{MRSD} = \frac{\text{HED}}{\text{SF}(10)}$$

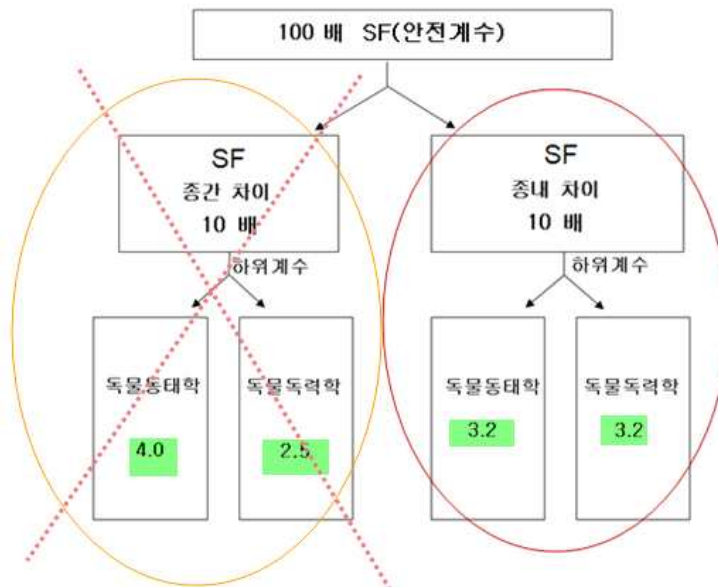
Table 1: Conversion of Animal Doses to Human Equivalent Doses Based on Body Surface Area			
Species	To Convert Animal Dose in mg/kg to Dose in mg/m ² , Multiply by <i>k_m</i>	To Convert Animal Dose in mg/kg to HED ^a in mg/kg, Either:	
		Divide Animal Dose By	Multiply Animal Dose By
Human	37	---	---
Child (20 kg) ^b	25	---	---
Mouse	3	12.3	0.08
Hamster	5	7.4	0.13
Rat	6	6.2	0.16
Ferret	7	5.3	0.19
Guinea pig	8	4.6	0.22
Rabbit	12	3.1	0.32
Dog	20	1.8	0.54
Primates:			
Monkeys ^c	12	3.1	0.32
Marmoset	6	6.2	0.16
Squirrel monkey	7	5.3	0.19
Baboon	20	1.8	0.54
Micro-pig	27	1.4	0.73
Mini-pig	35	1.1	0.95

4. Organ-on-a chip에서 얻은 자료를 통한 MRSD 추정 방법

4-1) Organ-on-a chip의 SF 적용에 논리적 근거

① 13주 반복투여 vs 4주 반복투여에 대한 NOAEL 추정

- Organ-on-a chip은 인체의 세포 및 조직으로 이루어짐으로 종간 차이가 없음. 따라서 종내 차이에 대한 SF 중 10만 적용되어 **MRSD = NOAEL/10이 됨**. Organ-on-a chip 자체적으로 장기 배양이 어렵지만, 현재 최대 장기 배양을 통해 약물 개발을 위한 서비스를 수행하고 있는 CN Bio의 PhysioMimix OoC에서 4주 정도 장기 배양이 가능하다고 함 (Medical technologies., 2025). 동물실험에서는 13주 반복투여를 통해 NOAEL을 얻기도 하지만 약 95% 정도가 4주 이내에 독성 여부가 확인됨(Olson 등, 2000). 따라서 OoC에서 4주 반복투여를 통한 NOAEL을 사용하여 임상시험에서 **MRSD = NOAEL/10**을 그대로 적용할 수 있음. 그러나 In vitro라는 측면에서 모든 활성이 생체보다 낮은 이유로 2주 반복투여를 통한 NOAEL 추정도 가능할 것으로 사료됨.

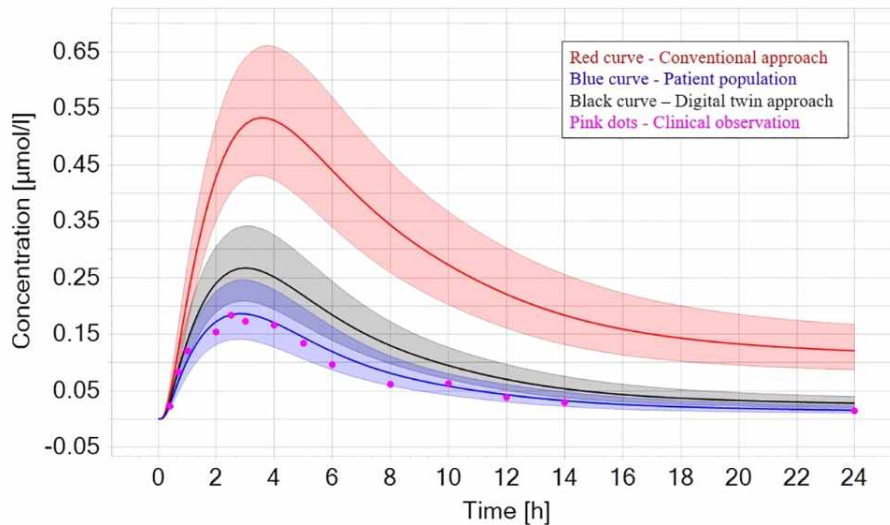


<그림-2> Organ-on-a chip에 적용할 안전계수 인간의 종내 차이 3.2 X 3.2

② PK에 영향을 주는 OoC의 민감도 요소- Cytochrome p450 활성화에 의한 SF

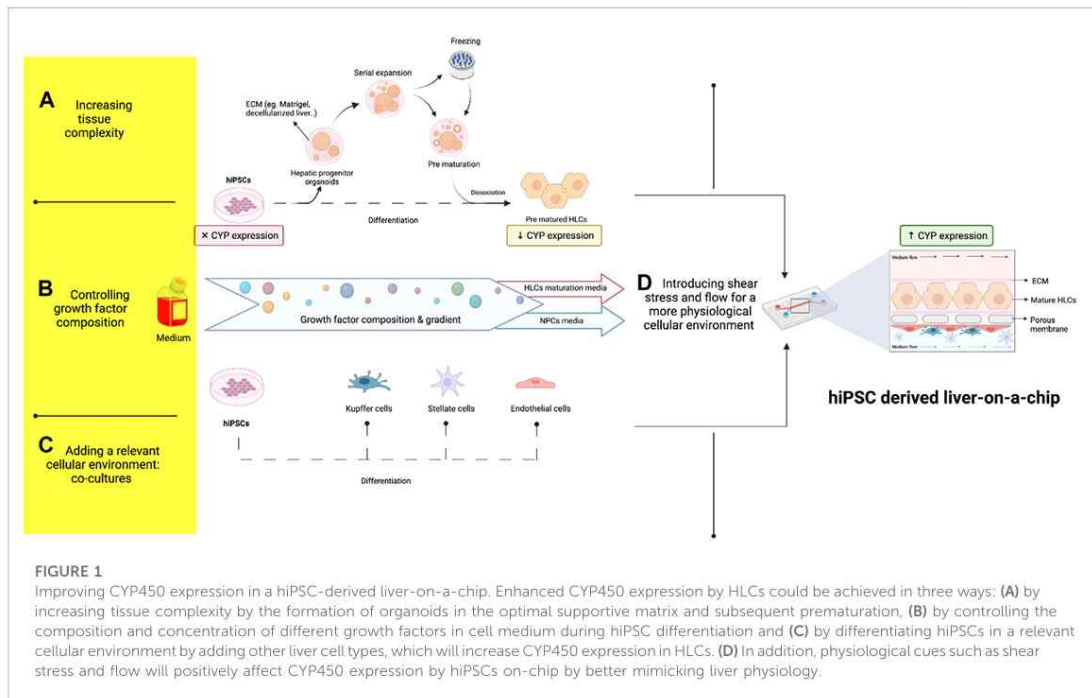
- 디지털 트윈(digital twin) 기반 OoC의 PK에 대한 민감도:** Aravindakshan 등(2025)은 현재까지 가장 앞선 기술인 디지털 트윈 기반 liver-on-a chip을 사용하여 32개 약물의 동태학적 지표인 AUC(area under the curve, 곡선하 면적)을 측정하였음. 디지털 트윈-OoC 시스템은 약물의 OoC 자체보다 인체 동태학적 지표를 더 잘 예측하기 위해 생물학, 하드웨어 칩 정보, 그리고 물리화학적 정보 등의 3가지 구성 요소로 이루어진 가상 환경의 소프트웨어임. 따라서 liver-on-a chip에서 확인된 AUC를 디지털 트윈을 통해 보다 인체에서 AUC를 보다 더 잘 예측한다고 할 수 있음.

- **PK 지표의 과대평가:** 디지털 트윈(digital twin) 기반 liver-on-a chip에서 32개의 약물에 대한 AUC를 확인한 결과, <Fig 8>의 프로프라놀롤(propranolol) 예시에서처럼 실제 임상 시험에서보다 평균 1.5배 과대평가가 이루어진다는 것이 확인됨. 이와 같은 과대평가에 대한 이유는 약물대사에 관여하는 cytochrome P450의 활성이 실제 인체에서보다 활성이 낮은 점에 기인하는 것으로 추정되었음.



<Fig 8> 단일 경구 투여(80mg) 후 프로프라놀롤의 시뮬레이션된 동력학:

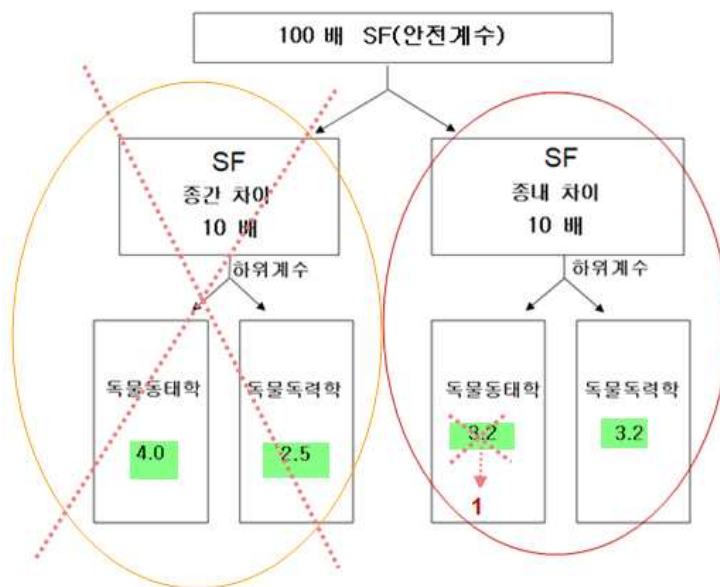
- **PK 과대평가에 대한 원인 - Cytochrome P450 활성:** 이와 같은 과대평가에 대한 이유는 약물 대사에 관여하는 cytochrome P450의 활성이 실제 인체에서보다 낮은 점에 기인하는 것으로 추정되었음. Tamargo-Rubio등(2023)은 hiPSC(induced pluripotent stem cell) 유래 liver-on-a chip에서 cytochrome p450의 발현 증진을 개선하기 위해 Figure 1에서처럼 4가지 대안을 제시함. 즉, Figure 1에서 (A) 최적의 지지 기질 내에서 세포층이 형성된 후 성숙 전 단계에서 조직 복잡성을 증가시키는 것, (B) hiPSC 분화 중 세포 배지 내 다양한 성장 인자의 조성 및 농도를 조절하여 (C) 다른 간세포 유형을 추가하여 관련 세포 환경에서 hiPSC를 구분함으로써 HLC(hepatocyte-like cell)에서 CYP450 발현 증가, (D) 전단 응력(shear stress)과 유체 흐름과 같은 생리학적 신호는 간 생리를 더 잘 모방함으로써 칩 내 hiPSCs의 CYP450 발현에 긍정적인 영향을 유도하는 것으로 확인됨.



③ **PK 과대평가에 대한 SF 적용:** Liver-on-a chip 시스템에서 cytochrome P450 발현 저하에 의한 AUC 과대평가에 대한 SF는 아래의 도표에서처럼 3.2를 1.5로 나누어주면 2.1이 됨.

4-2) PK 과대평가에 의한 혈중 과잉용량에 의한 독성 민감도에 대한 SF

- Liver-on-a Chip에서 cytochrome P450의 활성이 낮다는 것은 혈중용량을 증가시킨다는 것을 의미함. 이는 독성 증가로 실제적으로 인체 종내 차이에 의한 독성동태학적 SF 2.1은 안전성에 대한 계수로의 의미가 없으며 오히려 유효용량의 범위를 좁히는 결과를 가져올 수 있음. 따라서 <그림-3>에서처럼 Liver-on-a chip의 인체 외삽을 위한 safety factor는 독성독력학(toxicokinetics) 관점만을 고려한 3.2이면 충분할 것으로 사료됨. 그러나 **Liver-on-a Chip이 건강한 정상인 예측 모델과 환자에 대한 예측 모델이 차이가 있으므로 각각 5 및 3을 적용하면 적절할 것으로 사료됨. 환자에서 SF가 3이 되는 이유는 정상인보다 유전적 동질성 측면에서 일치성이 높기 때문임.**



<그림-3> Organ-on-a chip에서 cytochrome P450 발현 저하에 의한 인간의 종내 차이 SF = 3.2

5. NOAEL 설정을 위한 장기별 OoC toxicity Biomarker(독성의 생물학적 지표)

5-1) NOAEL 설정을 위한 장기별 OoC toxicity Biomarker

- 아직 인체의 모든 장기가 연결된 다장기 OoC에 의한 자료를 이용할 정도로 발전하지 못함. 따라서 <표-2>에서처럼 각각 단일 OoC에 대한 toxicity biomarker(독성의 생물학적 지표)를 이용하여 설정하여 NOAEL 추정이 가능(Cong 등, 2020). 대부분의 biomarker는 기능적인 것보다 거대분자의 생화학적 변화에 대한 것임.

<표-2> Some common biomarkers for drug toxicity evaluation.

Toxicity	Biomarker	Reference	Specification	Whether Utilized with Organ Chips
Hepatotoxicity	ALT (alanine aminotransferase) AST (aspartate aminotransferase)	[19]	Diagnostic marker of liver damage	✓
	ALP (alkalinephosphatase)	[19]	Diagnostic marker of cholestatic injury	✓
	GLDH (glutamate dehydrogenase)	[20]	Early detection biomarker	×
	HMGB-1 (high-mobility group box 1)	[21]	Early detection biomarker	×
	K18 (keratin-18)	[22]	Early detection biomarker	✓
	OCT (ornithine carbamoyltransferase)	[23]	Early detection biomarker	×
	GST-α (glutathione S-transferase α)	[24]	Early detection biomarker	✓
	CYP (cytochrome P450)	[25]	Metabolic ability biomarker	✓
	miRNA-122, miRNA-192	[26]	Genomic markers	✓
	CDH-5 (cadherin-5)	[27]	Proteomics biomarker	✓
	FABP1 (fatty acid binding protein 1)	[27]	Proteomics biomarker	×
nephrotoxicity	GFR (glomerular filtration rate)	[28]	Diagnostic marker of renal function	✓
	SCr levels and urine output	[29]	Diagnostic marker of AKI (acute kidney injury)	✓
	KIM-1 (kidney injury molecule-1)	[30]	Early detection biomarker	✓
	NAG (N-acetyl-β-glucosaminidase)	[30]	Early detection biomarker	✓
	NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)	[31]	Early detection biomarker	✓
	L-FABP (liver type fatty acid binding protein)	[32]	Early detection biomarker	×
	MCP-1 (monocyte chemotactic peptide-1)	[33]	Early detection biomarker	×
	Cys C (cystatin C)	[34]	Early detection biomarker	✓
	OPN (osteopontin)	[35]	Early detection biomarker	×
	CLU (clusterin)	[36]	Early detection biomarker	×
	TFF3 (trefoil factor 3)	[37]	Early detection biomarker	×
	TEER (transendothelial resistance)	[38]	Biomarker of barrier functions	✓
	miRNAs	[39]	Genomic markers	✓
cardiotoxicity	LVDP (left ventricular formation pressure) LVSP (left ventricular systolic pressure)	[40]	Diagnostic marker of myocardial injury	✓
	TnI (troponin I) TnT (troponin T)	[41]	Early detection biomarker	×
	BNP (brain natriuretic peptide) NT-proBNP	[42]	Early detection biomarker	×
	MPO (myeloperoxidase)	[43]	Biomarker of oxidative stress	×
	miR-146a, miR-1, miR-133, miR-208, miR-499	[44]	Genomic markers	✓
	beating frequency, systolic stress, field potential	[45,46]	Mechanical markers	✓
	TEER	[47]	Biomarker of barrier functions	✓
neurotoxicity	plasma P-Tau (phosphorylated-Tau) T-Tau (total Tau)	[48]	Diagnostic marker of central nervous system (CNS) injury	×
	NF-H (neurofilaments heavy subunit)	[49]	Diagnostic marker of axonal injury	×

	miR-425-p, miR-21, miR-93, miR-191, miR-499, miR-328, miR-362-3p, miR-451, miR-486a	[50]	Genomic markers	✓
	H-FABP (heart fatty acid binding protein)	[51]	Diagnostic marker of CNS injury	×
	SP, sCD40L, TIMP-1, MDA, CK-18	[52]	Early detection biomarkers	✓
	MBG (marinobufagenin)	[53]	Biomarker of neuro-inflammation	×
other toxicities	Ghrelin	[54]	Biomarker of stomach/small intestine injury	×
	DAO (diamine oxidase) Citrulline	[54]	Biomarker of small intestine injury	×
	CD64, C-reactive protein	[54]	Biomarker of small/large intestine	✓
	NOS isoenzymes	[55]	Breath biomarkers	✓
	HO (heme oxygenase)	[56]	Biomarker of upper respiratory tract viral infections	✓
	CYP (cytochrome P450) H2O2	[57]	Biomarker of pulmonary diseases	✓
	Breath methylated hydrocarbons	[58]	Lipid peroxidation markers	×
	TEER	[59]	Biomarker of barrier functions	✓

[Open in a new tab](#)

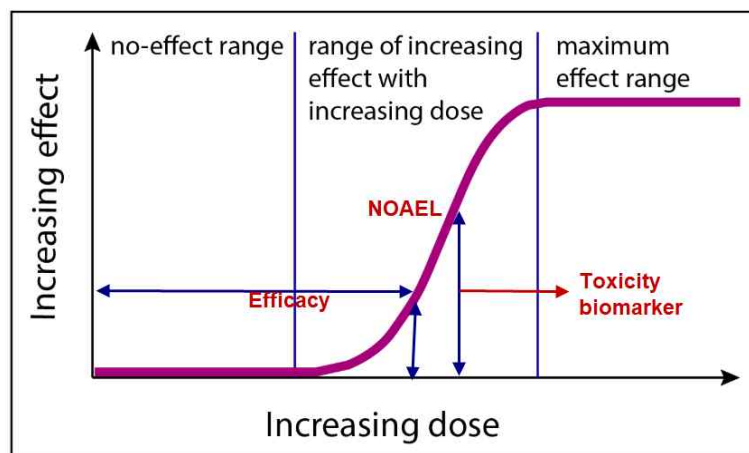
<표-2>의 참고문헌

19. Hamilton L.A., Collins-Yoder A., Collins R.E. Drug-induced liver injury. AACN Adv. Crit. Care. 2016;4:430–440. doi: 10.4037/aacnacc2016953. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
20. Thulin P., Homby R.J., Auli M., Nordahl G., Antoine D.J., Starkey Lewis P., Goldring C.E., Park B.K., Prats N., Gillingham B., et al. A longitudinal assessment of miR-122 and GLDH as biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. Biomarkers. 2017;5:461–469. doi: 10.1080/1354750X.2016.1269131. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
21. Huebener P., Pradere J., Hernandez C., Gwak G., Caviglia J.M., Mu X., Loike J.D., Jenkins R.E., Antoine D.J., Schwabe R.F. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. J. Clin. Investig. 2015;2:539–550. doi: 10.1172/JCI76887. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
22. Church R.J., Watkins P.B. The transformation in biomarker detection and management of drug-induced liver injury. Liver Int. 2017;37:1582–1590. doi: 10.1111/liv.13441. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
23. McGill M.R., Sharpe M.R., Williams C.D., Taha M., Jaeschke H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. J. Clin. Investig. 2012;4:1574–1583. doi: 10.1172/JCI59755. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
24. Church R.J., Ulick G.A.K., Aubrecht J., Bonkovsky H.L., Chalasani N., Fontana R.J., Goepfert J.C., Hackman F., King N.M.P., Kirby S. Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: An international collaborative effort. Hepatology. 2019;69:760–773. doi: 10.1002/hep.29802. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
25. Desai P.K., Tseng H., Souza G.R. Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell Culture for CYP450 Inhibition/Induction. Int. J. Mol. Sci. 2017;18:1085. doi: 10.3390/ijms18051085. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
26. Wang K., Zhang S., Marzolf B., Troisch P., Brightman A., Hu Z., Hood L.E., Galas D.J. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009;11:4402–4407. doi: 10.1073/pnas.0813371106. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
27. Mikus M., Drobin K., Gry M., Bachmann J., Lindberg J., Yimer G., Aklilu E., Makonnen E., Aderaye G., Roach J. Elevated levels of circulating CDH5 and FABP1 in association with human drug-induced liver injury. Liver Int. 2017;37:132–140. doi: 10.1111/liv.13174. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
28. Swan S.K. The search continues—An ideal marker of GFR. Clin. Chem. 1997;6:913–914. doi: 10.1093/clinchem/43.6.913. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
29. Rewa O., Bagshaw S.M. Acute kidney injury—Epidemiology, outcomes and economics. Nat. Rev. Nephrol. 2014;10:193–207. doi: 10.1038/nrneph.2013.282. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
30. Vlasakova K., Erdos Z., Troth S.P., McNulty K., Chapeau-Campredon V., Mokrzycki N., Muniappa N., Gu Y.Z., Holder D., Bailey W.J. Evaluation of the relative performance of 12 urinary biomarkers for renal safety across 22 rat sensitivity and specificity studies. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. 2014;1:3–20. doi: 10.1093/toxsci/kft330. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
31. George B., Joy M.S., Aleksunes L.M. Urinary protein biomarkers of kidney injury in patients receiving cisplatin chemotherapy. Exp. Biol. Med. 2018;243:272–282. doi: 10.1177/1535370217745302. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
32. Katagiri D., Hamasaki Y., Doi K., Negishi K., Noiri E. Interstitial renal fibrosis due to multiple cisplatin treatments is ameliorated by semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibition. Kidney Int. 2015;2:374–385. doi: 10.1038/ki.2015.327. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
33. Liu X., Guan Y., Xu S., Li Q., Sun Y., Han R., Jiang C. Early predictors of acute kidney injury: A narrative review. Kidney Blood Press. Res. 2016;5:680–700. doi: 10.1159/000447937. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
34. Pianta T.J., Pickering J.W., Succar L., Chin M., Davidson T., Buckley N.A., Mohamed F., Endre Z.H. Dexamethasone modifies cystatin c-based diagnosis of acute kidney injury during cisplatin-based chemotherapy. Kidney Blood Press Res. 2017;1:62–75. doi: 10.1159/000469715. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
35. Huang J.X., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Cell- and biomarker-based assays for predicting nephrotoxicity. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2014;12:1621–1635. doi: 10.1517/17425255.2014.967681. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
36. Wu C.Y., Yang H.Y., Chien H.P., Tseng M.H., Huang J.L. Urinary clusterin—A novel urinary biomarker associated with pediatric lupus renal histopathologic features and renal survival. Pediatr. Nephrol. 2018;33:1189–1198. doi: 10.1007/s00467-018-3924-4. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
37. Chapman A.B., Devuyst O., Eckardt K.U., Gansevoort R.T. Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): Executive summary from a kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) controversies conference. Kidney Int. 2015;88:17–27. doi: 10.1038/ki.2015.59. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
38. Odijk M., van der Meer A.D., Levner D., Kim H.J., van der Helm M.W., Segerink L.I., Frimat J., Hamilton G.A., Ingber D.E., van

- den Berg A. Measuring direct current trans-epithelial electrical resistance in organ-on-a-chip microsystems. *Lab Chip*. 2015;3:745–752. doi: 10.1039/C4LC01219D. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
- 39. Saikumar J, Hoffmann D, Kim T.M., Gonzalez V.R., Zhang Q., Goering P.L., Brown R.P., Bijol V., Park P.J., Waikar S.S. Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury. *Toxicol. Sci*. 2012;2:256–267. doi: 10.1093/toxsci/kfs210. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 - 40. Ewer M.S., Ali M.K., Mackay B., Wallace S., Valdivieso M., Legha S.S., Benjamin R.S., Haynie T.P. A comparison of cardiac biopsy grades and ejection fraction estimations in patients receiving adriamycin. *J. Clin. Oncol*. 1984;2:112–117. doi: 10.1200/JCO.1984.2.2.112. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 41. Wallace K.B., Hausner E., Herman E., Holt G.D., MacGregor J.T., Metz A.L., Murphy E., Rosenblum I.Y., Sistare F.D., York M.J. Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity. *Toxicol. Pathol*. 2004;1:106–121. doi: 10.1080/01926230490261302. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 42. Causey M.W., Niten Singh M.D. Clinical implications of B-type Natriuretic Peptide (BNP) and N-terminal proBNP (NT-proBNP) in the care of the vascular surgery patient. *Semin. Vasc. Surg*. 2015;27:143–147. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2015.01.004. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 43. Tan L., Lyon A.R. Role of biomarkers in prediction of cardiotoxicity during cancer treatment. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med*. 2018;20:55. doi: 10.1007/s11936-018-0641-z. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 - 44. Marta O.P.O., Gurda D., Fedoruk-Wysomirska A., Smolarek I., Wyszko E. Circulating microRNAs in cardiovascular diseases. *Acta Biochim. Pol*. 2016;4:725–729. doi: 10.18388/abp.2016.1334. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 45. Kujala V.J., Pasqualini F.S., Goss J.A., Nawroth J.C., Parker K.K. Laminar ventricular myocardium on a microelectrode array-based chip. *J. Mater. Chem. B*. 2016;2:3534–3543. doi: 10.1039/C6TB00324A. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 46. Agarwal A., Goss J.A., Cho A., McCain M.L., Parker K.K. Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies. *Lab Chip*. 2013;18:3599. doi: 10.1039/c3lc50350j. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 - 47. Maoz B.M., Herl A., Henry O.Y.F., Leineweber W., Yadid M., Doyle J., Mannix R., Kujala V., Fitzgerald E.A., Parker K.K. Organs-on-chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities. *Lab Chip*. 2017;17:2294–2302. doi: 10.1039/C7LC00412E. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 48. Higuchi M., Virginia M.Y.L., John Q.T. Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromol. Med*. 2002;2:131–150. doi: 10.1385/NNM.2.2.131. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 49. Siman R., Toraskar N., Dang A., McNeil E., McGarvey M., Plaum J., Maloney E., Grady M.S. A panel of neuron-enriched proteins as markers for traumatic brain injury in humans. *J. Neurotrauma*. 2009;11:1867–1877. doi: 10.1089/neu.2009.0882. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 - 50. Martinez B., Peplow P.V. MicroRNAs as diagnostic markers and therapeutic targets for traumatic brain injury. *Neural Regen. Res*. 2017;12:1749–1761. doi: 10.4103/1673-5374.219025. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 - 51. Lescuyer P., Allard L., Zimmermann-Ivol C.G., Burgess J.A., Hochstrasser D.F. Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics*. 2004;8:2234–2241. doi: 10.1002/pmic.200300822. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 52. Salehpour F., Meshkini A., Razmgiri A., Mahdikhah A. Prognostic serum factors in patients with traumatic brain injury: A systematic review. *Neurosurg. Q*. 2016;1:19–36. doi: 10.1097/WNQ.0000000000000117. [DOI] [Google Scholar]
 - 53. Oliver J., Abbas K., Lightfoot J., Baskin K., Collins B., Wier D., Bramhall J., Huang J., Puschett J. Comparison of neurocognitive testing and the measurement of marinobufagenin in mild traumatic brain injury: A preliminary report. *J. Exp. Neurosci*. 2015;9:67–72. doi: 10.4137/JEN.S27921. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 - 54. Carr D.F., Ayehunie S., Davies A., Duckworth C.A., French S., Hall N., Hussain S., Mellor H.R., Norris A., Park B.K., et al. Towards better models and mechanistic biomarkers for drug-induced gastrointestinal injury. *Pharmacol. Ther*. 2017;172:181–194. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.01.002. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 55. Zhou M., Liu Y., Duan Y. Breath biomarkers in diagnosis of pulmonary diseases. *Clin. Chim. Acta*. 2012;21–22:1770–1780. doi: 10.1016/j.cca.2012.07.006. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 56. Muller T. The cellular stress response induced by aqueous extracts of cigarette smoke is critically dependent on the intracellular glutathione concentration. *Carcinogenesis*. 1998;5:797–801. doi: 10.1093/carcin/19.5.797. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 57. Stolarek R., Bialasiewicz P., Krol M., Nowak D. Breath analysis of hydrogen peroxide as a diagnostic tool. *Clin. Chim. Acta*. 2010;411:1849–1861. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.031. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 58. Phillips M., Cataneo R.N., Greenberg J., Grodman R., Gunawardena R., Naidu A. Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. *Eur. Respir. J*. 2003;1:48–51. doi: 10.1183/09031936.02.00053402. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 - 59. Henry O.Y.F., Villenave R., Crounce M.J., Leineweber W.D., Benz M.A., Ingber D.E. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab Chip*. 2017;13:2264–2271. doi: 10.1039/C7LC00155J. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

5-2) NOAEL 설정을 위한 OoC toxicity Biomarker의 용량-반응관계

- OoC toxicity Biomarker에 있어서 시스템 자체의 재현성은 무엇보다도 중요함. 기술의 발달로 시험물질에 대한 OoC 시스템에서 재현성이 높다고 할 수 있음. 특히 liver-on-a-chip의 27종 시험물질에 대한 민감도와 특이도는 각각 87%과 100% 추정되었음(Ewart 등, 2022).
- 그러나 민감도와 특이도가 높다고 하여도 시험 때마다 미세한 차이는 있을 것으로 사료됨. 이를 극복하기 위해서는 질환모델 OoC를 이용하여 유효성과 독성의 용량-반응 관계를 한번의 시험으로 얻는 것이 바람직함. 또한 따라서 최소한 7단계의 용량군을 설정하여 OoC toxicity Biomarker의 용량-반응곡선을 아래의<그림-4>과 같이 추정하는 것이 바람직함. OoC에서 NOAEL은 보다 용량 변화에 대한 올바른 예측을 위하여 **조직병리학적 변화가 없는 세포 생화학적 독성 지표가 확인되는 최저 용량군으로 설정하는 것이 바람직함.**



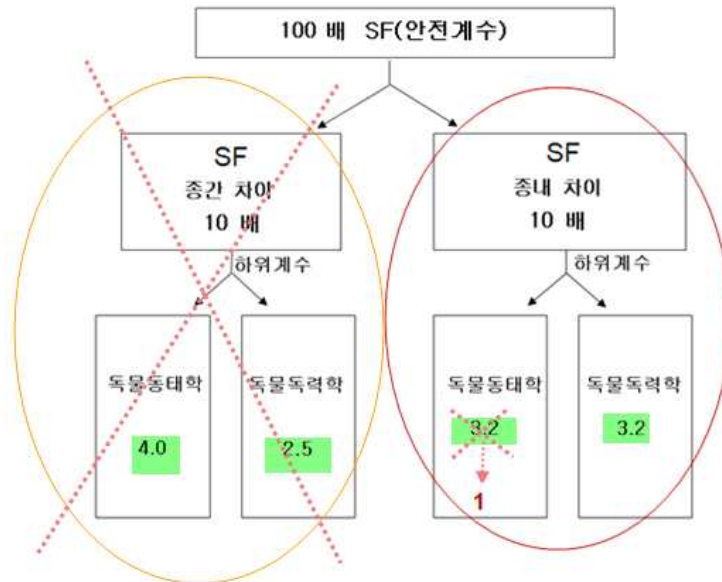
<그림-4> Organ-on-a chip 시스템에서 유효성 및 독성의 용량-반응곡선에 대한 예시

5-3) Organ-on a chip을 이용한 MRSD 추정 방법

- 결론적으로 Organ-on-a chip의 MRSD(maximum recommended starting dose, 임상최대 권장초기용량) 산출에서 정상적인 인체 세포를 이용할 경우, SF 5가 적용된 $MRSD = NOAEL/5$ 그리고 질환모델을 사용할 경우, SF=3이 적용되어 $MRSD = NOAEL/3$ 으로 추정됨.

6. 결론: Organ-on-a chip을 이용한 NOEL 및 임상시험 안전용량 설정 방법

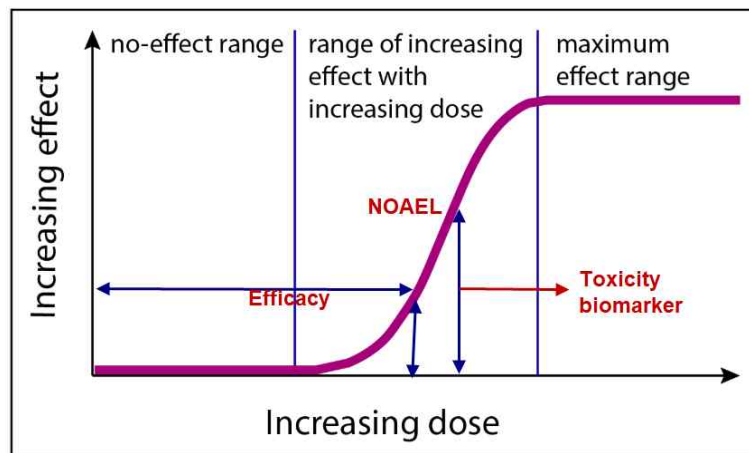
- 현재까지 organ-on-a chip을 이용한 임상최대권장초기용량을 추정한 연구가 수행되지 않았기 때문에 여기서 MRSD 산출 과정은 국내외적으로 최초가 될 수 있음. 규제기관이 이와 같은 논리를 통해 독성평가 및 IND에 도입한다면 글로벌 규제기관으로 거듭날 수 있다는 생각이 듭.
- 가장 앞선 기술인 디지털 트윈(digital twin) 기반 liver-on-a chip에서 32개의 약물에 대한 AUC를 확인한 결과, 실제 임상시험에서보다 평균 1.5배 과대평가되는 것을 확인이 됨. 과대평가되는 이유는 약물대사에 관여하는 cytochrome P450의 활성이 실제 인체에서보다 활성이 낮은 점에 기인하는 것으로 추정되었음. liver-on-a Chip에서 cytochrome P450의 활성이 낮다는 것은 혈중용량을 증가시킨다는 것을 의미함.
- Liver-on-a chip의 인체 외삽을 위한 safety factor는 아래의 <그림>에서처럼 독성독력학(toxicokinetics) 관점만을 고려한 3.2이면 충분할 것으로 사료됨. 그러나 **Liver-on-a Chip**이 건강한 정상인 예측 모델과 환자에 대한 예측 모델이 차이가 있으므로 각각 5 및 3을 적용하면 적절할 것으로 사료됨. 환자에서 SF가 3이 되는 이유는 정상인보다 유전적 동질성 측면에서 일치성이 높기 때문임.



<그림> Organ-on-a chip에서 cytochrome P450 발현 저하에 의한 인간의 종내 차이 SF = 3.2

- 아직 인체의 모든 장기가 연결된 다장기 OoC에 의한 자료가를 이용할 정도로 발전하지 못함. 따라서 각각 단일 OoC에 대한 toxicity biomarker(독성의 생물학적 지표)를 이용하여 설정하여 NOEL 추정이 가능. 대부분의 biomarker는 기능적인 것보다 거대분자의 생화학적 변화에 대한 것임.

- OoC의 민감도와 특이도가 높다고 하여도 시험 때마다 미세한 차이는 있을 것으로 사료 됨. 이를 극복하기 위해서는 질환모델 OoC를 이용하여 유효성과 독성의 용량-반응 관계를 한번의 시험으로 얻는 것이 바람직함. 또한 따라서 최소한 7단계의 용량군을 설정하여 **OoC toxicity Biomarker의 용량-반응곡선을 아래의<그림-4>과 같이 추정하는 것이 바람직함.** OoC에서 NOAEL은 보다 용량 변화에 대한 올바른 예측을 위하여 **조직병리학적 변화가 없는 세포 생화학적 독성 지표가 확인되는 최저 용량군으로 설정하는 것이 바람직함.**



<그림-4> Organ-on-a chip 시스템에서 유효성 및 독성의 용량-반응곡선에 대한 예시

- 결론적으로 Organ-on-a chip의 MRSD(maximum recommended starting dose, 임상최대 권장초기용량) 산출에서 정상적인 인체 세포를 이용할 경우, SF 5가 적용된 $MRSD = NOAEL/5$ 그리고 질환모델을 사용할 경우, SF=3이 적용되어 $MRSD = NOAEL/3$ 으로 추정됨.

<참고문헌>

Bernauer, Ulrike & Bodin, Laurent & Chaudry, Q. & Coenraads, P.J. & Dusinska, Maria & Ezendam, Janine & Gaffet, Eric & Galli, Corrado & Granum, Berit & Panderi, Irene & Rogiers, Vera & Rousselle, Christophe & Stepnik, Maciej & Vanhaecke, Tamara & Wijnhoven, Susan & Koutsodimou, Aglaia & Simmonard, A. & Uter, Wolfgang & Goetz, Natalie. (2018). "The SCCS note of Guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation – 10th Revision"SCCS/1602/18 - Final version.

WHO (World Health Organization) Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits. Environmental Health Criteria, 170, WHO, Geneva (1994).

Tamargo-Rubio I, Simpson AB, Hoogerland JA, Fu J. Human induced pluripotent stem cell-derived liver-on-a-chip for studying drug metabolism: the challenge of the cytochrome P450 family. Front Pharmacol. 2023 Jun 28;14:1223108.

Yang Z, Liu X, Cribbin EM, Kim AM, Li JJ, Yong KT. Liver-on-a-chip: Considerations, advances, and beyond. Biomicrofluidics. 2022 Nov 8;16(6):061502.

Ewart L, Apostolou A, Briggs SA, Carman CV, Chaff JT, Heng AR, Jadalannagari S, Janardhanan J, Jang KJ, Joshipura SR, Kadam MM, Kanellias M, Kujala VJ, Kulkarni G, Le CY, Lucchesi C, Manatakis DV, Maniar KK, Quinn ME, Ravan JS, Rizos AC, Sauld JFK, Sliz JD, Tien-Street W, Trinidad DR, Velez J, Wendell M, Irrechukwu O, Mahalingaiah PK, Ingber DE, Scannell JW, Levner D. Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology. Commun Med (Lond). 2022 Dec 6;2(1):154. doi: 10.1038/s43856-022-00209-1. Erratum in: Commun Med (Lond). 2023 Jan 12;3(1):7. doi: 10.1038/s43856-023-00235-7. Erratum in: Commun Med (Lond).

Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. Regul Toxicol Pharmacol. 2000;32(1):56-67.

107. FDA의 2026년 핵심 규제 요소와 글로벌 최초의 비임상 NAM(New approach methodologies) 가이드라인

1. FDA의 2026년 핵심 규제 4가지 요소

- 2026년 초에 FDA가 약물 개발 수명 주기 전반에 걸쳐 근거 기준에 접근하는 방식에 있어 일관된 변화를 반영하는 4가지의 정책 업데이트를 발표하였음. 네 가지 중 3가지는 임상시험과 관련된 것이며 1가지는 비임상시험과 관련된 것임.
- ① **Single-trial standard(단일 시험 표준):** 확인 증거로 뒷받침된 적절하고 잘 통제된 **하나의 임상시험 연구**가 이제 신약 승인의 기본 요건이 되었음.
- ② **Plausible mechanism framework(수용 가능한 메커니즘 프레임워크):** 새로운 경로는 개별화된 초희귀질환 치료제(individualized ultra-rare disease therapies) 개발자가 전통적인 임상시험이 불가능할 때 기전 데이터(mechanistic data)를 기반으로 승인 사례를 구축할 수 있게 함.
- ③ **Bayesian methodology(베이지안 방법론):** 개발자들은 적응형 임상시험 설계에 베이지안 통계 방법을 적용하고 실제 증거와 과거 및 향후 외부 대조통제군을 통합하는 것에 대해 더 명확한 규제 지침을 갖게 되었음.
- ④ **New approach methodologies(새로운 접근법 방법론):** 2026년 3월 발표된 초안 지침은 오가노이드, 장기 온 칩, 인실리코 모델 등 동물 실험 대안에 대한 검증 원칙을 확립함.

2. 글로벌 최초의 비임상 NAM 가이드라인

1) DRAFT GUIDANCE의 제목

- March 2026 Pharmacology/Toxicology. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER, 의약품평가연구센터)
- DRAFT GUIDANCE: **General Considerations for the Use of New Approach Methodologies(NAM) in Drug Development Guidance for Industry**(신약 개발에서 NAM의 활용에 관한 일반적인 고려 사항)

2) 배경

- 신뢰할 수 있는 NAM의 개발과 활용은 동물 실험을 줄이고 대체하는 동시에 인간 중심적 방법을 활용한 예측 독성학을 발전시키려는 FDA의 중요한 우선 과제. 이에 이 지침을 통해 FDA는 의약품 개발 및 규제 제출자료에 NAM을 보다 광범위하게 도입하고자 함.

- 비임상 시험의 예측성, 신뢰성 및 인체 관련성을 높여 결과적으로 후속 임상 시험의 안전성을 강화하는 경우, 규제 제출자료에 NAMs를 사용할 것을 권장.
- 본 지침은 제출된 NAM의 유효성 검증에 대한 고려 사항에만 초점을 맞추고 있지만 NAM을 포함한 신약 개발 도구의 적합(격)성 평가에 대해서는 다루지 않음. 이는 다른 지침에서 다루고 있음
- 검증(Validation)이란 특정 사용 맥락(COU, context of use)에 대해 확립하는 과정. 적격성 평가는 의약품 개발 도구와 그 제안된 COU가 의약품 개발 및 규제 심사 과정에서 특정 해석과 적용을 가질 수 있다고 판단하는 것임(12)
- 자격 부여는 유용하긴 하지만, 특정 상황에서 NAM 데이터의 신뢰성을 확립하기 위해서는 검증 과정이 필수적임. CDER는 신약 개발 프로그램에 사용된 검증된 NAM과 검증되지 않은 NAM의 데이터를 모두 검토하여 프로그램에서 사용된 자격을 갖춘 NAM과 검증된 NAM의 데이터를 모두 검토하여 특정 상황에서 그 사용이 적절한지 판단할 것임.

3. 검증 고려 사항(VALIDATION CONSIDERATIONS)

- 규제 결정을 내리기 위해 제출된 NAM 연구의 해석 가능성과 신뢰성을 높이기 위한 일반적인 검증 원칙은 다음과 같은 4가지 사항에 중점을 둠: (1) COU, (2) 인간 생물학적 적합성(human biological relevance), (3) 기술적 특성 분석(technical characterization), (4) 목적 적합성(fit-in-purpose).

A. 사용 맥락(Context of Use, COU)

- COU는 특정 신약 개발 의사결정 맥락을 다루기 위해 NAM의 의도된 용도와 규제 목적을 명확히 정의해야 함. 적절한 COU는 데이터 공백(a data gap)을 해소하고 하나 이상의 신약 개발 목표를 달성해야 함. COU가 유용하기 위해서는 CDER가 해당 정보를 활용하여 규제 결정을 뒷받침할 수 있도록 과학적 및/또는 신약 개발 관련 질문에 답을 해야 함.

B. 인간 생물학적 관련성(Human Biological Relevance)

NAM의 인간 생물학적 관련성은 정보 간의 관계를 의미함. NAM을 통해 생성된 정보와, 해당 정보가 인체 시험의 맥락에서 약물 평가에 어떤 영향을 미칠 수 있는지, 그리고 임상 시험에서 측정할 수 없는 독성을 예측하는 데 어떻게 활용될 수 있는지 시험에서 측정할 수 없는 독성 예측에 미치는 영향에 대해 논의해야함. NAM의 생물학적 관련성을 적절히 입증하면 아래의 요점들은 NAM의 인간 생물학적 타당성을 확립하기 위한 주요 권고 사항을 요약한 것임.

- ① NAM을 통해 평가될 생리학적 특징 - 사용된 세포 유형, 기원의 종, 그리고 독성학적 결과에 관여하는 해부학적 및 생리학적 특성 - 등이 NAM 플랫폼에서 어떻게 재현될 수 있는지 설명과 더불어 NAM 플랫폼에서 어떻게 재현될 수 있는지를 기술해야 함.
- ② NAM에서 관련 독성학적 결과를 어떻게 신뢰성 있게 평가할 수 있는지 입증함.
- ③ NAM에서 조사된 생물학적 메커니즘이 인간 임상시험에서 측정되는 결과에 어떻게 적용되는지 설명해야함.

C. 기술적 특성(Technical Characterization)

- 동물 실험의 경우와 마찬가지로, NAM의 기술적 특성화는 해당 플랫폼을 통해 얻은 데이터에 대한 과학적 신뢰성을 확립 필요성. 특정 평가 지표를 정량화하기에 충분히 견고하고 신뢰할 수 있으며 재현 가능한지 확인하는 데 필수적임. OECD의 '체외 시험 방법의 우수 실천 지침(GIVIMP)'에 따라, 아래의 요점들은 특정 유형의 NAM을 특성화하기 위한 주요 권고 사항들을 요약한 것임.
- 투여량 및 투여 빈도, 시험 물질의 조제 및 보관, 검출 방법 및 사용된 기기, 호환성 분석 측정값이나 시험 물질이 포함된 시료, 그리고 분석 변동성을 유발할 수 있는 모든 단계 또는 공정 등을 서술
- 데이터 분석 및 해석에 적용된 통계적 방법과 기준을 기술하고, 양성, 음성 또는 불확실한 결과를 판정하는 것에 대한 서술
- 특정 COU에 대한 NAM의 예측 성능(예:민감도, 특이도)에 대한 증명
- 검사의 유효 기간, 즉 검사가 유효한 기간에 대한 세부 정보를 제공. 제공된 분석 시약을 사용하면 안정적인 결과를 얻을 수 있음. 분석 결과는 작업 기간 내내 안정적이며, 시간이 지남에 따라 재료가 재공급될 때에도(예: 새로운 배치의 세포, 시약)에 걸쳐 안정적인 것으로 입증되어야 함.
- 사용된 세포 유형(예: 1차 세포, 불멸화 세포, 유래된 줄기세포 유래), 세포/조직 분리 및/또는 분화 방법, 세포 출처(예: 상업용, 환자 유래, 카탈로그 및 배치 번호) 및 종을 문서화하고 기술이 필요함.
- 생물학적 변이성(예: 유전적 요인, 기증자 간 변이성) 및 기증자 세포의 표현형 (예: 군주, 성별, 연령)을 COU와 관련하여 기술함.

- NAM의 과학적 타당성과 성능을 입증하기 위해 양성 및 시약의 사용 및 농도, 특정 성장 인자, 혈청 또는 항생제의 사용 및 농도를 포함하여 세포 배양 배지를 정의한다. 패싱 횟수, 배양 조건 및 표면 코팅등의 유지 관리 조건을 문서화함.
- 특정장기 칩과 같은 특정 플랫폼 및 기기에 대한 고려 사항을 다루기 위해 다음 연구 세부 사항을 제공해야함.
 - ① 유동, 매트릭스, 전단 응력, 배지 등과 같은 기술적 고려 사항.
 - ② 생체 적합성, 제조 방법, 기계적 특성, 구조, 생화학적 특성, 기질과의 호환성 및 이러한 요소가 실험적 변동성과 생물학적 관련성에 미치는 영향.
 - ③ (1) 시험 대상 물질과 플랫폼 또는 기기와 시험 물질 간의 상호작용 가능성을 배제하는 증거(예: 장기-온-칩에서 물질이 용출되어 독성을 유발하거나 세포를 변형시킬 수 있는 경우; (2) 세포 배양 웰 내에서의 시험 물질 흡수, 이는 표적에 도달하는 농도를 감소시킬 수 있는 경우; 또는 (3) (예: 조직 또는 세포)의 생체적합성 문제

D. 용도에 적합성(Fit-for-Purpose)

- NAM은 CDER의 규제 결정 과정을 지원하는 경우 그 목적에 부합하는 것으로 간주됨. 아래는 NAM이 목적에 부합함을 입증하기 위한 몇 가지 권고 사항을 요약한 것임.
- 기존의 비교 기준 방법이 이용 가능한 경우, 해당 NAM이 두 방법을 비교하는 성능 평가 (예: 민감도, 특이도, 양성 및 음성 예측도)를 포함하여, 기존 방법만큼이나 효과적으로 위험을 특성화함을 입증하는 데이터를 제공.
- NAM의 장점과 한계를 논의하되, 연구 설계나 수행 방식 중 신뢰성, 재현성 및/또는 해당 물질의 용도(COU)에 대한 위험 평가에 기여하는 능력에 영향을 미칠 수 있는 요소들을 포함하여 설명
- NAM의 연구 결과가 해당 의약품의 인체 건강 및/또는 안전성에 대한 인체 건강 및/또는 의약품의 안전성에 대한 전반적인 위험 평가에 기여하는지 설명.
- 목적에 부합하는 NAM은 다음의 세 가지 의약품 개발 목표 중 하나 이상을 달성하기 위한 정보를 제공할 수 있음. 의약품 개발 세가지 목표 중 하나 이상을 달성하는 데 필요한 정보를 제공할 수 있음:

- ① 기존 방식을 대체하거나 대안적인 접근 방식을 제시하며, 예를 들어 기존 방법과 비교하여 동등하거나 더 나은 유효성 또는 안전성 정보를 제공: <예시> 체외 NAM을 사용하여 동물 실험을 대체할 수 있음.
- ② 데이터 공백을 메우며, 예를 들어 기존의 비임상 모델이 없거나 불충분할 때 약물의 효능이나 안전성에 대한 추가적인 증거를 제공함: <예시> 체외 NAM은 종간 차이로 인해 동물 모델로는 재현할 수 없는 인체 내 독성 기전이나 작용 기전을 이해하는 데 도움이 될 수 있음.
- ③ 기존 방법의 결과를 확인 및/또는 보완하며, 예를 들어 전통적인 비임상 모델과 동등한 정보를 제공한다. <예시> 체외 NAM은 특정 동물 종이 왜 유용한 정보를 제공하지 못할 수 있는지를 설명해 줄 수 있음.

4. 결론-NAM 기반 독성시험 자료의 평가 및 우리나라 규제기관에서 예상 문제점

1) NAM은 인간중심이라는 것이 특별히 강조되었기 때문에 기존의 동물대체시험법과 다른 용어인 **인체 기반 시험법(방법)**으로 호칭하는 것이 타당함.

2) NAM 기반 독성시험은 GLP 시스템으로 따르지만 그 적합성은 제출 후 평가를 받음. 즉, 미국의 GLP 인증 제도는 FDA에 의해 사전에 GLP기관 지정을 받지 않고 어떤 기관에서도 GLP-기반 독성시험 보고서를 생산하여 제출할 수 있음. 제출 후 서면평가에서 문제가 있다고 생각되면 현장 점검이 이루어지는 사후 인증 제도임. 따라서 NAM 기반 독성시험 자료도 GLP 기관지정을 받지 않더라도 GLP 원리에 입각하여 수행되었다면 IND를 위해 제출이 가능함. 단, 서면 평가에 문제점이 있다면 FDA가 현장 방문을 할 수 있고 서면으로 보완 및 권고 조치가 이루어 질 수 있음.

3) NAM 기반 독성시험 자료의 평가에 있어 우리나라 규제기관에서 예상되는 문제점

① 우리나라는 미국과 같이 GLP-기반 **독성시험 보고서에 대한 사후 평가가 아니라 규제기관으로부터 시험별 사전인증을 받은 GLP기관으로부터 생산된 자료인가에 대해 초점**을 두는 제도임.

② 이와 같이 NAM을 이용한 독성시험 자료도 기존의 GLP기관 지정 제도로 한다면 오가노이드 또는 장기-온-칩은 단일 및 다 장기, 그리고 독성 biomarker별 방법, 또는 약물 모델링 등등에 따라 수 백에서 수 천 종류의 독성시험이 나올 수 있음. 따라서 **GLP 사전 인증된 기관에 의해서 생산된 NAM 기반 독성시험 보고서를 IND을 위해 제출 가능하다면 이는 감당할 수 없는 병목현상과 더불어 NAM 기반 독성시험 수행 방법의 개발과 발전에 상당한 차질을 빚을 것으로 예상됨.**

4) 따라서 NAM 기반 독성시험의 발전과 적합성 평가를 위해서는 미국과 같이 보고서의 서면평가 후 문제 시 대면점검 및 현장점검을 하는 사후 GLP인증 제도가 바람직함.

108. Oncolytic virus의 임상시험에서 안전성을 위한 독성시험에 대한 고찰

<고찰의 동기> 신라젠은 지난 3월 아래와 같이 현재까지 FDA에 의해 단 2개의 **oncolytic virus** 항암제만 승인된 oncolytic vaccinia virus를 개발하여 논문으로 발표하였음. 국내에서 최초이기 때문에 IND를 위한 비임상독성시험에 대한 경험이 없을 것으로 사료됨. 이에 논문 및 글로벌 가이드라인을 통해 수행되어야 할 독성시험과 용량설정 등의 수행 방법에 대해 고찰하였음.

<신라제의 발표논문: Eunhye Kim, Yeonsoo Yang, Solchan Won, Namhee Lee, Young-In Kim, Suk-Kyung Shin, Songyi Lee, Mi-Ju Park, Hang-Rae Kim, Keunhee Oh, Dong-Sup Lee, CD55-displaying oncolytic vaccinia virus treated metastatic cancers by evading the effect of host innate and adaptive humoral responses, Molecular Therapy, 2026, ISSN 1525-0016>

Part 1. Oncolytic virus에 대한 이해 및 항암기전

1. Oncolytic virus의 특성과 FDA 승인

- 의료 과정에서 환자 안전에 대한 우려가 끊임없이 제기됨에 따라, 가능한 한 안전한 치료법을 찾는 것이 최우선 과제임. 특히 심각한 부작용이 동반되기 쉬운 암 치료의 경우 더욱 그러함. 종양용해 바이러스(oncolytic virus)요법은 안전성과 효능 모두에서 유망한 신흥 암치료법임(Rasa 등, 2023).
- 2015년 미국 FDA에 의해 승인된 진행성 흑색종 치료를 위한 항암용해성 헤르페스 심플렉스 바이러스 1형(HSV-1) 탈리모젠 라헤르파레벡(T-VEC)은 최초의 FDA 승인 oncolytic virus가 됨. 그리고 종양용해성 HSV-1 테세르파투레프(G47Δ)가 2021년 일본에서 치료에 저항성 고등급 교모종 치료에 승인되었음. FDA에 의한 2번째로 2022년 두종양 유무와 관계없이 고위험 바실루스 칼메트-게랭(BCG) 반응성 없는 비근육침습성 방광암(NMIBC) 환자를 대상으로 나도파라겐 피라데노벡-VNCG(애스틸라드린, 페링 제약)를 승인되었음. 또한 <Table 1>에서처럼 따라서 일부 국가에서 승인이 되었지만 현재 2015년 이후 FDA에 의해 규제 승인을 받은 바이러스 약물은 단 두 가지뿐임(Yang 등, 2023; Appleton 등, 2025).

Table 1
Approved Oncolytic Viruses Worldwide.

Name	Vector	Genetic modifications	Tumor	Date&Location
Rigvir (ECHO-7)	Echovirus	Adaptation to melanoma has been achieved without genetic modification.	Melanoma	2004 in Latvian 2015 in Georgia 2016 in Australia
H101 T-VEC	Ad Hsv-1	Deleted for viral E1B-55k and with four deletions in viral E3 Deletion of viral genes ICP34.5 and ICP47, followed by the expression of the GM-CSF gene	Nasopharyngeal cancer Melanoma	2005 in China 2015 in USA 2015 in Europe 2016 in Australia 2018 in Israel 2021 in Japan
Teserpaturev(G47Δ) Nadofaragene & firadenovec	HSV-1 Ad	Deletion of the essential replication genes γ -34.5 and α 47, followed by inactivation of ICP6 through the insertion of the lacZ gene. Expression of IFN α and Syn3.	Malignant glioma BCG-unresponsive non-muscle invasive bladder cancer	2022 in USA

2. FDA 등록되어 진행 중인 Oncolytic virus에 대한 임상시험

- 비록 FDA에 의해 2건의 oncolytic virus가 지금까지 승인되었지만 현재 진행 중인 수많은 oncolytic virus의 임상시험을 고려하면 이 분야에 대한 관심이 점점 높아지고 있음을 보여줌. Table 2에서처럼 현재 다양한 oncolytic virus들이 다양한 단계의 임상시험을 진행 중에 있음(Xiao 등, 2026). 특히 임상시험이 진행 중인 oncolytic virus 항암제는 단일요법보다 병용요법으로 80% 정도로 진행되고 있음.

Table 2. 진행 중인 글로벌 임상시험의 FDA 리스트(Xiao 등, 2026)

바이러스 유형	OV 명칭	유전자 변형	행정	종양	복합 요법	현황	임상 시험
HSV	R130	안티-CD3 scFv/CD86/PD1/H SV2-US11 코딩	종양 내 또는 복강내	진행성 고형 종양	아님	초기 1 단계 모집	NCT05860374
				두경부암			NCT05961111
				재발/불응성 자궁경부 및 자궁 내막암			NCT05886075
				진행된 뼈 및 연부 조직 종양			NCT05830240
				재발/불응성 뼈 및 연부 조직 종양			NCT05812677
				재발/난소성 난소암			NCT06171282
				고형 종양 위장관암	이리노테칸(화학요법), HX008(항 PD-1)	1 / 2 단계 모집	NCT05866525
	OH2	ICP34.5 및 ICP47 유전자 결실 및 GM-CSF 삽입	종양 내 검사	중추신경계 종양	전혀 없습니다		NCT05235074
				고형 종양 흑색종	키트루다 (안티-PD-1)		NCT04386967
				진행성 방광암	아님	2 단계 모집	NCT05248789
				비근침습성 방광암		1 / 2 단계 모집	NCT05232136
				진행성 간암		1 단계 모집	NCT05698459
				흑색종	HX008 (안티-PD-1)	1 / 2 단계 모집	NCT04616443
					화학요법	3 단계 모집	NCT05868707

RP1	ICP34.5 및 ICP47 유전자 결실 및 퓨소제닉 단백질 삽입	종양 내 검사	피부 편평세포암	전혀 없습니다	1 / 2 단계 모집	NCT04349436
			삼중 음성 유방 신생물	아테졸리주맙 (항-PD-L1)	2상 활성 모집	NCT06067061
			피부 편평세포암	세미플리맙 (항 PD-1)	2상 활성 모집	NCT04050436
			흑색종	아님	초기 1 단계 모집	NCT06216938
			진행성 고형암, 흑색종, 비색색종 피부암	니볼루맙 (항 PD-1)	2 단계 모집	NCT03767348
R P 2 RP3	RP2: GM-CSF, GALV, 항CTLA-4 발현; RP3: GALV, 항 C T L A - 4 hCD40L, h4-1BBL의 발현	종양 내 검사	난치성 전이성 대장암, pMMR MSS	아테졸리주맙(항 PD-L1), 베바시주맙(항-VEGF)	2상 활성 모집	NCT05733611
RP3	ICP34.5 및 ICP47 결실, GM-CSF 및 CTLA-4 항체, CD40L 및 4-1BBL 삽입	종양 내 검사	진행성 고형 종양	니볼루맙 (항 PD-1)	1 단계 활동 모집	NCT04735978
T3011	PD-1 항체와 IL-12 통합	종양 내 검사	진행성 고형 종양, 유방암, 식도 신생물, HNSCC, 비흑색종 피부암, 비소색종, 육종	아님	1 / 2 단계 모집	NCT05205408 NCT05205421
BS-006	PD-L1을 표적으로 하는 이중특이적 항체(CD274)와 CD3의 발현	종양 내 검사	자궁경부 신생물	아님	1 단계 모집	NCT05393440
			고형 종양			NCT05938296
G207	ICP34.5 및 UL39 유전자의 결실	종양 내 검사	재발성 또는 불응성 소뇌 종양	아님	1 단계 활동 모집	NCT03911388
TBI-1401 (HF10)	비필수 유전자의 삭제	종양 내 검사	3기 또는 4기 절제 불가능한 췌장암	젬시타빈, 나브-파클리탁셀, TS-1 (화학요법)	1 단계 활동 모집	NCT03252808
C134	PKR 회피 유전자 IRS1의 삽입	종양 내 검사	재발성 교모세포종	전혀 없습니다	1 단계 모집	NCT03657576
rQNestin	γ34.5 및 ICP6 유전자의 결실	종양 내 검사	재발성 악성 교모종	사이클로포스파마이드	1 단계 모집	NCT03152318
M032	ICP34.5 유전자 결실, IL-12 유전자 삽입	종양 내 검사	재발/진행성 다형성 교모세포종, 변형성 성상세포종, 교세포종	아님	1 단계 활동 모집	NCT02062827
Ad	틸트-123	종양 내 검사	고형 종양	젬시타빈	1 단계 모집	NCT04695327
			흑색종, HNSCC	아벨루맙	1 단계 모집	NCT05222932

				전이성 흑색종	아님	1 단 계 활 동 모 집	NCT04217473
		종양 내 또는 정 맥 내		백금 내성 난화성 난소암	팜브롤리주맵	1 단 계 모 집	NCT05271318
H101	E1B-55kD 결실과 부분 E3 유전자	종양 내 검사		난치성/재발성 부인과 악성 종 양	방사선 치료	2상 활 성 모 집	NCT05051696
				악성 흉막 종피종	PD-L1 억제제	1 / 2 단 계 모 집	NCT06031636
				간내 담관암	FOLFOX HAIC (옥살리플라틴, 류코보린, 5-FU)	4 단 계 모 집	NCT05124002
Ad-TD- nsIL12	인간 비분비성 IL-12 유전자 삽 입	종양 내 검사		확산성 내재성 교교 교모종	전혀 없습니다	1 단 계 모 집	NCT05717712 NCT05717699
AdAPT- 001	"TGF-β 트랩을 장 착한 종양 분해성 아데노바이러스"	종양 내 검사		육종, 두경부암, TNBC	체크포인트 억제 기	2 단 계 모 집	NCT04673942
GM103	IL-12 및 shVEGF 유전자 삽입	종양 내 검사		국소적으로 진행된, 절제 불가 능, 불응성 및/또는 전이성 고형 종양	팜브롤리주맵	1 / 2 단 계 모 집	NCT06265025
CAdVE C	IL-12 및 PD-L1 차단 항체의 발현	종양 내 검사		진행된 HER2 양성 고형종양	전혀 없습니다	1 단 계 모 집	NCT03740256
ICVB-1 042	E1A 및 E4orf6/7 이중 개조	정맥 주 사		진행성 고형 종양	전혀 없습니다	1 단 계 모 집	NCT05904236
LOAd7 03	TMZ-CD40L 및 4-1BBL 인코딩	종양 내 검사		췌장암	젬시타빈, 나브- 파클리탁셀, 아 테졸리주맵	1 / 2 단 계 모 집	NCT02705196
MEM-2 88	인간 IFN-β 및 재 조합 형태의 CD40 - 리간드 (MEM40) 인코딩	종양 내 검사		고형 종양	니볼루맵	1 단 계 모 집	NCT05076760
VCN-0 1	히알루로니다제의 발현	종양 내 검사		전이성 췌장암	나브-파클리탁셀, 젬시타빈	2 단 계 모 집	NCT05673811
VV	GC001	TK 유전자 결실 및 STRIP1 shRNA 삽입	종양 내 검사	고형 종양	전혀 없습니다	1 단 계 모 집	NCT06508307
	ASP101 2	렙틴과 IL-2의 발 현	종양 내 검사	고형 종양	팜브롤리주맵	1 단 계 모 집	NCT06171178
	CF33-C D19	인간 CD19 단백 질의 발현	종양 내 또는 정 맥 내	고형 종양	블리나투모맵	1 단 계 모 집	NCT06063317
	올비-벡 (GL-ON)	HA, TK 및 F14.5L 유전자 선택 β-갈	복강내	PRROC, 난소암	백금-더블렛 화 학요법(카보플라	3 단 계 모 집	NCT05281471

	C1)	락 토 시 다 제 , RLuc-GFP 및 β - 글루쿠로니다아제 삽입			틴, 시스플라틴) 과 베바시주맵 (항 VEGF)		
	TG6050	인간 IL-12 및 항 -CTLA4 항체 인 사 코딩	정맥 주 사	비소세포암	전혀 없습니다	1 단 계 모 집	NCT05788926
	RGV004	CD19와 CD3를 표적으로 하는 이 중특이성 항체를 암호화하는 방법	종양 내 검사	재발 또는 불응성 B세포 림프종	전혀 없습니다	1 단 계 모 집	NCT04887025
	BT-001	인간 재조합 항 -CTLA-4 Ab 및 GM-CSF의 발현	종양 내 검사	STS, MCC, 흑색종, TNBC, NSCLC	팜 브 롤 리 주 맵, [KEYTRUDA®]	1 / 2 단 계 모 집	NCT04725331
	hV01	TK 및 VGF 유전 자 결실 및 IL-21 유전자 삽입	종양 내 검사	진행성 고형 종양	전혀 없습니다	초기 1 단 계 모 집	NCT05914376
	팩사-백	GM-CSF의 발현	종양 내 또는 정 맥 내	신세포암	세밀폴리맵	1 / 2 단 계 활 성 채 용	NCT03294083
MV	MV-s - NAP	헬리코박터 파일 로리 호중구 활성 화 단백질 암호화	종양 내 검사	유방암	전혀 없습니다	1 단 계 모 집	NCT04521764
	MV-NI S	갑상선 요오화나 트륨 심포터 인코 딩	종양 내 검사	MPNST 및 신경섬유종증 1형	백금 화학요법; ICI	1 단 계 모 집	NCT02700230
			복강내	백금 내성 또는 불응성 난소암, 난관암, 또는 복막암	화학요법, 베바 시주맵	2상 활 성 모 집	NCT02364713
				재발성 난소암, 원발성 복막암 또는 난관암	전혀 없습니다	1 / 2 단 계 활 성 채 용	NCT02068794
VSV	VSV-IF N β -NIS	IFN β 와 NIS의 발 현	정맥 주 사	고형 종양, 비상간종증, 신경내 분비암	팜 브 롤 리 주 맵, 이필리루맵 + 니 볼루맵	1 / 2 단 계 모 집	NCT03647163
			정맥 주 사	재발/불응성 다발성 다발성 골 수종, 급성 골수성 백혈병, T 및 B 세포 림프종, 또는 조직구/수 지상 세포 신생물	사이클로포스파 마이드, 세미플 리맵	1 단 계 모 집	NCT03017820
			종양 내 검사	4기 또는 재발성 자궁내막암	럭솔리티닙, 인 산; 래더피	1 단 계 활 동 모 집	NCT03120624
Ortho pox virus	CF33-h NIS	인간 아이오다이 드 나트륨 심포터 의 발현	종양 내 또는 정 맥 내	고형 종양, 담관암, 담관암	팜브롤리주맵	1 단 계 모 집	NCT05346484
	CF33-h NIS-항	인간 아이오다이 드 나트륨 심포터 와 항-PD-L1 scFv	종양 내 검사	전이성 TNBC	전혀 없습니다	1 단 계 활 동	NCT05081492

	PDL1	의 발현				모집	
Mara b a virus	MG1M A3	MAGEA3 종양 관 련 항원의 형질전 환 발현과 M 및 G 단백질에서의 돌연변이	정맥 주 사	진행성 또는 전이성 고형종양	MAGEA3 발현 아데노바이러스 백신	1 단 계 활 동 모 집	NCT02 285816
Reovi rus	펠 라 레 오렘	전혀 없습니다	정맥 주 사	TNBC	레티판리맵	2 단 계 모 집	NCT04 445844
			종양 내 검사	전이성 유방암	파클리탁셀, 아 벨루맵 (항PD-1)	2상 활 성 모 집	NCT04 215146

<HSV herpes simplex virus, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, PD-1 programmed cell death protein 1, PD-L1 programmed death-ligand 1, NSCLC non-small cell lung cancer, HNSCC headand neck squamous cell carcinoma, VEGF vascular endothelial growth factor, CTLA-4 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, TNBC triple negative breast cancer, STS soft tissue sarcoma, MCC merkel cellcarcinoma, HER2 human epidermal growth factor receptor 2, HAIC hepatic arterial infusion chemotherapy, CAR-T chimeric antigen receptor T-Cell, PRROC platinum resistant or refractory ovarian cancer, hNIShuman sodium iodide symporter, TCR T-cell receptor, IRS1 insulin receptor substrate 1, STRIP1 striatin-interacting protein 1The type of tumor and the progress of clinical trials with the relative code are indicated as reported on <https://clinicaltrials.gov/>, accessed on 17 September 2024>

3. 주요 종양용해성 바이러스 유형

- Oncolytic virus는 유전적 구성과 구조적 특성에 따라 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA 바이러스로 분류됨.
- DNA 바이러스는 일반적으로 더 큰 유전체를 가지고 있어 광범위한 유전자 변형을 통해 치료 효과를 최적화하고 면역 반응을 조절하면서 바이러스 복제 능력을 유지할 수 있음.
- 반면에 RNA 바이러스는 게놈이 상대적으로 작지만 빠른 복제와 혈액-뇌 장벽을 통과하는 능력을 보여 중추신경계 악성 종양을 표적으로 하는 데 특히 효과적임(Vazquez 등, 2022).
- 그러나 RNA 바이러스의 제한된 게놈 크기는 큰 형질전환 유전자를 수용하는 능력을 제한함. 더불어, DNA 바이러스와 비교할 때 RNA 바이러스는 유전적 불안정성이 증가하고 돌연변이율이 높은 것이 특징임(Barr 등, 2021). 입니다. <Table 3>은 임상 환경에서 흔히 사용되는 주요 oncolytic virus임

<Table 3> 주요 종양용해성 바이러스 유형

바이러스 종	게놈	게놈 크기	진입 방법	복제 부위	장점	예시
Herpesvirus	dsDNA	150 kb	H V E M , 넥틴-1, 넥틴-2	핵	대형 유전체를 통해 큰 조각과 다수의 형질전환 유전자를 삽입하는 것; 약물 차단	T-VEC, G47 Δ
Adenovirus	dsDNA	26-45 KB	C A R , C D 4 6 , VCAM-1	핵	고바이러스 역가 제조의 타당성; 게놈 조각의 용이성; 본질적으로 강력한 용해성 활성화	H101, 오닉스-015
Vaccinia virus	dsDNA	~190 kb	수용체 매개 엔도사이토시스	세포질	빠르고 효율적인 확산 바이러스; 고속 생애주기; 최대 40kd의 유전자 조각 삽입; 천연두로 인한 충분한 지식	펙사-벡, GL-ONC1
Reovirus	dsRNA	~23.5 kb	시알산, JAM1	세포질	정맥 주사에 대한 우수한 적응력; 다양한 암세포에 대한 자연스러운 선택성; 용량 제한 독성 없음	레올리신®
Coxsackievirus	ss(+)RNA	~15 kb	카, 이캄-1, DAF	세포질	인간에게는 병원성이 없음; 숙주 게놈에 통합되지 않음; 종양 특이적 림프구와 대식세포의 직접 활성화	CVA21
Poliovirus	ss(+)RNA	7.5 kb	CD155	세포질	BBB를 교차할 수 있음; 정상 세포를 감염하지 않음; 인간에서는 비병원성 종양 특이적	프스리포
Newcastle disease virus	ss(-)RNA	15 kb	시알산	핵	자연스럽게 종양 세포를 표적으로 삼으며; 면역원성이 낮음; 높은 안전성; 강한 항종양 면역 반응을 유도합니다	rndv-IL2-트레일
Measles virus	ss(-)RNA	16 KB	광, CD46	핵	면역원성이 낮음; 신체 내 높은 면역 탈출 능력; 자연스럽게 종양 세포를 표적으로 삼으며; 강한 면역 반응	MV-NIS
Vesicular stomatitis virus	ss(-)RNA	11 KB	LDLR	세포질	잘 이해했습니다; 비교적 경미한 질환과 관련이 있습니다; 바이러스 생산을 위해 고역가로 생산할 수 있습니다.	VSV-IFN β -NIS

dsDNA double-stranded DNA, dsRNA double-stranded RNA, ssRNA single-stranded RNA, VCAM-1 vascular cell adhesion molecule-1, HVEM herpesvirus entry mediator, CAR coxsackie adenovirus receptor, JAM-A junctional adhesion molecule A, ICAM1 intercellular adhesion molecule 1, DAF decay-accelerating factor, SLAMF signaling lymphocyte activation molecule, LDLR low-density lipoprotein receptor, nAbs neutralizing antibodies

4. 주요 종양용해성 바이러스의 항암기전

- Oncolytic virus에 의한 항암기전은 직접적인 종양 용해 활성 기전(Direct oncolytic activity)과 항종양 면역의 활성화 기전(Activation of antitumor immunity)으로 크게 분류되며 그 외에도 종양 혈관 파괴와 병용요법 등으로 기전으로 설명됨.

1) 직접적인 종양 용해 활성 기전(Direct oncolytic activity)

- Table 4는 Oncolytic virus에 의한 직접적인 종양 용해 활성 기전임(Xiao 등, 2026).

<Table 4> 종양 용해 바이러스가 표적으로 하는 중요한 경로와 그 기능적 기전

특정 OV 종양 제거 경로	기능적 메커니즘
p53 경로	많은 암이 p53 종양 억제 경로를 p53의 돌연변이나 상류/하류 조절인자의 손실로 비활성화시킴. 아데노바이러스, 레오바이러스, 파보바이러스와 같은 OV(Oncolytic virus)는 p53-null 또는 돌연변이 세포를 우선적으로 표적으로 삼음. OV는 p53 경로를 분해하거나 세포자멸사 신호를 회피하여 p53 결핍 종양 세포에서 복제함으로써 이를 이용함.
Wnt 신호 경로	Wnt 경로 활성화는 특히 위장관 종양 같은 암에서 흔히 볼 수 있음. CRAds와 같은 OV는 Wnt 신호 결함을 이용해 Wnt 신호가 결함 있는 종양 세포에서 선택적으로 복제함. 종양용해성 HSV bM24-TE는 APC 돌연변이가 있는 대장암에서 바이러스 복제를 활성화하는 합성 프로모터를 사용함.
IFN 신호 경로	OV는 종양 세포에서 흔히 발견되는 인터페론(IFN) 경로의 결함을 이용함. 정상 세포는 IFN을 이용해 항바이러스 반응을 유도하지만, 많은 종양은 IFN 신호를 하향 조절하여 바이러스 복제에 더 관여하게 만듦. VSV, NDV, 레오바이러스와 같은 OV는 이러한 결함을 선택적으로 표적으로 하여 종양 용해 활성을 높임.
항세포자멸 경로	많은 암세포는 Bcl-xL과 같은 항세포자멸사 단백질의 과발현을 통해 세포자멸사를 회피함. 아데노바이러스, HSV, 백시니아 바이러스 등 OV는 정상 세포에서 세포자멸사를 회피하는 메커니즘을 진화시켜 왔으며, 이 경로를 이용해 항세포자멸사 단백질을 과발현하는 종양 세포를 복제하고 죽임.
pRb 경로	망막모세포종(pRb) 경로는 암에서 자주 조절 장애를 겪어 세포가 아데노바이러스나 HSV와 같은 종양용해성 바이러스에 더 취약하게 만듦. 이 OV들은 변형된 바이러스 단백질(예: E1A)을 이용해 pRb 결핍 종양 세포에서 선택적으로 복제함으로써 pRb 경로 결함을 이용하여 종양 세포 용해를 일으킴.
PI3K/Akt/mTOR 경로	NDV와 같은 OV는 PI3K/Akt/mTOR 경로를 표적으로 하여 자가포식을 유도하고 시스플라틴과 파클리탁셀 같은 1차 치료제에 대한 내성을 극복할 수 있음. 이 경로는 저산소 유발 인자(HIF)를 조절하고 바이러스 복제 및 종양 세포 사멸을 촉진하는 데 중요함.

2) 항종양 면역의 활성화 기전(Activation of antitumor immunity)

- 항종양 면역의 활성화 기전으로 하는 대표적인 oncolytic virus는 최근 'Molecular Therapy' 저널에 발표된 신라젠의 항암 플랫폼 'SJ-650'을 예시로 들 수 있음(Kim 등, 2026).

항목	기능
응용된 virus	<ul style="list-style-type: none"> ● Vaccinia virus: 천연두를 근절한 최초의 널리 사용된 백신으로 가장 잘 알려져 있음. 숙주 세포의 세포질에서 복제되는 이중 가닥(ds) DNA 바이러스입니다. 광범위한 세포 감염 능력, 종양 세포에 대한 강한 친형성, 그리고 큰 외래 DNA 서열을 운반할 수 있는 능력이 oncolytic virus로서 주목을 받음
유전자 구성	<ol style="list-style-type: none"> ① Human CD55 extracellular domain fused to transmembrane domain of Vaccinia H3 protein: CD55은 분해 촉진 인자(decay accelerating factor) 또는 보체조절인자로 보체 매개 공격 및 중화항체(NAbs)를 회피를 통해 바이러스를 보호함. 이와 같은 회피 바이러스가 암세포 부위로의 이동을 용이하게 함. ② Human GM-CSF를 발현하도록 유전자 삽입: 과립구-대식세포 콜로니 자극인자인 GM-CSF는 수지상세포(DC)을 자극하여 hepler-T cell과 cytotoxic T cell- 증식 촉진
항암 기전 및 결과	<ul style="list-style-type: none"> ● 보체 및 항체 반응을 모두 회피함으로써, SJ-650은 두 가지 전이 모델에서 종양 성장을 현저히 억제했으며, 면역원성 세포 사멸을 유도하고 종양 미세환경을 재구성하였음. 이러한 결과는 SJ-650이 광범위한 임상 적용 가능성을 지닌 강력한 종양용해 플랫폼으로서의 잠재력을 뒷받침할 것으로 예상

Part 2. Oncolytic virus에 대한 비임상 안전성에 대한 고찰

1. 미국 및 한국의 유전자 치료제 비임상 안전성 주제 비교 및 글로벌 기준 결론

- 분자 및 분석 기술이 빠르게 발전함에 따라 모든 시나리오를 포괄적이고 상세한 규제 지침 접근법으로 다루기는 적합하지 않을 가능성이 크기 때문에 비임상 안전성에 대한 유연성(Flexibility)이 부과되고 있음.
- <표>에서처럼 미국 및 글로벌 기준과 비교하여 우리나라의 규제기관에서는 유전자 치료제의 비임상 안전성에서 더 많은 시험 및 자료를 요구하고 있다는 것을 확인 할 수 있음.

<표> 글로벌 유전자 치료제 및 한국의 비임상 안전성 가이드라인 비교분석

	가이드라인 제목	모달리션				주요 비임상 안전 주제								
		셀 에 디트	진 에 디트	비바 이러스성	바 이 러	동 물 모 델	생 식 발 달 시 험	생 식 계 이 식	ADA (항 원 시 험)	BioD	유 전 체 통 합	유 전 체 편 집	C M C 안 전	환 위 / 경 험 모
M EMA/ICH, 2009	종양용해바이러스에 대한 ICH 고려사항	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	네	해 당 없음	네	네	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네
N, FDA, 2019	치료용 단백질 제품의 면역원성 검사—항제항체 검출을 위한 분석 개발 및 검증	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음
O, FDA, 2006	유전자 치료 임상시험—지연된 부작용 관찰	해 당 없음	네	해 당 없음	네	네	해 당 없음	네	해 당 없음	네	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음
F D A, 2018년	인간 유전자 치료 제품 투여 후 장기 추적 관찰	해 당 없음	네	네	네	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	네	네	해 당 없음	해 당 없음
T, FDA, 2020	희귀질환에 대한 인간 유전자 치료	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	네	네	해 당 없음	네	네	해 당 없음	해 당 없음	네	네
미 국 F D A, 2018	제품 제조 및 환자 추적 관찰 중 복제 능력이 있는 레트로 바이러스를 위한 레트로바이러스 기반 인간 유전자 치료 제품의 시험	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	해 당 없음
5, FDA, 2021	희귀 의약 규정 하에서 유전자 치료 제품의 동일성 해석	네	해 당 없음	해 당 없음	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	해 당 없음
X, FDA, 2013	임상 시험용 세포 및 유전자 치료 제품의 평가	네	네	네	네	네	네	네	해 당 없음	네	네	네	네	네
Y, FDA, 2015	바이러스 또는 박테리아 기반 유전자 치료 및 종양 용해 제품의 탈락 연구 설계	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네

	및 분석													
Z, FDA, 2015	세포 및 유전자 치료 제품의 초기 임상 시험 설계에 대한 고려 사항	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	네	네	해 당 없음	네	네	네	해 당 없음	네	네
A A , F D A , 2015	유전자 치료제, 벡터 백신 및 관련 재조합 바이러스 또는 미생물 제품에 대한 환경 평가의 필요성과 내용 결정	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	해 당 없음	네	네
AG, 한 국 , 2017	가이드-0819-01: 유전자 치료제의 비임상 연구 평가 지침	네	네	네	네	네	네	네	네	네	네	네	해 당 없음	네

2. Oncolytic virus의 안전성 예측을 위해 독성시험에서 고려할 사항

1) 유전자 치료제 vs 종양용해 바이러스 치료제의 차이점

- 유전자 치료 제품과 종양용해 바이러스의 주요 차이점 중 하나는, 유전자 치료에 사용되는 바이러스는 외래 유전자를 전달하는 매개체에 불과한 반면, 종양용해 바이러스는 그 자체로 치료 효과가 있다는 점이다(Breitbach et al., 2016).

2) Oncolytic virus의 삽입성 돌연변이 유발 가능성

- 바이러스와 관련하여, 삽입성 돌연변이 유발, 즉 외래 DNA 서열이 숙주 유기체의 게놈에 통합되는 것에 대한 이론적 우려가 있다(EMA, 2013). 이는 무해할 수도 있지만, 숙주 세포의 형질전환을 유발하거나 심지어 발암을 일으킬 수도 있다. 삽입성 돌연변이 유발의 위험성은 바이러스의 특성에 따라 달라진다. 예를 들어, DNA 단계를 갖지 않는 RNA 바이러스나 세포질에서 복제되는 바이러스는 이러한 측면에서 어떠한 위험도 초래하지 않는다.
- 신라젠의 SJ-650는 Vaccinia virus는 DNA 바이러스이지만 숙주의 세포질에서 복제가 이루어지기 때문에 숙주의 DNA 삽입성 돌연변이 유발 가능성이 없다. 따라서 유전독성시험은 권장되지 않는다.

3) Oncolytic virus의 반복투여독성시험을 위한 동물 선택

- 인간 대상 연구에 앞서, 바이러스의 선택성, 세포독성, 생체 분포 및 복제 능력은 체외 세포주, 동물 이종 이식 모델 및 면역 기능이 정상인 동물에서 시험될 수 있다(Silva Lima & Videira, 2018; Yamaguchi & Uchida, 2018).
- 동물의 선택에 있어서 신라젠의 경우에 GM-CSF 수용체가 존재하는 동물을 선택하거나 human GM-CSF 수용체를 발현하는 humanized model의 필요성이 있다.

4) Oncolytic virus의 전임상 독성학 연구

- 국소 투여의 경우, 바이러스는 주로 투여 부위 인근 장기에 집중된다. 또한 종양용해성 바이러스들은 전임상 독성학 연구에서 낮은 독성과 높은 내약성을 보인 것으로 나타났다(Rasa 등, 2022).

3. Oncolytic virus의 비임상시험 평가 가이드라인<민원 안내서, 2017>에 따른 독성시험

- 유전자치료제 비임상시험 평가 가이드라인<민원 안내서, 2017>에 따르면 비임상 안전성 및 약리에서 다음과 같은 사항에 대한 자료를 제출 요구하고 있음.

- 독성시험 이전에 SJ-650의 독성 정도를 먼저 확인하기 위해 EMT6 유방암 세포를 이용하여 TCID₅₀(50% Tissue Culture Infectious Dose)를 먼저 구함. 이후 이를 이용하여 반복정맥투여독성시험에서 용량을 설정함.

<표> 비임상시험 평가 가이드라인<민원 안내서, 2017>에 따른 비임상 안전성 연구에 대한 컨설팅

시험항목	특성 및 의견
단회투여 독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ● 신라젠에서 세포를 EMT6 유방암 세포를 이용하여 세포에 50%를 감염하는 TCID₅₀(50% Tissue Culture Infectious Dose)를 산출 후 반복독성시험에서 용량 결정. 이를 이용하면 단회투여독성시험 생략됨.
반복정맥투여 독성시험	<ul style="list-style-type: none"> ● 용량 및 용량군: TCID₅₀를 이용하여 독성시험 용량군 결정 ● 투여기간 및 횟수: 주 1회, 4회 투여 및 4주 회복기간(임상에서 1차 치료 충분할 것으로 예상되며 2차 치료는 biodistribution 자료를 고려하여 일정기간 후 동일한 방법으로 투여 가능할 것으로 예상됨) ● 동물종: 시험물질이 인체 GM-CSF 유전자를 가진 VACV이므로 이대 수용체 존재로 감수성을 가진 Rabbit을 선택(추후 가장 민감한 Rabbit 확인 필요성) ● 군구성: 정상대조군, Wild type VACV, SJ-650 3 용량군 ● 잠재적 독성표적기관의 확인 필요성
생체분포 (biodistribution) 시험	<ul style="list-style-type: none"> ● GM-CSF에 대한 감수성을 가진 토끼를 이용하여 표적 장기 여부에 상관없이 모든 장기(예: 채취하는 조직 샘플에는 일반적으로 혈액)액, 난소/고환, 자궁/부고환, 신장, 간, 폐, 심장, 뇌, 비장, 국소 림프절 (장간막 및 서혜부, 투여 부위 및 반대측, 신경계인 척수, 좌골신경, 시신경) 등에서 평가. 지속성, 이동성(mobilization) 등 평가 ● 도입유전자 발현 및 활성의 지속성을 평가하기에 충분해야 하고, 벡터/유전자의 분포와 지속성에 대한 동력학의 특징을 알아보기 위해 최대 검출 예상시험과 소실 또는 지속여부를 판단할 수 있도록 설계 ● 비표적 장기에서 독성을 보이는 경우 또는 벡터/유전자 설계에 대한 평가/개념입증이 필요한 경우, 도입유전자의 산물 또한 분석 필요성. 그러나 신라젠의 SJ-650에 대한 논문에서 제시하였기 때문에 생략 가능함. ● 투여용량: 안전용량 또는 MFD(maximum feasible dose, 투여가능 최대용량) ● 검출한계용량 설정 필요성 ● 바이러스 배출(Shedding): 재조합 바이러스이기때문에 필요성이 있지만 재고의 필요성(검체는 바이러스 벡터의 특성, 투여경로, 사용되는 동물종을 고려하여 결정하는데 일반적으로 소변 및 대변을 포함하며, 타액, 구강 표본, 비강 표본, 기관지 표본 등을 고려)
유전독성시험	<ul style="list-style-type: none"> ● 바이러스와 관련하여, 삽입성 돌연변이 유발, 즉 외래 DNA 서열이 숙주 유기체의 게놈에 통합되는 것에 대한 이론적 우려가 있다(EMA, 2013). 이는 무해할 수도 있지만, 숙주 세포의 형질전환을 유발하거나 심지어 발암을 일으킬 수도 있다. 삽입성 돌연변이 유발의 위험성은 바이러스의 특성에 따라 달라진다. 예를 들어, DNA 단계를 갖지 않는 RNA 바이러스나

	세포질에서 복제되는 바이러스는 이러한 측면에서 어떠한 위험도 초래하지 않는다. 따라서 신라젠의 oncolytic virus는 DNA 바이러스지만 세포질에서 복제가 이루어지기 때문에 유전독성시험의 필요성이 없음
종양원성시험	<ul style="list-style-type: none"> ● Oncolytic virus는 세포사멸을 유도하지만 암세포 및 정상세포의 형질전환에 기여하지 않음. 따라서 신라젠의 SJ-650에 대한 종양원성시험이 필요하지 않음
면역독성(면역원성)시험	<ul style="list-style-type: none"> ● 성장인자, 사이토카인 또는 면역체계에 영향을 미치는 것으로 알려진 단백질을 발현하는 유전자 치료제의 경우, 체액성 또는 세포성 면역을 포함하는 면역독성(면역원성) 평가를 고려 ● SJ-650 자체가 TME(tumor microenvironment에서 helper T-cell 및 cytotoxic T-cell을 유도하는 항암의 항종양 면역의 활성화 기전(Activation of antitumor immunity)임. 따라서 신라젠의 SJ-650에 대한 면역원성 시험은 필요하지 않음
생식발생독성시험	<ul style="list-style-type: none"> ● 생식세포로 분포되거나, 삼입 혹은 발현될 가능성에 확인하기 위해 우선적으로 biodistribution을 통해 조사되어야 함. 암수 동물의 생식기관에서 유전자치료제의 존재 및 지속성 평가는 분포시험 결과로부터 얻을 수 있음. ● 위험 기반 접근법: 위험 기반 접근법이 개발 계획을 지원하기 위해 사용될 때, 이는 신약 및 관련 위험에 대한 축적된 데이터나 지식을 바탕으로 일부 연구(예: 생식 독성, 발암성, 종양 발생성 등)를 생략하는 데 정당화가 가능함.

<참고문헌>

EMA. (2013). European Medicines Agency. Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis. EMA/CAT/190186/2012.

Eunhye Kim, Yeonsoo Yang, Solchan Won, Namhee Lee, Young-In Kim, Suk-Kyung Shin, Songyi Lee, Mi-Ju Park, Hang-Rae Kim, Keunhee Oh, Dong-Sup Lee, CD55-displaying oncolytic vaccinia virus treated metastatic cancers by evading the effect of host innate and adaptive humoral responses, Molecular Therapy, 2026, ISSN 1525-0016,

Breitbach, C. J., Lichty, B. D., & Bell, J. C. (2016). Oncolytic viruses: Therapeutics with an identity crisis. eBioMedicine, 9,31–36.

Vazquez, C. & Jurado, K. A. Neurotropic RNA Virus Modulation of Immune Responses within the Central Nervous System. Int. J. Mol. Sci. 23, 4018 (2022).

Barr, J. N. & Fearn, R. in Genome stability: From virus to human application (eds. Kovalchuk & O. Kovalchuk) 21-35 (Academic Press, 2021).

Yang Li, Hao-yu Duan, Kai-di Yang, Jun-feng Ye, Advancements and challenges in oncolytic virus therapy for gastrointestinal tumors, Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 168, 2023, 115627, ISSN 0753-3322.

Elizabeth Appleton, E Antonio Chiocca, Guy Ungerechts, Alan Melcher, Richard Vile, Oncolytic viruses as anticancer agents: clinical progress and remaining challenges, The Lancet, Volume 406, Issue 10509, 2025, Pages 1295-1312, ISSN 0140-6736,

Xiao D, Zhang H, Liu Y, Li Y, Li G, Ning Y. Oncolytic viruses: advanced strategies in cancer therapy. Signal Transduct Target Ther. 2026 Feb 5;11(1):45.

Rasa A, Alberts P. Oncolytic virus preclinical toxicology studies. J Appl Toxicol. 2023 May;43(5):620-648.

109. 세포치료제의 임상시험에서 최초 용량선택과 고려사항

Part 1. 고찰의 필요성

- 과학과 기술의 발전으로 다양한 기전과 작용기전(MOA, mode of action)을 가진 세포치료제 및 유전자치료제가 개발되어 왔음. 그러나 이와 같은 다양한 기전을 가진 세포치료제 및 유전자치료제를 획일적인 표준화 방법으로 적용하는 것에 대한 문제가 제기되었고, 특히 비임상 효능 및 안전성 데이터를 인간에게 외삽이 종종 신뢰할 수 없는 경우가 발생하고 있음(Golpanian 등, 2016; Naota 등, 2025).
- 그러나 현재 규제 지침은 임상시험에서 용량 설정에 대한 상세한 고려사항을 제공하지 않고 있음(Ministry of Health, 2019; US FDA, 2013; EMA, 2019).
- 따라서 다양한 기전과 작용기전(MOA) 등의 고유한 특성을 고려하여 세포치료제의 최초 인체 투여(FIH, First-in-human) 용량 및 최대용량을 결정하기 위한 구체적인 고려사항을 확인할 필요성. 특히 일반 독성 연구와 용량 선택에 영향을 미치는 주요 요인에 중점을 둔 설정을 제시할 필요성 있음.

Part 2. 줄기세포 투여에 의한 심근경색에 대한 예시

1. Preclinical study에서의 줄기세포 투여에 의한 심근경색에 대한 예시

1-1) 정맥 내 투여 vs 심근경색 경계 부위

- <Table 1>은 줄기세포 치료 용량에 관한 전임상 연구 요약을 한 것으로 세포 치료의 용량 범위를 다룬 전임상 연구들은 역설적인 결과를 낳았음.
- Halkos 등(2008)은 75분간 좌전하행 관상동맥 폐색(left anterior descending coronary artery occlusion) 후 동종 중간엽 줄기세포(MSC, mesenchymal stem cells)를 **3가지 용량 (100만, 300만, 1,000만 개의 세포)**으로 **정맥 내 투여**한 돼지에 대한 수행함. **고용량군 (300만 및 1,000만 세포)**이 대조군에 비해 좌심실 수축 기능(left ventricular systolic function)과 예압에 의해 동원 가능한 박출량(preload-recrutable stroke work)이 유의하게 개선되었음을 확인됨.
- 반면, Hamamoto 등(2009)은 실험적 급성 심근경색(AMI, acute myocardial infarction) 발생 1시간 후, **심근경색 경계 부위에 4가지 다른 용량(2,500만, 7,500만, 2억 2,500만 또는 4억 5,000만 세포**의 동종 STRO-3 양성 중간엽 전구세포) 대 세포 배양액을 심근 내로 투여하여 양을 대상으로 용량 증량 연구를 수행하였음. 대조군과 비교했을 때, **낮은 용량 (2,500만 및 7,500만 개)**의 세포 투여만이 심근경색의 확대와 리모델링을 유의하게 완화시켰으며, 모든 세포 용량에서 좌심실 이완기 말기 용적(LVEDV, left ventricular

end-diastolic volume)과 좌심실 수축기 말기 용적(LVESV, left ventricular ejection fraction)을 감소시키고 좌심실 박출률(LVEF)을 개선시켰음.

- Halkos 등(2008)와 Hamamoto 등(2009)의 연구에서 유효 용량이 겹치지 않았을 뿐만 아니라 전자는 고용량군 후자는 저용량군에서 유효성이 확인됨. 또한 투여 경로(정맥 내 대 심근 내)가 달랐다는 점도 중요하며, 이것이 세포 용량의 효과에 영향을 미쳤을 것이라고 추측하는 것은 타당할 것으로 사료됨.

1-2) 흉부 투여 vs 심내막 투여

- Schuleri 등(2009)은 개흉(open chest) 돼지를 대상으로 직접 주사를 통해 세포를 투여한 연구 수행. 급성 심근경색(AMI, acute myocardial infarction) 후 "저용량"(2천만 개 세포) 자가 유래 MSC와 비교하여 "고용량" (2억 개) 자가 유래 MSC 투여 시 심근경색 후 돼지 모델에서 "저용량"(2천만 개) 자가 유래 MSC 투여군에 비해 심근경색 크기가 유의하게 감소하였음.
- 대조적으로, Hashemi 등(2008)은 심내막 내 투여법을 사용하여 저용량 MSC 군(2,400만 및 2,400만 개 세포)에서 심근경색 크기가 유의하게 감소한 반면, 4,400만 개의 MSC를 투여한 고용량 군에서는 그러한 효과가 나타나지 않았음. 즉, 저용량군에서는 효과가 있었지만, 고용량군에서는 효과가 없었음.

1-3) 결론

- 언급한 전임상 연구들은 연구 설계, 투여 경로(ROA , routes of administration), 그리고 세포 용량과 관련된 결과 면에서 차이가 있었음. 각 연구에서 사용된 총 세포 수의 범위는 상당히 달랐으며, "저용량"과 "고용량"의 정의도 일관되지 않았음. 특히 중요한 점은, 세포 농도와 총 주입량의 효과 역시 사용된 다양한 투여 경로와 관련이 있으므로 아직 명확히 규명되지 않았다는 것임. 따라서 심근경색 크기를 줄이고 심장 구조 및 기능을 개선하는 데 있어 "저용량"과 "고용량" 중 어느 것이 가장 효과적인지는 여전히 알려지지 않았음.

Table 1. Summary of preclinical studies on stem cell therapy dosing

Preclinical study and number of cells	Cell type	Delivery mode	Cell-dose relationship	Cardiac function parameter						
				Scar size	EDV	ESV	EF	ESPVR	PRSW	Peak ECC
Hamamoto et al. [2]	Allogeneic MPCs (STRO-3 ⁺)	Direct epicardial	Inverse							
25 million				↓	↓	↓	↑			
75 million				↓	↓	↓	↑			
225 million				—	—	—	↑			
450 million				—	—	—	↑			
Halkos et al. [1]	Allogeneic MSCs	Intravenous	Direct							
1 million								—	—	
3 million								↑	↑	
10 million								↑	↑	
Hashemi et al. [4]	Allogeneic MSCs	Catheter-based TESI	Inverse							
24 million				↓						
240 million				↓						
440 million				—						
Schuleri et al. [3]	Autologous MSCs	Direct epicardial	Direct							
20 million				—						↑
200 million				↓						↑ ^a

^aRegional contractility of infarct zone, specifically, improved only in the higher dose group.

Abbreviations: —, no dose-response effect was observed; ECC, Eulerian circumferential strain; EDV, end-diastolic volume; EF, ejection fraction; ESPVR, end-systolic pressure-volume relationship; ESV, end-systolic volume; MPCs, mesenchymal precursor cells; MSCs, mesenchymal stem cells; PRSW, preload recruitable stroke work; TESI, transcatheter stem cell injection.

2. Clinical study에서의 줄기세포 투여에 의한 심근경색에 대한 예시

2-1) 관상동맥 내 vs 심내막

- <Table 2>에서처럼 임상시험 3건에서 세포 용량과 임상적 이점 간의 관계를 평가가 이루어짐.
- Quyyumi 등(2011)은 ST분절 상승 심근경색증 환자에게 자가 골수 유래 CD34+ 세포를 투여하는 연구를 수행. 세포는 스텐트 삽입 8일 후 관상동맥 내 경로를 통해 심근경색 관련 동맥으로 주입되었으며, **세 가지 다른 세포 용량(500만, 1,000만, 1,500만)**이 연구되었음. 1,000만 개의 CD34+ 세포를 투여받은 환자들은 단일광자방출단층촬영(SPECT)으로 측정했을 때 **관류에서 유의미한 개선을** 보였으며, 500만 개의 CD34+ 세포를 투여받은 환자들에서도 대조군에 비해 좌심실 박출률(LVEF)이 개선되는 경향을 보였음.
- 반면, Losordo 등(2011)은 1상~2a상, 이중 맹검, 위약 대조, 무작위 임상 시험에서 세 가지 용량군(**체중 1kg당 5×10^4 , 1×10^5 또는 5×10^5 의 자가 CD34+ 세포**) 중 하나를 투여받은 24명의 환자를 평가했으나, **용량-반응 관계는 관찰되지 않았음**. 그러나 동일한 연구팀이 수행한 더 대규모 임상시험(Losordo 등, 2011)에서는 167명의 환자를 두 가지 용량(체중 1kg당 1×10^5 또는 5×10^5 의 자가 CD34+ 세포, 또는 동등한 용량의 위약) 중 하나로 무작위 배정했으며, **저용량군에서 협심증 빈도와 운동 내성이 유의하게 개선**되었음.
- Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects On Neomyogenesis (POSEIDON) 임상시험(Hare 등, 12)은 **세포의 출처(동종 이식 대 자가 이식)와 용량(2천만, 1억, 또는 2억 개 세포)**에 따라 30명의 환자를 6개의 하위 그룹으로 무작위 배정되어 수행됨. 모든 환

자는 카테터를 통해 **심내막**을 경유하여 0.5ml 주사 10회를 투여받았음. 2억 세포 용량군과 비교했을 때, 2천만 세포를 투여받은 환자들은 조기 강화(early enhancement) 측정 결과에서 유의하게 더 높은 좌심실 박출률(LVEF), 좌심실 말기 수축기 용적(LVESV)의 개선, 그리고 흉터 크기의 감소가 관찰되었음. **즉, 고용량군에서보다 저용량군에서 효능이 확인됨.**

2-2) 결론

- 따라서 전임상 연구에서 지적된 바와 마찬가지로, 임상시험에서도 **세포 투여량과 임상적 이점 간의 관계에 대해 일관되지 않고 상반된 결과가 보고되었음.** 또한, 서로 다른 투여 경로를 사용한 세포 투여량 연구들을 비교하는 것은 적절하지 않을 수 있다는 점도 유의해야 할 필요성.

Table 2. Summary of clinical studies of stem cell therapy dosing

Clinical trial and number of cells	Cell type	Delivery mode	Cell-dose relationship	Cardiac function, functional capacity, and quality of life parameters					
				ESV	EF	Scar size	Perfusion	Angina frequency	Exercise tolerance
Hare et al. [7]	Autologous vs. allogeneic MSCs	Catheter-based TESI	Inverse						
20 million				↓	↑	↓			
100 million				—	—	—			
200 million				—	—	—			
Quyyumi et al. [5]	Autologous CD34 ⁺	Intravenous	Direct						
5 million						↑ ^a	—		
10 million							↑		
15 million							↑		
Losordo et al. [6]	Autologous CD34 ⁺	Catheter-based TESI	—						
5 × 10 ⁴ per kg							—	—	—
1 × 10 ⁵ per kg							—	—	—
5 × 10 ⁵ per kg							—	—	—
Losordo et al. [6]	Autologous CD34 ⁺	Catheter-based TESI	Inverse						
1 × 10 ⁵ per kg								↓	↑
5 × 10 ⁵ per kg								—	—

^aNot significant.

Abbreviations: —, no dose-response effect was observed; EF, ejection fraction; ESV, end-systolic volume; MSCs, mesenchymal stem cells; TESI, transendocardial stem cell injection.

3. 결론 - 심근경색 치료를 위한 줄기세포 투여에서 문제점과 고려할 사항

- 새로운 효과적인 치료법을 확립하는 데 있어 중요한 과제는 최적의 용량과 투여 방법을 정립하는 것임. 치료제로서 생세포를 사용하는 것은 잘 확립된 약동학 및 약력학 원리가 적용되는 전통적인 약리학과 여러 중요한 측면에서 다름.
- 그러나 심혈관 질환에 대한 세포 치료 분야에서는 이러한 문제들이 아직 명확히 규명되지 않았음. 세포치료제의 경우, 이식되는 세포의 적절한 양 또는 농도와 투여 경로가 중요하지만, 올바른 투여 요법을 평가하는 데에는 매우 다른 원칙과 가정이 적용될 수 있음. 투여되는 세포의 총 수가 임상 효과와 비례 관계에 있을 것이라는 점은 직관적으로 보일 수 있으나, 심장 구조, 기능적 능력 및 삶의 질 측정을 임상 지표로 삼을 때, 이 개

념은 아직 결정적으로 확립되지 않았음.

- 2002년에서 2003년 사이 심장 질환에 대한 줄기세포 치료의 첫 임상 시험 결과가 발표된 이후 방대한 양의 데이터가 축적되었음에도 불구하고(Assmus 등, 2002; Strauer 등, 2002; Perin 등, 2003) 다양한 줄기세포 제제에 대한 최적의 용량과 투여 경로를 규명하는 것은 여전히 달성하기 어려운 목표로 남아 있음(Golpanian 등, 2015; Naota 등, 2025). 이에 원인으로서는 (a) 광범위한 줄기세포 공급원 및 생산 방법을 표준화할 합리적인 근거가 없음, (b) **줄기세포 제제의 MOA에 따른 용량선택의 부재**, (c) 세포 용량과 투여경로를 모두 비교한 연구가 부족함, (d) 대상 적응증 및 환자의 이질성 등이 제시되었음(Golpanian 등, 2015; Naota 등, 2025).

Part 3. 세포치료제의 MOA-기반 용량설정에 대한 고찰

1. 세포치료제의 MOA(mode of action)을 고려한 starting dose 및 maximum dose

1-1) 필요성

- 다양한 줄기세포 제제에 대한 최적의 용량과 투여 경로를 규명하는 것은 여전히 달성하기 어려운 목표로 남아 있고 이유 중의 하나가 줄기세포 제제의 MOA에 따른 용량선택의 부재임.
- FIH 연구에서 용량 선택에 관한 구체적인 고려사항으로 ① 결함 또는 손상된 조직 재건용 세포치료제, ② 면역조절, 분화, 이동, 단백질 분비 등 여러 MOA를 통해 약리학적 효과를 나타내는 세포치료제 등으로 <표-1>에 요약.

1-2) 결함 있거나 손상된 조직을 재건하는 MOA의 세포치료제

- 결함 있거나 손상된 조직을 이식으로 물리적으로 재건하기 위해 설계된 세포치료제에 대한 임상시험 용량 설정에 있어 고려사항임. 세포치료제의 기원은 대부분 체세포 기준이며 세포 기반 조직공학 제품임. 세포치료제 예시로는 연골 결손을 위한 인간 자가연골 유래 조직 이식과 변연줄기세포 결핍(limbal stem cell deficiency) 환자의 눈에 이식하기 위한 자가구강 점막 또는 각막 상피에서 추출한 시트 제품이 있음 ([https://www.jppte.co.jp/en/\(Link\)](https://www.jppte.co.jp/en/(Link))).
- 약리 작용에 의한 효능을 보장하기 위해 인간의 투여량은 일반적으로 조직 결손의 부피를 기준으로 결정됨. 안전성은 면역결핍 동물이나 외과적으로 재건된 조직 결함이 있는 동물모델을 이용한 비임상 안전성 또는 효능 연구에서 확인되었음. 일반적으로 비임상 안전성 평가에서는 제품의 잠재적 위험을 식별하기 위해 최대 허용량(MTD, Maximum Tolerated Dose) 또는 최대 실현 가능한 용량(MFD, Maximum Ffeasible Dose)을 투여할 것을 권장함(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2016).
- 그러나 국소적으로 투여되는 세포치료제의 경우, 과도한 투여가 인접 조직에 물리적 압박이나 손상을 일으켜 데이터 해석을 복잡하게 만들 수 있음. 따라서 전신 독성에 대한 특별한 우려가 없는 한 비임상 연구에서는 MTD 또는 MFD 적용이 필요하지 않음. 대신 목표 부위의 조건과 부피를 고려하여 임상적으로 적합한 용량을 사용하여 제품의 안전성을 적절히 확인할 수 있음.

1-3) 면역조절, 분화, 이동, 단백질 분비 등 여러 MOA를 통해 약리학적 효과를 나타내는 세포치료제

- 뼈, 연골, 지방 조직으로의 분화(Dominici 등, 2006), 면역조절(Klyushnenkova 등, 2005),

염증 부위로의 이동(Chamberlain 등, 2007), 단백질 분비(Jeffrey 등, 2016) 등과 같은 다중 MOA를 가진 대표적인 산물로는 체세포 줄기세포(예: MSC)에서 유래한 세포치료제. 일본에서는 이식편대 숙주 질환(GVHD), 척수 손상, 외상성 뇌손상, 복잡한 항문주누공 치료에 대해 네 가지 MSC 유래 제품이 승인되었음.

- 상대적으로 세포 분화와 MSC의 염증 부위 이동에 관해서는, 비임상 연구에서 표적 독성의 정량 평가가 어려워 인간에서의 유효 용량 추정이 복잡함. 따라서 과학적 근거라기보다는 임상 환경에서 시작 용량을 추정하는 데 있어 비임상 연구가 일반적인 참고 자료로 간주될 수 있음. FIH 연구에서 시작 용량은 적절한 안전계수와 비임상 연구의 NOAEL을 고려하여 결정할 수 있음. 또는 다른 임상 연구에서 사용된 유사한 MOA를 가진 제품의 용량을 참고할 수도 있음. 그러나 MSC의 정맥 주사 비임상 연구에서 폐 내 세포색전이 보고되었기 때문에(Furlani 등, 2009), 전신적으로 투여되는 MSC 유래 제품에서는 세포수와 용량, 투여 속도 등 물리적 영향으로 인해 표적 외 독성도 고려해야 함. 따라서 FIH 연구에서 최대 용량은 비임상 연구에서 안전성이 입증된 범위 내에 있어야 함.

<표-1> 세포치료제의 MOA에 따른 임상시험에서 starting dose 및 maximum dose

	Starting dose	Maximum dose
결함이나 손상된 조직을 재건하는 세포치료제	<ul style="list-style-type: none"> • 결함이나 손상된 부위의 양을 고려하여 설정. 	<ul style="list-style-type: none"> • 비임상 연구에서 안전하다고 확인된 용량 범위를 선택
면역조절, 분화, 이동, 단백질 분비 등 여러 MOA에 의해 약리학적 효과를 나타내는 세포치료제	<ul style="list-style-type: none"> • 면역 효과를 포함한 여러 MOA는 비임상 연구에서 인간의 유효 선량을 추정하기 어렵게 만듦. • 특정 안전성 계수를 고려한 비임상 연구의 NOAEL 기준이 사용될 수 있음. • 유사한 MOA를 가진 유사 제품의 임상 연구용 용량을 사용할 수 있음. 	<ul style="list-style-type: none"> • 물리적 영향으로 인한 표적 외 독성을 고려할 때, 비임상 연구에서 안전성이 입증된 용량 범위를 선택해야 함.

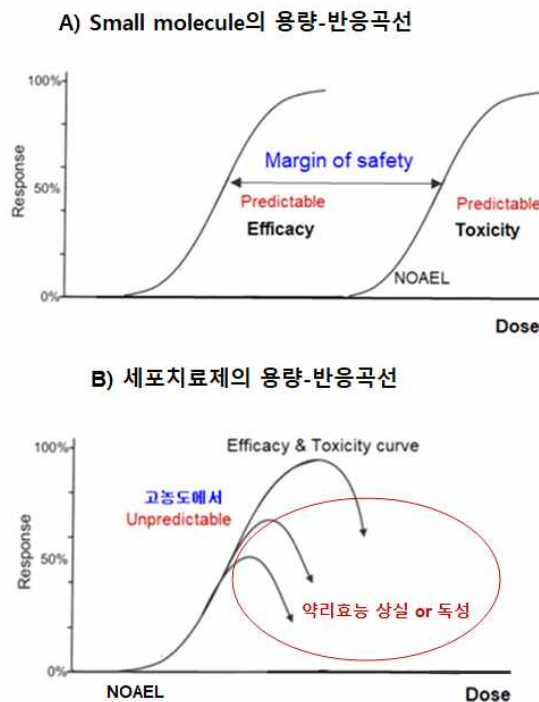
2. 세포치료제의 NOAEL 적용 및 기타 고려할 사항

2-1) 필요성

- 앞선 내용: 상대적으로 세포 분화와 MSC의 염증 부위 이동에 관해서는, 비임상 연구에서 표적 독성의 정량 평가가 어려워 인간에서의 유효 용량 추정이 복잡함. 따라서 과학적 근거라기보다는 임상 환경에서 시작 용량을 추정하는 데 있어 비임상 연구가 일반적인 참고 자료로 간주될 수 있음. **FIH 연구에서 시작 용량은 적절한 안전계수와 비임상 연구의 NOAEL을 고려하여 결정할 수 있음.**

2-2) Small molecule vs Biologics(세포치료제 포함)의 독성기전의 차이에 대한 고려

- 세포치료제의 약리작용 측면에서 용량-반응 관계가 나타나지 않는 이유는 Small molecule vs Biologics(세포치료제 포함)의 독성기전의 차이에서 비롯된 것일 수도 있음.
- 약물의 모든 독성은 ① 유해활성대사체, ② 과잉용량 등 2가지 기전에 의해 발생함. <그림>의 A)에서처럼 small molecule은 약리에 대한 반응곡선과 독성에 대한 반응곡선이 분리되어 있음. 이는 small molecule이 ① 유해활성대사체과 ② 과잉용량에 의해 독성이 유도되기 때문임. 반면에 세포치료제는 유해활성대사체를 생성하지 않으며 과잉용량에 의해서만 약리작용이 사라지거나 독성이 발생. 이와 같은 이유로 <그림>의 B)에서처럼 약리작용과 독성이 동일한 곡선상에 존재함.
- Part 2에서 중간엽 줄기세포를 심근경색 동물모델 및 환자에게 투여한 후 저용량에서 약리작용이 확인되었지만, 고용량에서 약리작용이 나타나지 않는 것이 특성이었음. 결과적으로 세포치료제의 고용량 투여에 의한 효능이 없는 것은 과잉용량에 의한 환자 자체가 수용할 수 없는 용량에 따른 정상적인 항상성 방향 소실에 기인하는 것으로 추정됨. 그러나 이것이 반드시 독성으로 연결되지는 않는 특성도 있다고 추정됨.



<그림> Small molecule(A) vs 세포치료제(B)의 용량-반응곡선

2-3) 소동물 및 대동물의 NOEL 외삽과 SF의 고려

① FIH의 용량 설정 표준화 및 NOAEL

- 전통적으로 적용한 비임상 데이터만을 기반으로 임상시험에서 최초 인체 투여(FIH, First-in-human) 용량으로 설정하는 것이 표준화되어 왔음. $MRSD = HED/SF(=10)$,

HED(human equivalent dose) = NOAEL(animal Km/human Km) (Km=체중-체표면적 전환계수로 Table 1에서 인체를 비롯하여 다양한 종별 Km이 제시됨)

Table 1: Conversion of Animal Doses to Human Equivalent Doses Based on Body Surface Area			
Species	To Convert Animal Dose in mg/kg to Dose in mg/m ² , Multiply by Km	To Convert Animal Dose in mg/kg to HED ^a in mg/kg, Either:	
		Divide Animal Dose By	Multiply Animal Dose By
Human	37	---	---
Child (20 kg) ^b	25	---	---
Mouse	3	12.3	0.08
Hamster	5	7.4	0.13
Rat	6	6.2	0.16
Ferret	7	5.3	0.19
Guinea pig	8	4.6	0.22
Rabbit	12	3.1	0.32
Dog	20	1.8	0.54
Primates:			
Monkeys ^c	12	3.1	0.32
Marmoset	6	6.2	0.16
Squirrel monkey	7	5.3	0.19
Baboon	20	1.8	0.54
Micro-pig	27	1.4	0.73
Mini-pig	35	1.1	0.95

② 세포치료제의 FIH 결정에서 표준화 방법과 차이

- 일반적으로 세포치료제는 아래의 <참고자료>에서처럼 동물을 이용한 반복투여독성시험에서 확인된 NOAEL(No-Observed Adverse-Effect-Level, 최대비독성용량)임. 즉 SF(safety factor) 적용이 없이 NOAEL을 FIH로 하여 임상시험에서 dose-escalation이 이루어짐.

<참고자료> FDA, 2013, Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products
These preclinical data will help guide clinical trial design. For example, data generated from the toxicology studies will potentially establish a No-Observed Adverse-Effect-Level (NOAEL), which will help determine selection of the starting dose level and subsequent dose-escalation scheme for the clinical trial. In addition, this information will potentially allow for circumvention or mitigation of significant toxicities in patients.

- 세포치료제는 NOAEL을 FIH로 설정하기 때문에 Km이 적용되지 않음. 이러한 경우, 소동물 및 대동물의 Km 차이로 인하여 이를 고려하지 않은 NOAEL을 인체에 적용하게 되어 임상시험의 인체 외삽에서 번역 오류를 유도할 수 있음.

<참고문헌>

Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res* 2009;77:370–6.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.

Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: Immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 2005;12:47–57.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739–49.

Jeffrey L.S., Ryang H.L., Carl A.G. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7: Article number: 125.

Assmus B, Schächinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) *Circulation*. 2002;106:3009–3017.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106:1913–1918.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003;107:2294–2302.

Quyyumi AA, Waller EK, Murrow J, et al. CD34(+) cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent. *Am Heart J*. 2011;161:98–105.

Losordo DW, Henry TD, Davidson C, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res*. 2011;109:428–436.

Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: The POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308:2369–2379.

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. Technical guidance for quality, and nonclinical and clinical studies of regenerative medicines (human cell-processed therapeutic products, PFSB/MDRMPE administrative notice. Tokyo, Japan: Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW); 2016.

Halkos ME, Zhao ZQ, Kerendi F, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells

enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2008;103:525–536.

Hamamoto H, Gorman JH, 3rd, Ryan LP, et al. Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: The effect of cell dosage. *Ann Thorac Surg.* 2009;87:794–801.

Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2009;30:2722–2732.

Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, et al. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;29:251–259.

Golpanian S, Schulman IH, Ebert RF, Heldman AW, DiFede DL, Yang PC, Wu JC, Bolli R, Perin EC, Moyé L, Simari RD, Wolf A, Hare JM; Cardiovascular Cell Therapy Research Network. Concise Review: Review and Perspective of Cell Dosage and Routes of Administration From Preclinical and Clinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Feb;5(2):186-91.

Misaki Naota, Yusuke Nozaki, Fumito Mikashima, Gen Higashiyama, Key considerations for dose selection in first-in-human studies of cell and gene therapy products, *Cytotherapy*, Volume 27, Issue 11, 2025, Pages 1271-1278, ISSN 1465-3249.

Ministry of Health, Labour and Welfare(MHLW), Japan. Ensuring the quality and safety of gene therapy products. Notification PSEHB/MDDED Notification No. 07092. July 9, 2019.

US FDA. Guidance for industry: preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration; 2013.

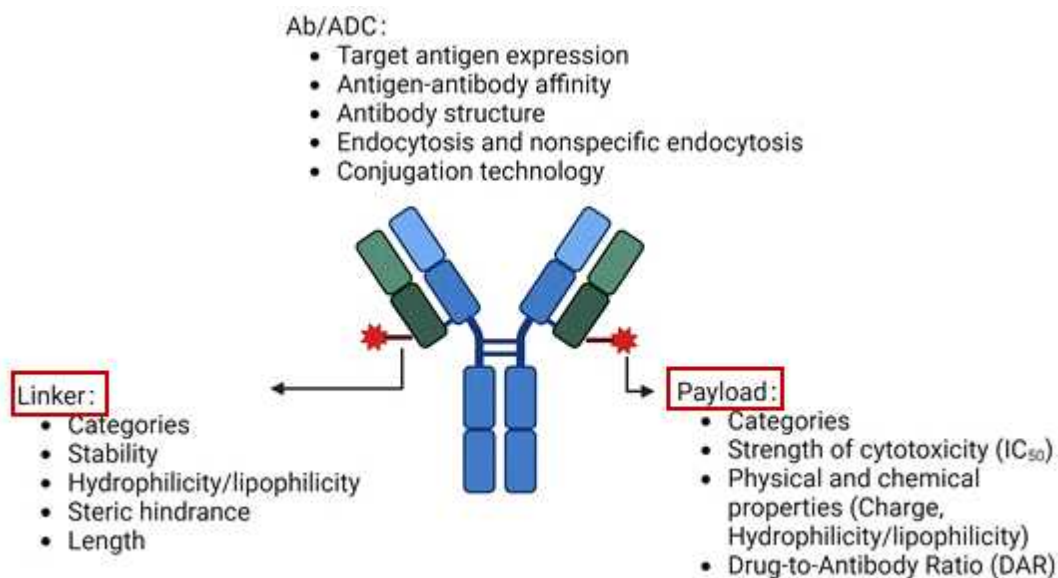
EMA(European Medicines Agency). Guideline on quality, nonclinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials. Amsterdam, The Netherlands: European Medicines Agency; 2019.

Halkos ME, Zhao ZQ, Kerendi F, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2008;103:525–536.

110. ADC(항체-약물 결합체) 개발에 적절한 Payload 결정을 위한 기준

1. 고찰의 필요성

- 항체-약물 접합체(ADC, antibody-drug conjugate)는 암 치료를 위한 가장 빠르게 성장하는 약물 중 하나임. ADC data base에 따르면 >300개의 ADC가 임상시험 파이프라인에 있으며, >500개의 ADC가 비임상시험에 참여, 그리고 >5,000대의 ADC가 초기 개발 단계에 있음(Shen 등, 2024).
- ADC는 <그림-1>에서처럼 암세포 표면 항원에 대한 antibody, 암세포 독성을 유발하는 payload 그리고 antibody와 payload를 연결해 주는 linker로 구성됨(Cheng 등, 2026).



<그림-1> ADC 독성에 기여할 가능성이 높은 분자 구조 특성.

- ADC는 암세포 항원을 표지하는 항체에 기존 항암제를 결합하여 암세포 표적에서만 독성을 유발하여 항암 효능을 증가시키며, 동시에 혈관을 통해 전신으로 이동하여 전신독성을 유발하는 것을 감소시키는 목적으로 설계됨(Nguyen 등, 2023; Donaghy 등, 2016; Su 등, 2021; Su 등, 2021).
- 그러나 미국 FDA에 의해 승인된 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC 처방으로 암환자로부터 다양한 전신적 부작용이 확인되었음. 따라서 이와 같은 전신독성의 원인과 이를 줄일 수 있는 payload 선택은 어떠한 기준이 바탕이 되어야 하는 것에 이해 필요성이 있음.

2. FDA-approved ADC 15종과 확인된 임상에서의 부작용

- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC를 승인됨(Liu, 2025; 바이오 제약 PEG, 2026). <표-1>은 지금까지 승인된 15종 ADC의 설계, 승인된 적응증, 표적 등을 요약한 것임.

<표-1> ADC의 설계, 승인된 적응증, 용량 등의 요약

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2017; 2000	급성 골수성 백혈병(AML)
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	2011	HL; sALCL; MF; DLBCL
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2+ BC
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	칼리체아미신	2017	모두
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti®	AstraZeneca	CD22	절단 가능	PE38	2018년, 미국 시장에서 단종됨	HCL
Polatuzumab vedotin-piiq	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	2019	DLBCL
Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Seagen	Nectin-4	절단 가능	MMAE	2019	UC
Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	HER2+ 피임약, HER2-저/초저혈 MBC, HER2+ GC, NSCLC
Sacituzumab govitecan	Trodelvy®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2- MBC, TNBC
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF	2025년에 재승인됨	음
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	PBD SG3199	2021	DLBCL
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	2021	자궁경부암
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE™	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	HR+/HER2- BC
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE	2025	비소세포암

- FDA에 의해 승인된 ADC의 payload에 의한 항암기전은 payload의 세포독소로서의 작용을 통해 DNA 손상과 미세소관(microtubule) 형성 방해 등의 2 기전임. 두 기전 모두에 의해 암세포 분열이 정지됨.
- 이러한 분류에 따라 <표-2>에서처럼 FDA-승인 ADC로부터 다양한 부작용이 임상에서 확인되었음(Markides 등, 2024). ADC와 같은 새로운 치료법들이 기대수명을 연장하고 치료에 대한 새로운 희망을 주지만, 암 치료의 환경은 끊임없이 변화하고 있으며 동시에 독성과 기타 합병증도 존재함. 마찬가지로 ADC 사용이 증가함에 따라 ADC 관련 부작용이 임상에서 보고되는 경우도 증가하고 있음. 이러한 사건 중 일부는 드물지만, 조기에 인지할 때 가장 효과적으로 치료됨.

<표-2> FDA-승인 ADC의 항암기전별 ADC의 부작용

항체-약물 접합체 명칭(상표명)	약어	항체 표적	적응증	일반적인 부작용
세포독소로서의 DNA 손상 기전의 ADC				
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	GO	CD33	Acute myeloid leukemia	세포감소증, 감염, 발열, 트랜스아미나제 수치 상승, 출혈, 메스꺼움/구토
Inotuzumab ozogamicin (Besponsa)	InO	CD22	B-cell acute lymphocytic leukemia	세포감소증, 아미노트랜스퍼라제 수치 증가, 빌리루빈 증가, 열성 호중구 감소증
Loncastuximab tesirine (Zynlonta)	LT	CD19	Lymphoma	세포감소증, 피로, 메스꺼움, 기침, 감마글루타밀 트랜스펩티다제 증가, 설사
Fam-trastuzumab deruxtecan (Enhertu)	T-DxD	HER2	Breast cancer, gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma	적혈구 감소증(호중구감소증, 빈혈, 혈소판 감소, 백혈구 감소증), 메스꺼움, 구토, 설사, 피로, 식욕 감소, 탈모 ¹
세포독소로서의 항미세관 작용 기전의 ADC				
Brentuximab vedotin (Adcentris)	BV	CD30	Certain lymphomas	말초 신경병증, 메스꺼움, 설사, 구토, 피로, 상기도 감염, 적혈구 감소증
Polatuzumab vedotin (Polivy)	Pola	CD79b	Lymphoma	말초 신경병증, 호중구 감소증, 빈혈, 혈소판 감소, 설사, 변비, 식욕 감소, 발열증
Enfortumab vedotin (Padcev)	EV	Nectin 2	Urothelial carcinoma	말초 감각 신경병증, 식욕 감소, 설사, 기후불 등, 황반염색 발진, 빈혈
Tisotumab vedotin (Tivdak)	TV	Tissue factor	Cervical cancer	삼피, 메스꺼움, 구토, 피로, 말초 신경병증, 결막염, 탈모, 변비, 식욕 감소, 빈혈
Ado-trastuzumab emtansine (Kadcycla)	T-DM1	HER2	Breast cancer	메스꺼움, 피로, 두통, 음피, 변비, 설사, 식욕 감소, 아스파르트산 전이효소 상승
Sacituzumab govitecan (Trodelvy)	SG	Human trophoblast cell surface Ag ²² (Trop 2)	Breast cancer, urothelial cancer	호중구 감소증, 설사, 메스꺼움, 탈모, 피로
Mirevetuximab soravtansine (Elahere)	MIRV	FR α	Ovarian, fallopian tube, peritoneal	메스꺼움, 시야 흐림, 각막병증, 설사, 피로, 말초 신경병증, 안구 건조증

			cancer	
--	--	--	--------	--

3. ADC의 세포독성을 통한 항암기전

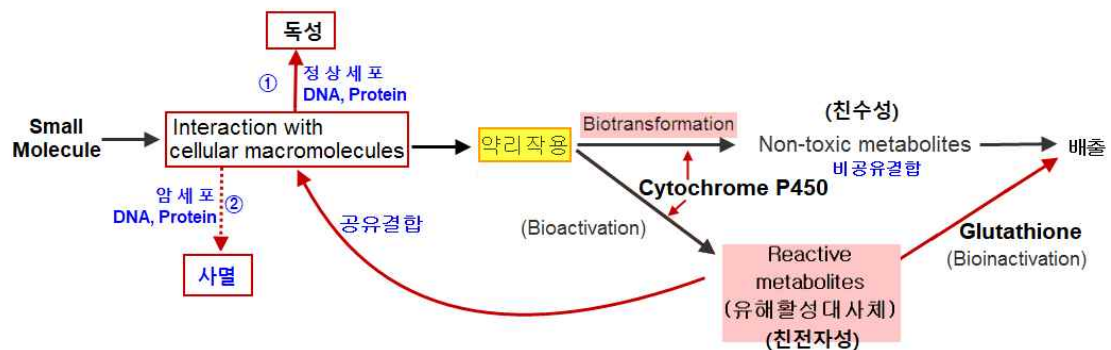
- ADC의 DNA 손상제과 미세소관 저해제에 의한 항암기전이 <표-2>에 보다 상세한 서술되었음. 표적 암세포가 항체에 의해 표지되면, 세포독성 화합물은 암세포에 의해(1) 리소좀(2)으로 내화되어 효소적으로 항체에서 분리되어 세포질로 방출됨(3). 세포질에 도달한 후(4), 세포독성 약물은 **(a) 미세소관 파괴 또는 (b) DNA 손상으로 세포 사멸**(세포자멸사, apoptosis)을 일으킴(Pysz 등, 2019; Jain 등, 2015; Recent Advances, 2024).
- <표-3>은 ADC payload의 항암기전에 따라 DNA 손상 약물과 미세소관 저해약물로 분류하여 좀 더 상세하게 기전을 설명한 것임.

<표-3> ADC payload의 항암작용 기전.

Class	Payload	Mechanism
DNA-damaging agents		
Calicheamicin	Ozogamicin	DNA의 마이너 홈에 결합하여 이중 가닥 DNA 절단을 유도
Camptothecins	Deruxtecan, govitecan	토포이소머라제 I을 억제하여 DNA 가닥 절단을 유도
Pyrrolobenzodiazepine dimer	Tesirine (SG3199)	DNA 나선 간 가교결합을 일으키는 알킬화 작용제유도
Microtubule inhibitors		
Auristatin	Vedotin (monomethyl auristatin E)	튜불린에 결합하여 미세소관 중합을 억제하여 성장 정체를 유도
Maytansinoid	Emtansine (DM-1)-soravtansine (DM-4)	튜불린에 결합하여 미세관 조립체를 파괴함.

4. Payload의 DNA 및 미세소관의 손상 기전

- 세포질에서 방출된 payload가 친전자성(electrophilic)으로 전환이 이루어져야 DNA 및 미세소관의 친핵성 부분과 공유결합에 의한 손상으로 암세포의 apoptosis가 유도됨. 이때 친전자성으로 전환은 효소-의존적 및 비효소-의존적으로 이루어지지만, 대부분 경우에 cytochrome P450에 의한 생화학적 전환(biotransformation)으로 이루어짐.
- <그림-2>는 Cytochrome P450에 의해 발생한 친전자성대사체의 2 경로: ① 정상세포의 DNA와 단백질에 결합을 통한 독성경로, ② 암세포에서 DNA 및 단백질에 결합하여 암세포사멸 유도(박영철, 2019)

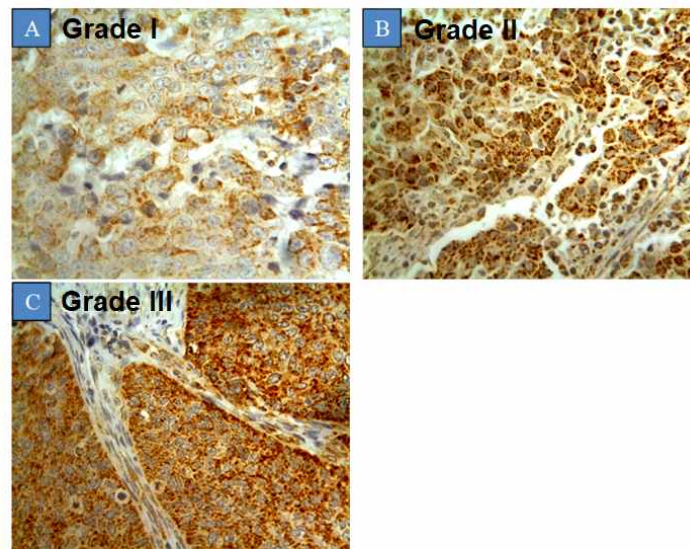


<그림-2> Cytochrome P450에 의해 발생한 친전자성대사체의 2 경로: ① 정상세포의 DNA와 단백질에 결합을 통한 독성경로, ② 암세포에서 DNA 및 단백질에 결합하여 암세포사멸 유도(박영철, 2019)

- <표-2>와 <표-3>에서처럼 FDA-승인된 ADC의 payload가 암세포의 DNA와 단백질인 미세소관의 손상을 유도하기 위해서는 친전자성으로 전환되어야 함. 결과적으로 <그림-2>의 경로②와 같이 암세포의 DNA와 미세소관이 payload의 친전자성에 의한 손상으로 세포사멸(apoptosis)이 유도됨.

5. ADC의 Payload에 의한 암환자 부작용 예방을 위한 전략

- ADC 개발에서 발생하는 모든 부정적인 영향 중 가장 큰 우려는 안전성, 즉 독성임. Payload는 보통 낮은 치료 지수를 보이며, 비특이적 약물 노출로 인해 표적 외 조직 (off-target tissues)에 심각한 부작용을 일으킴. 이는 ADC의 원래 목적인 치료지수를 높이고 전신독성을 감소시키는 설계와 반대적인 현상임(Nguyen 등, 2023; Masters 등, 2018).
- 이와 같이 ADC가 표적 항암제임에도 불구하고 전신독성을 유발하는 원인은 payload가 on-target에서 벗어나 전신혈관계를 통해 off-target으로 이동에 기인함.
- 일찍이 cytochrome P450은 암세포 특이적으로 발현되는 것으로 알려졌다(Graeme 등, 1997). 예시로 아래의 <그림>에서처럼 자궁경부암<cervical cancer>에서는 CYP1B1의 특이적으로 발현함(Alshammari 등, 2021). 또한 종양의 조직학적 등급이 (A) 1등급, (B) 2등급, (C) 3등급 등 등급이 높아질수록 CYP1B1의 발현이 비례적으로 높아진다는 것이 확인됨.



Cytochrome P450 1B1 expression in different grades of cervical cancer. Tumors were classified on the basis of histological grades. (A) Grade I, (B) grade II, and (C) grade III.

<그림-3> 자궁경부암<cervical cancer>의 다양한 등급에서 CYP1B1 발현. 종양은 조직학적 등급에 따라 분류되었으며 (A) 1등급, (B) 2등급, (C) 3등급. 등급이 높아질수록 CYP1B1의 발현이 비례적으로 높아짐 (Alshammari 등, 2021)

- 결론: 이와 같이 표적하는 암세포-특이적 cytochrome P450 발현을 우선적으로 확인이 필요함. 다음 단계로 특이적-cytochrome P450에 의해 친전자성으로 전환되는 payload를 선택하여 ADC를 개발할 필요성이 있음. 이러한 경우에 on-target에서 암세포-특이적 cytochrome P450에 의해 대부분 payload가 대사되어 전신혈관계를 통한 off-target으로 이동이 감소되며 동시에 ADC에 의한 부작용이 없어지거나 감소됨을 예측할 수 있음.

<참고문헌>

- Alshammari, Fatemah & Al-saraireh, Yousef & Youssef, Ahmed & Al-Sarayra, Yahya & Alrawashdeh, Hamzeh Mohammad. (2021). Cytochrome P450 1B1 Overexpression in Cervical Cancers: Cross-sectional Study. *Interactive Journal of Medical Research*. 4. e31150.
- Graeme I. Murray,² Martin C. Taylor, Morag C. E. McFadyen, Judith A. McKay, William F. Greenlee, M. Danny Burke, and William T. Melvin. Tumor-specific Expression of Cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* (1997) 57 (14): 3026–3031.
- Bin T, Tang J, Lu B, Xu XJ, Lin C, Wang Y. Construction of AML prognostic model with CYP2E1 and GALNT12 biomarkers based on golgi- associated genes. *Ann Hematol*. 2024 Dec;103(12):5297-5314.
- Licznarska, B.; Szaefer, H.; Baer-Dubowska, W. Orphan Cytochromes P450 as Possible Pharmacological Targets or Biomarkers in Breast Cancer. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2025**, *47*, 682.
- He, C., Mao, Y., & Wan, H. (2025). In-depth understanding of the structure-based reactive metabolite formation of organic functional groups. *Drug Metabolism Reviews*, 57(2), 147–189.
- Pysz IJ, Jackson PJM, Thurston DE. Introduction to Antibody-drugconjugates. In: Thurston D, Jackson P, eds. *Cytotoxic Payloads for Antibody-Drug Conjugates* Croydon, UK: Royal Society of Chemistry;2019:1-30.
- Jain N, Smith SW, Ghone S, et al. Current ADC linker chemistry. *Pharm Res*. 2015;32:3526-3540.
- Recent Advances in ADC Published May, 2024. Accessed August 31,2024. <https://njbio.com>
- Danna Michelle Markides, Angel Guido Hita, Jeffrey Merlin, Cielto Reyes-Gibby, Sai-ching J. Yeung, Antibody-Drug Conjugates: The Toxicities and Adverse Effects That Emergency Physicians Must Know, *Annals of Emergency Medicine*, Volume 85, Issue 3, 2025, Pages 214-229, ISSN 0196-0644
- Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC toxicity and strategies to increase ADC tolerability. *Cancers (Basel)* 2023;15:713.
- Masters JC, Nickens DJ, Xuan D. et al. Clinical toxicity of antibody drug conjugates: a meta-analysis of payloads. *Invest New Drugs*, 2018;36:121–35.
- Shen L, Sun X, Chen Z. et al. ADCdb: the database of antibodydrug conjugates. *Nucleic Acids Res* 2024;52:D1097–109.
- Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. *MAbs* 2016;8:659–71.

Su Z, Xiao D, Xie F. et al. Antibody-drug conjugates: recent advances in linker chemistry. Acta Pharm Sin B 2021;11: 3889–907.

Su D, Zhang D. Linker design impacts antibody-drug conjugate pharmacokinetics and efficacy via modulating the stability and payload release efficiency. Front Pharmacol 2021;12:687926.

바이오제약 PEG FDA 승인 항체-약물 접합체(ADC) 2026년

Frank Liu, Safety assessment of antibody-drug conjugates: Nonclinical toxicology, non-active ingredients, and environmental risk considerations, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 215, 2025, 104865, ISSN 1040-8428,

박영철 (2019). 위해성평가를 위한 독성학. 한국학술정보(주). ISBN: 978-89-268-9827-7

110. Next-Generation Sequencing-기반 유전체 편집 치료제의 안전성 평가에 관한 FDA의 최신 지침

1. 목적

- CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, 사람 유전체에 완전히 새로운 DNA 절편이나 유전자 전체를 삽입하여 기존의 유전정보를 다른 것으로 바꾸기 위한 기술)을 응용한 유전체 편집 기술인 3세대 유전자 가위(RGENs, RNA-guided engineered nucleases) 및 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease; 원하는 DNA 부위를 아주 정확하게 찾아 잘라내는 2.5세대 유전자 가위 기술) 등 유전체 편집 기술은 엄청난 치료 잠재력을 제공함.
- 그러나 기술은 높은 효율성에도 불구하고, 의도치 않은 DNA 위치를 자르는 ‘off-target’ 효과에 의한 유전체 변형으로 안전 문제와 인간 배아 유전자 편집에 대한 윤리적 및 제도적 우려가 상존함.
- 지난 2024년 발표한 유전체 편집 치료에 관한 초기 유전체 편집 치료에 관한 초기 지침은 상당히 넓은 개발의 영역을 다루고 있지만(FDA Guidance for Industry, Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing, January 2024), 일부 새로운 유전자 편집, 후생유전학 및 RNA 편집 제품을 포함하지 않았음.
- 새로운 지침의 목적은 2024년 지침에 포함되지 않은 일부 새로운 유전자 편집, 후생유전학 및 RNA 편집 제품에 대한 고려사항을 포함하기 위함.
- 이에 따라 2026년 4월 FDA는 인간 유전자 치료에서 유전체 편집(GE, gene editing) 안전성 평가를 위한 차세대 시퀀싱(NGS, Next-Generation Sequencing) 사용에 관한 지침을 제공하는 업데이트안 발표(Draft Guidance for Industry; Safety Assessment of Genome Editing in Human Gene Therapy Products Using Next-Generation Sequencing, 2026)

2. NGS(Next-Generation Sequencing, 차세대 시퀀싱)

1) 개념: 차세대 시퀀싱(NGS)은 이전 방법보다 이점을 제공하는 최근의 DNA 및 RNA 시퀀싱 기술을 의미합니다. 이 방법은 핵산 조각의 고처리량, 대규모 병렬, 심층 시퀀싱을 가능하게 하며, 질병이나 기타 생물학적 현상과 관련된 유전적 변이를 식별하는 데 자주 사용됨.

2) NGS workflow 단계: NGS는 4 가지 주요 단계로 구성

1. **핵산의 분리 및 정제:** 세포와 핵에서 DNA와 RNA를 방출하는 용해 단계로 추출 후에는 다양한 방법으로 DNA 농도와 샘플의 순도를 측정할 수 있음. 핵산 정제는 수작업으로 수행하거나 자동 액체 취급으로 수행할 수 있음. 자동화 방법은 인간의 실수를 줄이고 대량 실험실에 적합하며, 수동 방법은 소규모 또는 특수 응용 분야에 유연성을 제공함.
2. **NGS 라이브러리 준비:** 핵산 샘플을 시퀀싱이 가능한 샘플로 변환하는 방법에 의해 정의됨. NGS 워크플로우에서 가장 힘들고 도전적인 부분 중 한 단계임. NGS 라이브러리 준비에는 표적 서열 증폭, 단편화, 어댑터 부착, 특정 조각 길이 선택, 라이브러리 정량화, 라이브러리 풀링, 수동 라이브러리 준비 vs 자동 라이브러리 준비 등 여러 중요한 단계가 포함. 그러나 설명된 모든 단계가 반드시 필요한 것은 아니며, 추가 단계가 필요할 수도 있음.
3. **시퀀싱:** 시퀀싱 과정의 주요 단계는 다음과 같음
 - **실행 계획:** 실행 계획은 샘플 로딩, 시퀀싱 화학, 실행 시간 등 시퀀싱 매개변수를 설정하는 것을 포함함. 적절한 계획은 최적의 데이터 품질과 시퀀싱 자원의 효율적인 사용을 지원하는 데 도움을 줌.
 - **클론 증폭:** 클로날 증폭은 각 DNA 조각의 여러 복사본을 생성하여 클러스터 또는 콜로니를 만듦. 이 단계는 일반적으로 유제나 브리지 PCR(emulsion or bridge PCR)을 통해 시퀀싱 중 신호 검출에 필수적임.
 - **합성에 의한 시퀀싱:** 합성에 의한 시퀀싱은 표지된 뉴클레오타이드를 고정된 템플릿에 통합하여 DNA 조각의 뉴클레오타이드 서열을 읽는 방법임. 각 통합 이벤트를 감지하여 DNA 서열을 결정할 수 있음. NGS에는 나노포어 시퀀싱, 단일 분자 실시간 시퀀싱(SMRT), 라이게이션에 의한 시퀀싱 등 다른 접근법도 사용할 수 있음.
 - **염기 호출 및 데이터 출력:** 염기 염기열 분석은 원시 시퀀싱 데이터를 뉴클레오타이드 서열로 변환하여 품질 지표를 포함한 FASTQ 파일을 생성함. 이 단계는 시퀀싱 실행의 정확성과 신뢰성을 평가하는 데 매우 중요하며, 후속 분석에 필수적인 정보를 제공함.
4. **데이터 분석:** NGS 데이터 분석은 일반적으로 생물정보학이라고 널리 불리며, DNA 시퀀싱 데이터로부터 정확하고 의미 있는 결과를 생성하기 위해 설계된 일련의 필수 계산 단계로 구성됨. 이 단계에는 탈다중화, 품질 필터링, 기준 게놈과의 정렬, 변이 호출 등이 포함됨. 다양한 응용 분야에 따라 매우 다양하지만, NGS 분석은 자동화된 방식으로 실행될 수 있는 단일 종단 간 파이프라인으로 통합될 수 있음.

하위 분석 및 그래픽 도구는 데이터 해석을 가능하게 함. 보고 구성 요소는 결과, 지표, 시각화를 종합 출력으로 구성하여 여러 시퀀싱 실행을 비교함.

3. FDA의 새로운 개괄적 권고사항(2026년 4월)

- 2024년 1월에 발표된 이전 지침을 기반으로 하며, 해당 지침은 인간 유전체 편집을 포함하는 인간 유전자 치료 제품에 대한 비임상, 임상, 화학, 제조 및 통제(CMC) 고려사항을 다룸.
- 초안 지침에서 FDA의 새로운 권고사항은 유전자 편집 신청의 안전성을 평가하는 NGS 기법과 도구에 초점을 맞추고, NGS 분석의 계획, 개발 및 데이터 분석과 관련된 기관의 기대치를 개괄하는 것임
- 지침은 유전체 편집(GE) 제품의 임상 개발 프로그램이 "유전자 치료 제품 자체와 관련된 위험뿐만 아니라, 유전 질환을 표적으로 하는 치료, 개별 치료법을 포함한 유전체 변형 등 off-target 편집 및 의도치 않은 게놈 변화 등 GE와 관련된 추가 위험도 모두 다뤄야 한다"고 명시. 또한 이를 위해 최신 시퀀싱 기술을 활용해 off-target 편집 위험을 평가하기 위한 명확하고 과학적으로 근거 있는 권고안임.
- 즉, 전통적인 분석 접근법만으로는 더 이상 충분하지 않다는 점을 대신하여 NGS(Next-Generation Sequencing, 차세대 시퀀싱) 기반 방법을 제시. NGS 전략을 통해 포괄적이고 과학적으로 다음과 같은 분야에 응용을 통해 유전자 편집 기술을 기반한 치료법의 위험성을 제거하여야 함. 특히 NGS를 사용하여 편집된 세포의 유전체 무결성에 대해 "민감하고 정량적인" 평가를 수행.
 - 유전체 전반에 걸친 off-target 편집 사건 탐지
 - 염색체 재배열 및 구조 변이 평가
 - 삽입/결실 돌연변이(인델) 평가
 - 전체 유전체 무결성 모니터링

3. NGS(Next-Generation Sequencing, 차세대 시퀀싱)의 구체적 지침

(예시-1): DNA의 짧은 구간(예: 50bp 이하)에 변화를 초래하는 on-target 및 off-target 부위의 편집을 평가하기 위해, short-read sequencing-based method을 활용하는 시퀀싱 전략이 적절할 수 있다고 권고. 그러나 대규모 삽입이나 대규모 결손의 유무를 확인하기 위해 더 긴 서열 구간을 평가하는 경우에는, 이러한 변화를 감지할 수 있는 long-read sequencing-based method을 사용하는 시퀀싱 전략을 적용해야 할 수 있음

(예시-2): 시퀀싱 깊이의 적절성과 민감도를 입증하고, 저빈도 off-target 편집 사건을 검출하기 위한 전략을 뒷받침하기 위해 NGS 실행의 대표 데이터와 같은 자체 생성 데이터 및 peer-reviewed publications의 관련 정보를 제공할 것을 권장

(예시-3): 시퀀싱 데이터 처리 과정에서 각 단계에 적용되는 수용 기준(해당되는 경우)에 대한 정보를 포함하여, 시퀀스 분석의 각 단계에 대한 간략한 설명. 또한 및 수용 기준 정보에는 시퀀싱 품질 수용 기준, 시퀀싱 깊이 수용 기준 및 정렬 지표 수용 기준에 대한 정보가 포함되어야 함.

(예시-4): On-target 및 off-target 부위 분석에 사용되는 샘플은 결과적인 on-target 편집률이 최종 의약품에서 제안된 비율과 비교가 가능하도록 적절한 매개변수를 사용하여 편집되어야 함.

(예시-5) Ex-vivo 제품: 유전자 편집 전략이 환자 세포의 돌연변이를 교정하는 것을 목표로 하는 경우, 당국은 의뢰인이 환자 유래 시료나 해당 돌연변이를 보유하도록 조작된 정상 세포를 사용할 것을 권장함. 이러한 접근 방식은 표적 부위의 편집률 보고를 용이하게 할 것임. **중요한 점은, 후원사가 적절한 경우 건강한 기증자 검체를 사용할 수 있으며, 해당 접근법의 타당성을 뒷받침하는 과학적 근거를 제시해야 한다는 것임.** 후원사가 편집을 시도하려는 세포 유형과 다른 세포 유형을 선택하는 경우, **검체 선정 전략의 타당성을 뒷받침하는 과학적 근거를 제시해야 함.**

(예시-6) 인간 유전적 변이: 지침은 인간 게놈에 내재된 뉴클레오타이드 변이가 on-target 서열과 off-target 게놈 편집 부위 간의 불일치를 줄여, 유전자 편집기의 서열 인식 도메인인 이를 인식하게 함으로써 off-target 위험을 증가시킬 수 있다고 지적함. 인간 유전적 변이를 적절히 반영하기 위한 체외(in silico) off-target 분석 방법에 대한 구체적인 고려 사항이 논의되며, 여기에는 다음이 포함됨: ① 건강한 집단과 환자 집단의 변이 정보를 포함한 인간 유전적 변이 데이터베이스의 선정(예정된 대상 집단의 질병 유병률 및 질병 유발 변이에 대한 지식을 바탕으로 특정 데이터베이스를 선택한 근거 제시 포함), ② 그리고 유병률이 명확히 규명된 질병에 대해 인구 계층화를 활용하여 변이를 선별하는 in silico off-target 후보 선정 전략(in silico off-target nomination strategy).

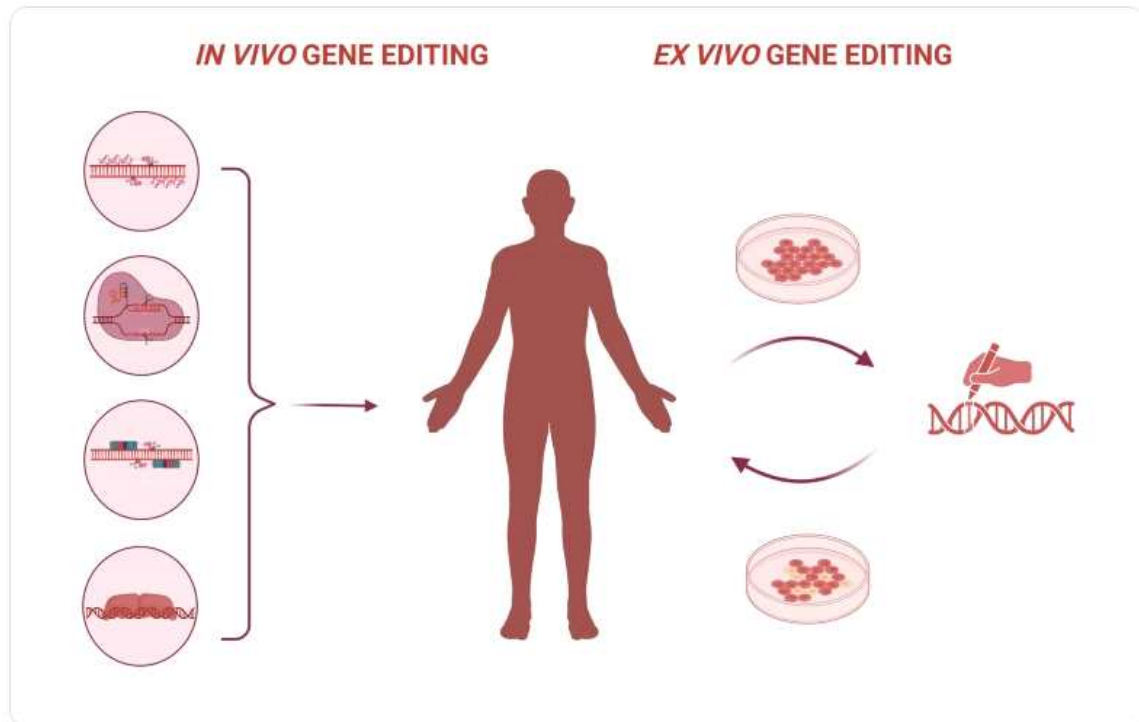
4. NGS와 관련 FDA와 INTERACT meeting

- 지침은 INTERACT Meeting 및 IND 제출 전 개발 단계에서 요구되는 최소한의 정보를 제시함. INTERACT Meeting은 신약이나 혁신 의료기기를 개발하는 초기 단계에서 **미국 FDA**로부터 초기 비구속적 조언과 피드백을 받을 수 있는 공식적인 사전 회의 제도로 초기 비임상 연구(proof-of-concept)는 진행했으나 아직 본격적인 독성시험이나 임상시험은 설계하지 않은 혁신 신약 및 복잡한 기술 제품에 대한 개발 방향성을 점검하는 회의임. 이는 INTERACT 회의 및 IND 제출 전 단계에서 NGS와 관련하여 FDA가 기대하는 바를 후원사에게 명확한 틀로 제시함으로써, 후원사가 IND 제출을 준비하는 데 도움을 준다는 점에서 중요한 내용임.
- 예를 들어, INTERACT 회의 단계에서는 분석법에 사용된 편집기 및 작용 기전에 대한 정보가 요구되는 반면, IND 전 단계에서는 데이터 품질, 시퀀싱 깊이 및 정렬에 대한 구체적인 내용을 포함한 시퀀싱 전략과 각 분석에 사용된 시료에 대한 정보가 요구됨.
- FDA는 이전에 유전성 질환이나 기타 질환이 의심되는 증상 있는 개인의 진단을 돕기 위한 전체 엑솜 인간 DNA 시퀀싱(WES) 또는 표적 인간 DNA 시퀀싱에 대한 NGS의 설계, 개발 및 분석적 검증에 관한 구체적인 지침을 발표한 바 있음(Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) - Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Intended to Aid in the Diagnosis of Suspected Germline Diseases |FDA, April 2018)

5. 결론

- 위와 같은 지침 내의 예시를 통해 FDA의 권고안은 **분자 및 유전체 위험을 최소화하기 위한 표준화된 접근법에 초점**을 맞추고 있다고 할 수 있음.
 - **Off-target editing 식별:** 유전체 전체에 민감한 NGS 방법을 활용하여 의도치 않은 편집, 방관자 돌연변이, 그리고 게놈 내 어디에서든 표적 밖 활성을 식별하고 정량화
 - **On-target editing 평가:** 염기서열 충실도를 특성화하고 원치 않는 국소 재배열 없이 원하는 치료 변화가 이루어지도록 정확한 의도된 편집 부위를 분석하는 것.
 - **Genomic integrity 평가:** DNA 이중 가닥 절단을 일으키는 유전자 편집(GE) 기술의 경우, 후원자는 염색체 무결성을 평가. 여기에는 저주파 염색체 전좌 평가와 이러한 사건의 발생률을 보고하여 유전체 안정성을 보장하는 것이 포함됨.
 - **Product Types:** 이 지침은 **ex vivo** (cells edited outside the body) 그리고 **in vivo** (editing occurs directly within the patient) 치료적 접근법(therapeutic approaches) 등 모두에 해당.

- 유전자 치료법 개발의 주요 장애물은 안전성과 효율성이므로, 가장 큰 문제 중 하나는 **환자 세포에 유전자 구조물을 전달**하는 것임. 유전자 전달 방식은 <그림>에서처럼 체외(ex vivo)와 체내(in vivo)로 나뉘며, 각각 다른 경우에 적합. 체외 방식은 주로 혈액 세포 편집, 암 치료 개선, 감염성 질환 치료에 사용됨. 장기 내 세포를 편집하기 위해 개발자들은 체내 방식을 선택함. 각 접근법에는 상당히 다양한 방법이 존재하지만, 안타깝게도 이러한 방법들이 모두 동일한 수준의 효과와 안전성을 보장하는 것은 아님(Volodina 등, 2025)



<참고문헌>

Volodina, O., Smirnikhina, S. The Future of Gene Therapy: A Review of In Vivo and Ex Vivo Delivery Methods for Genome Editing-Based Therapies. *Mol Biotechnol* **67**, 425–437(2025).

FDA, 2018. Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) - Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Intended to Aid in the Diagnosis of Suspected Germline Diseases.

FDA. 2024. Guidance for Industry, Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing,

FDA. 2026. Draft Guidance for Industry; Safety Assessment of Genome Editing in Human Gene Therapy Products Using Next-Generation Sequencing.

112. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Calicheamicin의 linker

- **고찰의 목적:** 최초로 ADC 승인된 시기는 2000년임. 2026년 현재 15종이며 모든 ADC는 항암제임. 올해 당장 우리나라가 1종의 ADC를 승인한다고 가정한다면 ADC 신약 개발에서 약 25년 뒤쳐져 있음. 오늘날 다양한 항암제가 개발되었지만 말기암을 치료할 수 있는 세포·유전자 치료제인 CAR-T가 가장 기술적으로 앞선 개발 항암제 요법이라고 할 수 있음. 그러나 세포·유전자 치료제의 가장 문제점은 환자의 면역세포를 추출해 유전자를 조작하거나 결함이 있는 유전자를 정상 유전자로 교체하는 환자 맞춤 항암제로 접근성이 극히 제한 되었다고 할 수 있음. 국산 1호 CAR-T 치료제 탄생이 되었지만 거의 5억원 정도가 하는 치료비용 및 접근성 등을 비롯하여 고열과 저혈압을 동반하는 사이토카인 방출 증후군(CRS), 의식 저하와 경련을 일으키는 신경학적 독성, 그리고 면역력 저하 등이 독성학적 문제는 여전히 극복해야 할 문제임. CAR-T가 3세대 항암제이면 면역 관문 억제제의 3세대 면역항암제와 기존 1세대 화학항암제의 결합으로 탄생한 Antibody-drug conjugate(항체-약물 접합체)가 4세대의 가장 첨단 항암제임. 현재까지 15종이 개발되었고 여전히 수많은 ADC 개발에 도전하고 있음. 항암제의 대표적인 특성은 치료 효과와 동반하여 부작용도 많다는 것임. **ADC는 이와 같은 off-target toxicity를 극복하고 항암효과를 극대화하는 유도미사일과 같은 항암제임. 그러나 여전히 ADC의 부작용이 보고되고 있으며 이를 극복하는 방법은 ADC의 한층 더 업그레이드를 통한 환자의 안전성을 높이는 핵심 사항이라고 할 수 있음. 이에 본 고찰에서는 승인된 15종 ADC에 분석을 통해 보다 더 안전성이 높이는 ADC 개발에 도움이 목적임.**

1. FDA-approved ADC와 최초의 ADC

1-1) 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체)가 승인됨(Liu, 2025; Mullard, 2026). <표-1>은 지금까지 승인된 15종 ADC의 설계, 승인된 적응증, 표적 등을 요약한 것임.

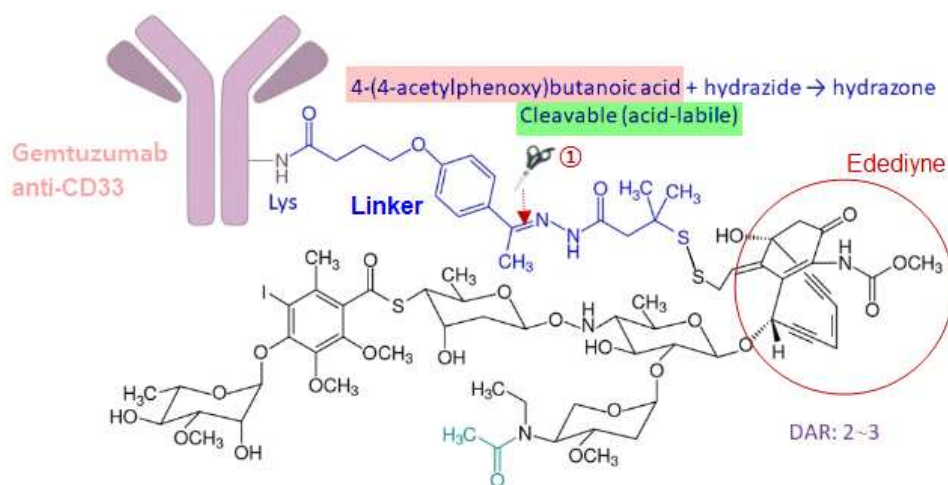
<표-1> FDA 승인된 15종 ADC의 특성 요약

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2000; 2017	급성 골수성 백혈병(AML)
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	2011	HL; sALCL; MF; DLBCL
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2+ BC
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti®	AstraZeneca	CD22	절단 가능	PE38	2018년, 미국 시장에서 단종됨	HCL
Polatuzumab vedotin-piiq	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	2019	DLBCL
Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Se	Nectin-	절단 가능	MMAE	2019	UC

Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	HER2+ 피임약, HER2-저/초저혈 MBC, HER2+ GC, NSCLC
Sacituzumab govitecan	Trodely®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2 - MBC, TNBC
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF	2025년에 재승인 됨	음
Loncastumab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	PBD SG3199	2021	DLBCL
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	2021	자궁경부암
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE™	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	HR+/HER2- BC
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE	2025	비소세포암

1-2) 최초의 ADC payload – Calicheamicin 구조

- 15종의 ADC 중 최초 ADC인 Gemtuzumab ozogamicin의 payload는 Calicheamicin이며 가장 강력한 형태는 <그림-1>에서처럼 항체와 payload를 연결하는 4-(4-acetylphenoxy)butanoic acid임. 그리고, calicheamicin의 enediyne 구조가 라디칼 형태로 활성화되어 암세포의 DNA 이중나선을 절단하여 암세포의 사멸을 유도(Ladror 등, 2024)



N-acetyl-γ calicheamicin 1,2-dimethyl hydrazine dichloride

<그림-1> Gemtuzumab ozogamicin의 구조

2. Calicheamicin-기반 payload로 사용하는 ADC의 비교 분석

2-1) ADC의 3 종류

- Calicheamicin(칼리케아마이신) 기반 항체-약물 접합체(ADC, antibody-drug conjugate)인 겐투주맙 오조가미신(Gemtuzumab ozogamicin, Mylotarg) 및 이노투주맙 오조가미신(Inotuzumab ozogamicin, Besponsa) 등이 있음. <표-2>에서처럼 최근에는 글로벌 제약사 AbbVie가 소세포폐암(SCLC, Small cell lung cancer) 치료를 위해 개발 중인 ADC 치료제 후보물질인 ABBV-011임.

<표-2 Calicheamicin-기반 항체-약물 접합체의 종류

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2017; 2000	급성 골수성 백혈병(AML)
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
임상 1상 진행 (NCT03639194)	ABBV-011	AbbVie	SEZ6(Seizure-related homolog 6)	비절단성	Calicheamicin	개발중	소세포성 폐암

2-2) ADC의 적응증에 따른 Linker의 차이점

- 개발된 Gemtuzumab ozogamicin와 Inotuzumab ozogamicin은 절단형 링커를 이용하였지만, 개발 중인 ABBV-011(NCT03639194)은 비절단성 링커를 사용하였음.
- 이와 같이 절단형 링커와 비절단성 링커를 다르게 사용하는 가장 큰 이유는 가능한 최대 off-target 독성을 막기 위함이고 동시에 약물의 방출 특성을 조절하기 위함임. 이와 같은 이유를 이해하기 위해서는 동일한 calicheamicin payload를 사용하더라도 적응증에 차이점에 대한 이해가 필요함.
- <표-1>에서처럼 **Gemtuzumab ozogamicin**와 **Inotuzumab ozogamicin**의 적응증은 골수 같은 혈액세포를 만들어내는 장기나 또는 면역기능을 수행하는 세포를 만들어내는 장기에서 발생하는 혈액암의 일종인 백혈병(leukemia)임. 반면에 **ABBV-011의 적응증**은 단단한 덩어리로 구성된 고형암의 일종인 소세포성 폐암(small cell lung cancer)임.

2-3) 항체-약물 접합체(ADC)에서 링커의 역할

- ADC의 세 가지 핵심 구성 요소인 항체, 약물, 링커 중에서 링커는 "정밀한 방출"을 보장하는 핵심 요소임. 링커는 단순히 항체와 약물을 연결하는 물리적 "다리"가 아니라, 약물이 언제, 어디서, 어떤 속도로 방출될지를 결정하는 분자 스위치. 이상적인 링커는 다음과 같은 조건을 충족해야 함.

- ① 혈류 내에서 높은 안정성을 유지하여 약물의 조기 누출을 방지
- ② 표적 세포 내부의 특정 신호(효소, pH 또는 환원 환경 등)에 정밀하게 반응하여 약물을 방출
- ③ 항체와 약물의 활성이나 구조에 영향을 주지 않으면서 둘 모두와 호환되어야 함.

2-4) 절단형과 비절단형의 링커 개념과 분류

- 약물 방출 메커니즘에 따라 링커는 <표-3>과 같이 절단형(cleavable type) 또는 비절단형(non-cleavable type)으로 2종류가 있으며 개념은 다음과 같음(Editorial Team 등, 2020; Su 등, 2021; Yang 등, 2025; WuXi Apptec).

① **절단형 링커**: **혈액 순환 중**에는 안정적으로 유지되다가 표적 암세포 내부나 주변의 특정 조건(효소, pH, 환원 환경)에서 선택적으로 절단되어 약물을 방출하도록 설계된 분자(Su 등, 2021). 표적 세포 내에서 특정 생화학적 조건에서 빠르게 분해되어 약물을 빠르게 방출할 수 있음. 이러한 빠른 방출은 짧은 시간 내에 높은 세포독성 농도를 달성하여 표적 세포에 대한 억제 효과를 강화함. 미세소관 억제제나 DNA 손상제와 같이 신속한 작용이 필요한 강력한 세포독성 약물의 경우, 절단 가능한 설계가 치료 잠재력을 극대화할 수 있음. 또한, 이 링커들은 종양과 정상 세포 간의 효소 수준, pH 또는 산화환원 상태의 차이를 활용하여 높은 선택성을 달성할 수 있음. 리소좀 내부의 Cathepsin B 효소에 의해 절단되는 효소 절단성 링커(Enzyme-Cleavable Linkers)로는 리소좀 내 β-글루쿠로니다아제에 의해 분해와 화학적 환경 감응형 링커 (Chemically Labile Linkers)고 분류됨. **<표-1> 중 현재 FDA-승인된 대다수의 ADC 신약이 약 80%가 이와 같은 절단성 링커 기술을 채택하고 있음.**

② **비절단성 ADC(Non-cleavable Antibody-Drug Conjugate)**: 혈류 내에서 약물이 임의로 떨어져 나가지 않도록 고도의 안정성을 확보한 항체-약물 접합체임. 약물 방출을 위해 외부 자극이나 특정 효소 분해 지점을 활용하는 절단성(Cleavable) ADC와 달리, **비절단성 ADC는 세포 내로 흡수된 후 항체 단백질 전체가 완전히 분해되어야만 약물이 활성화됨.**

<표-3> Cleavable Linker와 Non-cleavable Linker의 종류와 특성

Linker 소분류		특성
Cleavable Linker 종류		
효소 절단성 링커 (Enzyme-Cleavable Linkers)	펩타이드 기반 링커 (Peptide Linkers)	• 리소좀 내부의 카텝신 B(Cathepsin B) 효소에 의해 절단
	β-글루쿠로니다 링커 (β-Glucuronidase Linkers)	• 리소좀 내 β-글루쿠로니다아제에 의해 분해
화학적 환경 감응형 링커 (Chemically Labile Linkers)	산성 감응형 히드라존 링커 (Acid-Sensitive Hydrazone Linkers)	• 세포 내부의 엔도솜 및 리소솜의 낮은 pH(약 4.5~5.5) 환경에서 가수분해됨. • 초기 ADC(예: Mylotarg)에 쓰였으나, 혈장 내 안정성이 다소 떨어져 조기 방출 위험이 있다는 단점
	환원 감응형 이황화결합 링커 (Glutathione-Sensitive Disulfide Linkers)	• 세포 내부의 글루타치온(GSH) 농도가 세포 외부(혈액)보다 수백~천 배 높다는 점을 이용함. • 세포 내로 들어가면 이황화 결합이 환원되면서 끊어짐.

		<ul style="list-style-type: none"> 안정성을 높이기 위해 주변 구조에 메틸기를 붙여 입체 장애(Steric hindrance)를 유도하기도 함
Non-cleavable Linker 종류		
리소좀에서 항체의 단백질 분해에 의존성 Linker	SMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)	<ul style="list-style-type: none"> 특징: 가장 대표적인 티오에테르(Thioether) 계열 비절단성 링커로, 시클로헥산 고리가 입체 장애를 일으켜 혈장 내 가수분해를 강력히 억제 적용 치료제: 캐싸일라(Kadcyla, 성분명: T-DM1) — 트라스투주맙 항체에 SMCC 링커를 통해 DM1 페이로드를 결합하여 HER2 양성 유방암 치료에 성공적으로 사용되고 있음. 리소좀 분해 후 최종 활성 물질은 Lysine-MCC-DM1 형태로 방출
	MC (Maleimidocaproyl)	<ul style="list-style-type: none"> 특징: 말레이미드 기반의 선형 알킬 체인 구조로, 면역원성이 낮고 결합 구조가 단순하여 안정성이 뛰어나 적용 치료제: 블렌렙(Blenrep) — 다발성 골수종 치료제로 승인받았으나 이후 효능 지표 미달 등의 이유로 시장에서 철회 및 재조정 과정을 거쳤음 (페이로드: MMAF 결합)

2-5) Calicheamicin-기반 절단형과 비절단형 종류와 독성학적 특성

- 제1세대 ADC인 Gemtuzumab ozogamicin의 linker는 산에 불안정한 dimethyl hydrazine(acid-labile DMH)이었으며 off-target 독성으로 용량을 줄여야 했음. 예를 들어 2000년 승인된 Gemtuzumab ozogamicin에서 산성에 의해 분리된 DMH 대사산물은 독성이 매우 강했으며 전신 방출에 의해 off-target 독성을 더욱 증가시켜 환자의 위험을 초래하였음(Hamann 등, 2002; Dowell 등, 2001). 이와 같은 이유로 Gemtuzumab ozogamicin은 2000년 최초 승인되었으나 안전성 문제로 2010년 자진 철회되었고, 이후 용량과 일정을 최적화하여 2017년 미국 FDA의 재승인을 받았음(Appelbaum 등, 2017).
- 소세포폐암(SCLC) 치료를 위한 ADC인 ABBV-011은 기존의 Calicheamicin-기반 ADC에서 발견되던 산에 불안정한 DMH를 포함하지 않는 새로운 링커인 **LD19.10**과 결합되어 있음.

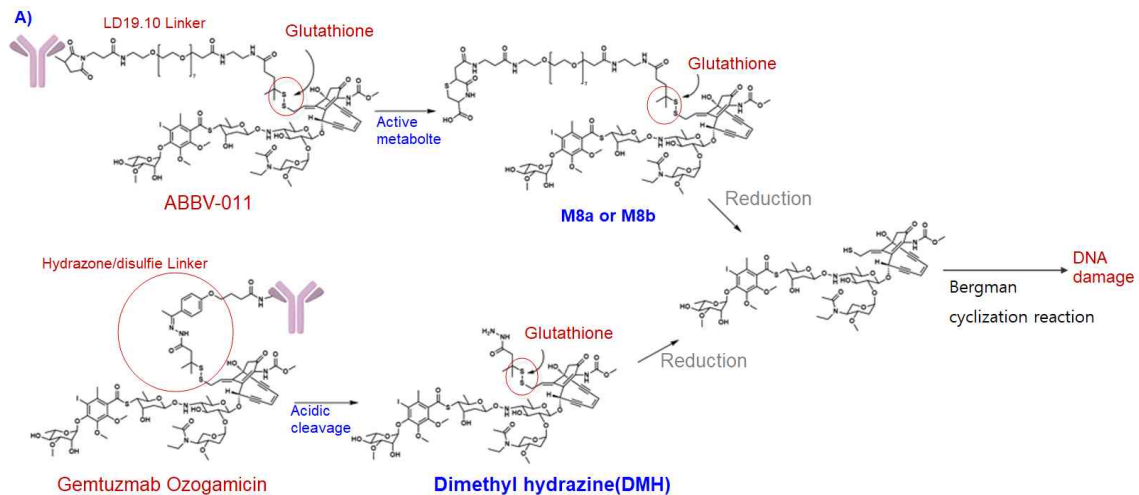
<표-4> Calicheamicin-기반 ADC의 linker 차이

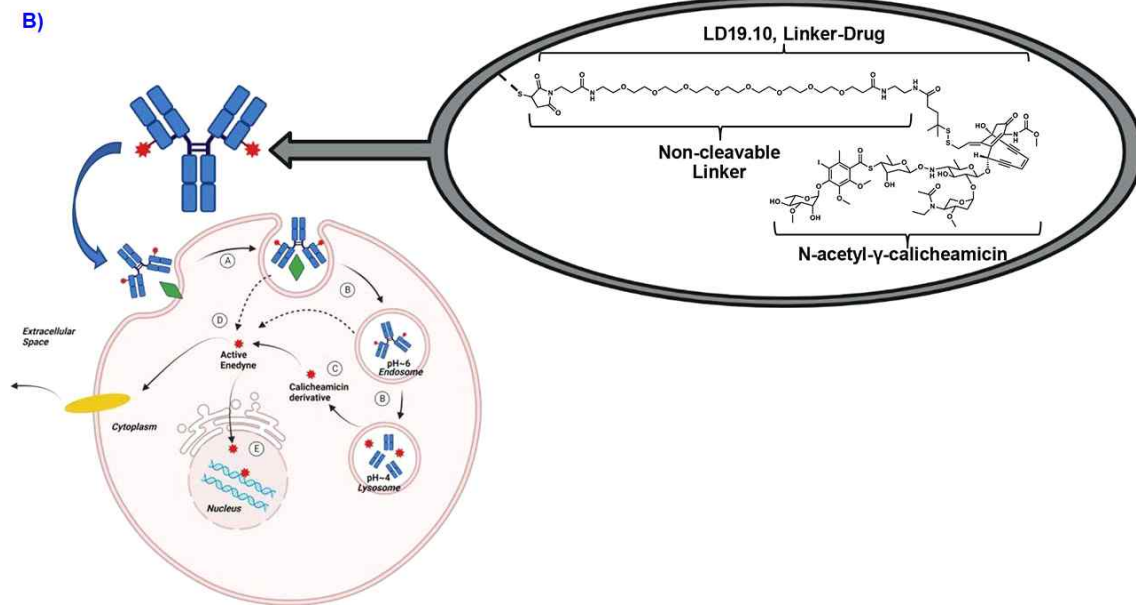
약물	Target	Linker (물질)	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	CD33	절단형 (Hydrazone/disulfide)	Calicheamicin	2000; 2017;	급성 골수성 백혈병 (AML)
Inotuzumab ozogamicin	CD22	절단형 (Hydrazone/disulfide)	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
임상 1상 진행 ABBV-011 (NCT03639194)	SEZ6(Seizure-related homolog 6)	비절단성 (LD19.10)	Calicheamicin	개발중	소세포성 폐암

3. Calicheamicin-기반 ADC의 항암기전 차이에 따른 off-target 독성 차이

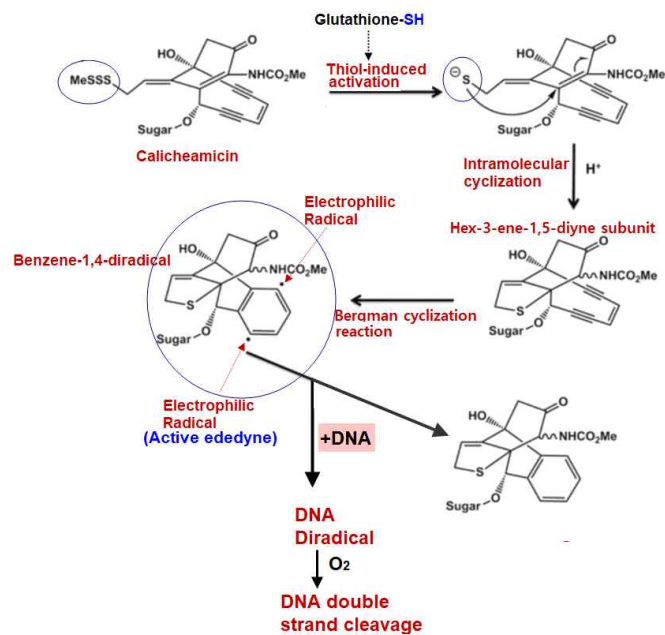
3-1) Calicheamicin-기반 ADC의 linker cleavage site

- <그림-2>의 A)는 Gemtuzumab ozogamicin와 ABBV-011의 DNA damage를 유도하여 암 세포 사멸의 항암기전을 나타나기 전까지 ADC의 Linker 변화를 나타낸 것임. <그림-2>의 B)는 ABBV-011의 linker를 나타낸 것임(Lador 등, 2024). 두 ADC 모두 암세포 내 lysosome에서 payload가 분리되어 세포사멸을 유도함. 즉, Gemtuzumab ozogamicin에서 linker는 암세포의 산성 환경에서 환원 반응을 통해 Dimethyl hydrazine(DMH)이라는 Calicheamicin 유도체를 생성함. DMH 자체가 DNA 이중나선을 절단하는 것이 아니라 <그림-3>에서처럼 glutathione의 환원으로 Calicheamicin의 enediyne 부분에 발생한 benzene-1,4-diradical에 의해 암세포의 DNA 이중나선 절단으로 항암기전이 발생함 (LaMarr 등, 1998; Bouchard 등, 2014). 반면에 ABBV-011은 암세포 내의 리소좀의 단백 분해효소(protease)와 glutathione에 의해 항체에서 분리된 M8a 또는 M8b인 linker+Calicheamicin 형태로 분리된 후 다시 glutathione 환원 반응으로 active edediyne 부분이 benzene-1,4-diradical로 전환 및 이에 의한 암세포의 DNA 이중나선 절단으로 항암기전이 이루어짐(Wiedemeyer 등, 2022).





<그림-2> Gemtuzumab ozogamicin와 NCT03639194(ABBV-011)의 항암기전 유도까지의 payload 전환 과정(A) & LD19.10 linker 구조(B)



<그림-3> Calicheamicin의 전환을 통한 active edediyne인 electrophilic radical 생성기전

3-2) Calicheamicin-기반 ADC의 암세포에서 Calicheamicin 유도체의 독성 차이

① Calicheamicin 유도체 차이에 의한 독성의 강도

- Gemtuzumab ozogamicin의 **Calicheamicin** 유도체인 Dimethyl hydrazine(DMH)은 Table 1에서처럼 1,400 및 1,200 nmol/L의 IC₅₀으로 세포를 5.1 nmol/L로 세포를 강력하게 사멸시키는 것으로 밝혀졌음. DMH가 없는 M8a 및 M8b 대사산물은 각각 1,400 및 1,200 nmol/L의 IC₅₀으로 세포독성을 유발했으며, 이는 DMH보다 200배 이상 약한 효능이었음. 산에 불안정한 링커를 가진 DMH 대사산물이 정상적인 세포독성에 기여할 수 있지만 암 세포에 대한 **높은 긍정적인 치료지수(Therapeutic Index = TD₅₀/ED₅₀)** 달성이 가능. 그러나 이는 혈액암일 경우에만 바람직할 수 있음.
- 반면에 고형 종양의 경우, 종양 내 약물 전달의 어려움을 극복하기 위해 더 높은 용량이 필요하므로 치료 지수가 제한될 수 있음. 즉 효능을 위한 투여량이 많으면 치료지수가 낮아지면 안전성에 문제가 높다는 것을 의미함.

Table 1. Catabolite profiles for ABBV-011 versus Mylotarg.

Catabolite (drug)	<i>In vitro</i> potency (nmol/L)	Detectable in plasma?
DMH (Mylotarg)	5.1	Yes
M8a (ABBV-011)	1,400	ND
M8b (ABBV-011)	1,200	Yes

② Calicheamicin 유도체의 혈장에서 존재

- Table 1에서 혈구(백혈구, 적혈구와 혈소판 등)가 존재하지 않은 혈장(plasma)에서의 Gemtuzumab ozogamicin에서 Calicheamicin 유도체 DMH가 존재함. 반면에, ABBV-011의 Calicheamicin 유도체인 M8a 및 M8b 다소 존재하거나 혈장에 존재하지 않음. DMH가 혈장에 존재한다는 것은 전신혈관계를 통해 전신으로 이동이 가능하다는 것을 의미함. 특히 DMH가 ABBV-011의 Calicheamicin 유도체인 M8a 및 M8b보다 약 200배 정도 독성이 더 강하기 때문에 동일한 용량이 혈장에 존재하더라도 Gemtuzumab ozogamicin이 ABBV-011보다 off-target toxicity가 훨씬 높을 것으로 추정됨. LD19.10 ADC는 간에서 쉽게 분해되지 않아 혈장으로의 분포되는 것은 쉽지 않음.

③ Calicheamicin 유도체의 세포막을 통한 이동

- ADC 약물이 세포 내로 흡수되어 리소솜에 도달하면, 링커는 분해되지 않지만 결합된 항체는 아미노산으로 분해되어 아미노산-링커-저분자 독소 복합체를 형성함으로써 세포 사멸 효과를 발휘함. 이와 같은 과정을 통해 암세포 내의 아미노산-링커-저분자인 ABBV-011의 Calicheamicin 유도체인 M8a 및 M8b는 암세포 막을 통과하지 못하여 외부 및 전신혈관계로 배출이 이루어지지 않아 off-target toxicity를 유발하지 않음(Ladror 등

2024). 반면에 Gemtuzumab ozogamicin의 Calicheamicin 유도체인 DMH는 암세포의 막을 빠져나와 전신혈관계로 유입되어 전신독성을 유발할 수 있음. 그러나 이와 같이 DMH가 암세포 막을 통과하기 때문에 전신독성을 유발할 수도 있지만 <표-5>와 같이 주변 암세포도 사멸하는 Bystander 효과도 기대할 수 있음(Liu 등, 2025, Bargh 등, 2020; Watanabe 등, 2024; B).

<표-5> 절단성 링커 (Cleavable)와 비절단성 링커 (Non-cleavable)의 장단점

특징	절단형 링커 (Cleavable)	비절단형 링커 (Non-cleavable)
방출 메커니즘	특정 환경(효소, pH, 환원 등)에서 링커 자체 분해	항체 전체가 완전히 분해되어야 약물 방출
방출 형태	원래 구조 그대로의 순수 약물(Free Payload)	약물 + 링커 + 아미노산 잔기(예: Lysine) 형태
바이스탠더 효과	있음 (주변 암세포까지 사멸 가능)	없음 (세포막 통과가 어려워 단일 세포만 사멸)
혈장 안정성	상대적으로 조기 방출 위험 존재	매우 우수하며 전신 독성이 적음
대표 치료제	Enhertu, Adcetris, Trodelvy 등	Kadcyla, Blenrep 등

4. 결론: FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Calicheamicin의 linker

- 최초의 ADC인 Gemtuzumab ozogamicin와 **Calicheamicin의 linker인 4-(4-acetylphenoxy)butanoic acid**은 유도체 dimethyl hydrazine(acid-labile DMH)을 생성하여 payload인 calicheamicin와 별개로 독성을 유발할 수 있음.
- 그러나 Dimethyl hydrazine(DMH)은 독성이 강하여 혈관을 통해 off-target toxicity를 유발하는 Gemtuzumab ozogamicin에 의한 전신독성을 유발하는 원인임.
- 이와 같은 DMH에 의한 독성으로 혈액암 치료제인 Gemtuzumab ozogamicin은 2011년 자진 철회 후 용량 조절을 통해 2017년 재승인을 얻음.
- 만약 Gemtuzumab ozogamicin이 고형암 치료제이라면 효능을 위해 더 많은 용량이 필요한 것으로 추정됨. 이는 Gemtuzumab ozogamicin이 고형암의 표적에 도달하기에 많은 어려움이 있기 때문인 것으로 파악됨.
- 소세포폐암 치료제로 개발 중인 ABBV-011은 절단성 링커인 4-(4-acetylphenoxy)butanoic acid을 대신하여 비절단성 링커인 LD19.10 사용함. 두 치료제 모두 동일한 payload인 **Calicheamicin이지만** LD19.10 링커인 경우, 대사산물의 독성이 4-(4-acetylphenoxy)butanoic acid보다 약 200 배 정도 약하여 off-target toxicity가 감소되었으며 특히 큰 분자량으로 인하여 암세포 외부로 유출이 적은 것으로 확인됨. 이는 비록 이웃 암세포에 대한 bystander effect는 없지만 전신혈관계로의 이동이 없어 전신독성의 예방이 가능함.
- 결론적으로 ADC의 가장 중요하게 고려할 점은 효능 외에도 off-target toxicity를 줄여 환자의 안전성을 어떻게 확보하는 것이 관건임. 따라서 효능과 안전성 사이의 균형을 맞추기 위해서는 페이로드 특성, 종양 생물학 및 환자별 요인을 바탕으로 적절한 링커 유형을 선택해야 하는 것이 ADC 개발의 중요한 요소임. 링커 선택은 단순히 화학적 합성의 고려 사항일 뿐만 아니라, 독성·약리학과 임상 전략의 중요한 통합 과정이기도 함. 결과적으로 ADC의 링커 설계는 일반적으로 혈중 유리 약물 농도를 낮추는 데 도움이 되어, off target toxicity를 감소시키는 방향으로 이루어지는 것이 필요함.

<참고문헌>

- Asher Mullard. 2025 FDA approvals Nature Reviews Drug Discovery. 25, 81-87 (2026)
- Lador D, Gu C, Tong V et al., Preclinical Characterization of Catabolic Pathways and Metabolism of ABBV-011, a Novel Calicheamicin-Based SEZ6-Targeting Antibody-Drug Conjugate. Drug Metabolism and Disposition, 2024, 52, 135-142
- Liu X, Wu F, Li Z, Li C, Li X, Yuan Y, Sun X, Du Y, Du X, Wang S, Xu P. Safety assessment of gemtuzumab ozogamicin: real-world adverse event analysis based on the FDA Adverse Event Reporting System. Front Med (Lausanne). 2025 Sep 11;12:1643780.
- Appelbaum FR, Bernstein ID. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. Blood 2017;130:2373-6.
- Hamann PR, Hinman LM, Hollander I, Beyer CF, Lindh D, Holcomb R, et al. Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Bioconjug Chem 2002;13:47-58.
- Dowell JA, Korth-Bradley J, Liu H, King SP, Berger MS. Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. J Clin Pharmacol 2001;41:1206-14.
- Wiedemeyer WR, Gavriluk J, Schammel A, Zhao X, Sarvaiya H, Pysz M, Gu C, You M, Isse K, Sullivan T, French D, Lee C, Dang AT, Zhang Z, Aujay M, Bankovich AJ, Vitorino P. ABBV-011, A Novel, Calicheamicin-Based Antibody-Drug Conjugate, Targets SEZ6 to Eradicate Small Cell Lung Cancer Tumors. Mol Cancer Ther. 2022 Jun 1;21(6):986-998.
- Editorial Team, "FDA Grants Accelerated Approval for Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-negative Breast Cancer", ADC Review (2020), <https://www.adcreview.com/news/fda-grants-accelerated-approval-for-sacituzumab-govitecan-in-metastatic-triple-negative-breast-cancer/>
- Staudacher, Brown, "Antibody drug conjugates and bystander killing: is antigen-dependent internalisation required?", Br J Cancer 117, (2017): 1736-1742, <https://www.nature.com/articles/bjc2017367#citeas>
- WuXi Aptec. A Review on ADC Linkers: Cleavable and Non-Cleavable Linker Design and Stability Evaluation. 2026
- W. A. LaMarr, L. Yu, K. C. Nicolaou, and P. C. Dedon. Supercoiling affects the accessibility of glutathione to DNA-bound molecules: Positive supercoiling inhibits calicheamicin-induced DNA damage. January 6, 1998. 95 (1) 102-107
- Bouchard, Hervé & Viskov, Christian & Garcia-Echeverria, Carlos. (2014). Antibody-drug conjugates - A new wave of cancer drugs. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 24. 10.1016/j.bmcl.2014.10.021.

113. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – MMAE or MMAF used as a peptide payload

- **고찰의 목적:** 최초로 ADC 승인된 시기는 2000년임. 2026년 현재 15종이며 모든 ADC는 항암제임. 올해 당장 우리나라가 1종의 ADC를 승인한다고 가정한다면 ADC 신약 개발에서 약 25년 뒤쳐져 있음. 오늘날 다양한 항암제가 개발되었지만 말기암을 치료할 수 있는 세포·유전자 치료제인 CAR-T가 가장 기술적으로 앞선 개발 항암제 요법이라고 할 수 있음. 그러나 세포·유전자 치료제의 가장 문제점은 환자의 면역세포를 추출해 유전자를 조작하거나 결함이 있는 유전자를 정상 유전자로 교체하는 환자 맞춤 항암제로 접근성이 극히 제한 되었다고 할 수 있음. 국산 1호 CAR-T 치료제 탄생이 되었지만 거의 5억원 정도가 하는 치료비용 및 접근성 등을 비롯하여 고열과 저혈압을 동반하는 사이토카인 방출 증후군(CRS), 의식 저하와 경련을 일으키는 신경학적 독성, 그리고 면역력 저하 등이 독성학적 문제는 여전히 극복해야 할 문제임. CAR-T가 3세대 항암제이면 면역 관문 억제제의 3세대 면역항암제와 기존 1세대 화학항암제의 결합으로 탄생한 Antibody-drug conjugate(항체-약물 접합체)가 4세대의 가장 첨단 항암제임. 현재까지 15종이 개발되었고 여전히 수많은 ADC 개발에 도전하고 있음. 항암제의 대표적인 특성은 치료 효과와 동반하여 부작용도 많다는 것임. **ADC는 이와 같은 off-target toxicity를 극복하고 항암효과를 극대화하는 유도미사일과 같은 항암제임. 그러나 여전히 ADC의 부작용이 보고되고 있으며 이를 극복하는 방법은 ADC의 한층 더 업그레이드를 통한 환자의 안전성을 높이는 핵심 사항이라고 할 수 있음. 이에 본 고찰에서는 승인된 15종 ADC에 분석을 통해 보다 더 안전성이 높이는 ADC 개발에 도움이 목적임.**

1. FDA-approved ADC

- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체)가 승인됨(Liu, 2025; Mullard, 2026). <표-1>은 지금까지 승인된 15종 ADC의 설계, 승인된 적응증, 표적 등을 요약한 것임.

<표-1> FDA 승인된 15종 ADC의 특성 요약

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2000; 2017	급성 골수성 백혈병(AML)
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	2011	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2+ BC
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti®	AstraZeneca	CD22	절단 가능	PE38	2018년, 미국 시장에서 단종됨	HCL
Polatuzumab vedotin-piq	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	2019	미만성 거대 B세포 림프종

Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Seagen	Nectin-4	절단 가능	MMAE	2019	요로상피암 (방광암)
Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	HER2+ 피임약, HER2-저/초저혈 MBC, HER2+ GC, NSCLC
Sacituzumab govitecan	Trodelyv®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2 - MBC, TNBC
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF	2025년에 재승인 됨	재발성 또는 불응성 다발성 골수종
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	PBD SG3199	2021	DLBCL
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	2021	자궁경부암
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE™	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	HR+/HER2- BC
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE	2025	비소세포암

2. MMAE 및 MMAF ADC의 특성

2-1) MMAE 및 MMAF 기반 ADC - 6종

- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체) 중 <표-2>에서처럼 MMAE(Monomethyl auristatin E)와 MMAF(Monomethyl auristatin F)를 payload로 사용한 6종 ADC임. 따라서 현재 항암 시장에서 가장 널리 사용되는 핵심 ADC 플랫폼 중 하나임.
- MMAE(Monomethyl auristatin E)와 MMAF(Monomethyl auristatin F)는 항체-약물 접합체 (ADC, Antibody-Drug Conjugate) 개발에 가장 널리 쓰이는 강력한 세포독성 페이로드(미세소관 저해제). 이 두 페이로드는 화학적 구조와 세포막 투과성에 큰 차이가 있어, 결합하는 링커(Linker)의 설계 방식 역시 명확하게 다름.

<표-2> FDA 승인된 MMAE-기반 ADC 특성

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	Average DAR	승인 연도	적응증
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	4	2011	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종
Polatuzumab vedotin-piiq	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	3.5	2019	미만성 거대 B세포 림프종
Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Seagen	Nectin-4	절단 가능	MMAE	3.8	2019	요로상피암 (방광암)
Belantamab mafodotinblmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF		2025년	재발성 또는 불응성 다발성 골수종
Tisotumab vedotintftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	4	2021	자궁경부암
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE		2025	비소세포암

2-2) MMAE의 화학적 구조: Peptide-기반 ADC

- Figure 16에서처럼 MMAE(Monomethyl Auristatin E)은 천연물 돌라스타틴 10(dolastatin 10)의 합성 유사체로, 튜불린 중합(tubulin polymerization)을 억제하는 강력한 항유사분열제(a potent antimitotic agent). 또한 MMAF(Monomethyl Auristatin F)도 돌라스타틴 10(dolastatin 10)의 합성 유사체로 유사한 기전으로 항암을 유도하는 물질로 ADC Belantamab mafodotinblmf의 payload로 응용됨. MMAE와 MMAF는 일종의 peptide payload의 ADC로 분류됨(Bouchard 등, 2014; Musaimi 등, 2024).
- 독특한 분자구조: MMAE의 분자구조는 아미노산의 복잡한 배열(a complex arrangement of amino acids)과 독특한 5-펩타이드 서열(a unique pentapeptide sequence)을 특징으로 하며, 이는 미세소관 형성에 필수적인 단백질인 튜불린에 대한 높은 친화력을 부여함. 이러한 친화력은 분자 내 기능기의 전략적 배치에 기인하며, 이를 통해 중합을 억제하고 미세소관의 역학을 교란시킴.

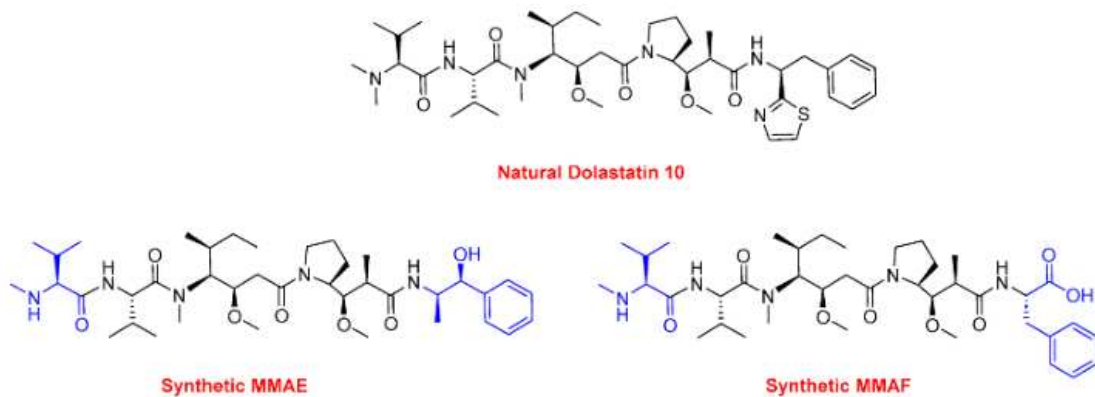


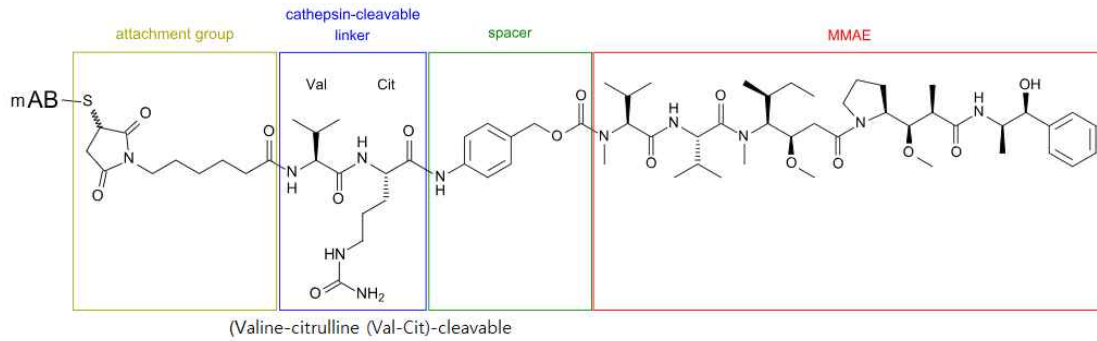
Figure 16. The chemical structure of the natural dolastatin 10, MMAE, and MMAF. Blue: differences from the natural dolastatin 10.

2-3) MMAE와 MMAF 기반 ADC의 linker

- MMAE(Monomethyl auristatin E)와 MMAF(Monomethyl auristatin F)는 항체-약물 접합체 (ADC, Antibody-Drug Conjugate) 개발에 가장 널리 쓰이는 강력한 세포독성 페이로드(미세소관 저해제). 이 두 페이로드는 화학적 구조와 세포막 투과성에 큰 차이가 있어, 결합하는 링커(Linker)의 설계 방식 역시 명확하게 다름.

① MMAE-기반 ADC의 cleavable linker

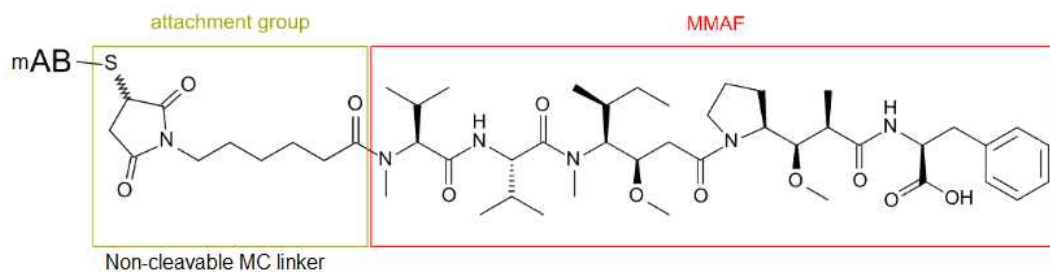
- **MMAE 기반 ADC와 링커 valine-citrulline (Val-Cit)-cleavable linker:** MMAE는 전하를 띠지 않아 세포막을 자유롭게 통과할 수 있음. 따라서 표적 세포 안에서 분해된 후 주위의 표적 음성 암세포까지 죽이는 동반자 효과(Bystander Effect)가 강력함. 혈액 내에서는 안정적이고 세포 내에서만 선택적으로 약물을 방출하기 위해 주로 절단성 링커(Cleavable Linker)를 사용함. Brentuximab vedotin, Polivy, Padcev 등의 payload에 응용됨.
- MMAE는 세포분열 억제제로, 튜불린의 중합을 차단하여 세포 분열을 억제함. 단일클론 항체에 연결된 링커는 세포외액에서는 안정적이지만, cathepsin(카텅신)에 의해 절단되어 항세포분열 기전을 활성화시킴.
- MMAE-mAB 접합체의 구조. 아미노산 발린(Val)과 시트룰린(Cit)으로 구성된 링커(A valine-citrulline (Val-Cit)-cleavable linker)는 종양 세포 내부의 카텅신에 의해 절단됨 (Klement, 2014; Best 등, 2021). Spacer(*para*-aminobenzyl carbamate)는 녹색으로, 카텅신에 의해 절단되는 링커는 파란색으로, attachment group(maleimide와 caproic acid로 구성)는 갈색으로 표시되어 있음. <그림-1>에서 네 개의 상자 안에 있는 전체 라디칼을 vedotin이라고 함.



<그림-1> Structure of a MMAE-mAB-conjugate: A valine-citrulline (Val-Cit)-cleavable linker

② MMAF-기반 ADC의 Non-cleavable linker

- MMAF(Monomethyl Auristatin E)도 dolastatin 10의 합성 유사체이며 MMAE와 동일한 항암기전임. 그러나 MMAF는 비절단 linker인 MC 링커(Maleimidocaproyl linker)의 ADC payload임.
- MMAF는 C-말단에 음전하를 띠는 카르복실기(Charged Phenylalanine)를 가지고 있어 세포막을 통과하지 못함. 따라서 표적 세포 내에서만 작용하며 주변 정상 세포를 공격하지 않아 안전성이 높지만, 바이스텐더 효과는 없음
- MC(Maleimidocaproyl) linker는 **비절단성(Non-cleavable) 링커**로 효소에 의해 잘리지 않고, ADC가 세포 내로 세포내섭취(Endocytosis)된 후 항체 단백질 전체가 아미노산 단위로 완전히 분해(Lysosomal degradation)되면서 약물이 방출됨. 최종 방출 형태는 미세소관 저해 활성을 유지하는 링커 조각이 붙은 Cys-MC-MMAF 형태됨<그림-2>.



<그림-2> Structure of a MMAF-mAB-conjugate: Maleimidocaproyl-noncleavable linker

③ MMAE vs MMAF 링커 설계 핵심 비교

<표-2> MMAE vs MMAF 링커 설계 핵심 비교(BenchChem, 2026)

Payload 항목	MMAE (Vedotin 계열)	MMAF (Mafodotin 계열)
주요 링커 유형	절단성 (Cleavable) (주로 Val-Cit 부착)	비절단성 (Non-cleavable) (주로 MC 단독)
세포막 투과성	높음 (친지질 성 고유 구조)	낮음 (C-말단 음전하 유래)
바이스탠더 효과	있음 (주변 이질성 암세포 공격 가능)	없음 (표적 암세포 내부 유실 제한)
링커 유래 독성	조기 방출 시 전신독성 우려 있음	전신 혈액 내 안정성이 비교적 우수함

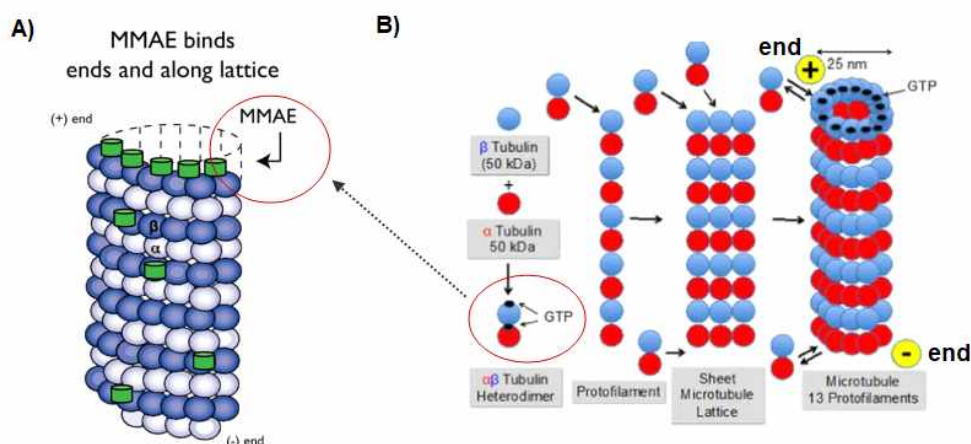
④ 하나의 항체에 이질적 Dual-Payload의 개발

- Val-Cit-MMAE, MC-Val-Cit-MMAE, MC-Val-Cit-PABC-MMAE 및 MC-MMAF와 같이 이미 ADC 의약품에 사용되고 있는 MMAF/MMAE-링커 접합체 외에도, BOC Sciences는 MMAE/MMAF 페이로드 기반 즉, 두 약물의 장점을 결합하여 종양 이질성을 극복하기 위해, 하나의 항체에 MMAE(절단성)와 MMAF(비절단성)를 동시에 접합하는 듀얼 페이로드(Dual-Payload) ADC 링커 기술도 활발히 개발하고 있음(BOC Sciences, 2026).

3. MMAE와 MMAF의 항암기전과 독성기전

3-1) 항암기전 (Mechanism of Action)

① **Tubulin Heterodimer inhibition(튜블린 이량체 중합 억제):** MMAE는 세포 내 용해성 α/β 튜블린 이량체(tubulin heterodimer)에 약 1:1 비율로 결합함. 이 결합은 튜블린 단백질이 길게 연결되어 미세소관(microtubule) 구조를 형성하는 '중합 과정'을 직접 방해함(Best 등, 2021).<그림-3>



<그림-3> MMAE에 의한 α/β 튜블린 이량체(tubulin Heterodimer)과 미세소관 형성 방해

② **미세소관 구조적 결합 및 동역학 억제(polymerization Inhibition)**: 이미 형성되어 있는 미세소관의 말단과 외벽에도 높은 친화력으로 결합합니다. 미세소관이 늘어나고 줄어드는 동역학(Dynamics)을 억제하며 기하학적 결합을 유도해 탈중합(Depolymerization)을 촉진 (Hingorani 등, 2022).

③ **G2/M기 세포 주기 정지(Cellular Arrest)**: 암세포가 분열할 때 복제된 염색체를 양쪽으로 끌고 가려면 미세소관으로 이루어진 '방추사'가 완벽하게 작동해야 함. MMAE에 의해 방추사 형성이 차단되면 암세포는 세포 분열 M 단계(Mitosis)에서 진행을 멈추고(**G2/M Arrest**) 결국 세포사멸(Apoptosis)로 이어짐(Stagg 등, 2021).

3-2) 부작용

- 이와 같이 MMAE는 강력한 항암 미세소관 표적제(MTA, microtubule-targeting agent)로, 다양한 유형의 암 치료를 위해 ADC와 임상 개발 중인 다수의 ADC에서 유효 성분으로 사용되고 있음.
- 그러나 MMAE-기반 ADC는 **말초 신경병증(peripheral neuropathy)**을 유발할 수 있는데, 이는 치료 용량 감소나 중단, 그리고 그에 따른 많은 MMAE-ADC 임상시험의 조기 종료로 이어지는 빈번한 부작용임. MMAE-ADC에 의해 유발되는 말초 신경병증은 말초 신경에서 ADC가 비특이적으로 흡수되고 MMAE가 방출되어 미세소관이 파괴되고 신경 퇴행이 발생하기 때문으로 추정됨.
- 미세소관 안정화제를 투여받은 암 환자 4,367명을 대상으로 한 체계적 문헌고찰에 따르면, 중증 말초신경병증(3등급 또는 4등급)의 전체 발생률은 30%에 달하는 것으로 나타났음(Lee 등, 2006). 분석을 MMAE payload를 함유한 ADC로 제한했을 때, 말초 신경병증의 3등급 또는 4등급 **독성 발생률은 6.5%(90% 신뢰구간, 4.4%–9.4%)였음(Masters 등, 2018)**. MMAE 기반 ADC를 조사한 임상시험에서 보고된 말초 신경병증 발생률은 <Table 2>에 요약되어 있음(Fu 등, 2023).

Table 2. MMAE-based ADC를 조사한 임상시험에서 보고된 말초 신경병증 발생률

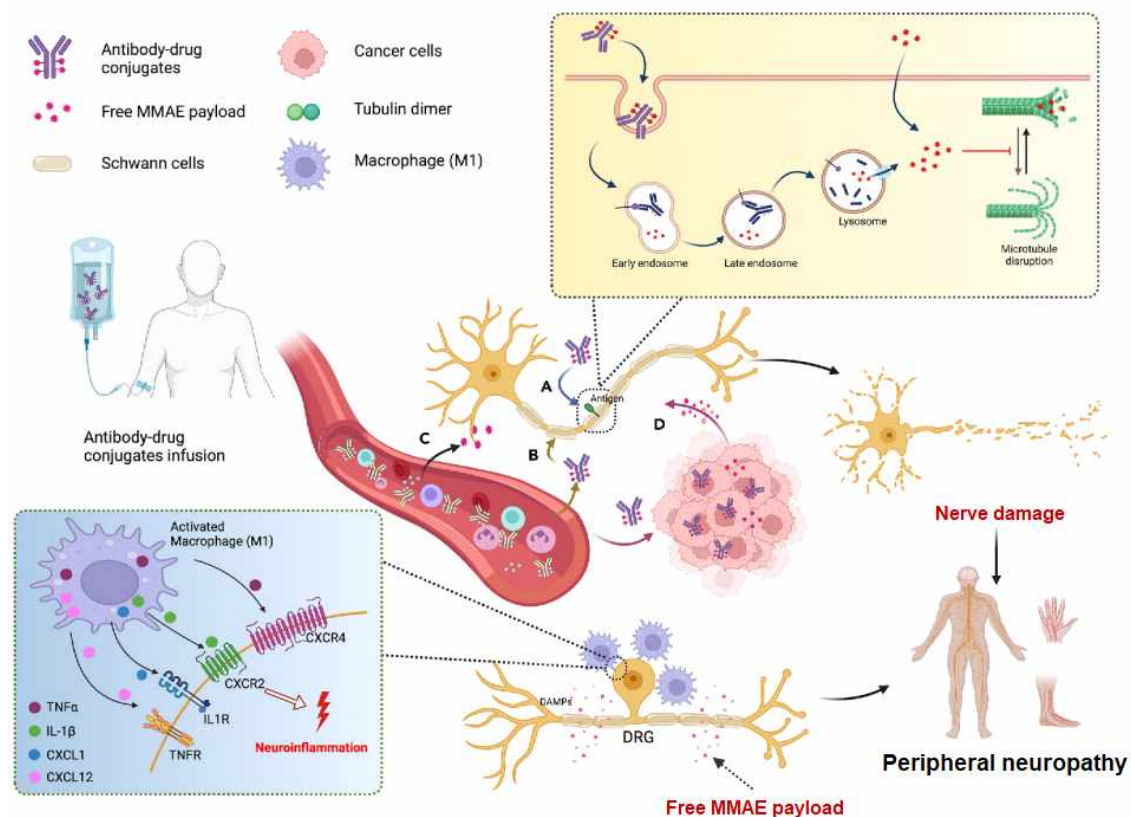
Drugs	Indications	No. of patients	Incidence (%)		Reference
			Any-grade	Grade 3 or 4	
Brentuximab vedotin	Relapsed/refractory CD30-positive HL and ALCL	45	22%	0%	Anas Younes (2010)
	Relapsed/refractory systemic ALCL	58	41%	12%	Barbara Pro (2012)
	Relapsed/refractory CD30-positive NHL	35	–	9%	Steven Horwitz (2014)
	CD30-positive B-cell lymphomas, including DLBCL and other B-cell	68	26.5%	2.9%	Eric D. Jacobsen (2015)

	lymph				
	CD30-positive mycosis fungoides or primary cutaneous ALCL	66	67%	9%	H Miles Prince (2017)
	CD30-positive PTCL ^a	223	52%	4%	Steven Horwitz (2019)
	Stage III or IV classic HL ^a	662	66%	1.6%	Stephen M. Ansell (2022)
Polatuzumab vedotin	Relapsed/refractory B-cell NHL and CLL	45	27%	9%	Maria Corinna A Palanca-Wessels (2015)
	Relapsed/refractory DLBCL ^a	39	43.6%	0%	Laurie H. Sehn (2020)
	CD20-positive DLBCL ^a	435	52.9%	1.6%	H. Tilly (2022)
Enfortumab vedotin	Locally advanced or metastatic UC who had previously received platinum-based chemotherapy and previously treated with PD-1 or PD-L1 inhibitors.	296	46.3%	5.1%	Thomas Powles (2021)
	Locally advanced or metastatic UC previously treated with PD-1 or PD-L1 inhibitors	125	40%	2%	Evan Y Yu (2021): Cohort 1
	Locally advanced or metastatic UC previously treated with PD-1 or PD-L1 inhibitors	89	54%	7.9%	Evan Y Yu (2021): Cohort 2
Disitamab vedotin	HER2-positive locally advanced or mUC who previously failed at least one line of systemic chemotherapy	43	46.3%	2.3%	Xinan Sheng (2021)
	HER2-positive locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer who were under at least second-line therapy	125 ^b	40%	3.2%	Zhi Peng (2021)
Tisotumab vedotin	Relapsed, advanced, or metastatic cancer of the ovary, cervix, endometrium, bladder, prostate, esophagus, HNSCC or NSCLC	147	21%	1%	Johann S de Bono (2019)
	Recurrent or metastatic cervical cancer	55	36%	4%	David S Hong (2020)
	Recurrent or metastatic cervical cancer who had received no more than two prior systemic regimens	101	8%	2%	Robert L Coleman (2021)
	Japanese patients with advanced solid malignancies	17	17.6%	0%	Kan Yonemori (2022)

ALCL, anaplastic large-cell lymphoma; HL, Hodgkin's lymphoma; PTCL, peripheral T cell lymphomas; NHL, non-Hodgkin lymphomas; CLL, chronic lymphocytic leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; UC, urothelial carcinoma; NSCLC, non-small-cell lung cancer; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma.

3-3) MMAE-ADC 투여에 의한 말초 신경병증(peripheral neuropathy) 발생기전

- 최근 연구들은 말초 신경병성 통증의 발병에 대식세포가 기여한다는 증거를 점점 더 많이 제시하고 있음((Silva 등, 2021; Yu 등, 2020). 구체적으로, 미세소관 표적 약물에 의해 신경 손상이 유발되는 경우, 슈반 세포가 활성화되어 손상 관련 분자 패턴(DAMPs, damage-associated molecular patterns)을 생성하며, 이는 차례로 염증성 대식세포인 M1형 대식세포와 같은 순환 백혈구를 손상 부위로 유인함(Bedoui 등, 2022; Donnelly 등, 2020). 정상적인 상황에서는 상주하는 대식세포는 항염증성 대식세포인 M2형 아형 대식세포이며, 이들은 조직의 항상성을 유지하고 말초 신경계를 손상으로부터 보호하는 역할을 함(Chowdhury 등, 2023). 그러나 대식세포 집단의 염증성 M1형 대식세포로의 전환은 IL-1 β , TNF α , CXCL1, CXCL12 등을 포함한 다양한 전염증성 사이토카인의 분비를 촉진함. 이러한 사이토카인은 <그림-4>에서처럼 신경염증을 유발하고 통각 정보를 DRG(dorsal root ganglion, 등근 신경절) 뉴런으로 전달하여 통증 지각을 유발함(Kiguchi 등, 2017; Chen 등, 2020)



<그림-4>. MMAE 기반 항체-약물 접합체(ADC)와 관련된 말초 신경병증의 가능한 기전: (A) 표적 의존적 ADC 흡수. (B) 건강한 세포에 의한 ADC의 비특이적 흡수. (C) 순환 중 MMAE의 조기 방출. (D) MMAE 기반 ADC의 방관자 효과. MMAE가 직접적 경로(자유 MMAE) 또는 간접적 경로(MMAE 기반 ADC의 흡수 및 MMAE 방출)를 통해 말초 신경 세포에 흡수되면, MMAE는 미세소관 전체에 걸쳐 풍부한 결합 부위에 결합하여 미세소관 네트워크를 파괴함으로써 말초 신경병증을 유발함. 또한, 미세소관을 표적으로 하는 약물로 인해 신경 손상이 발생하는 경우, 슈반 세포가 활성화되어 손상 관련 분자 패턴(DAMPs, damage-associated molecular patterns)을 생성하고, 이는 차례로 M1형 대식세포와 같은 순환 백혈구를 손상 부위로 유인함. 이는 IL-1 β , TNF α , CXCL1, CXCL12 등을 포함한 다양한 전염증성 사이토카인의 방출을 촉진함. 이러한 사이토카인은 신경염증을 유발하고 통각 정보를 DRG(dorsal root ganglion, 등근 신경절) 뉴런으로 전달하여 통증을 느끼게 함. 그림은 BioRender.com을 사용하여 제작되었음. (Fu 등, 2023)

3-4) MMAE-ADC의 Linker

- 승인된 5가지 MMAE 기반 ADC 모두에서 <표-3>에서처럼 MC-VCit-PABC 또는 MC-VC-PABC는 효소 절단형(Cathepsin cleavable) 링커(Linker) 구조

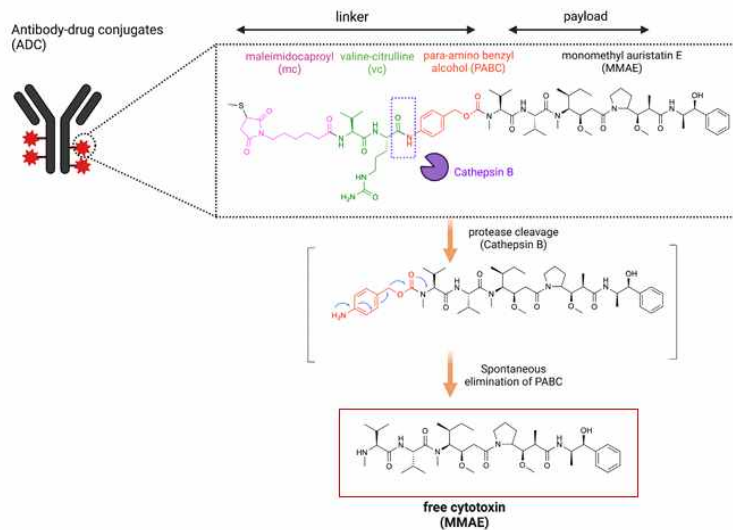
<표-3>MMAE 기반 ADC의 MC-VCit-PABC linker

First Approved	Drug Name	Trade Name	Target	Linker Type	Payload	DAR
2011 (FDA)	Brentuximab vedotin	Adcetris	CD30	MC-VCit-PABC	MMAE	4 (Cys)
2019 (FDA)	Polatuzumab vedotin	Polivy	CD79b	MC-VCit-PABC	MMAE	3-4 (Cys)
2019 (FDA)	Enfortumab vedotin	Padcev	Nectin-4	MC-VCit-PABC	MMAE	3.8 (Cys)
2020 (FDA)	Belantamab mafodotin	Blenrep	BCMA	MC (Non-cleavable)	MMAF	4 (Cys)
2021 (FDA)	Tisotumab vedotin	Tivdak	TF	MC-VCit-PABC	MMAE	4 (Cys)
2025 (FDA)	Telisotuzumab vedotin	Emrelis	c-Met	MC-VCit-PABC	MMAE	3.1 (Cys)

약어: MC(maleimidocaproyl), VC 또는 VCit(valine-citrulline), PABC(para-amino benzyloxycarbonyl)

3-5) 부작용의 기전 추정 - free MMAE의 조기 방출

- MC-VCit-PABC 링커는 다음과 같이 3가지 요소를 구성됨
 - ① **MC (Maleimidocaproyl):** 항체의 시스테인(Cysteine) 티올기(thiol)와 결합하는 부위
 - ② **VCit 또는 VC (Val-Cit / Valine-Citrulline):** 종양 세포 내부의 카텡신(cathepsin) B 효소에 의해 인식되고 절단되는 다이펩타이드(Dipeptide) 서열
 - ③ **PABC (p-aminobenzyloxycarbonyl):** VC가 절단된 후 스스로 분해(Self-immolative, 자기 희생)되며 최종적으로 약물(Payload)을 방출하는 스페이서(Spacer)
- MC-VC-PABC-MMAE 약물/링커 복합체<그림-5>인 Vedotin은 카텡신 B에 의한 발린-시트룰린 디펩티드 링커의 프로테아제 절단 후 PABC의 자발적 제거를 거쳐 세포독성 물질인 MMAE를 본래의 형태로 방출함. 카텡신 B(Cathepsin B)는 포유류 리소좀에서 주로 발현되는 리소좀 protease이며, 다양한 유형의 암세포에서 과발현되는 것으로 알려져 있음(Dorywalska 등, 2016). 따라서, 카텡신 B는 표적 암세포에서 MMAE 유효 성분을 정확하고 효과적으로 방출할 수 있게 함. "MC-VC-PABC-MMAE" 링커-약물 복합체의 설계는 카텡신 B에 의한 VC 그룹의 인식을 보장할 뿐만 아니라, 생성물로서 자유 MMAE를 방출하여 인접한 항원 음성 세포로 확산시켜 bystander effect를 달성할 수 있게 함(Singh 등, 2019). "MC-VC-PABC-MMAE" 링커-약물 복합체를 포함하는 ADC는 생리학적 조건에서 더 큰 전신적 안정성을 보이지만, 인간의 neutrophil elastase(호중구 엘라스타제)와 같은 **serine protease**가 순환 중인 "MC-VC-PABC" 링커를 절단하여, 과도한 독성을 지닌 유리(free) MMAE가 조기에 방출되어 원치 않는 off-target toxicity를 유발하는 것으로 알려져 있음(Zhao 등, 2017; Fu 등, 2023).



<그림-5> MMAE 기반 항체-약물 접합체 (ADCs): MC-VC-PABC 가분해성 링커는 페이로드와 항체 간의 접합에 사용되며, 이는 티올 반응성 말레이미도카프로일(MC) 그룹, 발린-시트룰린(VC) 디펩티드, 및 파라-아미노벤질옥시카르보닐(PABC) 스페이서로 구성됨. MC-VC-PABC-MMAE 약물/링커 복합체인 베도틴(Vedotin)은 카텝신 B에 의해 발린-시트룰린 디펩티드 링커가 프로테아제 절단되고, PABC가 자발적으로 제거되어 세포독소 MMAE가 본래의 형태로 방출됨(Fu 등, 2023).

3-6) 인체 neutrophil elastase(호중구 엘라스타제) - 혈장에서의 free-MMAE 증가

- **FIGURE 1은 TV(tisotumab vedotin) ADC의 2가지 용량**을 정맥 투여 후 혈장에서 TF-ADC(tissue factor to antibody–drug conjugate, 조직 인자-항체-약물 접합체) 용량과 free-MMAE가 용량 증강에 따라 비례적으로 증가하는 것이 확인됨(Yonemori 등, 2022).

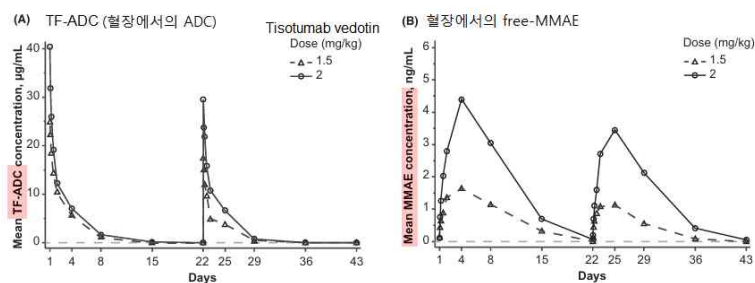
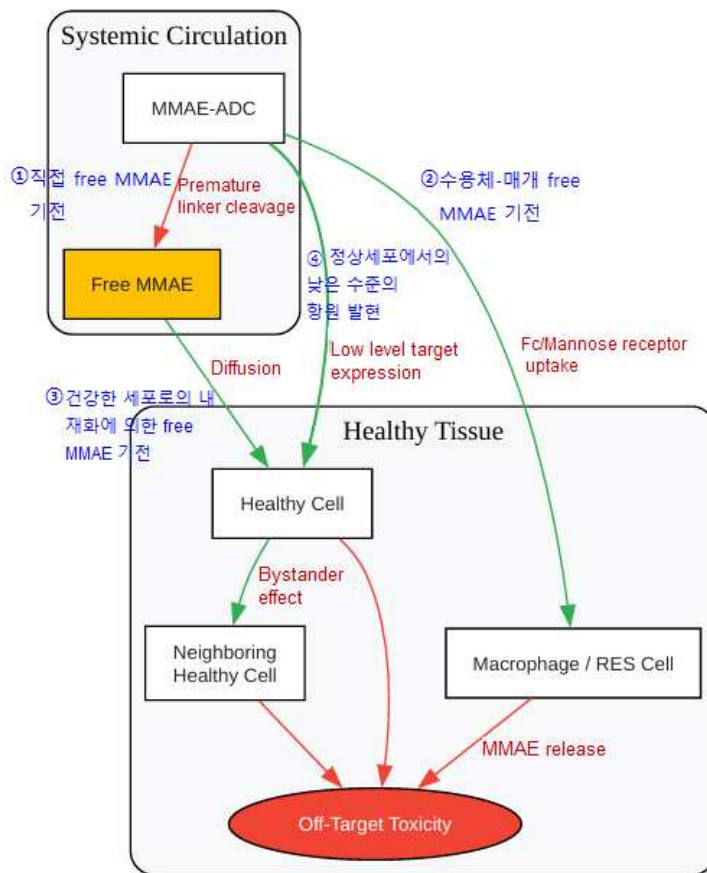


FIGURE 1 TV(tisotumab vedotin) ADC 및 free MMAE의 약동학 프로파일. Plasma concentrations of the ADC (A) and free MMAE (B) in plasma from patients in the dose escalation cohort. The gray dashed line represents the lower limit of quantitation. ADC, antibody–drug conjugate; MMAE, monomethyl auristatin E; **TF-ADC, tissue factor to antibody–drug conjugate(조직 인자-항체-약물 접합체);** TV, tisotumab vedotin

- 이들 혈장 MMAE는 말초 신경세포에서 직접 접근법(free MMAE) 또는 간접 방법(MMAE 기반 ADC 흡수로 MMAE 방출)을 통해 존재할 수 있음. MMAE는 미세소관 길이를 따라 풍부한 결합 부위에 결합하여 미세소관 네트워크를 교란시켜 말초 신경병증을 유발하는 것으로 추정됨(Fu 등, 2023). 아래의 <그림-6>에서처럼 혈장에서의 free MMAE는 인간의 neutrophil elastase(호중구 엘라스타제)와 같은 **serine protease에 의해** 순환 중인

“MC-VC-PABC” 링커를 절단에 의한 직접법에 기인함. 반면에 비표적 세포, 특히 대식세포와 같은 망상내피계의 세포는 Fc 수용체와 mannose receptor를 통한 수용체 매개 endocytosis를 통해 ADC를 흡수할 수 있음(Gorovits 등, 2012; Nguyen 등, 2023). 이와 같은 Fc 및 mannose receptor(MR/CD206) 매개에 의한 free MMAE 유도 독성이라고함. 또한 건강한 대식세포나 단핵구에 내화되면, 링커 또는 ADC는 분해되어 막 투과성 MMAE를 방출함(Donaghy 등, 2016). 요약하면 ① 혈액 내에서 직접 발생한 free MMAE, ② Fc 및 mannose receptor 매개에 의한 free MMAE 기전, ③ 조직의 건강한 세포로의 내재화에 의한 free MMAE 기전, 그리고 ④ 정상세포의 낮은 수준의 암세포성 항원 발현 등의 4가지를 통해 free MMAE 생성 기전



<그림-6> Free MMAE의 혈중으로의 방출 4가지 경로

4. 결론: MMAE 기반 항체-약물 접합체(ADC)의 off-target toxicity 감소 전략

1) 비표적 독성과 원인

1-1) 비표적 독성(off-target toxicity)

- MMAE 기반 ADC에 의한 off-target toxicity의 대표적인 질환은 말초 신경병증(peripheral neuropathy)임.
- 미세소관 안정화제를 투여받은 암 환자 4,367명을 대상으로 한 체계적 문헌고찰에 따르면, 중증 말초신경병증(3등급 또는 4등급)의 전체 발생률은 30%에 달하는 것으로 나타났음(Lee 등, 2006). 분석을 MMAE payload를 함유한 ADC로 제한했을 때, 말초 신경병증의 3등급 또는 4등급 독성 발생률은 6.5%(90% 신뢰구간, 4.4%–9.4%)였음(Masters 등, 2018). 이외에도 호중구 감소증(neutropenia), 각막 손상에 의한 시력 문제 등이 있음(Richardson 등, 2023; Mao 등, 2024)

1-2) 비표적 독성의 4대 기전

- 이와 같이 MMAE payload를 함유한 ADC에 의한 말초 신경병증의 원인으로 순환계서의 직접적 또는 간접적 free MMAE 생산에 기인하는 것으로 추정되었음(Yonemori 등, 2022; Fu 등, 2023). 이와 같은 혈장 free MMAE 존재는 다음과 같이 4가지 기전으로 설명되고 있음

- ① 혈중에서 MMAE가 조기 방출되어 건강 조직에 확산을 유도하는 링커 불안정성에 의한 기전
- ② Fc 수용체 및 mannose receptor에 의한 비특이적 세포의 ADC를 흡수하는 비표적 세포 섭취 즉, 거대음세포작용(macropinocytosis)에 의한 기전
- ③ MMAE가 표적 세포에서 빠져나와 주변 정상 세포 손상을 유도하는 Bystander 효과에 의한 기전
- ④ 정상 조직에서도 낮은 수준의 항원이 발현되어 독성 발생하는 항원 발현에 의한 기전

2) 비표적 독성과 원인

- 다음의 <표-4>는 MMAE 기반 ADC의 전임상 개발 과정에서 흔히 겪는 문제에 대한 해결 가이드임.

<표-4> MMAE 기반 ADC의 부작용 예방 및 감소를 위한 방안

Observed issue (Free MMAE에 의한 독성)	Potential cause(잠재적 원인)	Troubleshooting Steps & Recommendations(문제 해결 단계 및 권장 사항)
<p>항원-negative 세포주에서 높은 시험관 내 세포독성.</p> <p><High in vitro cytotoxicity in antigen-negative cell lines></p>	<p>1. 배양 배지 내 MMAE가 조기 방출되는 것은 링커 불안정성으로 인한 것임.</p> <p>2. 세포가 거대음세포작용(Macropinocytosis)이나 Fc 수용체 결합과 같은 메커니즘을 통해 ADC를 비특이적으로 흡수</p> <p>3. ADC의 소수성(hydrophobicity)은 세포와의 응집과 비특이적 상호작용을 유발함</p>	<p>1. 링커 안정성 평가(Assess Linker Stability): MMAE 방출 속도를 시간에 따른 정량화하기 위해 플라즈마 안정성 분석법(plasma stability assay)을 수행함. 안정성 향상을 위해 링커를 재설계하거나 절단 불가능한 링커를 탐색하는 것을 고려(BenchChem, 2026).</p> <p>2. 비특이적 흡수 평가(Evaluate Non-Specific Uptake): 비표적 ADC 대조군(같은 링커를 약물이지만 관련 없는 항체를 사용하는 ADC)을 사용하여 비특이적 흡수와 세포독성을 정량화(BenchChem, 2026). 비특이적 흡수가 높다면, 항체의 Fc 영역을 설계하여 Fc 수용체 결합을 줄이는 것을 고려할 수 있음.</p> <p>3. 친수성 증가(Increase Hydrophilicity): 비특이적 결합과 응집을 줄이기 위해 polyethylene (B3416737) glycol (PEG)과 같은 친수성 모이에티(hydrophilic moieties)를 링커에 포함시킴(BenchChem, 2026; Li 등, 2022).</p>
<p>ADC 저용량의 동물모델에서 유의미한 체중 감소 또는 혈액학적 독성(예: 호중구감소증).</p> <p><Significant body weight loss or hematological toxicity (e.g., neutropenia) in animal models at low ADC doses></p>	<p>1. ADC의 빠른 제거 및 비특이적 흡수, 특히 간 및 조혈 세포에 의한 것(BenchChem, 2026).</p> <p>2. 높은 약물 대 항체 비율(DAR)은 더 빠른 제거와 독성 증가로 이어짐(BenchChem, 2026).</p> <p>3. 생체 내 링커의 불안정성으로 인해 전신적으로 자유 MMAE 분비가 발생했음(BenchChem, 2026). 호중구 감소증은 골수 내 호중구가 분비하는 세린 프로테아제에 의한 VC-링커의 세포외 절단에 의해 발생할 수 있음(코매 등, 2017).</p>	<p>1. 약물동학 최적화: 링커 변형을 통해 ADC의 친수성을 높여 클리어런스를 낮추고 비특이적 조직 축적을 줄임(BenchChem, 2026; Liu 등, 2023).</p> <p>2. DAR(drug-to-antibody ratio) 최적화: 더 낮고 균질한 DAR을 목표로 하세요. 부위 특이적 활용법은 일관된 DAR 2 또는 4를 달성하는 데 도움을 주며, 이는 종종 더 나은 치료 창을 제공함(Probst 등, 2025; BenchChem, 2026)</p> <p>3. 생체 내 링커 안정성 평가: 혈장 내 자유 MMAE 측정을 위한 약동학 연구를 수행하세요. 만약 링커가 불안정하다면, 대안 링커 화학을 고려할 수 있음(BenchChem, 2026).</p>
<p>저표적 항원 발현을 가진 조직에서 온표적 및 오프 종양 독성.</p> <p><On-target, off-tumor toxicity in tissues with low target antigen expression></p>	<p>표적 항원은 건강한 조직에 발현되어 ADC 결합과 그에 따른 독성을 유발(BenchChem, 2026).</p>	<p>1. 친화력 최적화(Affinity Optimization): 항체가 표적 항원에 대한 친화도를 낮게 설계하여, 항원 발현이 낮은 건강한 조직을 보존하면서도 항원 발현이 높은 종양 세포에 효과적일 수 있습니다.</p> <p>2. Masked 항체 사용(Use of Masked Antibodies): Probody™ 치료법과 같은 전략을 사용하는데, 이는 항체의 결합 부위를 가려두고 종양 미세환경에서만 활성화되는 방법임(Gorovits 등, 2021).</p>

<p>안구 독성. <Ocular Toxicity></p>	<p>페이로드가 각막에 미치는 비표적 효과. MMAE와 관련된 오리스타틴인 MMAF 모두 안구 독성과 관련이 있음. MMAE 페이로드는 빠르게 재생되는 각막 상피 세포에 세포독성 효과를 가할 수 있음(Marshall 등, 2024; Richardson 등, 2024; Mao 등, 2024).</p>	<p>1. 용량 감소 및 중단: 안구 부작용이 발생할 경우 권장 용량 조정 지침을 준수(Richardson 등, 2023).</p> <p>2. 완화 전략(Mitigation Strategies): 치료 중 권장되는 안과 관리 전략을 실천(Richardson 등, 2023).</p> <p>3. 탑재체 선택(Payload Selection): 향후 ADC 설계에서는 안구 독성이 큰 우려라면 투과성이 낮은 페이로드를 고려(BenchChem, 2026)</p>
--	---	--

<참고문헌>

- Marshall, Rayna & Xu, Hannah & Berkenstock, Meghan. (2024). Ocular toxicities associated with antibody drug conjugates. *Current opinion in ophthalmology*. 35. 10.1097/ICU.0000000000001063.
- Liu H, Xiao Y, Wang G, Shen W, Wang L, Shanq X, et al. 1407 Expanding the therapeutic index of MMAE-based antibody-drug conjugates (ADCs) with a novel linker system (LD343). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2023;11:.
- Probst, Philipp & Attinger-Toller, Isabella & Bertrand, Romain & Stark, Ramona & Santimaria, Roger & Schlereth, Bernd & Grabulovski, Dragan & Spycher, Philipp. (2025). Broadening the Therapeutic Window of ADCs Using Site-Specific Bioconjugation Showcased by an MMAE-Containing Peptide Linker in a CD79b-Targeting ADC. *Molecular Cancer Therapeutics*. 24. 803-815. 10.1158/1535-7163.MCT-24-0983.
- BenchChem. Technical Support Center: Mitigating Off-Target Toxicity of MMAE-Based ADCs. 2026.
- BenchChem. A Head-to-Head Comparison of ADC Linker Stability: MMAE-SMCC vs. mc-vc-PAB-MMAE. 2026.
- BenchChem. Technical Support Center: Reducing Off-Target Toxicity of MMAE-Based ADCs. 2026.
- Gorovits, Boris & Krinos-Fiorotti, Corinna. (2012). Proposed mechanism of off-target toxicity for antibody-drug conjugates driven by mannose receptor uptake. *Cancer immunology, immunotherapy* : CIL. 62. 10.1007/s00262-012-1369-3.
- Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 24;15(3):713.
- Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. *MAbs*. 2016 May-Jun;8(4):659-71.
- Li M, Mei S, Yang Y, Shen Y, Chen L. Strategies to mitigate the on- and off-target toxicities of recombinant immunotoxins: an antibody engineering perspective. *Antib Ther*. 2022 Jun 16;5(3):164-176.
- Richardson, D.L. (2023). Ocular toxicity and mitigation strategies for antibody drug conjugates in gynecologic oncology. *Gynecologic oncology reports*, 46, 101148 .
- Mao K, Chen P, Sun H, Zhong S, Zheng H and Xu L (2024) Ocular adverse events associated with antibody-drug conjugates in oncology: a pharmacovigilance study based on FDA adverse event reporting system (FAERS). *Front. Pharmacol*. 15:1425617. doi: 10.3389/fphar.2024.1425617
- Itaborahy, M.F., Feng, I.Z.L.F., Vieira-Machado, U.F. *et al.* Chemotherapy-induced neuropathy in monomethyl Auristatin E treatment: prevention by lithium. *Br J Cancer* **133**, 604–614 (2025).
- Technical Support Center: Reducing Off-Target Toxicity of MMAE-Based ADCs
- Yonemori K, Kuboki Y, Hasegawa K, Iwata T, Kato H, Takehara K, Hirashima Y, Kato H, Passey C, Buchbjerg JK, Harris JR, Andreassen CM, Nicacio L, Soumaoro I, Fujiwara K. Tisotumab vedotin in Japanese patients with recurrent/metastatic cervical cancer: Results from the innovaTV 206 study. *Cancer Sci*. 2022 Aug;113(8):2788-2797. doi: 10.1111/cas.15443. Epub 2022 Jun 15.
- A. Younes, N.L. Bartlett, J.P. Leonard, D.A. Kennedy, C.M. Lynch, E.L. Sievers, A. Forero-Torres
Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas *N. Engl. J. Med.*, 363 (2010), pp. 1812-1821.
- B. Pro, R. Advani, P. Brice, N.L. Bartlett, J.D. Rosenblatt, T. Illidge, J. Matous, R. Ramchandren, M. Fanale, J.M. Connors, *et al.* Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study *J. Clin. Oncol.*, 30 (2012), pp. 2190-2196.
- S.M. Horwitz, R.H. Advani, N.L. Bartlett, E.D. Jacobsen, J.P. Sharman, O.A. O'Connor, T. Siddiqi, D.A. Kennedy, Y. Oki
Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin *Blood*, 123 (2014), pp. 3095-3100.
- E.D. Jacobsen, J.P. Sharman, Y. Oki, R.H. Advani, J.N. Winter, C.M. Bello, G. Spitzer, M.C. Palanca-Wessels, D.A. Kennedy, P. Levine, *et al.* Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood The Journal of the American Society of Hematology*, 125 (2015), pp. 1394-1402.
- H.M. Prince, Y.H. Kim, S.M. Horwitz, R. Dummer, J. Scarisbrick, P. Quaglino, P.L. Zinzani, P. Wolter, J.A. Sanches, P.L. Ortiz-Romero, *et al.* Brentuximab vedotin or physician's choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial *Lancet*, 390 (2017), pp. 555-566.
- S. Horwitz, O.A. O'Connor, B. Pro, T. Illidge, M. Fanale, R. Advani, N.L. Bartlett, J.H. Christensen, F. Morschhauser, E. Domingo-Domenech, *et al.* Brentuximab vedotin with chemotherapy for CD30-positive peripheral T-cell lymphoma (ECHÉLON-2): a global, double-blind, randomised, phase 3 trial *Lancet*, 393 (2019), pp. 229-240.
- S.M. Ansell, J. Radford, J.M. Connors, M. Długosz-Danecka, W.S. Kim, A. Gallamini, R. Ramchandren, J.W. Friedberg, R. Advani, M. Hutchings, *et al.* Overall Survival with Brentuximab Vedotin in Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma *N. Engl. J. Med.*, 387 (2022), pp. 310-320.
- M.C.A. Palanca-Wessels, M. Czuczman, G. Salles, S. Assouline, L.H. Sehn, I. Flinn, M.R. Patel, R. Sangha, A. Hagenbeek, R. Advani, *et al.* Safety and activity of the anti-CD79B antibody-drug conjugate polatuzumab vedotin in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1 study *Lancet Oncol.*, 16 (2015), pp. 704-715.

- L.H. Sehn, A.F. Herrera, C.R. Flowers, M.K. Kamdar, A. McMillan, M. Hertzberg, S. Assouline, T.M. Kim, W.S. Kim, M. Ozcan, *et al.* Polatuzumab vedotin in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma *J. Clin. Oncol.*, 38 (2020), pp. 155-165.
- H. Tilly, F. Morschhauser, L.H. Sehn, J.W. Friedberg, M. Trněný, J.P. Sharman, C. Herbaux, J.M. Burke, M. Matasar, S. Rai, *et al.* Polatuzumab vedotin in previously untreated diffuse large B-cell lymphoma *N. Engl. J. Med.*, 386 (2022), pp. 351-363.
- T. Powles, J.E. Rosenberg, G.P. Sonpavde, Y. Loriot, I. Durán, J.L. Lee, N. Matsubara, C. Vulsteke, D. Castellano, C. Wu, *et al.* Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma *N. Engl. J. Med.*, 384 (2021), pp. 1125-1135.
- E.Y. Yu, D.P. Petrylak, P.H. O'Donnell, J.L. Lee, M.S. van der
eijden, Y. Loriot, M.N. Stein, A. Necchi, T. Kojima, M.R. Harrison, *et al.* Enfortumab vedotin after PD-1 or PD-L1 inhibitors in cisplatin-ineligible patients with advanced urothelial carcinoma (EV-201): a multicentre, single-arm, phase 2 trial *Lancet Oncol.*, 22 (2021), pp. 872-882.
- X. Sheng, X. Yan, L. Wang, Y. Shi, X. Yao, H. Luo, B. Shi, J. Liu, Z. He, G. Yu, *et al.* Open-label, Multicenter, Phase II Study of RC48-ADC, a HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate, in Patients with Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma *Clin. Cancer Res.*, 27 (2021), pp. 43-51.
- Z. Peng, T. Liu, J. Wei, A. Wang, Y. He, L. Yang, X. Zhang, N. Fan, S. Luo, Z. Li, *et al.* Efficacy and safety of a novel anti-HER2 therapeutic antibody RC48 in patients with HER2-overexpressing, locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: a single-arm phase II study *Cancer Commun.*, 41 (2021), pp. 1173-1182.
- J.S. deBono, N. Concin, D.S. Hong, F.C. Thistlethwaite, J.P. Machiels, H.T. Arkenau, R. Plummer, R.H. Jones, D. Nielsen, K. Windfeld, *et al.* Tisotumab vedotin in patients with advanced or metastatic solid tumours (InnovaTV 201): a first-in-human, multicentre, phase 1-2 trial *Lancet Oncol.*, 20 (2019), pp. 383-393.
- D.S. Hong, N. Concin, I. Vergote, J.S. deBono, B.M. Slomovitz, Y. Drew, H.T. Arkenau, J.P. Machiels, J.F. Spicer, R. Jones, *et al.* Tisotumab Vedotin in Previously Treated Recurrent or Metastatic Cervical Cancer *Clin. Cancer Res.*, 26 (2020), pp. 1220-1228.
- R.L. Coleman, D. Lorusso, C. Gennigens, A. González-Martín, L. Randall, D. Cibula, B. Lund, L. Woelber, S. Pignata, F. Forget, *et al.* Efficacy and safety of tisotumab vedotin in previously treated recurrent or metastatic cervical cancer (InnovaTV 204/GOG-3023/ENGOT-cx6): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.*, 22 (2021), pp. 609-619.
- K. Yonemori, Y. Kuboki, K. Hasegawa, T. Iwata, H. Kato, K. Takehara, Y. Hirashima, H. Kato, C. Passey, J.K. Buchbjerg, *et al.* Tisotumab vedotin in Japanese patients with recurrent/metastatic cervical cancer: Results from the InnovaTV 206 study. *Cancer Sci.*, 113 (2022), pp. 2788-2797
- J.C. Masters, D.J. Nickens, D. Xuan, R.L. Shazer, M. Amantea, Clinical toxicity of antibody drug conjugates: a meta-analysis of payloads. *Invest. N. Drugs*, 36 (2018), pp. 121-135
- J.J. Lee, S.M. Swain. Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. *J. Clin. Oncol.*, 24 (2006), pp. 1633-1642
- Zhao, H.; Gulesserian, S.; Malinao, M. C.; Ganesan, S. K.; Song, J.; Chang, M. S.; Williams, M. M.; Zeng, Z.; Mattie, M.; Mendelsohn, B. A. A potential mechanism for ADC-induced neutropenia: role of neutrophils in their own demise mechanism for ADC-induced neutropenia. *Mol Cancer Ther* 2017, 16, 1866-1876.
- Singh, A.P., and Shah, D.K. (2019). A "dual"cell-level systems PK-PD model to characterize the bystander effect of ADC. *J. Pharmaceut. Sci.* 108, 2465-2475.
- Dorywalska, M., Dushin, R., Moine, L., Farias, S.E., Zhou, D., Navaratnam, T., Lui, V., Hasa Moreno, A., Casas, M.G., Tran, T.-T., *et al.* (2016). Molecular Basis of Valine-Citrulline PABC Linker Instability in Site-Specific ADCs and Its Mitigation by Linker Design. *Molecular Basis of VC-PABC Linker Instability. Mol. Cancer Therapeut.* 15, 958-970.
- Zhao, Hui & Gulesserian, Sara & Malinao, Christina & Ganesan, Sathish Kumar & Song, James & Chang, Mi & Williams, Melissa & Zeng, Zhilan & Mattie, Michael & Mendelsohn, Brian & Stover, David & Doñate, Fernando. (2017). A Potential Mechanism for ADC-Induced Neutropenia: Role of Neutrophils in Their Own Demise. *Molecular Cancer Therapeutics*. 16. 1866-1876. 10.1158/1535-7163.MCT-17-0133.
- Kiguchi, N., Kobayashi, D., Saika, F., Matsuzaki, S., and Kishioka, S. (2017). Pharmacological regulation of neuropathic pain driven by inflammatory macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2296.
- Chen, O., Donnelly, C.R., and Ji, R.-R. (2020). Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 62, 17-25.
- Chowdhury, S., and Trivedi, A.K. (2023). Origin, production and molecular determinants of macrophages for their therapeutic targeting. *Cell Biol. Int.* 47, 15-29.
- Bedoui, Y., De Larichaudy, D., Daniel, M., Ah-Pine, F., Selambarom, J., Guiraud, P., and Gasque, P. (2022). Deciphering the Role of Schwann Cells in Inflammatory Peripheral Neuropathies Post Alphavirus Infection. *Cells* 12, 100.80.
- Donnelly, C.R., Chen, O., and Ji, R.-R. (2020). How do sensory neurons sense danger signals? *Trends Neurosci.* 43, 822-838.
- Silva, C.E.A., Guimaraes, R.M., and Cunha, T.M. (2021). Sensory neuron-associated macrophages as novel modulators of neuropathic pain. *Pain Reports* 6.76.

- Yu, X., Liu, H., Hamel, K.A., Morvan, M.G., Yu, S., Leff, J., Guan, Z., Braz, J.M., and Basbaum, A.I. (2020). Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nat. Commun.* 11, 264.
- Fu, Zhiwen & Gao, Chen & Wu, Tingting & Wang, Lulu & Li, Shijun & Zhang, Yu & Shi, Chen. (2023). Peripheral neuropathy associated with monomethyl auristatin E-based antibody-drug conjugates. *iScience*. 26. 107778. 10.1016/j.isci.2023.107778.
- Stagg, N., Feinstein, S., Wilson, L., Jordan, M., Shen, B.-Q., Chih, S., Genualdi, C., Miller, H., Azarenko, O., LaPointe, N., & Best, R. (2021). Microtubule and tubulin binding and regulation of microtubule dynamics by the antibody drug conjugate (ADC) payload, monomethyl auristatin E (MMAE): Mechanistic insights into MMAE ADC peripheral neuropathy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 421, 115534.
- Hingorani, D.V., Allevato, M.M., Camargo, M.F. *et al.* Monomethyl auristatin antibody and peptide drug conjugates for trimodal cancer chemo-radio-immunotherapy. *Nat Commun* **13**, 3869 (2022).
- Best, Rebecca & Lapointe, Nichole & Azarenko, Olga & Miller, Herbert & Genualdi, Christine & Chih, Stephen & Shen, Ben-Quan & Jordan, Mary & Wilson, Leslie & Feinstein, Stuart & Stagg, Nicola. (2021). Microtubule and tubulin binding and regulation of microtubule dynamics by the antibody drug conjugate (ADC) payload, monomethyl auristatin E (MMAE): Mechanistic insights into MMAE ADC peripheral neuropathy. *Toxicology and applied pharmacology*. 421. 115534. 10.1016/j.taap.2021.115534.
- BenchChem Technical Support Team. Cleavable vs. Non-Cleavable Linkers for MMAE ADCs: A Comparative Guide. 2026.
- BOC Sciences, 2026. MMAE/MMAF-Based Linker Conjugation Services - BOC Sciences
- Best, Rebecca & Lapointe, Nichole & Azarenko, Olga & Miller, Herbert & Genualdi, Christine & Chih, Stephen & Shen, Ben-Quan & Jordan, Mary & Wilson, Leslie & Feinstein, Stuart & Stagg, Nicola. (2021). Microtubule and tubulin binding and regulation of microtubule dynamics by the antibody drug conjugate (ADC) payload, monomethyl auristatin E (MMAE): Mechanistic insights into MMAE ADC peripheral neuropathy. *Toxicology and applied pharmacology*. 421. 115534. 10.1016/j.taap.2021.115534.
- Chu, Yurou & Zhou, Xiangxiang & Wang, Xin. (2021). Antibody-drug conjugates for the treatment of lymphoma: clinical advances and latest progress. *Journal of Hematology & Oncology*. 14. 10.1186/s13045-021-01097-z.
- A. Klement (13 May 2013). "Sprunginnovation beim Hodgkin-Lymphom: Adcetris". *Österreichische Apothekerzeitung* (in German) (10/2013): 67f.
- Victor Yip, Ola M. Saad, Doug Leipold, Chunze Li, Amrita Kamath & BenQuan Shen (2024) Monomethyl auristatin E (MMAE), a payload for multiple antibody drug conjugates (ADCs), demonstrates differential red blood cell partitioning across human and animal species, *Xenobiotica*, 54:8, 511-520.
- Al Musaimi, O. Peptide Therapeutics: Unveiling the Potential against Cancer—A Journey through 1989. *Cancers* 2024, 16, 1032.
- Bouchard, H.; Viskov, C.; Garcia-Echeverria, C. Antibody-drug conjugates-a new wave of cancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 5357–5363.
- Fu Z, Gao C, Wu T et al., **Peripheral neuropathy associated with monomethyl auristatin E-based antibody-drug conjugates**. *iScience*, 2023; 26

114. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Maytansine 유도체(DM1과 DM4) ADC

- **고찰의 목적:** 최초로 ADC 승인된 시기는 2000년임. 2026년 현재 15종이며 모든 ADC는 항암제임. 올해 당장 우리나라가 1종의 ADC를 승인한다고 가정한다면 ADC 신약 개발에서 약 25년 뒤쳐져 있음. 오늘날 다양한 항암제가 개발되었지만 말기암을 치료할 수 있는 세포·유전자 치료제인 CAR-T가 가장 기술적으로 앞선 개발 항암제 요법이라고 할 수 있음. 그러나 세포·유전자 치료제의 가장 문제점은 환자의 면역세포를 추출해 유전자를 조작하거나 결함이 있는 유전자를 정상 유전자로 교체하는 환자 맞춤 항암제로 접근성이 극히 제한 되었다고 할 수 있음. 국산 1호 CAR-T 치료제 탄생이 되었지만 거의 5억원 정도가 하는 치료비용 및 접근성 등을 비롯하여 고열과 저혈압을 동반하는 사이토카인 방출 증후군(CRS), 의식 저하와 경련을 일으키는 신경학적 독성, 그리고 면역력 저하 등이 독성학적 문제는 여전히 극복해야 할 문제임. CAR-T가 3세대 항암제이면 면역 관문 억제제의 3세대 면역항암제와 기존 1세대 화학항암제의 결합으로 탄생한 Antibody-drug conjugate(항체-약물 접합체)가 4세대의 가장 첨단 항암제임. 현재까지 15종이 개발되었고 여전히 수많은 ADC 개발에 도전하고 있음. 항암제의 대표적인 특성은 치료 효과와 동반하여 부작용도 많다는 것임. **ADC는 이와 같은 off-target toxicity를 극복하고 항암효과를 극대화하는 유도미사일과 같은 항암제임. 그러나 여전히 ADC의 부작용이 보고되고 있으며 이를 극복하는 방법은 ADC의 한층 더 업그레이드를 통한 환자의 안전성을 높이는 핵심 사항이라고 할 수 있음. 이에 본 고찰에서는 승인된 15종 ADC에 분석을 통해 보다 더 안전성이 높이는 ADC 개발에 도움이 목적임.**

1. FDA-approved ADC

- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체)가 승인됨(Liu, 2025; Mullard, 2026). <표-1>은 지금까지 승인된 15종 ADC의 설계, 승인된 적응증, 표적 등을 요약한 것임.

<표-1> FDA 승인된 15종 ADC의 특성 요약

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2000; 2017	급성 골수성 백혈병(AML)
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	2011	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2+ BC
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti®	AstraZeneca	CD22	절단 가능	PE38	2018년, 미국 시장에서 단종됨	HCL
Polatuzumab vedotin-piqq	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	2019	미만성 거대 B세포 림프종

Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Seagen	Nectin-4	절단 가능	MMAE	2019	요로상피암 (방광암)
Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	HER2+ 피임약, HER2-저/초저혈 MBC, HER2+ GC, NSCLC
Sacituzumab govitecan	Trodely®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2 - MBC, TNBC
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF	2025년에 재승인 됨	재발성 또는 불응성 다발성 골수종
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	PBD SG3199	2021	DLBCL
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	2021	자궁경부암
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE™	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	HR+/HER2- BC
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE	2025	비소세포암

2. Maytansine 유도체 계열의 Payload

2-1) 항암기전

- DM1(N2'-Deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)과 DM4(4(N2'-Deacetyl-N2'-(4-mercapto-4-methyl-1-oxopentyl) maytansine)는 항체-약물 접합체(ADC, Antibody-Drug Conjugate)에 사용되는 대표적인 메이탄신(Maytansine) 유도체 계열의 세포독성 페이로드(Payload)이며 다음과 같은 기전을 통해 항암 효능<표-2>.

- ① **세포 분열 억제:** 미세소관의 중합(Polymerization)을 방해하는 미세소관 저해제(Microtubule Inhibitor)로 세포 주기를 정지(Mitotic Arrest)시키고 세포 사멸(Apoptosis)을 유도함.
- ② **초강력 독성:** 일반적인 화학요법 항암제보다 수백에서 수천 배 이상 강력하여 항체를 통해 표적 암세포에만 정밀하게 전달되도록 설계되었음

2-2) 상용화 및 임상 적응증

- DM1 기반 ADC:** 유방암 표적 치료제인 Trastuzumab emtansine가 대표적임. 항-HER2-positive 항체에 DM1 결합에 의한 항암 효과를 냄. (HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2)
- DM4 기반 ADC:** 난소암 치료제인 Mirvetuximab soravtansine에 적용되어 높은 치료 효

과를 증명하였음.

<표-2> Payload - DM1와 DM4의 일반적인 사항

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2-positive breast cancer
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE TM	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암

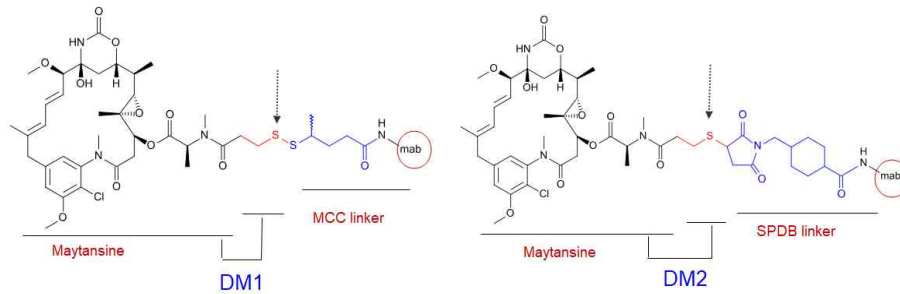
2-3) DM1 vs DM4 주요 차이점

- 두 페이로드의 Figure 8에서처럼 화학 구조적 차이(Disulfide 결합 주변의 메틸기 유무)로 인해 결합하는 링커와 Bystander Effect에 의한 세포사멸 효과에서 <표-3>에서처럼 뚜렷한 차이를 보임

<표-3> DM1-ADC와 DM4-ADC의 차이

특징	DM1 (= Mertansine or Emtansine)	DM4 (= Ravtansine or Soravtansine)
Linker	주로 비절단성 링커(Non-cleavable Linker, 예: MCC)와 결합	주로 절단성 링커(Cleavable Linker, 예: SPDB)와 결합
화학적 특징	이황화 결합(disulfide bond)에 메틸기가 치환되지 않은 구조.	이황화 결합에 메틸기가 치환되어 환원이 쉽게 일어나지 않음.
방출 형태	Lysine 잔기가 붙은 형태로 세포 내에서 분해됨	세포 내 glutathione 등에 의해 free-DM4 형태로 절단
bystander 효과	없음/낮음 (전하를 띤 구조로 막 투과가 어려움)	세포막 투과성이 좋아 주변 암세포까지 사멸시키는 효과가 우수함(소수성이 높아 주변 암세포로 확산 가능)
대표 상용화 약물	Kadcyla®	Elahere

- Maytansine은 미세소관 조립을 강력하게 억제하여 중독된 세포에서 유사분열 정지를 유도하는 물질이지만 구조 자체가 반응성 작용기(reactive functional groups)를 가지고 있지 않아 conjugation(공액화)하기 어려움. 공액화(conjugation)이란 일반적으로 단일결합과 이중결합(또는 다중결합)이 번갈아가면서 연결된 것을 의미함. 이 문제를 해결하기 위해, -SMe기(methyl thioether group)를 포함하는 일련의 매우 강력한 Maytansine 유도체(세포 내 흡수 후 글루타티온에 의한 환원 과정을 통해 SH가 방출되는 전구체)가 개발되었음. 이 계열의 초기 예로는 <Figure 8>에서처럼 native N-acetyl group 대신 methylthiopropionyl group를 가진 DM1과 DM4(Kostova 등, 2021)와 더불어 Maytansine과 그 공액 유도체인 DM1의 링커는 MCC(4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane1-carboxylate), 그리고 DM4의 linker는 SPDB(N-Succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butyrate). <그림-1>에서처럼 . Drug-antibody ratio(DAR)는 DM1의 평균 3.5, 그리고 DM4의 3.4임(Biopharma PEG, 2023).



<그림-1> The structure of maytansine and its conjugable derivatives DM1 and DM4.

3. Maytansine 유도체 계열 – On and Off target toxicity

3-1) DM1과 DM4 기반 부작용

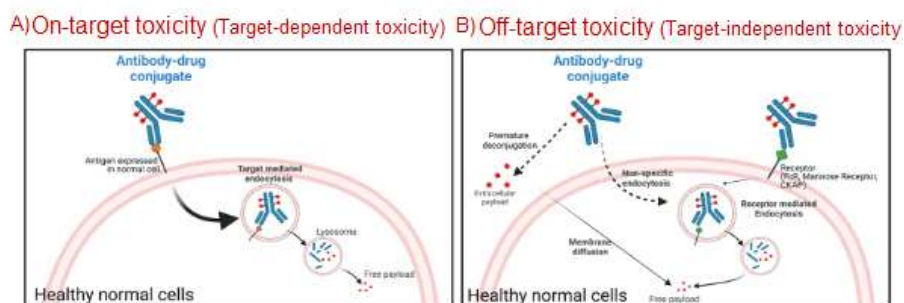
- 두 payload의 차이점과 이에 따른 독성에 대해 아래의 <표-4>에 설명하였음(Masters 등, 2018; Liu 등, 2026). DM1과 DM4의 부작용은 상호 교차 발생으로 발생하는 것으로 이해됨.

<표-4> DM1 & DM4-ADC의 주요 부작용

Feature	DM1 & DM4
주요 독성 유발 인자	용량 의존성 축삭 퇴행(신경병증)<dose-dependent axonal degeneration (neuropathy)> 혈소판 감소증<Thrombocytopenia>, Ocular Toxicity(각막병증), 말초 신경병증(Peripheral Neuropathy)

3-1) On target toxicity and Off target toxicity의 정의

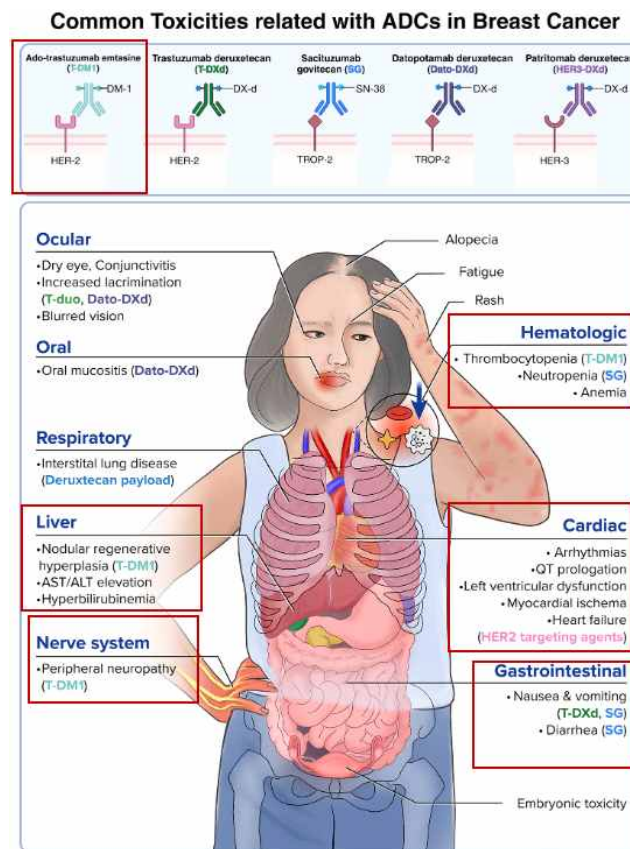
- 모든 ADC의 antibody는 암세포의 표면 항원 단백질을 표적으로 함. 그러나 때로는 암세포에 현저히 많은 항원이 정상적인 세포에서도 발현됨. 이때 <그림-2>에서처럼 ADC에 의해 나타나는 독성을 target-dependent toxicity라고함. 반면에 혈장에서 조기 방출된 free load에 의한 독성을 target independent toxicity이라고 함(Kang 등, 2025).



<그림-2> ADC의 독성에 대한 간략한 기전

3-2) 유방암(breast cancer)에서 항체-약물 복합체(ADC)와 관련된 흔한 독성 반응

- <그림-3>은 유방암(breast cancer)에서 여러 항체-약물 복합체(ADC)와 관련된 흔한 독성 반응임(Kang 등, 2025). 이들 ADC 치료법들은 ADC는 현재 호르몬 수용체 양성, 인산 효소 성장 인자 수용체 2 수용체 양성, 삼중음성 등 모든 유방암 아형에서 자주 사용됨. 표적 설계임에도 불구하고, ADC는 세포독성 payload가 건강한 세포에도 영향을 미칠 수 있어 부작용을 일으킬 수 있음. 이러한 부작용은 특정 ADC에 따라 다르며 건강한 조직 손상을 포함할 수 있음. 이러한 독성의 효과적인 관리는 ADC로부터 환자의 이익을 극대화하면서 위험을 완화하는 데 매우 중요함.



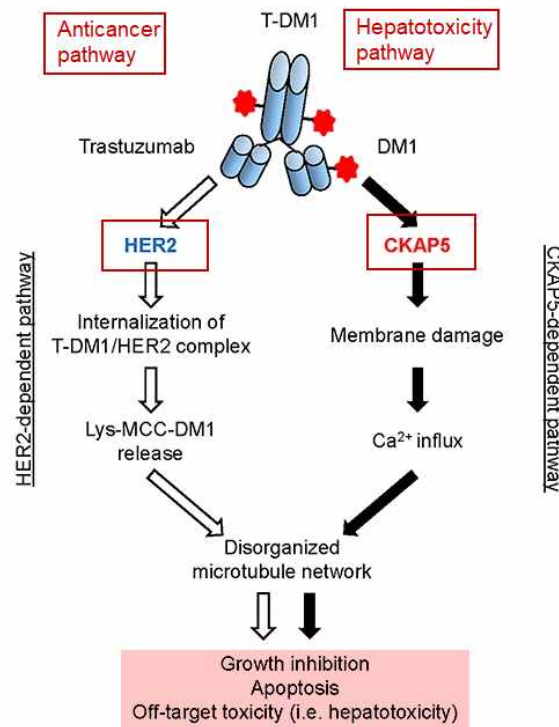
<그림-3> Common toxicities related with ADCs in breast cancer

3-2) DM1의 payload를 하는 T-DM1(Ado-trastuzumab emtansine)에 의한 독성 및 기전

- 다음은 DM1 and DM4-payload 기반 ADC에 대한 독성 발생률과 기전을 병인별로 설명하였음.

① 간독성(hepatotoxicity)

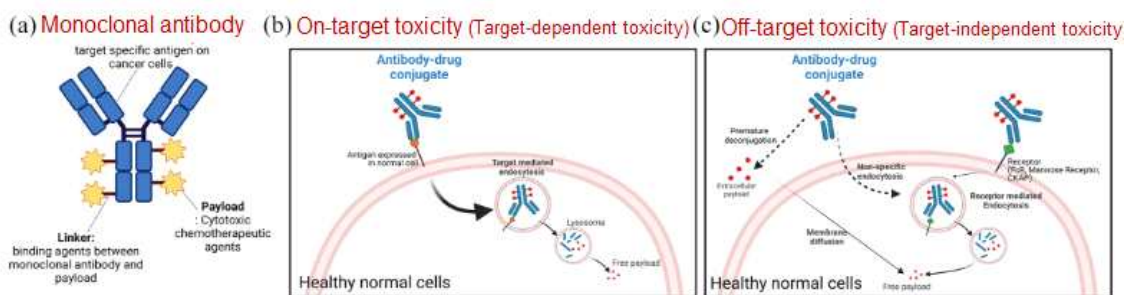
- 간독성은 DM1을 payload로 가진 Trastuzumab emtansine(트라스투주맙 엠탄신) 치료의 블랙박스 경고 중 하나에 포함되어 있으며, 혈청 트랜스아미나제의 무증상 일시적 증가로 나타남(FDA, 2022). 간부전과 심각한 치료 관련 간 손상의 치명적 사례가 보고되었음. Trastuzumab emtansine 치료와 관련된 간 독성은 <그림-4>에서처럼 HER2 의존적이고 독립적인 경로 때문일 수 있음. 간독성은 FDA의 T-DM1 경고 블랙박스에 포함되었음 (D'Arienzo 등, 2023).
- **HER2 의존적 경로:** 종양 세포 표면에 발현된 HER2와 T-DM1이 상호작용하면, T-DM1/HER2 복합체가 세포 내로 흡수된 후 리소좀 분해와 미세소관을 표적으로 하는 페이로드 방출이 이어져 세포 사멸 및 세포 사멸을 유발함. HER2 의존적 경로는 HER2 양성 종양 세포에서 T-DM1의 작용 기전에 주요한 역할을 함(Shi 등, 2019; Yan 등, 2016).
- **HER2 비의존적 경로:** 그러나 다른 한편으로는 T-DM1의 페이로드(DM1)가 간세포 표면의 세포골격 관련 단백질 5(CKAP5, cytoskeleton-associated protein 5)에 특이적으로 결합하면, T-DM1은 세포질막을 손상시키기 시작하고 이에 따라 간세포 내부로 칼슘이 유입됨 (Endo 등, 2018; Al-Bassam 등, 2007; Brouhard 등, 2008). 간세포 세포질 내 칼슘 농도 증가로 인해 미세소관 네트워크가 무질서해지며, 이는 세포 성장 억제, 세포 사멸 및 간 독성을 초래함. 세포 표면의 CKAP5와의 상호작용을 통한 T-DM1 페이로드(DM1) 매개 세포막 손상 및 칼슘 유입은, HER2 발현이 상대적으로 낮거나 결여되어 "비표적(off-target)" 독성을 유발할 수 있는 정상 세포/조직에 대한 T-DM1 유도 세포 독성에 특히 중요한 역할을 할 수 있음.



<그림-4> HER2 의존적 및 비의존적 기전을 통한 T-DM1 매개 세포독성.

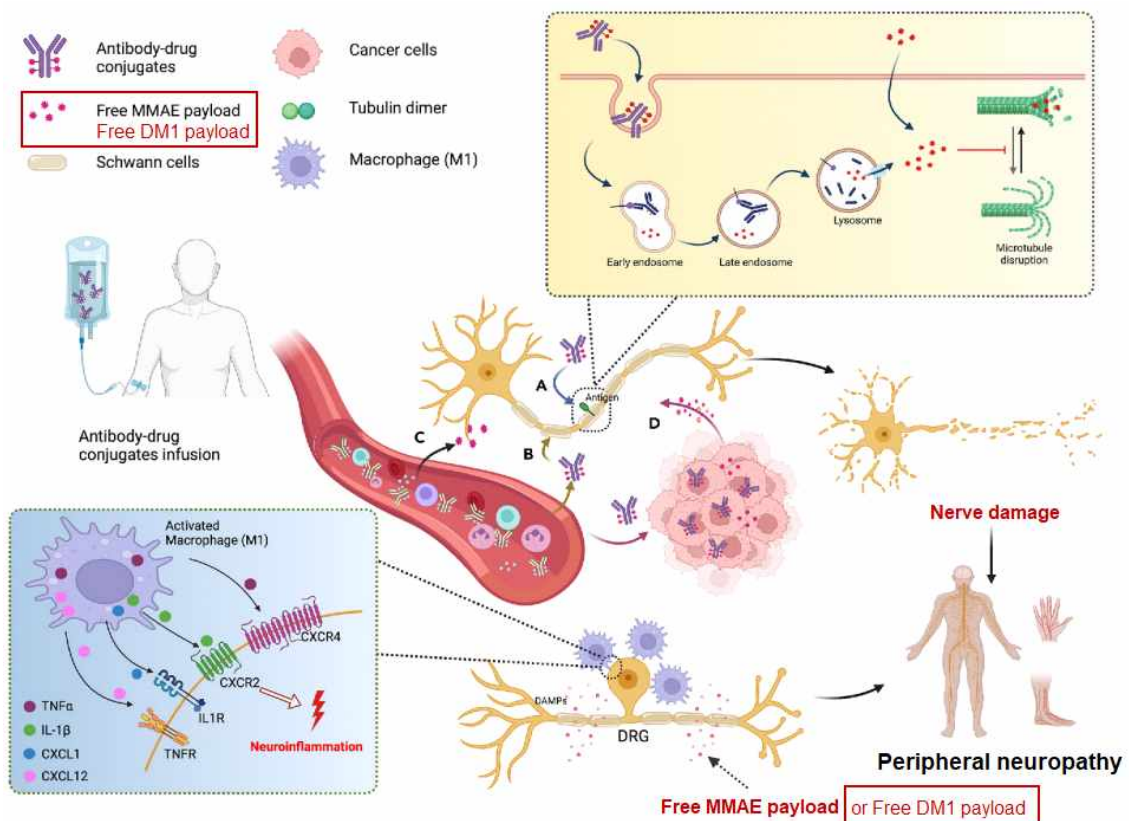
② 말초 신경병증(peripheral neuropathy)

- <그림-5>에서처럼 On target 및 off target toxicity: 모두 T-DM1이 유발하는 신경독성에 기전적으로 기여함. 미세소관 억제 페이로드(DM1)는 용량 의존적 축삭 퇴화를 통해 신경 독성을 유발하여 표적 독립적 기전을 시사함(Poon 등, 2013). 별도의 전임상 연구에서는 T-DM1 치료 후 원숭이(HER2 결합 중)만이 신경독성을 보였고, 쥐는 T-DM1 또는 DM1 치료 후 신경독성을 보이지 않아 표적 독성이 있을 가능성을 제시했음(Jahan 등, 2020). T-DM1 치료받은 환자에서 말초 신경병증 모든 등급의 발생률은 3상 임상시험에서 5%에서 18.3% 사이로 보고되었으며, 3등급 말초 신경병증은 0.5%에서 2.2%에서 발생하였음(Verma 등, 2012; von Minckwitz 등, 2019; Krop 등, 2017).



<그림-5> ADC의 구조 및 ADC 독성의 간략한 기전. (a) 단클론 항체, 세포독성 페이로드, 링커로 구성된 ADC의 개략도. (b) 온타겟, 오프 종양 독성을 보여주는 개략도. ADC는 건강한 정상 조직에서 발견되는 표적 항원에 결합할 수 있으며, 표적 매개 엔도사이토시스를 통해 표적 의존적 독성을 유발할 수 있다. (c) 오프 타겟, 오프 종양 독성의 개략도. ADC는 건강한 비표적 조직에 영향을 미쳐 표적 독립적 독성을 유발할 수 있다. 절단 가능한 링커를 사용하는 ADC는 종종 혈장 내에서 페이로드를 조기 방출하며, 이 방출된(자유) 페이로드는 정상 세포에 의해 수동 확산이나 특정 수송체를 통해 내화될 수 있음. 더 불어, 온전한 ADC는 수용체 매개 장치(Fcγ 수용체, 신생아 Fc 수용체, C형 렉틴 수용체) 또는 비특이적 엔도사이토시스를 통해 정상 세포에 내화될 수 있음.(Mahalingaiah 등, 2019)

- 메타분석에서 HER2 양성 암 환자에서 T-DM1 요법이 다른 치료법에 비해 말초신경병증 발생 위험이 유의하게 높지 않았으며 탁산 치료와 관련된 수치보다 낮았음(Jahan 등, 2020; Jahan 등, 2021).
- 또한, KATHERINE 임상시험에서 말초 신경병증은 74.6%의 환자에서 해결되었음(Krop 등, 2017). 따라서 T-DM1 유발 말초 신경병증은 일반적으로 경미한(등급 <2) 것으로 간주되며, 용량 감량 또는 일시적 치료 중단을 통해 관리할 수 있음. 그리고 3등급 말초신경병증의 경우, FDA 라벨은 2등급 이하로 회복될 때까지 T-DM1 복용을 중단할 것을 권장함.
- 신경독성은 기존 및 신형 암 치료에서 흔하고 잠재적으로 심각한 부작용으로 나타남. 중추 및 말초 신경계 손상의 임상 증상의 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았음. 그러나 페이로드인 DM1은 tubulin 합성 저해를 통해 미세소관 억제 기전의 항암기전을 나타냄. 말초 신경병증
- 튜블린은 또한 신경세포의 골격을 유지하고 물질을 이동시키는 '미세소관(Microtubule)'을 구성하는 단백질임. 따라서 <그림-6>에서 **MMAE 기반 항체-약물 접합체(ADC)의 free MMAE에 의한 말초 신경병증을 유발하듯이 free DM1도 동일한 기전으로 신경병증을 유발하는 것으로 추정됨**(Fu 등, 2023).

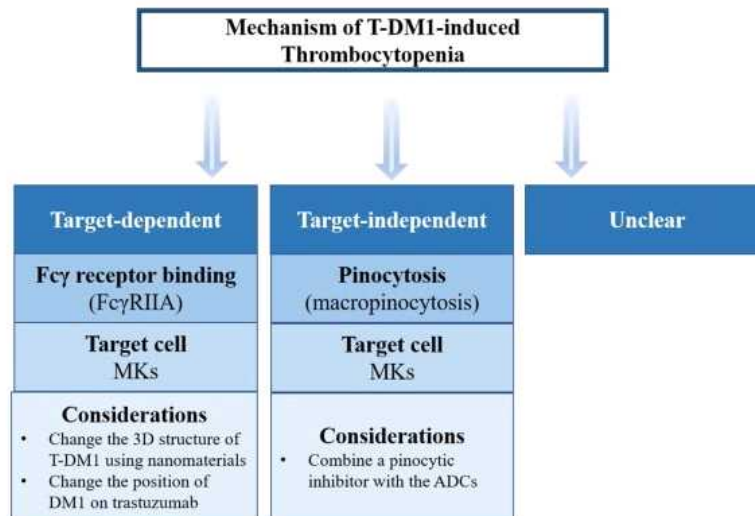


<그림-6>. MMAE 및 DM1 기반 항체-약물 접합체(ADC)와 관련된 말초 신경병증의 가능한

기전: (A) 표적 의존적 ADC 흡수. (B) 건강한 세포에 의한 ADC의 비특이적 흡수. (C) 순환 중 MMAE의 조기 방출. (D) MMAE 기반 ADC의 방관자 효과. MMAE가 직접적 경로(자유 MMAE) 또는 간접적 경로(MMAE 기반 ADC의 흡수 및 MMAE 방출)를 통해 말초 신경 세포에 흡수되면, MMAE는 미세소관 전체에 걸쳐 풍부한 결합 부위에 결합하여 미세소관 네트워크를 파괴함으로써 말초 신경병증을 유발함. 또한, 미세소관을 표적으로 하는 약물로 인해 신경 손상이 발생하는 경우, 슈반 세포가 활성화되어 손상 관련 분자 패턴(DAMPs, damage-associated molecular patterns)을 생성하고, 이는 차례로 M1형 대식세포와 같은 순환 백혈구를 손상 부위로 유인함. 이는 IL-1b, TNF α , CXCL1, CXCL12 등을 포함한 다양한 전염증성 사이토카인의 방출을 촉진함. 이러한 사이토카인은 신경염증을 유발하고 통각 정보를 DRG(dorsal root ganglion, 등근 신경절) 뉴런으로 전달하여 통증을 느끼게 함. 그림은 BioRender.com을 사용하여 제작되었음. (Fu 등, 2023)

③ 혈소판감소증(Thrombocytopenia)

- 혈소판 감소증은 T-DM1 치료 과정에서 가장 중요한 AE 중 하나다. 혈소판감소증은 T-DM1의 용량 제한 독성(dose-limiting toxicity)으로, 3상 연구에서 환자의 6%~15%에서 3등급 혈소판감소증이 발생함(Verma 등, 2012; Dieras 등, 2017; Krop 등, 2017). 아시아 계 환자는 비아시아계 환자에 비해 3등급 혈소판감소증의 발생률이 유의하게 높았음(통합 분석 44.4% 대 10.6%)(Dieras 등, 2014). KAMILLA 연구에서는 36.5% 대 3.7%, 그러나 ≥ 3 등급 출혈 발생률은 낮으며, 인종에 관계없이 심각한 출혈을 경험한 환자는 3%에서 8.1%에 불과함(Dieras 등, 2017; Wuerstlein 등, 2022).
- <그림-7> 에서처럼 T-DM1 매개 혈소판 감소증에는 두 가지 일반적인 기전인 표적 의존적 기전과 표적 비의존적 기전임(Hinrichs 등, 2015). T-DM1의 Fc γ 수용체 결합은 표적 의존적 기전임. 이 상태에서는 주로 Fc γ receptor 매개 과정을 통한 T-DM1의 내화(internalization)로 인한 거대핵세포 분화 장애에서 발생함(Uppal 등, 2015). Fc γ 수용체는 immunoglobulin superfamily에 속하며, 옵소니화된(opsonized) 미생물의 식작용(phagocytosis)을 유도하는 데 가장 중요한 Fc 수용체의 일종임. 그리고 표적 비의존적 기전 음세포작용(pinocytosis)을 통해 정상 세포로 흡수되어 off-target effect의 결과로 추정됨(Liu 등 2020). 혈소판감소증은 일반적으로 용량 조정으로 효과적 관리가 이루어져 치료 중단 없이 이루어졌음(Berger 등, 2023).



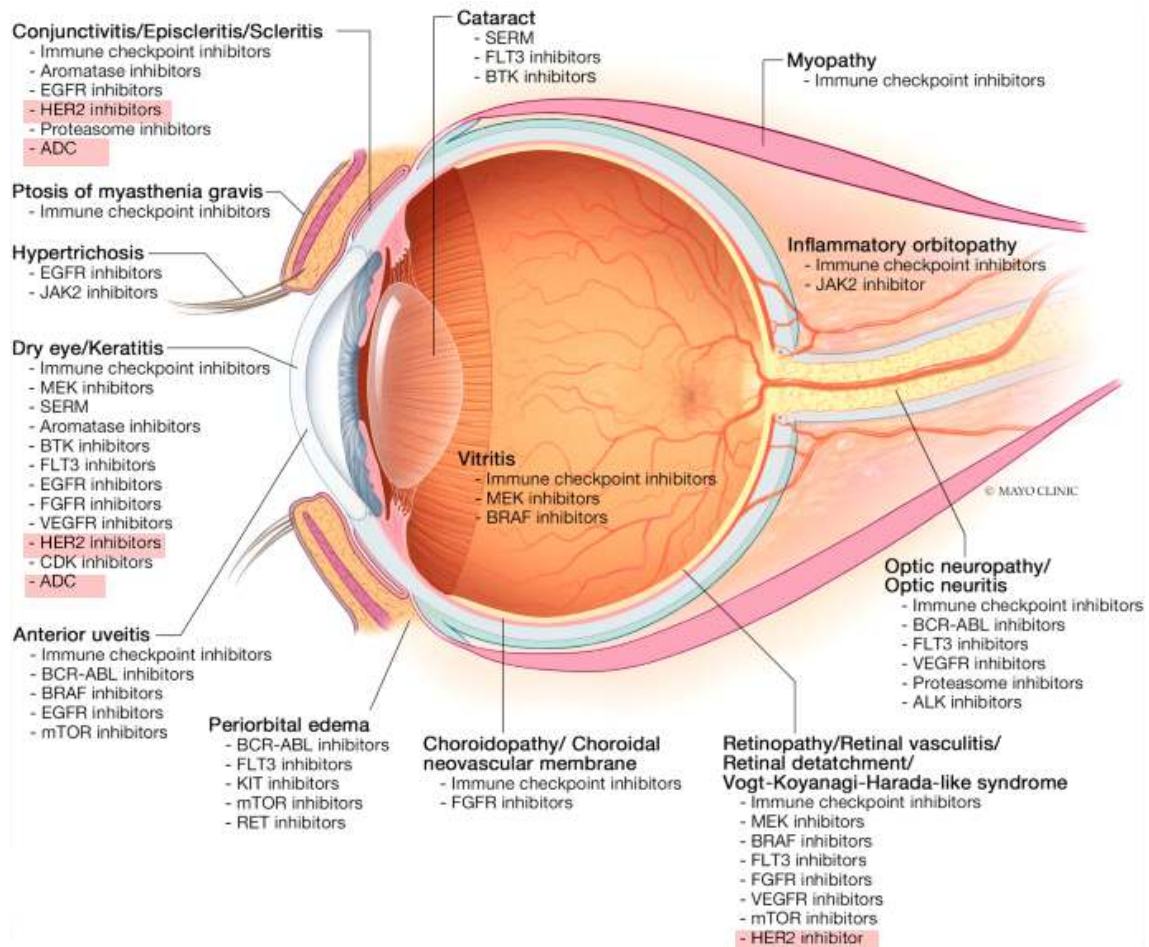
<그림-7> The possible mechanisms of T-DM1-induced thrombocytopenia: T-DM1의 안전성 향상을 위한 고려 사항은 두 가지 가능한 작용 기전 각각에 따라 달라짐(Liu 등 2020).

④ 심장독성(Cardiotoxicity)

- 심장독성은 HER2 표적 약물의 알려진 잠재적 부작용. HER2 수용체는 심근세포에서 발현되어 세포 성장, 항상성, 산화 스트레스를 조절함. 또한, 태아 심장 발달에도 중요한 역할을 함. HER2 표적 작용제의 심장독성 기전은 여러 전임상 연구에서 밝혀졌음(Crone 등, 2002). ADC 관련 심장독성은 HER2 항체를 이용한 약물의 표적-종양 외 효과의 한 예입니다. 따라서 이전 연구에서 얻은 지식을 고려할 때, HER2 표적 항암제는 비가역적 및 가역적 심장 손상을 모두 일으킬 수 있고 잠재적 독성으로는 QT 연장, 부정맥(arrhythmias), 심근허혈(myocardial ischemia), 고혈압(hypertension), 좌심실 기능 장애(LVD, left ventricular dysfunction), 심부전(HF, heart failure) 등이 있음(D'Arienzo 등, 2023).
- T-DM1은 LVD 발병 위험이 낮음과 관련이 있습니다. 실제로 EMILIA 시험에서 T-DM1 그룹의 1.7%, 대조군 환자의 1.6%가 좌심실 박출률(LVEF, left ventricular ejection fraction)이 기준치보다 50% 이상 < 최소 15% 낮은 수준을 보였음(Verma 등, 2012). 마찬가지로, TH3RESA 시험에서는 전처리가 많이 이루어졌음에도 불구하고 T-DM1 환자 중 1.5% < LVEF 감소가 보고되었고, 대조군에서는 1.1%만 보고되었음(Krop 등, 2014). MARIANNE 시험에서 TDM-1 치료 환자의 0.8%가 LVEF < 발달했으며, 기저라인 대비 ≥15% 감소한 반면, 트라스투주맙과 탁산 병용은 4.5%, TDM-1과 퍼투주맙 병용은 2.5%였음(Perez 등, 2017).
- 그러나 SAFE-HEaRt 연구는 트라스투주맙, 퍼투주맙, T-DM1을 40%에서 49% 사이의 LVEF 환자에게 심장 모니터링과 심장 보호제 치료와 함께 안전하게 투여할 수 있음을 입증했음(Lynce 등, 2019).

⑤ 안구독성(Ocular toxicity)

- 눈은 활발히 증식하는 세포, 고밀도 혈관, 그리고 많은 상피 수용체로 구성된 구조적으로 복잡한 기관임. ADC와 함께 보고된 안구 부작용은 표적 또는 페이로드와 관련이 있지만, 완전히 이해되지는 않았음. 안구건조증, 결막염, 시야 흐림, 눈물 증가는 흔한 AE로, 각각 3-6%의 사례에서 보고됨(Burris 등, 2010). 또한 드물게 백내장과 점상 각막염 사례도 보고되었음(Beeram 등, 2012). 각막 상피의 변화가 T-DM1 치료를 받는 모든 환자에서 보고되었으며, 대부분 무증상이며 약물 중단 시 호전되었음(Deklerck 등, 2019).
- ADC에 의한 안구독성 메커니즘이 on-target toxicity와 off-target toxicity 모두에 기인함. 그러나 후자의 경우, 안구 독성은 T-DM1과 같이 비접액 세포독성 마이탄시노이드와 오리스타틴 유도체(cytotoxic maytansinoids and auristatin derivatives)의 전달로 더 자주 보고됨(Burris 등, 2020). T-DM1 안구 독성은 특히 표면에서 더 분화된 안구 상피세포에 HER2 수용체가 존재하는 것과 가장 자주 관련이 있음(Liu 등, 2001). 이와 같은 예시는 아래의 <그림>의 눈의 해부학적 도식도에서 확인이 가능함(Fortes 등, 2021). 예를 HER2 수용체를 표적으로 하는 ADC인 T-DM1, 트라스투주맙 데록스테칸(T-DXd)이 안구독성을 유발하는 것으로 확인됨(Fortes 등, 2021). 또한 각 안구 구조별 주요 안과적 이상반응과 관련된 약물군 목록이 표시되어 있음.
- 또한 ADCs와 관련된 안구 독성은 여러 조절된 세포 사멸과 세포 스트레스 경로의 상호 작용에서 발생으로 기전이 설명되기도 함. 안구 표면에서 각막 상피의 완전성은 엄격히 조절된 세포골격 구조에 의존함. 액틴 필라멘트와 미세소관의 파괴는 상피 장벽 기능, 부착력, 재생 능력을 저해함. ADC가 리소좀 수송 이후, ADC 링커 성분의 단백질 분해로 인해 monomethyl auristatin F (MMAF)를 비롯하여 DM1과 DM4와 같은 강력한 미세소관 억제제와 같은 세포독성 페이로드가 세포 내 방출됨. 한 페이로드의 세포 내 축적은 리소좀 막 투과를 유도하여 카텝신 방출과 세포 사멸 경로의 2차 활성화를 통해 세포 스트레스를 더욱 증폭시킬 수 있음. 동시적인 미세관 파괴는 유사분열 방추 조립과 상피 교체를 방해하여 각막 재생을 저해함. 따라서 진행성 리소좀 과부하와 기능 장애가 미세낭성 상피 각각병증의 중심 메커니즘으로 제안되었으며, 세포 내 이동 장애가 상피 공포화, 미세낭포 형성, 각막 투명성 상실과 연관되어 있으며, 이는 암 생물학에서 리소좀 표적 치료 전략과 리소좀 취약성에 대한 새로운 증거와 일치함(Karaosmanoglu 등, 2021; Liu 등, 2024).



<그림-7> 눈의 해부학적 도식도. 각 안구 구조별 주요 안과적 이상반응과 관련된 약물군 목록이 표시되어 있음((Fortes 등, 2021).

4. 결론: FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Maytansine 유도체(DM1과 DM4)

- Maytansine 유도체(DM1과 DM4)를 payload 기반 ADC는 아래의 <표>와 같이 2가지가 승인되었음

<표> Payload - DM1와 DM4의 일반적인 사항

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2-positive breast cancer
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE TM	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암

1. Payload

- DM1(N2'-Deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)과 DM4(4(N2'-Deacetyl-N2'-(4-mercapto-4-methyl-1-oxopentyl) maytansine)는 항체-약물 접합체(ADC, Antibody-Drug Conjugate)에 사용되는 대표적인 메이탄신(Maytansine) 유도체 계열의 세포독성 페이로드(Payload).

① **세포 분열 억제:** 미세소관의 중합(Polymerization)을 방해하는 미세소관 저해제(Microtubule Inhibitor)로 세포 주기를 정지(Mitotic Arrest)시키고 세포 사멸(Apoptosis)을 유도함.

② **초강력 독성:** 일반적인 화학요법 항암제보다 수백에서 수천 배 이상 강력하여 항체를 통해 표적 암세포에만 정밀하게 전달되도록 설계되었음.

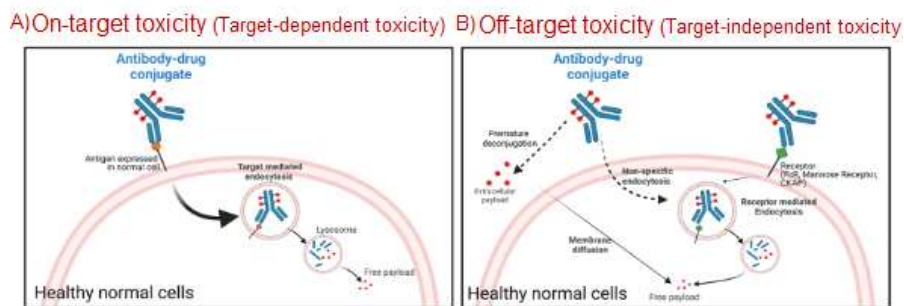
2. 주요 부작용

- DM1-ADC DM4-ADC의 부작용을 특별하게 구분하고 어렵고 상호 교차적으로 발생함.

Feature	DM1	DM4
주요 독성 유발 인자	용량 의존성 축삭 퇴행(신경병증)<dose-dependent axonal degeneration (neuropathy)> 혈소판 감소증<Thrombocytopenia>	Ocular Toxicity(각막병증), 말초 신경병증(Peripheral Neuropathy)

3. 독성기전

- 모든 ADC의 antibody는 암세포의 표면 항원 단백질을 표적으로 함. 그러나 때로는 암세포에 현저히 많은 항원이 정상적인 세포에서도 발현됨. 이때 ADC에 의해 나타나는 독성을 target-dependent toxicity라고함. 반면에 혈장에서 조기 방출된 free load에 의한 독성을 target independent toxicity이라고 함(Kang 등, 2025). DM1-ADC DM4-ADC에 의한 독성은 target-dependent toxicity과 target independent toxicity을 유발함.
- DM-1 ADC의 표적인 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 양성 암세포에서는 유전자 증폭으로 인해 정상 세포보다 수십 배 많은 수백만 개의 수용체가 발현되어 통제할 수 없는 암세포 증식을 유발함. HER2 양성 유방암은 전체 유방암 원인의 30% 정도임(Atallah 등, 2026). 그러나 정상 세포에서도 세포 성장과 분열을 조절하기 위해 **HER2 단백질이 소량(약 20,000~50,000개) 존재함.**
- 이와 같은 DM-1 ADC에 의한 부작용 및 독성은 정상세포에 존재하는 HER2 수용체에 결합하여 target-dependent toxicity 즉, on-target toxicity에 기인하는 것으로 추정됨. 물론 혈액에서 DM-1 ADC로부터 조기에 방출되어 off-target toxicity(target-independent toxicity)도 유발하는 기전도 Trastuzumab emtansine의 부작용의 원인으로 추정됨.
- 결론적으로 DM-1 ADC는 target-dependent toxicity 및 target independent toxicity 등 2가지 모두 기전을 통해 독성을 유발하는 것으로 추정됨.



<그림> ADC의 독성에 대한 간략한 기전

<참고문헌>

- Atallah, N.M., Quinn, C. & Rakha, E. HER2 expression in breast cancer: evidence gaps and challenges. *npj Precis. Onc.* **10**, 6 (2026)
- Karaosmanoglu, S.; Zhou, M.; Shi, B.; Zhang, X.; Williams, G.R.; Chen, X. Carrier-free nanodrugs for safe and effective cancer treatment. *J. Control. Release* **2021**, 329, 805–832.
- Liu, B.; Yang, C.; Liu, J.; Peng, M.; Mao, J.; Tang, S.; Huang, W. Targeting of lysosomes as a therapeutic target in cancer. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2024**, 17, e18761429354659.
- Fortes, B.H., Tailor, P.D. & Dalvin, L.A. Ocular Toxicity of Targeted Anticancer Agents. *Drugs* **81**, 771–823 (2021). <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01507-z>
- Deklerck E, Denys H, Kreps EO. Corneal features in trastuzumabemtansine treatment: not a rare occurrence. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 [cited 2023 Mar 12];175(2):525–530. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05179-y>.
- Liu Z, Carvajal M, Carraway CA, Carraway K, Pflugfelder SC. Expression of the receptor tyrosine kinases, epidermal growth factor receptor, ErbB2, and ErbB3, in human ocular surface epithelia. *Cornea.* 2001;20(1):81–85.
- Beeram M, Krop IE, Burris HA, et al. A phase 1 study of weekly dosing of trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with advanced human epidermal growth factor 2-positive breast cancer. *Cancer.* 2012 [cited 2023 Mar 12];118(23):5733–5740.
- Burris HA III, Rugo HS, Vukelja SJ, et al. Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-Positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *J Clin Oncol.* 2010 [cited 2023 Mar 12];29(4):398–405. Available from: www.jco.org.
- Lynce F, Barac A, Geng X, et al. Prospective evaluation of the cardiac safety of HER2-targeted therapies in patients with HER2-positive breast cancer and compromised heart function: the SAFE-HEARt study. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;175(3):595603.
- Perez EA, Barrios C, Eiermann W, et al. Trastuzumab emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab plus taxane for human epidermal growth factor receptor 2-positive, advanced breast cancer: primary results from the phase III MARIANNE study. *J Clin Oncol.* 2017;35(2):141–148.
- Krop IE, Kim S-BB, González-Martín A, et al. Trastuzumabemtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):689–699.
- Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;367(19):1783–1791.
- Crone SA, Zhao Y-Y, Fan L, et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med.* 2002;8(5):459–465.
- Liu F, Ke J, Song Y. T-DM1-induced thrombocytopenia in breast cancer patients: New perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie.* 2020 Sep;129:110407.
- M.J. Hinrichs, R. Dixit, Antibody drug conjugates: nonclinical safety considerations, *AAPS J.* 17 (5) (2015) 1055–1064,
- Berger MJ, Agarwal R, Anand S, et al. NCCN guidelines version 1.2023 antiemesis continue; 2023 [cited 2023 Feb 11]. Available from: <https://www.nccn.org>.

Collineau B, Gonçalves A, Domon M, Bruyat D, Bertucci F, de Nonneville A. Toxicity Profiles of Antibody-Drug Conjugates: Synthesis and Graphical Insights to Optimize Patient-Centered Treatment Strategies for HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2025 Jul 11;17(14):2307.

Uppal H, Doudement E, Mahapatra K, et al. Potential mechanisms for thrombocytopenia development with trastuzumab emtansine (T-DM1). *Clin Cancer Res* 2015; 21: 123–133.

Wuerstlein R, Ellis P, Montemurro F, et al. Final results of the global and Asia cohorts of KAMILLA, a phase IIIB safety trial of trastuzumab emtansine in patients with HER2positive advanced breast cancer. *ESMO Open* 2022; 7: 100561

Dieras V, Harbeck N, Budd GT, et al. Trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: an integrated safety analysis. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2750–2757.

Mahalingaiah PK, Ciurlionis R, Durbin KR, et al. Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. *Pharmacol Ther* 2019; 200: 110–125.

Dieras V, Miles D, Verma S, et al. Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 732–742.

Krop IE, Kim SB, Martin AG, et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 743–754.

Jahan N, Rehman S, Khan R, et al. Relative risk of peripheral neuropathy with ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) compared to taxane-based regimens in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cureus* 2021; 13: e15282

Jahan N and Hardwicke F. Abstract P5-14-15: risk of peripheral neuropathy with trastuzumab emtansine: a systematic review and meta-analysis of published phase 3 randomized controlled trials. *Cancer Res* 2020; 80: P5-14-15.

Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 367: 1783–1791.

von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2019; 380: 617–628.

Krop IE, Kim SB, Martin AG, et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 743–754.

Jahan N and Hardwicke F. Abstract P5-14-15: risk of peripheral neuropathy with trastuzumab emtansine: a systematic review and meta-analysis of published phase 3 randomized controlled trials. *Cancer Res* 2020; 80: P5-14-15.

Fu Z, Gao C, Wu T et al., Peripheral neuropathy associated with monomethyl auristatin E-based antibody-drug conjugates. *iScience*, 2023; 26

Poon KA, Flagella K, Beyer J, et al. Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DM1): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability. *Toxicol Appl*

Pharmacol 2013; 273: 298–313.

Tolcher AW, Ochoa L, Hammond LA, et al. Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the Can Ag antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. J Clin Oncol 2003; 21: 211–222.

Kang, Sora & Kim, Sung-Bae. (2025). Toxicities and management strategies of emerging antibody–drug conjugates in breast cancer. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 17. 10.1177/17588359251324889.

D'Arienzo A, Verrazzo A, Pagliuca M et al. **Toxicity profile of antibody-drug conjugates in breast cancer: practical considerations.** eClinicalMedicine, 2023; 62

Nguyen, TD. Bordeau, BM. Balthasar, JP. Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. Cancers 2023, 15, 713.

Shi, J.H.; Guo, W.-Z.; Jin, Y.; Zhang, H.-P.; Pang, C.; Li, J.; Line, P.-D.; Zhang, S.-J. Recognition of HER2 expression in hepatocellular carcinoma and its significance in postoperative tumor recurrence. Cancer Med. 2019, 8, 1269–1278. [CrossRef]126.

Yan, H.; Endo, Y.; Shen, Y.; Rotstein, D.; Dokmanovic, M.; Mohan, N.; Mukhopadhyay, P.; Gao, B.; Pacher, P.; Wu, W.J. AdoTrastuzumab Emtansine Targets Hepatocytes Via Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 to Induce Hepatotoxicity. Mol.Cancer Ther. 2016, 15, 480–490.

Mahalingaiah, P.K.; Ciurlionis, R.; Durbin, K.R.; Yeager, R.L.; Philip, B.K.; Bawa, B.; Mantena, S.R.; Enright, B.P.; Liguori, M.J.; vanVleet, T.R.; et al. Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. Pharmacol. Ther.2019, 200, 110–125

FDA. 2022. US Prescribing Information: Trastuzumab Emtansine. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/1254271bl.pdf (accessed on 2 April 2022).

Mechanisms contributing to ado-trastuzumabemtansine-induced toxicities: a gateway to better understanding of ADC-associated toxicities

Endo, Y, Takeda, K, Mohan, N et al. Payload of T-DM1 binds to cell surface cytoskeleton-associated protein 5 to mediate cytotoxicity of hepatocytes. Oncotarget 2018; 9: 37200–15.

Al-Bassam, J, Larsen, NA, Hyman, AA et al. Crystal structure of a TOG domain: conserved feature of XMAP215/Dis-1-family TOG domains and implications of tubulin binding. Structure 2007; 15:355–62.

Brouhard, GJ, Stear, JH, Noetzel, TL et al. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. Cell 2008; 132: 79–88.

Highlights of prescribing information: Kadcyla. Accessed: January 30, 2021: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/125427s1051bl.pdf .

Hurvitz SA, Martin M, Symmans WF, et al.: Neoadjuvant trastuzumab, pertuzumab, and chemotherapy versus trastuzumab emtansine plus pertuzumab in patients with HER2-positive breast cancer (KRISTINE): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2018, 19:115-26. 10.1016/S14702045(17)30716-7

von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al.: Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. N Engl J Med. 2019, 380:617-28. 10.1056/NEJMoa1814017

Xiaoyu Liu, Saige Yin, Xiyin Li, Jianyun Nie, Focusing on toxicity management: Challenges and strategies for HER2-targeted antibody–drug conjugates in breast cancer, The Breast, Volume 86, 2026, 104741, ISSN 0960-9776,

Masters JC, Nickens DJ, Xuan D, Shazer RL, Amantea M. Clinical toxicity of antibody drug conjugates: a meta-analysis of payloads. *Invest New Drugs*. 2018 Feb;36(1):121-135.

Biopharma PEG, 2023. Maytansinoids as Payloads of ADCs: DM1, DM4

Kostova, V.; Désos, P.; Starck, J.-B.; Kotschy, A. The Chemistry Behind ADCs. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 442. <https://doi.org/10.3390/ph14050442>

Cassady, J.M.; Chan, K.K.; Floss, H.G.; Leistner, E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chem. Pharm.Bull.* 2004, 52, 1–26.

BenchChem Technical Support Team. A Head-to-Head Comparison of Maytansinoid Payloads: DM1 vs. DM4. 2026

Zhijia Wang, Hanxuan Li, Lantu Gou, Wei Li, Yuxi Wang, Antibody–drug conjugates: Recent advances in payloads, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volume 13, Issue 10, 2023, 4025-4059, ISSN 2211-3835.

115. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Exatecan derivatives(T-DXd and Dato-DXd)

- **고찰의 목적:** 최초로 ADC 승인된 시기는 2000년임. 2026년 현재 15종이며 모든 ADC는 항암제임. 올해 당장 우리나라가 1종의 ADC를 승인한다고 가정한다면 ADC 신약 개발에서 약 25년 뒤쳐져 있음. 오늘날 다양한 항암제가 개발되었지만 말기암을 치료할 수 있는 세포·유전자 치료제인 CAR-T가 가장 기술적으로 앞선 개발 항암제 요법이라고 할 수 있음. 그러나 세포·유전자 치료제의 가장 문제점은 환자의 면역세포를 추출해 유전자를 조작하거나 결함이 있는 유전자를 정상 유전자로 교체하는 환자 맞춤 항암제로 접근성이 극히 제한 되었다고 할 수 있음. 국산 1호 CAR-T 치료제 탄생이 되었지만 거의 5억원 정도가 하는 치료비용 및 접근성 등을 비롯하여 고열과 저혈압을 동반하는 사이토카인 방출 증후군(CRS), 의식 저하와 경련을 일으키는 신경학적 독성, 그리고 면역력 저하 등이 독성학적 문제는 여전히 극복해야 할 문제임. CAR-T가 3세대 항암제이면 면역 관문 억제제의 3세대 면역항암제와 기존 1세대 화학 항암제의 결합으로 탄생한 Antibody-drug conjugate(항체-약물 접합체)가 4세대의 가장 첨단 항암제임. 현재까지 15종이 개발되었고 여전히 수많은 ADC 개발에 도전하고 있음. 항암제의 대표적인 특성은 치료 효과와 동반하여 부작용도 많다는 것임. **ADC는 이와 같은 off-target toxicity를 극복하고 항암효과를 극대화하는 유도미사일과 같은 항암제임. 그러나 여전히 ADC의 부작용이 보고되고 있으며 이를 극복하는 방법은 ADC의 한층 더 업그레이드를 통한 환자의 안전성을 높이는 핵심 사항이라고 할 수 있음. 이에 본 고찰에서는 승인된 15종 ADC에 분석을 통해 보다 더 안전성이 높이는 ADC 개발에 도움이 목적임.**

1. FDA-approved ADC

- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 **15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체)가 승인됨**(Liu, 2025; Mullard, 2026). 아래의 <표>는 지금까지 승인된 15종 ADC의 설계, 승인된 적응증, 표적 등을 요약한 것임.

<표> FDA 승인된 15종 ADC의 특성 요약

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2000; 2017	급성 골수성 백혈병(AML)
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	2011	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2+ BC
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti®	AstraZeneca	CD22	절단 가능	PE38	2018년, 미국 시장에서 단종됨	HCL
Polatuzumab vedotin-piiq	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	2019	미만성 거대 B세포 림프종
Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Se	Nectin-4	절단 가능	MMAE	2019	요로상피암 (방광)

		agen	4				암)
Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	HER2+ 피임약, HER2-저/초저혈 MBC, HER2+ GC, NSCLC
Sacituzumab govitecan	Trodely®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2 - MBC, TNBC
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF	2025년에 재승인 됨	재발성 또는 불응 성 다발성 골수종
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	PBD SG3199	2021	DLBCL
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	2021	자궁경부암
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE™	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	HR+/HER2- Breast cancer, NSCLC
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE	2025	비소세포암

2. Exatecan derivative 계열의 Payload

- DXd(deruxtecan)은 ADC의 payload로 응용된 Exatecan derivative(유도체)로 DNA topoisomerase I의 강력한 억제제(inhibitor).
- <표-1>에서처럼 FDA-승인 DXd 기반 ADC는 Trastuzumab deruxtecan(T-DXd)와 Datopotamab Deruxtecan(Dato-DXd)이 있음. 또한 EGFR 돌연변이가 있는 국소 진행성 또는 전이성 비소세포폐암에 대한 임상시험이 진행 중인 Patritumab Deruxtecan도 개발 중임.

<표-1> FDA-승인 DXd 기반 ADC

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/ Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	<ul style="list-style-type: none"> • Early-stage and metastatic HER2-positive, • HER2-low, and HER2-ultralow breast cancer, HER2-mutated • non-small cell lung cancer, • HER2-positive gastric cancer
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/ Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	<ul style="list-style-type: none"> • HR+/HER2- breast cancer • EGFR 돌연변이 비소세포폐암(NSCLC)
Patritumab Deruxtecan	HER3-DXd	Merck	HER3	절단 가능	DxD	임상 시험 중	<ul style="list-style-type: none"> • EGFR-mutated, locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC)

2-1) Trastuzumab deruxtecan(T-DXd)의 적응증

- T-DXd는 HER2-targeting ADC로 적응증 및 환자의 치료 상황은 다음과 같음(FDA, 2026; Ottawa, 2023).

① Breast cancer

- **초기 HER2 양성(HER2-Positive Early-Stage):**신보조 요법 후 잔류 침습성 질환 환자를 위한 신보조요법(수술 전) 치료 및 보조요법(수술 후 치료).
- **전이/절제 불가능한 HER2 양성(HER2-Positive Advanced/Metastatic):**이전에 항 HER2 기반 치료를 받은 성인을 위한 것임.
- **HER2-저 및 HER2-초저 전이(HER2-Low and HER2-Ultralow Metastatic):**HR-양성 또는 HR-음성 유방암을 가진 성인으로, HER2-저혈증 또는 HER2-초저 전이로 간주되며, 한 가지 이상의 내분비 치료나 이전 항암치료로 진행된 경우.

② 위 및 위식도(GEJ) 암(Gastric & Gastroesophageal (GEJ) Cancer)

- **국소 진행/전이 HER2 양성(locally advanced or metastatic HER2-positive gastric or GEJ adenocarcinoma):** 이전에 치료를 받은 HER2 양성(IHC3+ 또는 IHC 2+/ISH+) 선암종 환자, 이전에 트라스투주맙 기반 치료를 받은 성인의 경우.

③ 비소세포폐암(NSCLC, Non-small cell lung cancer)

- **HER2 돌연변이 절제 불가능/전이(Approved for unresectable or metastatic NSCLC):** HER2 (erbb2)이전에 전신 치료를 받은 돌연변이.

2-2) Datopotamab Deruxtecan(Dato-DXd)의 적응증

- Dato-DXd은 많은 종양에서 고도로 발현되는 Trop-2 단백질을 표적으로 마치 “정밀 전달 서비스(precision delivery service)”처럼 작용하여 건강한 조직은 건드리지 않은 채 암세포만을 사멸을 유도함. 적응증은 다음과 같음(FDA, 2026; Medscape, 2026; National Breast Cancer Foundation 등, 2026; Dent 등, 2026)).

① Breast cancer

- 성인 환자에게 적용 시: **HR-양성, HER2-음성.** (IHC 0, IHC 1+, 또는 IHC 2+/ISH-) 유방암 포함.
 - **사전 치료:** 환자는 국소 진행성 또는 전이성 질환에 대해 이미 내분비 기반 치료와 화학요법을 받은 적이 있어야 함.
- 또한 다음과 같이 지정되어 있습니다. 삼중음성 유방암(TNBC, Triple-negative breast center).
 - **사전 치료:** 절제가 불가능하거나 전이된 TNBC 환자 중 PD-1/PD-L1 억제제 치료 대상이 아닌 환자.

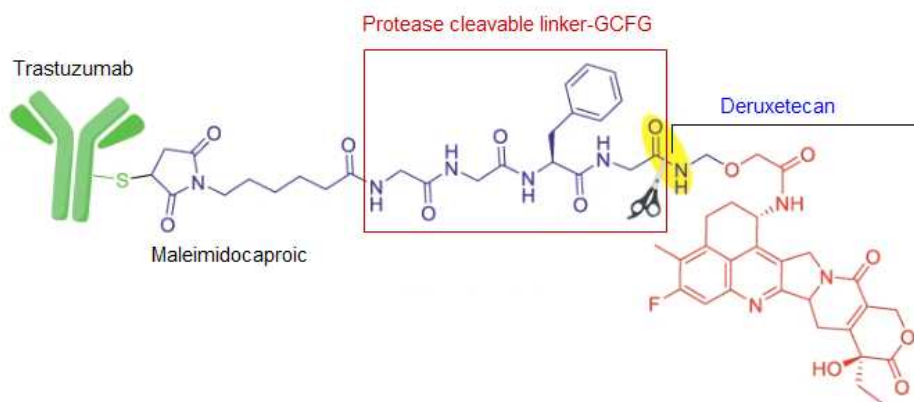
② 폐암(NSCLC)

- 성인 환자에게 적용 시: **EGFR(epidermal growth factor receptor) 돌연변이 비소세포폐암.**
 - **사전 치료:** 국소 진행성 또는 전이성 질환으로 환자는 이전에 EGFR 유도 표적 치료와 백금 기반 화학요법을 받았고 진행 중이어야 함.

3. Trastuzumab deruxtecan(T-DXd)의 항암기전 – Mechanism of action

3-1) ADC 구조

- Trastuzumab deruxtecan(T-DXd)은 항 HER2 mAb 트라스투주맙, 효소 분해 가능한 테트라펩티드 링커, 그리고 Exatecan derivative(유도체, DXd)로 구성된 ADC(Barroso-Sousa 등, 2021)
- <그림-1>에서처럼 Trastuzumab은 maleimide caproyl glycyl-glycyl-phenylalanyl-glycine (GGFG) peptide를 이용하여 시스테인 잔기를 통해 DXd를 연결(Nakada 등, 2016).



<그림-1> Trastuzumab deruxtecan의 구성

3-2) 특성

- <표-1>은 유방암 치료에 사용되는 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2, human epidermal growth factor receptor 2) 표적 항체-약물 접합체의 구조, 작용 기전 및 항종양 활성을 나타낸 것임(Martín 등, 2024).
- 높은 약물 대 항체 비율(drug-to-antibody ratio, DAR)(8:1) 덕분에 T-DXd가 세포 내로 흡수되고 tetrapeptide 기반 링커가 절단된 후, 표적 종양 세포에 높은 농도의 DXd가 전달됨

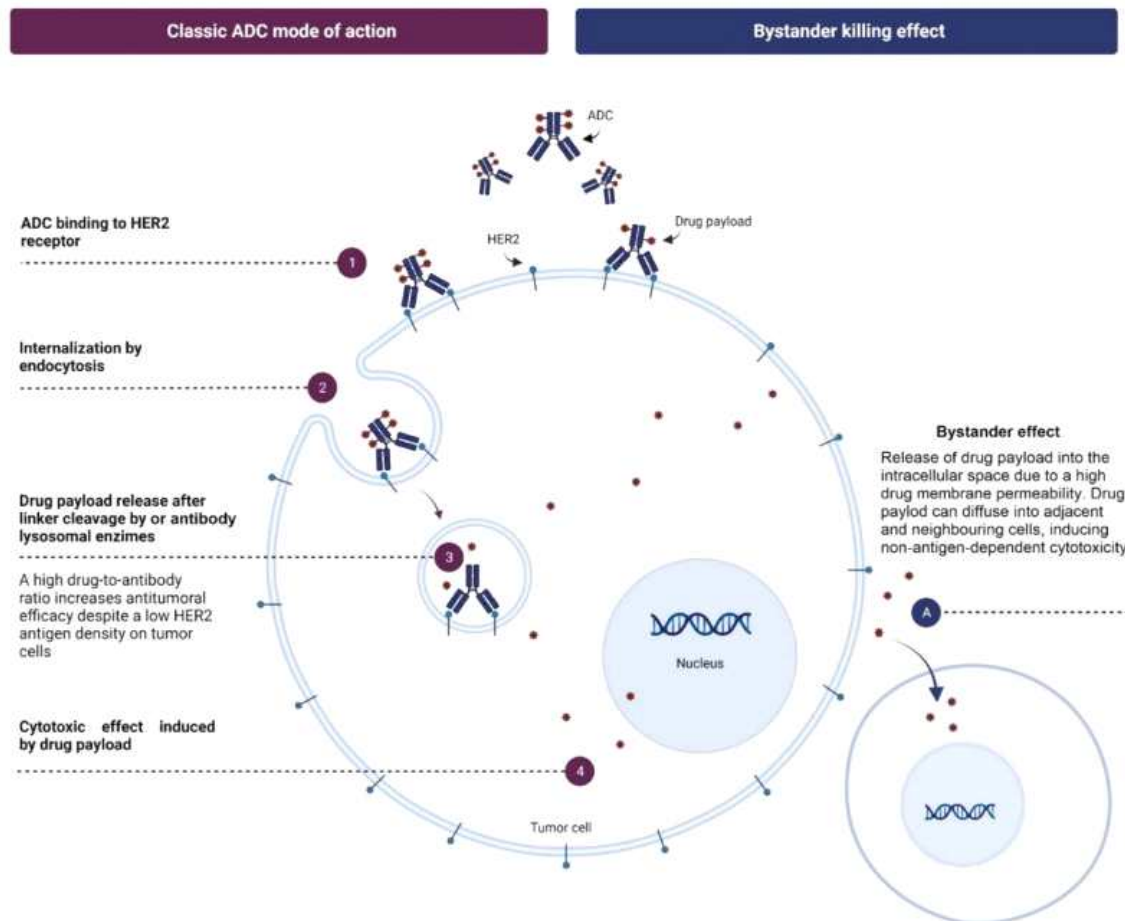
<표-1> 유방암 치료에 사용되는 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2, human epidermal growth factor receptor 2) 표적 항체-약물 접합체의 구조, 작용 기전 및 항종양 활성.

항목	Trastuzumab deruxtecan(T-DXd)
Structure	
DAR	8:1
Monoclonal antibody	Trastuzumab
Antibody isotype	IgG1
Linker	Tetrapeptide-based
Linker type	Cleavable by lysosomal cathepsins
Cytotoxic payload	Exatecan derivative
Mechanism of action of payload	Topoisomerase I inhibitor
IC ₅₀ in HER2-positive cells	6.7–26.8 ng/mL
Membrane-permeable?	Yes
Bystander effect?	Yes
Targets HER2-positive or homogeneous tumours? ^a	Yes
Targets HER2-low tumours? ^a	Yes

ADC, antibody-drug conjugate; DAR, drug-to-antibody ratio; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; IC₅₀, half-maximal inhibitory concentration; IgG1, immunoglobulin G1.

3-3) Trastuzumab deruxtecan의 항암기전

- <그림-2>에서처럼 고전적 작용 기전(classical mode of action)에서 ADC는 HER2 수용체에 결합한 후(1), 내포작용을 통해 세포 내로 흡수됨(2). T-DXd의 테트라펩티드 링커는 리소좀 효소인 cathepsin에 의해 분해 및 절단되면(3) 약물 페이로드가 방출되어 세포독성 효과를 유발함(4). 바이스탠더 살상 효과의 경우, 약물의 높은 세포막 투과성으로 인해 약물 유효 성분이 세포 내 공간으로 방출된 후 인접한 세포로 확산되어, 항원 비의존적 세포독성 효과를 나타낼 수 있음(Martin 등, 2024). 특히 세포독성은 토포이소머라제 I 억제제뿐만 아니라 미세소관 교란제, DNA 삽입제로서의 역할 등이 포함됨(Barroso-Sousa 등 2021, Ferraro 등, 2021). 방출된 후, 세포독성 유효 성분은 세포 내 표적(예: 튜블린, DNA 또는 토포이소머라제 I)에 결합하며, 이는 궁극적으로 표적 종양 세포의 사멸로 이어짐. (Barroso-Sousa 등, 2021).

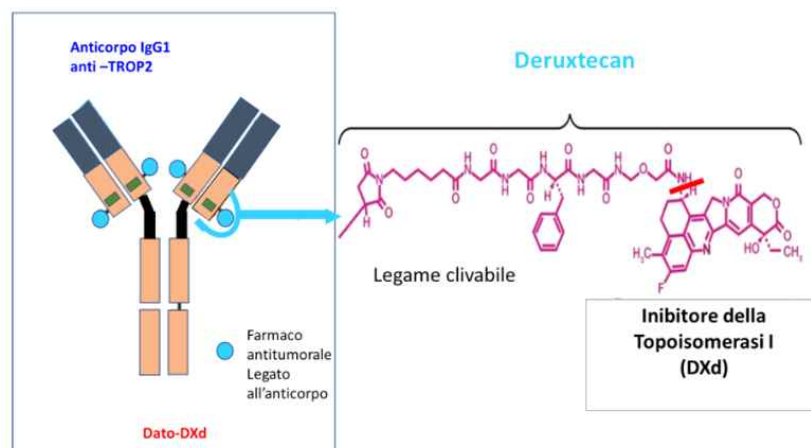


<그림-2> Trastuzumab deruxtecan의 두 가지 항암작용 기전: 고전적 작용 기전과 bystander effect에 의한 사멸 효과(Martín 등, 2024)

4. Datopotamab Deruxtecan(Dato-DXd)의 항암기전 – Mechanism of action

4-1) 구성

- <그림-3>에서처럼 Dato-DXd은 인간화된 항-TROP2 단일클론 항체가, 혈장 내 안정성이 높고 선택적으로 절단 가능한 링커를 통해 강력한 엑사테칸 유래 토포이소머라제 I 억제제인 데루스테칸(DXd)과 결합된 ADC(Vincenzo 등, 2025; Sreelatha 등, 2025).
- TROP2(Trophoblast cell-surface antigen 2)는 항체-약물 복합체(ADC) 개발 분야에서 매우 유망한 종양 표지자이자 치료 표적임. 피부, 간, 폐, 심장, 신장, 식도 등 여러 정상 상피 조직에서도 발현되지만, 악성 세포에서는 그 발현 수준이 현저히 높아짐. 1p32 염색체에 위치한 인트론이 없는 TACSTD2 유전자에 의해 암호화되는 TROP2는 제1형 막 관통 당단백질임(Stepan 등, 2011; Calabrese 등, 2001).
- Dato-dxd는 테트라펩타이드 기반 가분해성 링커(tetrapeptide-based cleavable linker), 구체적으로는 Gly-Gly-Phe-Gly를 이용하여 TROP2 표적 항체를 DXd 유효 성분에 결합시킴. 이 링커는 혈류 내에서 혈장 안정성이 매우 높으며, 암세포 내부의 종양 특이적 리소솜 효소인 cathepsin에 의해 선택적으로 분해(incenzo 등, 2025)

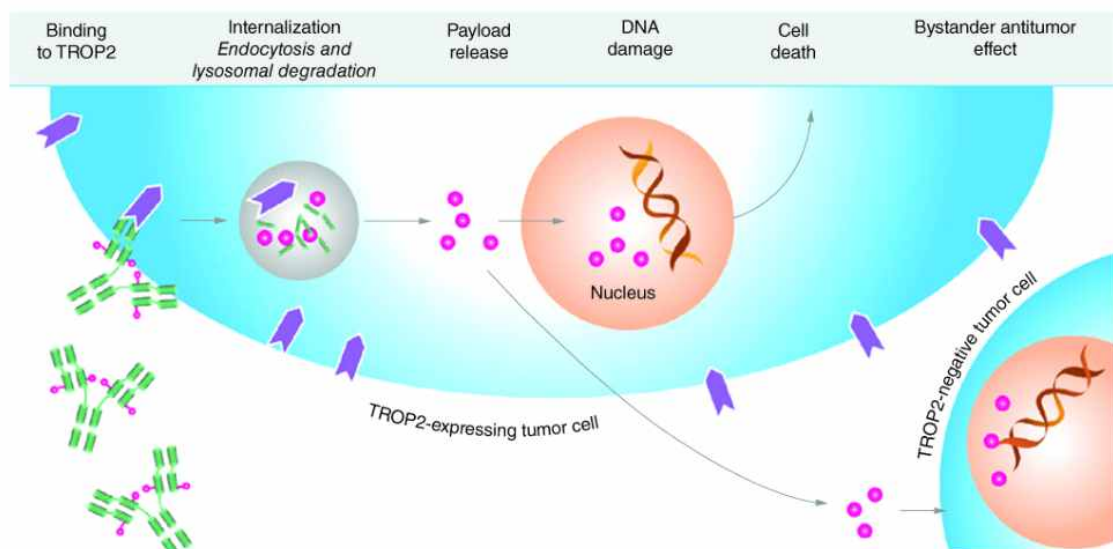


<그림-3> Datopotamab Deruxtecan(dato-DXd)의 구성

- Payload인 Dxd는 매우 강력한 효능을 지닌, 세포막 투과성 토포이소머라제 I 억제제임. 세포독성은 토포이소머라제 I 억제제뿐만 아니라 미세소관 교란제, DNA 삽입제로서의 역할이 등이 포함됨 (Barroso-Sousa 등 2021, Ferraro 등, 2021). 방출된 후, 세포독성 유효 성분은 세포 내 표적(예: 튜불린, DNA 또는 토포이소머라제 I)에 결합하며, 이는 궁극적으로 표적 종양 세포의 사멸로 이어짐(Barroso-Sousa 등, 2021). Dato-DXd은 약 4:1의 최적화된 약물-항체 비율(DAR)로 구성(Schipilliti 등, 2024).

4-2) Dato-dxd의 항암기전

- <그림-4>에서처럼 Dato-DXd은 혈청 안정성이 뛰어난 테트라펩타이드 기반의 종양 선택적 절단 가능 링커(A)를 통해 강력한 토포이소머라제 II 억제제와 접합된 인간화 항-TROP2 IgG1 단일클론 항체로 구성된, TROP2를 표적으로 하는 ADC임(Nakada 등, 2019). 안정적인 링커 덕분에, Dato-DXd는 정맥 내(iv.) 투여 후 약 45.12 ± 13.92 시간의 연장된 반감기($t_{1/2}$)를 나타냄(Okajima 등, 2021). 이러한 연장된 $t_{1/2}$ 는 온전한 ADC가 종양에 노출되는 시간을 늘려주며, 이는 항종양 효과와 반응 지속 기간을 증가시킬 수 있음. 또한 연장된 $t_{1/2}$ 덕분에 3주마다 한 번씩(21일 주기의 1일째) 투여할 수 있음. 항체가 종양 표면에 발현된 TROP2에 결합하면 전체 분자가 내재화되고, 링커가 효소적으로 절단되어 DXd가 방출됨(Mahmood 등, 2021).
- 온전한 ADC와 달리, 유리 상태의 DXd는 in vivo에서 짧은 $t_{1/2}$ 를 나타내며, 이로 인해 유효 성분에 대한 전신 노출이 낮아져 표준 치료인 화학요법과 차별화된 안전성 프로파일을 갖음. 엑사테칸 유도체인 DXd는 동일한 TROP2(Trophoblast cell-surface antigen 2)에 대한 ADC인 Sacituzumab govitecan의 payload인 SN38인 이리노테칸보다 더 강력한 효능을 보임(Han 등, 2022). 또한, DXd는 높은 세포막 투과성을 나타내어 주변 세포로 침투할 수 있으며, 반드시 TROP2를 발현하지 않는 종양 세포에서도 세포독성 효과를 발휘하는 “방관자 효과(bystander effect)”도 있음(Ogitani 등, 2016)



<그림-4> Proposed mechanism of action of datopotamab deruxtecan.

DXd: Deruxtecan; IgG1: Immunoglobulin G1; mAb: Monoclonal antibody; TROP2: Trophoblast cell surface antigen 2.

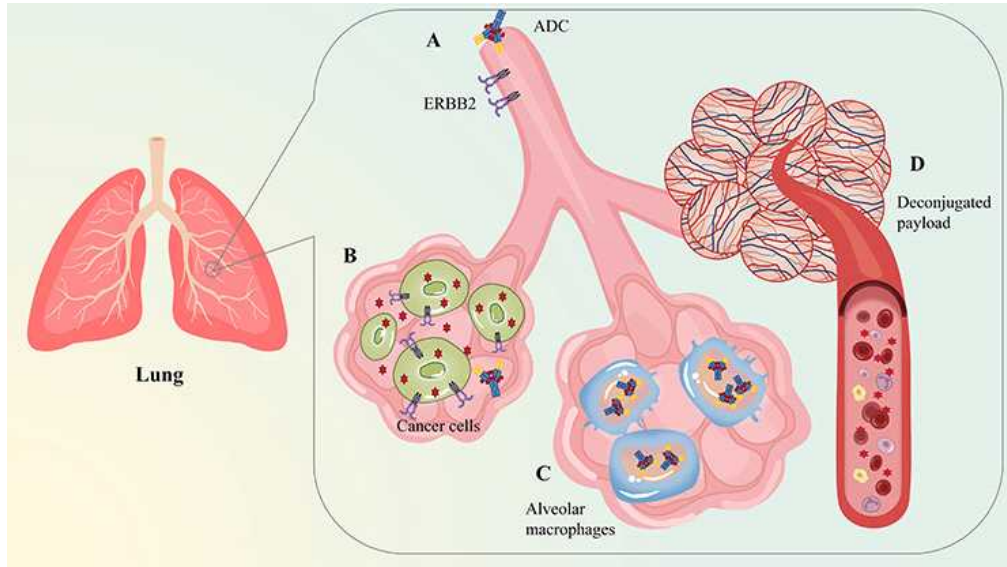
5. T-DXd와 Dato-DXd의 독성학적 고찰

- ADC 설계의 목표는 종양에 미치는 세포독성 효과를 제한하면서 전신 노출을 최소화하는 것임. 그러나 T-DXd와 Dato-DXd의 ADC는 비록 동일한 payload를 가졌지만 탑재체와 표적 메커니즘에 따라 서로 다른 독성 프로필을 가지고 있기 때문에 독성의 차이가 있음.

5-1) T-DXd의 주요 독성 및 경로

① 간질성 폐질환(ILD) / 폐렴(Interstitial Lung Disease (ILD) / Pneumonitis):

- 이는 T-DXd와 관련된 가장 중요한 독성임. 다양한 진행성 고형 악성 종양을 가진 환자 3,380명을 대상으로 한 18건의 임상 연구에 대한 문헌 고찰을 통해 확인됨. 대부분의 환자는 3주마다 5.4 mg/kg 또는 6.4 mg/kg 용량의 T-DXd를 정맥 주사 형태로 투여받았음. 판정된 약물 관련 ILD/폐렴의 전체 발생률은 12.40%였으며, ILD/폐렴의 발생률은 종양 유형에 따라 차이가 있었음(Liao 등, 2025). 대부분의 ILD/폐렴 사례는 경증이었으나, ILD/폐렴 관련 사망 위험을 간과해서는 안 됨.
- T-DXd의 항체 표적인 HER2 단백질 발현은 인간 폐에서 주로 기관지 및 세기관지 상피에 국한되어 있으며, 폐포 상피에는 나타나지 않음(Merrick 등, 2006). 따라서 독성 메커니즘은 항체-약물 복합체(ADC)에 의한 간질성 폐질환/폐렴에는 직접적인 세포독성 폐 손상과 면역 매개성 폐 손상으로 설명되고 있음. 이에 대해 <그림-5>에서처럼 네 가지 가능한 기전이 제안되었음: (1) 표적 의존적 T-DXd 흡수. (2) 정상 세포에서의 표적 비의존적 T-DXd 흡수. (3) 암세포에서 방출된 유리 세포독성 DXd에 의해 유발되는 “바이스탠더 효과”. (4) T-DXd의 탈결합으로 인해 순환하는 유리 DXd(Liao 등, 2025).
- **폐포 대식세포의 cathepsin 발현:** T-DXd에 의한 폐 독성의 주요 비표적 기전은 폐 내 대식세포의 흡수와 관련이 있음. **인간 폐포 대식세포에서 지속적으로 발현되는 카텡신 B(cathepsin B, CTSB)**은 T-DXd 내 링커의 절단을 촉매함(Inoue 등, 2003; Shiose 등, 2007). 이 과정은 동물 모델에서 T-DXd에 의한 폐 독성과 관련이 있는 것으로 밝혀졌음(Kumagai 등, 2020). 이전의 동물 연구에 따르면, T-DXd는 면역 매개 작용보다는 직접적인 세포 독성을 통해 폐 손상을 유발하는 것으로 나타났음(Merrick 등, 2003). 이러한 결과는 원숭이에서 T-DXd에 의해 유발된 폐 독성이 용량 의존적이고 용량-빈도 의존적이며, 폐 상피 세포에서의 HER2 흡수와는 무관함을 강조함. 또한, 순환하는 비결합형 DXd만으로는 T-DXd와 관련된 관찰된 폐 독성을 설명할 수 없는 것으로 보임.



<그림-5> T-DXd에 의해 유발되는 간질성 폐질환(ILD)/폐렴의 가능한 기전. (A) ERBB2 표적에 의존적인 T-DXd의 흡수, (B) 정상 세포에서 표적과 무관하게 일어나는 T-DXd의 흡수, (C) 암세포에서 방출된 자유 세포독성 DXd에 의해 유발되는 “바이스탠더 효과”, (D) T-DXd의 탈결합으로 인해 순환하는 유리 DXd(Liao 등, 2025).

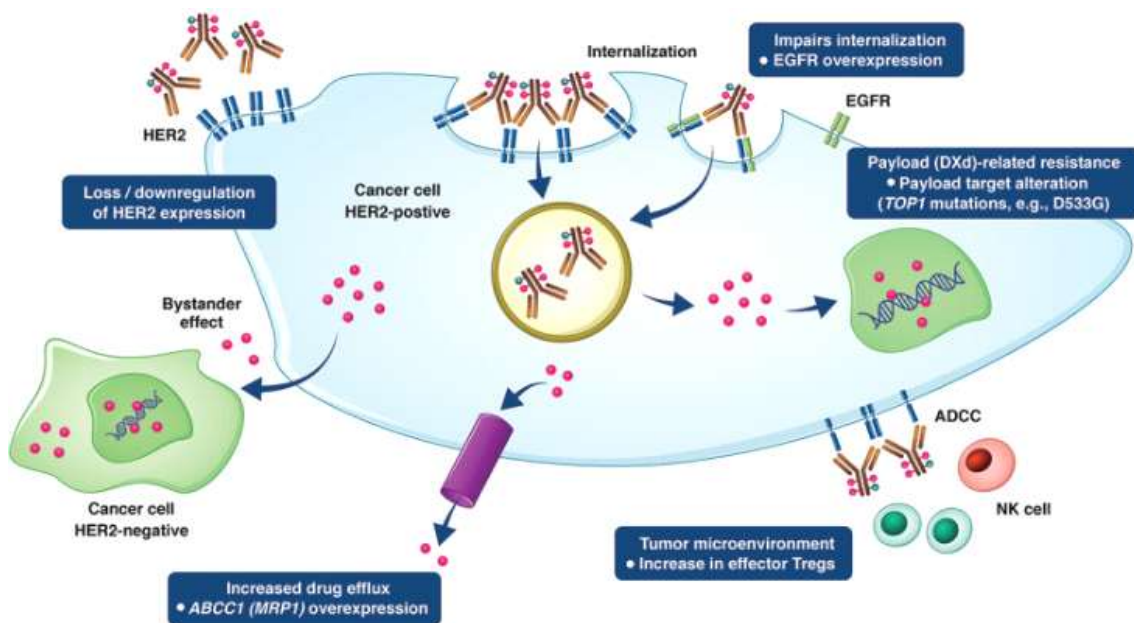
② Hematologic Toxicities(혈액학적 독성)

- T-DXd는 분열 중인 세포를 표적으로 삼아 골수 억제를 유발함. 이로 인해 일반적으로 호중구 감소증, 빈혈, 혈소판 감소증이 발생하는데 이는 이 약물의 토포이소머라제 I 억제제 유효 성분이 미치는 세포독성 효과를 반영한 것임. 가장 두드러진 혈액학적 독성은 호중구감소증이며, 이는 일반적으로 용량 감량이나 지지 요법을 통해 관리할 수 있음 (Modi 등, 2020, MERIC-Bernstam 등, 2024). 중증 호중구감소증(3등급 이상)은 비교적 소수의 환자에서 보고되었으며, 발열성 호중구감소증은 드물게 발생했는데, 이는 HER2 발현 악성 종양을 대상으로 한 이전 T-DXd 연구 결과와 일치한다 (Modi 등, 2020, MERIC-Bernstam 등, 2024). 기전은 DXd는 분열 세포를 표적으로 삼아 골수 억제를 촉진하는 것으로 추정되고 있음

③ T-DXd: 저항 기전

- T-DXd에 대한 내성 메커니즘을 이해하는 것은 새로운 치료 전략을 개발하는 데 필수적입니다. <그림-6>는 T-DXd에 대한 내성의 잠재적 기전을 나타낸 것임. ADC에 대한 일반적인 내성 기전은 항체-항원 결합, ADC 내부 및 처리, 페이로드 작용 등 여러 기전적 단계에서 ADC 활성을 회피하는 것을 포함함. T-DXd는 HER2 양성 암세포에 결합해 내부화된 후 항종양 활성을 발휘하며, 이를 통해 탑재체인 DXd가 방출됨. NK 세포가 매개하는 항체 의존성 세포독성과 인접한 HER2 음성 세포를 죽이는 방관자 효과도 주요 작용 기전임. T-DXd에 대한 후천적 내성에 기여하는 여러 잠재적 기전이 다음과 같음: (1)

HER2 발현의 저하/하향 조절: 암세포 표면의 HER2 수치 감소로 T-DXd의 결합 부위 수가 감소; (2) T-DXd 내화의 장애, EGFR 과발현은 HER2와의 상호작용을 통해 T-DXd 내화를 저해할 수 있음; (3) 탑재체 관련 내성: 토포이소머라제 I의 돌연변이와 같은 탑재체 표적 변화는 약물의 효능을 감소시킬 수 있음; (4) 약물 배출가스 증가: 약물 배출 펌프 (ABCC1 포함, MRP1)의 과발현이 페이로드를 세포 밖으로 적극적으로 운반함; 그리고 (5) 종양 미세환경 변화: 효과 조절 T 세포와 같은 면역억제 세포의 증가가 NK 세포가 매개하는 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, 항체 의존성 세포 매개 세포독성) 반응을 억제할 수 있음.



<그림-6> T-DXd에 대한 내성의 잠재적 기전.

ABCC1/MRP1, ATP-binding cassette subfamily C member 1/multidrug resistance-associated protein 1; ADC, antibody – drug conjugate; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; EGFR, epidermal growth factor receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; NK cell, natural killer cell; TOP1, topoisomerase I; Treg, regulatory T cell.

- **임상시험에서의 내성 예시:** 표적 발현의 손실 또는 감소는 표적 치료에 대한 내성의 가장 근본적인 메커니즘으로 간주되며, 이 원리는 T-DXd에도 적용됨. 실제로, 기저라인에서 HER2 발현을 가진 34명의 환자를 대상으로 한 분석에서, 11명(32.4%)은 HER2 발현이 완전히 상실되었고, 10명(29.4%)은 T-DXd 치료 후 HER2 점수가 감소했음. 이러한 HER2 발현 손실 또는 감소는 질병 진행으로 치료를 중단한 환자에서 확인되었으며, 독성으로 인해 치료를 중단한 한 환자에서는 HER2 점수가 유지되었음(Gouda 등, 2025). 지속 HER2 발현의 중요성은 임상시험의 바이오마커 분석에서도 더욱 입증되었으며, trastuzumab 치료 후 또는 치료 중 지속 HER2 발현이 확인된 환자(45.7%)에서 T-DXd와 TPC(treatment of physician's choice, 의사가 선택한 치료법) 간 ORR(objective response rate, 객관적 반

응률) 차이가 1차 치료 전 HER2 양성인 환자(33.0%)보다 더 컸음. 이는 더 큰 OS(overall survival, 전체 생존율) 혜택으로 이어졌으며, 전자군의 심박수가 0.28인 반면 후자의 0.76에 비해 감소했음(Shitara 등, 2024). 이 결과와 일치하여, 이전 후향적 분석(n = 29)에서는 치료 직전 T-DXd 직전 HER2 음성 반응을 보인 환자에서 HER2 양성률을 유지하는 환자보다 수치적으로 낮은 ORR이 나타났습니다(30.8% 대 56.3%)(Jubashi 등, 2025).

5-2) Dato-DXd의 전신 및 비표적 독성

- T-DXd가 높은 약물 대 항체 비율(drug-to-antibody ratio, DAR)인 8:1이지만 Dato-DXd의 DAR은 다른 TROP2 표적 ADC와 비교했을 때 낮은 약 4:1 비율임(Schipilliti 등, 2024). 이와 같은 특정 공학은 치료 창을 개선하고 비표적 전신독성(systemic toxicity)을 제한하면서 종양 세포 내 표적 DNA 손상을 보장하기 위한 것임(Schipilliti 등, 2024).
 - ADC 구조는 표적 외 전신 노출을 줄여주지만, Dato-DXd에 의한 전신 독성은 여전히 발생함. 가장 흔한 부작용으로는 구내염(입안 궤양), 메스꺼움, 피로, 탈모, 안구 표면 이상 등이 있음. 가장 중요한 전신 관련 우려 사항 및 모니터링 지표는 다음과 같음(Lisberg 등, 2025). 그러나 T-DXd와 동일하게 Dato-DXd에 의하여서도 간질성 폐질환(ILD) / 폐렴(Interstitial Lung Disease (ILD)이 가장 중대한 독성 현상임(Lisberg 등, 2025; Heist 등, 2024; Jones 등, 2025).
- ① 구강 독성(구내염 / 점막염Oral Mucositis / Stomatitis): 가장 자주 관찰되는 부작용
 - ② 안독성(Ocular Toxicity): 안구건조증, 각막염, 눈물 분비 증가를 유발
 - ③ 간질성 폐질환(ILD) / 폐렴(Interstitial Lung Disease (ILD) / Pneumonitis): Dato-DXd의 가장 중대한 위험
 - ④ 위장관 이슈(Gastrointestinal Issues): 메스꺼움과 구토

6. 결론: FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Exatecan derivatives (T-DXd and Dato-DXd)

6-1) 핵심 ADC

- DXd(deruxtecan)은 ADC의 payload로 응용된 Exatecan derivative(유도체)로 DNA topoisomerase I의 강력한 억제제(inhibitor). DXd(deruxtecan)를 기반으로 한 Trastuzumab deruxtecan(T-DXd)와 Datopotamab Deruxtecan(Dato-DXd)은 DXd(deruxtecan)를 payload로 하는 FDA 승인된 ADC임. 또한 EGFR 돌연변이가 있는 국소 진행성 또는 전이성 비소세포폐암에 대한 임상시험이 진행 중인 Patritumab Deruxtecan도 개발 중임.

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/ Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	<ul style="list-style-type: none"> • Early-stage and metastatic HER2-positive, • HER2-low, and HER2-ultralow breast cancer, HER2-mutated • non-small cell lung cancer, • HER2-positive gastric cancer
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/ Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	<ul style="list-style-type: none"> • HR+/HER2- breast cancer • EGFR 돌연변이 비소세포폐암(NSCLC)
Patritumab Deruxtecan	HER3-DXd	Merck	HER3	절단 가능	DxD	임상 험중 시	<ul style="list-style-type: none"> • EGFR-mutated, locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC)

6-2) 핵심 부작용과 독성기전

- T-DXd와 Dato-DXd의 공통적으로 중대한 부작용은 간질성 폐질환(ILD) / 폐렴(Interstitial Lung Disease (ILD) / Pneumonitis)임
- 암세포 사멸은 payload DXd(deruxtecan)에 의한 토포이소머라제 I 억제제뿐만 아니라 미토콘드리아 교란제, DNA 삽입제 기능 등의 역할에 기인함. Payload DXd는 암세포 내에서 카텝신 B (cathepsin B)에 의해 ADC에서 분리되어 암세포 사멸을 유도하는 항암기전).
- 카텝신 B (cathepsin B, CTSB)는 어디서나 발현되는 리소좀 시스테인 프로테아제 (lysosomal cysteine protease). 건강한 인간에서, 거의 모든 세포 유형에서 기저 수준에서 발견되어 단백질 교체, 자가포식, 항원 제시를 촉진함. 하지만 염증이나 종양 진행과 같은 병리적 상태에서 특정 세포에 의해 과발현되고 분비됨(Liu 등, 2024).
- <표>에서처럼 정상적인 생리학적 조건에서 인간의 폐 상피세포(human lung epithelial cells)는 비활성 전구체인 약 42 kDa의 프로카텝신 B(Procathepsin B)를 분비함. 카텝신

B의 인간 폐상피 내 기능적 관련성, 조절 등의 생리적 기능 및 분비 등과 관련하여 구조화되어 있음(Gerber 등, 2000; Burnett 등, 1995; Wang 등, 2023; Jiang 등, 2023)

- ① **단백질 성숙** 폐 상피세포는 프로카텡신 B를 합성하며, 이는 호중구 엘라스타제와 같은 다른 효소에 의해 세포 외부에서 절단 및 활성화될 수 있음.
- ② **태아 발달**: CTSB는 분지된 추정 기관지의 상피세포(임신 12주<)에서 조기에 검출되어 태아 폐 발달과 조직 재형성에 필수적인 역할을 함.

<표> 다양한 cathepsin 아종의 정상 조직 및 병리 상태 조직에서의 발현(Jiang 등, 2023)

Cysteine protease Categories	Expression in specific cells/tissue	Pathology
cathepsin B	Neuron, Microglia, Human PBMCs, Type-1 alveolar epithelial cells , Hela cells, Human pancreatic cancer cells, Thyroid carcinoma cells, Liver	Apoptosis, Inflammation, NLRP3 activation, Oxidative stress, Hepatic steatosis, Ferroptosis, Thyroid malignancies, Osteoarthritis, Alzheimer's disease, Cancer
cathepsin C	Neutrophils, Mast cells, Monocytes, Macrophages, Cytotoxic lymphocytes, Natural killer cells, Lung , Spleen, Kidney, Liver	Apoptosis, Pro-inflammatory granule-associated serine proteases activation, NLRP3 activation, Inflammation, Haim-Munk syndrome, Asthma, Rheumatoid arthritis, Multiple sclerosis, COPD, Cystic fibrosis, Sepsis, Cancer
cathepsin F	Human alveolar macrophage , Senescent human skin cells, Cervical cancer cells, Gastric cancer cells, Heart, Brain, Skeletal muscle, Testis, Prostate, Ovary, Colon	Apoptosis, Cervical cancer, Gastric cancer
cathepsin H	Human prostate cancer cells, Osteosarcoma cells, Pro-monocytic cells, Macrophages, Thyrocytes, Kidney	BMP4 protein degradation, Protein degradation, Mature neuropeptide substrates degradation, lysosomal degradation of pre-hormones, Pro-granzyme B in cytotoxic lymphocytes processing, Active peptide neurotransmitters production, Angiogenic switching, Tumor vasculature regulating, Colorectal, Pancreatic, Prostate cancer, Glioma, Melanoma, Breast cancer, Fibrous meningioma, Arthritis, Lung cancer
cathepsin K	Osteoclasts, Epithelial cells, Glioblastoma cells, Brain cells, Neurons, Glial cells, Bronchial cells, Macrophages, Endothelial cells, Multinucleated giant cells, Langhans cells, Fibroblasts, Lymphocytes, Lung , Heart, Renal tumors,	ECM degradation, Bone metastasis, Collagen degradation, Growth factors degradation, Stem cell Differentiation, Cellular protein turnover, Extracellular matrix remodeling, Wound healing, Autoimmune diseases, Obesity, Lung fibrosis, Osteoporosis, Rheumatoid arthritis, Stroke, Schizophrenia, Cardiac dysfunction, Myocardial infarction, Atherosclerosis, Giant cell tumors, Glioblastoma, Renal tumors, Cerebral aneurism, Chondrosarcoma, Melanoma, Bone cancer, Prostate cancer, Breast cancer, Cancer, Renal cell carcinoma
cathepsin L	Macrophages, Microglia, Cancer cells, Tumor-associated fibroblasts	NLRP3 activation, Apoptosis, Autophagy, Antigen processing and presentation, Spike protein processing, Rheumatoid arthritis, Atherosclerosis, Liver fibrosis, Type I and II diabetes, Cardiac diseases, Bone diseases, Kidney disorders, Immune disorders, Bone turnover, Muscle degeneration, Cancer metastasis

cathepsin O	Macrophages	Extracellular matrix degradation, Hormonal regulation, Immune activation, Catabolism of intracellular proteins mediation, Macrophage function activation, Bone resorption activation
cathepsin S	Antigen-presenting cells (APCs), B-cells, Dendritic cells, Macrophages, Spleen, Lymphatic system, Cancer	Inflammation, NLRP3 activation, Pro-inflammatory cytokines and proteases upregulating, Apoptosis, Angiogenesis, Antigen processing and presentation, ECM and BM proteolysis, Decorin degradation, Proteoglycan 4 degradation, PAR2 cleavage, FKN cleavage, Tuberculosis, COPD, Cardiovascular diseases, Atherosclerosis, Cystic fibrosis (CF), Sjögren's syndrome, Idiopathic pulmonary fibrosis, Lupus, Obesity, Pain, Cancer, Arthritis, Neuropathy
cathepsin V	Macrophages, Cornea, Thymus, Heart, Brain, Skin, Testis, Lung bronchus , Kidney, Esophagus, Gastrointestinal tissue	Antigenic peptides release, Intracellular degradation of elastin, Corneal neovascularization, MHC class II molecules maturation, Elastin fibrils turnover, Intra- and extra-cellular substrates cleavage, Hypertension, Keratoconus corneas, Myasthenia gravis, Atherosclerosis, Aortic aneurysm, Breast cancer, Squamous cell carcinoma, Colorectal cancer
cathepsin X	Monocytes, T-lymphocytes, Macrophages, dendritic cells, Neuronal cells, non-hematopoietic bone marrow cells, gastrointestinal tract	Inflammation, Phagocytosis, maturation, proliferation, migration, adhesion, and the signal transduction of immune cells, Adhesion and maturation of macrophages and dendritic cells, Clathrin-dependent phagocytosis suppression, Hormone signaling regulation, Phagocytosis, Signal transduction, Cancer, Neurodegenerative disorders, Inflammatory diseases
cathepsin W	NK cells, CTLs	Chronic inflammatory bowel disease, Autoimmune gastritis

6-3) 핵심 부작용과 독성기전의 결론

- T-DXd 및 Dato-DXd ADC의 핵심 부작용은 간질성 폐질환과 폐렴이며 이는 payload DXd(deruxtecan)의 분리를 유도하는 cathepsin B의 발현이 폐조직에서 이루어지기 때문임.

<참고문헌>

Jiang H, Dong Z, Xia X and Li X (2023) Cathepsins in oral diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Front. Immunol.* 14:1203071. doi: 10.3389/fimmu.2023.1203071

Burnett D, Abrahamson M, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Buttle DJ. Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Feb 20;317(1):305-10.

Wang J, Zheng M, Yang X, Zhou X, Zhang S. The Role of Cathepsin B in Pathophysiologies of Non-tumor and Tumor tissues: A Systematic Review. *J Cancer.* 2023 Jul 24;14(12):2344-2358.

Fuxian Liu, Ting Zhou, Shangzu Zhang, Yangyang Li, Yan Chen, Zhiming Miao, Xin Wang, Genqianq Yang, Qiyang Li, Liying Zhang, Yongqi Liu, Cathepsin B: The dawn of tumor therapy, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 269, 2024, 116329, ISSN 0223-5234.

Gerber A, Welte T, Ansorge S, Bühling F. Expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells is regulated by cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:287-92.

FDA, 2026. FDA approves datopotamab deruxtecan-dlnk for unresectable or metastatic, HR-positive, HER2-negative breast cancer. FDA approves datopotamab deruxtecan-dlnk for unresectable or metastatic, HR-positive, HER2-negative breast cancer.

Medscape, 2026. datopotamab deruxtecan. Datroway (datopotamab deruxtecan) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more.

FDA, 2026. FDA approves two separate indications for fam-trastuzumab deruxtecan-nxki in HER2-positive early-stage breast cancer. FDA approves two separate indications for fam-trastuzumab deruxtecan-nxki in HER2-positive early-stage breast cancer | FDA

Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. Trastuzumab Deruxtecan (Enhertu): CADTH Reimbursement Recommendation: Indication: For the treatment of adult patients with unresectable or metastatic HER2-low (IHC 1+ or IHC 2+/ISH-) breast cancer who have received at least 1 prior line of chemotherapy in the metastatic setting or developed disease recurrence during or within 6 months of completing adjuvant chemotherapy. Patients with hormone receptor positive breast cancer should have received at least 1 and be no longer considered for endocrine therapy [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2023 Jul. Report No.: PC0305.

Daniel Jones et al., Abstract A095: Tolerability and ocular adverse events of Datopotamab Deruxtecan in advanced cancers: A meta-analysis of phase III trials. *Mol Cancer Ther* (2025) 24 (10_Supplement): A095.

Heist, RS. Heist, Jacob Sands, Aditya Bardia, Toshio Shimizu, Aaron Lisberg, Ian Krop, Noboru Yamamoto, Takahiro Kogawa, Saba Al-Hashimi, Simon S.M. Fung, Anat Galor, Francesca Pisetzky, Priyanka Basak, Cindy Lau, Funda Meric-Bernstam, Clinical management, monitoring, and prophylaxis of adverse events of special interest associated with datopotamab deruxtecan, *Cancer Treatment Reviews*, Volume 125, 2024, 102720, ISSN 0305-7372.

Lisberg A, Huppert LA, Halmos B, Ledezma B, Soto-Romano V, Traina TA. Datopotamab deruxtecan-associated select adverse events: clinical practices and institutional protocols on prophylaxis, monitoring, and management. *Oncologist.* 2025 Sep 1;30(9):oyaf225.

Modi, S., C. Saura, T. Yamashita, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 382 (7) (2020), pp. 610-621,

Meric-Bernstam, F., V. Makker, A. Oaknin, et al. Efficacy and Safety of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-expressing solid tumors: primary results from the DESTINY-PanTumor02 phase II trial. *J. Clin. Oncol.*, 42 (1) (2024), pp. 47-58,

Jubashi A, Nakayama I, Koganemaru S, et al. Prognostic and predictive factors for the efficacy and safety of trastuzumab deruxtecan in HER2-positive gastric or gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer.* 2025;28(1):63-73.

Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive advanced gastric cancer: exploratory biomarker analysis of the randomized, phase 2 DESTINY-Gastric01 trial. *Nat Med.* 2024;30(7):1933-1942.

Gouda MA, Gonugunta A, Dumbrava EE, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 loss following treatment with trastuzumab deruxtecan in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2025;31(7):1268-1274.

Merrick DT, Kittelson J, Winterhalder R, et al. Analysis of c-ErbB1/epidermal growth factor receptor and c-ErbB2/HER-2 expression in bronchial dysplasia: evaluation of potential targets for

chemoprevention of lung cancer. Clin Cancer Res. 2006;12:2281–2288. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2291

Kumagai K, Aida T, Tsuchiya Y, Kishino Y, Kai K, Mori K. Interstitial pneumonitis related to trastuzumab deruxtecan, a human epidermal growth factor receptor 2-targeting Ab–drug conjugate, in monkeys. Cancer Science. 2020;111(12):4636–4645. doi:10.1111/cas.14686

Inoue K, Kumazawa E, Kuga H, Susaki H, Masubuchi N, Kajimura T. CM-dextran-polyalcohol-camptothecin conjugate: DE-310 with a novel carrier system and its preclinical data. Polymer Drugs Clin Stage. 2003;145–153.

Shiose Y, Ochi Y, Kuga H, Yamashita F, Hashida M. Relationship between drug release of DE-310, macromolecular prodrug of DX-8951f, and cathepsins activity in several tumors. Biol Pharm Bull. 2007;30(12):2365–2370. doi:10.1248/bpb.30.2365

Liao D, Zhang J, Yan T, Chen Y, Fu Y, Xie N, Long M. A Systematic Review of Mechanisms, Incidence, and Management of Trastuzumab Deruxtecan Induced ILD/Pneumonitis in Solid Tumors. Drug Des Devel Ther. 2025;19:1655-1668

Merrick DT, Kittelson J, Winterhalder R, et al. Analysis of c-ErbB1/epidermal growth factor receptor and c-ErbB2/HER-2 expression in bronchial dysplasia: evaluation of potential targets for chemoprevention of lung cancer. Clin Cancer Res. 2006;12:2281–2288. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2291.

Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, Naito H, Agatsuma T. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. Cancer Sci. 107(7), 1039–1046 (2016)

Han S, Lim KS, Blackburn BJ et al. The potential of topoisomerase inhibitor-based antibody-drug conjugates. Pharmaceutics. 14(8), 1707 (2022).

Mahmood I. Clinical pharmacology of antibody-drug conjugates. Antibodies (Basel). 10(2), 20 (2021).

Francesca Matilde Schipilliti, Denise Drittone, Federica Mazzuca, Daniele La Forgia, Deniz Can Guven, Alessandro Rizzo, Datopotamab deruxtecan: A novel antibody drug conjugate for triple-negative breast cancer, Heliyon, Volume 10, Issue 7, 2024, e28385, ISSN 2405-8440.

Vincenzo Di Lauro, Alessandro Rizzo, Margherita Tafuro, Emanuela Fina, Claudia Martinelli, Claudia Calderaio, Rossana Di Rienzo, Miriam Pirolo, Annarita Fanizzi, Raffaella Massafra, Michelino De Laurentiis, Datopotamab deruxtecan: rational strategies, novel advancements, challenges, and future perspectives, Cancer Treatment Reviews, Volume 140, 2025, 103023, ISSN 0305-7372.

Stepan, L.P. · Trueblood, E.S. · Hale, K. et al., Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues: potential implications as a cancer therapeutic target. J Histochem Cytochem. 2011; 59(7):701-710.

Calabrese, G. · Crescenzi, C. · Morizio, E. et al., Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. 2001; 92(1–2):164-165

Gangu Sreelatha, Naikoti Akhila, Arunabha Mallik, Datopotamab Deruxtecan: A Comprehensive Review of a Trop2 Targeted Antibody–Drug Conjugate. Chemistry Research Journal, 2025, 10(6):113-118.

Okajima D, Yasuda S, Maejima T et al. Datopotamab deruxtecan, a novel TROP2-directed antibody-drug conjugate, demonstrates potent antitumor activity by efficient drug delivery to tumor cells. Mol. Cancer Ther. 20(12), 2329–2340 (2021).

Nakada T, Sugihara K, Jikoh T, Abe Y, Agatsuma T. The latest research and development into the antibody-drug conjugate [fam-], trastuzumab deruxtecan (DS-8201a), for HER2 cancer therapy. Chem. Pharm. Bull (Tokyo). 67(3), 173–185 (2019).

National Breast Cancer Foundation, Inc. Triple Negative Breast Cancer. Available at: <https://www.nationalbreastcancer.org/triple-negative-breast-cancer/#tnbc-stats>. Accessed May 2026.

Dent R, et al. Datopotamab deruxtecan in patients with untreated, advanced triple-negative breast cancer (TROPION-Breast02): a randomised, open-label, international, phase III trial. Ann Oncol. Published online April 3, 2026.

Miguel Martín, Atanasio Pandiella, Emilio Vargas-Castrillón, Elena Díaz-Rodríguez, Teresa Iglesias-Hernangómez, Concha Martínez Cano, Inés Fernández-Cuesta, Elena Winkow, Maria Francesca Perelló, Trastuzumab deruxtecan in breast cancer, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 198, 2024, 104355, ISSN 1040-8428.

Barroso-Sousa, R., S.M. Tolaney. Clinical development of new antibody-drug conjugates in breast cancer: to infinity and beyond. *BioDrugs*, 35 (2) (2021), pp. 159-174

Takashi Nakada, Takeshi Masuda, Hiroyuki Naito, Masao Yoshida, Shinji Ashida, Koji Morita, Hideki Miyazaki, Yuji Kasuya, Yusuke Ogitani, Junko Yamaguchi, Yuki Abe, Takeshi Honda, Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 26, Issue 6, 2016, Pages 1542-1545, ISSN 0960-894X.

Ferraro, E., J.Z. Drago, S. Modi. Implementing antibody-drug conjugates (ADCs) in HER2-positive breast cancer: state of the art and future directions. *Breast Cancer Res*, 23 (1) (2021), p. 84.

116. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Sacituzumab govitecan & Loncastuximab tesirine-lpyl

- **고찰의 목적:** 최초로 ADC 승인된 시기는 2000년임. 2026년 현재 15종이며 모든 ADC는 항암제임. 올해 당장 우리나라가 1종의 ADC를 승인한다고 가정한다면 ADC 신약 개발에서 약 25년 뒤쳐져 있음. 오늘날 다양한 항암제가 개발되었지만 말기암을 치료할 수 있는 세포·유전자 치료제인 CAR-T가 가장 기술적으로 앞선 개발 항암제 요법이라고 할 수 있음. 그러나 세포·유전자 치료제의 가장 문제점은 환자의 면역세포를 추출해 유전자를 조작하거나 결함이 있는 유전자를 정상 유전자로 교체하는 환자 맞춤 항암제로 접근성이 극히 제한 되었다고 할 수 있음. 국산 1호 CAR-T 치료제 탄생이 되었지만 거의 5억원 정도가 하는 치료비용 및 접근성 등을 비롯하여 고열과 저혈압을 동반하는 사이토카인 방출 증후군(CRS), 의식 저하와 경련을 일으키는 신경학적 독성, 그리고 면역력 저하 등이 독성학적 문제는 여전히 극복해야 할 문제임. CAR-T가 3세대 항암제이면 면역 관문 억제제의 3세대 면역항암제와 기존 1세대 화학 항암제의 결합으로 탄생한 Antibody-drug conjugate(항체-약물 접합체)가 4세대의 가장 첨단 항암제임. 현재까지 15종이 개발되었고 여전히 수많은 ADC 개발에 도전하고 있음. 항암제의 대표적인 특성은 치료 효과와 동반하여 부작용도 많다는 것임. **ADC는 이와 같은 off-target toxicity를 극복하고 항암효과를 극대화하는 유도미사일과 같은 항암제임. 그러나 여전히 ADC의 부작용이 보고되고 있으며 이를 극복하는 방법은 ADC의 한층 더 업그레이드를 통한 환자의 안전성을 높이는 핵심 사항이라고 할 수 있음. 이에 본 고찰에서는 승인된 15종 ADC에 분석을 통해 보다 더 안전성이 높이는 ADC 개발에 도움이 목적임.**

1. FDA-approved ADC

- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체)가 승인됨(Liu, 2025; Mullard, 2026). 아래의 <표>는 지금까지 승인된 15종 ADC의 설계, 승인된 적응증, 표적 등을 요약한 것임.

<표> FDA 승인된 15종 ADC의 특성 요약

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozoqamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2000; 2017	급성 골수성 백혈병(AML)
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	2011	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2+ BC
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti®	AstraZeneca	CD22	절단 가능	PE38	2018년, 미국 시장에서 단종됨	HCL
Polatuzumab vedotin-piia	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	2019	미만성 거대 B세포 림프종
Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Seagen	Nectin-4	절단 가능	MMAE	2019	요로상피암 (방광암)

Trastuzumab deruxtecan	Enhertu®	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	HER2	절단 가능	Dxd	2019	HER2+ 피임약, HER2-저/초저혈 MBC, HER2+ GC, NSCLC
Sacituzumab govitecan	Trodelvy®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2 - MBC, TNBC
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF	2025년에 재승인 됨	재발성 또는 불응성 다발성 골수종
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	SG3199(PBD dimer)	2021	DLBCL
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	2021	자궁경부암
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE™	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	HR+/HER2- Breast cancer, NSCLC
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE	2025	비소세포암

2. ADC의 특성과 적응증

- **SG3199**와 SN-38은 서로 완전히 다른 두 가지의 매우 강력한 세포독성 탄두로, 각기 다른 항체-약물 접합체(ADC)에 사용되어 암세포를 선택적으로 표적화

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Sacituzumab govitecan	Trodelvy®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2 - MBC, TNBC
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	SG3199 (PBD dimer)	2021	DLBCL

2-1. Sacituzumab govitecan의 적응증과 구조

1) 적응증

- Sacituzumab govitecan(상품명: Trodelvy)은 절제 불가능한 국소 진행성 또는 전이성 유방암 및 요로상피암(urothelial cancer)의 특정 유형을 치료하는데 적응증이 있는 표적 항체-약물 접합체(ADC)임. FDA가 승인한 적응증은 삼중 음성 유방암(mTNBC, metastatic Triple-Negative Breast Cancer)와 요로상피암(urothelial cancer)로 다음과 같은 환자에게 투여됨.

1-1) 전이성 유방암 적응증

- ① **이전 치료 이력(Previously Treated)이 있는 경우:** 이전에 최소 두 차례의 치료(이 중 적어도 한 차례는 전이성 질환에 대한 치료)를 받은 성인 환자를 대상으로 한 단독 요법.

- ② **1차 치료(First-Line PD-L1+):** 트로델비 처방 정보(Trodelvy prescribing information)에 명시된 바와 같이, 전이성 PD-L1 발현(CPS $\geq$ 10) 종양에 대해 펌브롤리주맙(pembrolizumab=Keytruda)과 병용 요법.

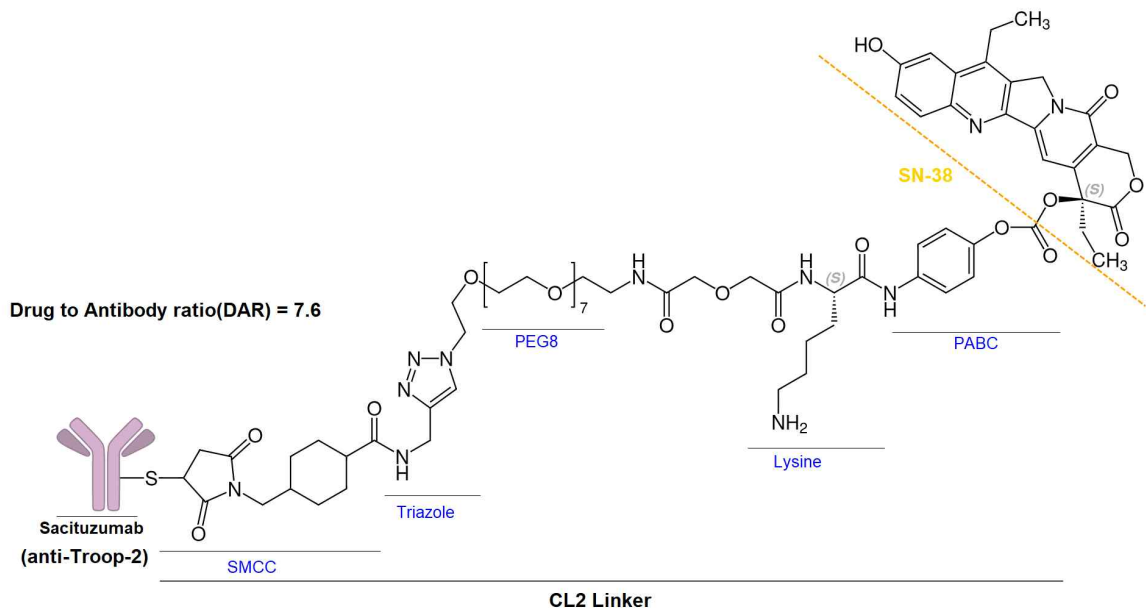
※ CPS(Combined Positive Score, 통합양성점수): 종양학에서 암세포와 주변 면역세포에서 발현되는 PD-L1 단백질의 양을 측정하는 척도.

1-2) 요로상피암(urothelial cancer) 적응증

- 이전에 백금 기반 화학요법과 PD-1 또는 PD-L1 억제제 중 하나를 투여받은 적이 있는 국소 진행성 또는 전이성 요로상피암 성인 환자에게 적응증이 있음.

2) 구조와 기능

- <그림>과 같이 Sacituzumab govitecan(사시투주맙 고비테칸)은 인간화 단일클론 항체인 Sacituzumab(많은 종양 세포에서 과발현되는 Trop-2 수용체를 표적으로 함)와 독자적인 가수분해성 링커(고비테칸)를 통해 강력한 항암제인 SN-38에 결합된 형태로 구성되어 있는 ADC(FDA, 2020; Fenn 등, 2019; Rugo 등, 2023).



<그림> Sacituzumab govitecan의 구조

① 항체: Sacituzumab

- B 유형:** B 인간화 IgG1 카파 단일클론 항체(hRS7으로도 알려짐).
- 표적:** 상피성 암종(예: 삼중음성 유방암, 요로상피암)에서 빈번히 과발현되는 막 관통 당 단백질인 **Trop-2**((Trophoblast cell-surface antigen 2, 영양막 세포 표면 항원 2)에 선택적으로 결합함

② 링커: Govitecan

- 유형:** 가수분해성(pH 민감성) 탄산염 링커.

- **기능:** SN-38 유효 성분을 항체에 공유결합으로 결합시킴. 이 링커는 혈류 내에서는 안정적이지만, 종양 리소좀이나 종양 미세환경과 같은 약산성 환경에서는 절단되도록 설계되었음.
- **약물-항체 비율(DAR):** 평균적으로 각 항체 분자당 약 **7.6개 분자**의 SN-38이 결합되어 있음.

③ 유효 성분인 payload: SN-38

- **유형:** Topoisomerase I inhibitor
- **기능:** SN-38은 항암제 irinotecan의 활성 대사산물임. SN-38은 irinotecan보다 약 100~1,000배 더 강력한 효능을 지님. 복제 과정에서 토포이소머라제 I-DNA 복합체 (topoisomerase I-DNA complex)를 안정화시켜 **DNA 이중 가닥 절단**과 세포 사멸을 유발함

2-2. Loncastuximab tesirine-lpyl의 적응증과 구조

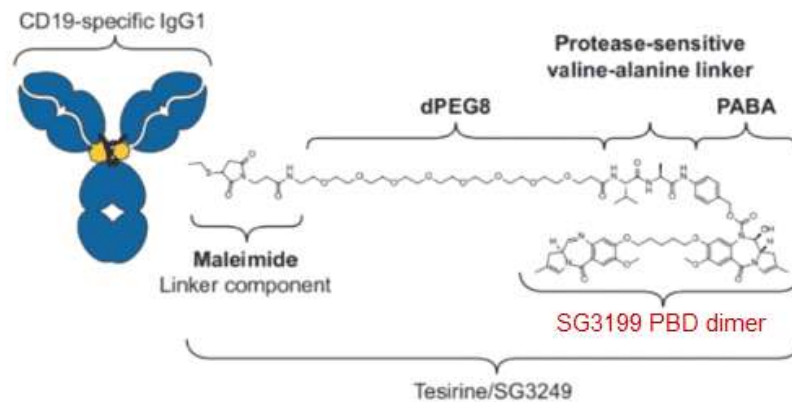
1) 적응증

- Loncastuximab tesirine-lpyl(상표명 Zynlonta)은 성인 환자의 재발성 또는 난치성 대세포 B세포 림프종(relapsed or refractory large B-cell lymphoma) 치료에 적응증이 있는 ADC이며 적응증에는 구체적으로 다음이 포함됨. 환자는 반드시 **2회 이상의 전신 요법을 선행 치료로 받은** 상태여야 하며 정맥 주입(Caimi 등, 2024; Epperla 등, 2025; Furqan 등, 2022).
 - 확산성 대세포 B세포 림프종(DLBCL, Diffuse large B-cell lymphoma) 기타 미분류(NOS)
 - DLBCL 저등급 림프종에서 발생한 경우(DLBCL arising from low-grade lymphoma)
 - 고등급 B세포 림프종(High-grade B-cell lymphoma)

2) 구조와 기능

- Loncastuximab tesirine-lpyl(상품명 Zynlonta)은 <그림>과 같이 단일클론 항체, 프로테아제 분해 가능 링커(protease-cleavable linker), 그리고 고효능 세포독성 payload라는 세 가지 구조적 구성 요소로 이루어져 있음(Derenzini 등, 2025; Kanas 등, 2022; Westin 등, 2022; Gonzalez 등, 2023).

Diseases	Antibody target	Cytotoxin	Linker
Relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).	CD19	S G 3 1 9 9 PBD(Pyrrolobenzodiazepine) dimer	A cleavable (valine-alanine dipeptide as cathepsin B cleavage site) maleimide type linker containing a spacer PEG (n=8) On an average of 2 cysteinyl



<그림> Loncastuximab Tesirine structure

① **항체(Loncastuximab):** 정상 및 악성 B-계통 세포 표면에 발현되는 막 관통 단백질인 인간 **CD19**에 특이적으로 결합하는 인간화 IgG1 카파 단일클론 항체임.

② **링커(Tesirine):** 혈류 내에서는 안정적으로 유지되다가 표적 세포 내부로 들어가면 절단되도록 설계된 프로테아제 절단형 링커입니다. 이는 다음으로 구성됨:

- **발린-알라닌(Val-Ala)** 디펩티드 서열(cathepsin B와 같은 리소솜 프로테아제에 의해 절단됨).
- 항체에 공유 결합하기 위한 **말레이미드** 기(maleimide group).
- 수용성 및 안정성을 최적화하기 위한 친수성 **PEG8** (polyethylene glycol) spacer

③ **Payload / Warhead (SG3199):** 강력한 세포 독성을 지닌 **Pyrrolobenzodiazepine(PBD)** 이량체. 이 핵심 구조는 유연한 프로필디옥시 연결체를 통해 C8 위치에서 결합된 두 개의 PBD 단량체(two PBD monomers linked through their C8-positions via a flexible propyldioxy tether)로 구성됨. 평균 약물-항체 비율(DAR)은 약 2.3임.

3. Sacituzumab govitecan와 Loncastuximab tesirine-lpyl의 약리기전과 독성학적 고찰

3-1. Sacituzumab govitecan의 MOA

- Sacituzumab govitecan의 작용 기전은 네 가지 뚜렷한 단계를 거쳐 건강한 조직은 손상시키지 않으면서 암세포만을 선택적으로 파괴함(그림: Schreiber 등, 2021; Thomas 등, 2016; Goldenberg 등, 2019)).
- ① **표적화(Targeting):** ADC의 인간화 항체 성분은 많은 고형 종양 표면에서 과도하게 발현되는 단백질인 **Trop-2**(Trophoblast surface antigen 2, 영양막 세포 표면 항원 2)에 특이적으로 결합함.
- ② **세포 내 유입(Internalization):** 일단 결합이 이루어지면, 이 복합체는 세포 내포 작용을 통해 암세포 내부로 직접 유입됨.
- ③ **Payload 방출(Payload Release):** 세포 내 산성 리소솜에서 가수분해 가능한 링커가 절단되어 세포독성 페이로드인 **SN-38**(이리노테칸의 활성 대사산물)이 방출됨.
- ④ **DNA 손상 및 세포사멸(DNA Damage & Apoptosis):** **SN-38은 토포이소머라제 I 저해제(Topoisoemerase I inhibitor)**에 결합하여 DNA 단일 가닥 파열의 복구를 차단함. 세포가 증식함에 따라 이러한 차단 현상은 돌이킬 수 없는 DNA 이중가닥 파열을 유발하여 세포사멸(아포토시스)로 이어짐.
- 다른 ADC와 차별화 요소는 ADR 및 Bystander effect로 설명됨. 각 항체에 약 7.6~8개의 SN-38 분자가 결합된 높은 비율을 특징으로 하여, 종양에 전달되는 세포독성 유효 부하를 극대화함. SN-38은 세포막 투과성이 있어, 자유 상태의 약물이 주변 종양 미세환경으로 확산될 수 있음. 이를 통해 약물은 표적 단백질인 Trop-2를 발현하지 않는 인접한 암세포까지 사멸시킬 수 있음.

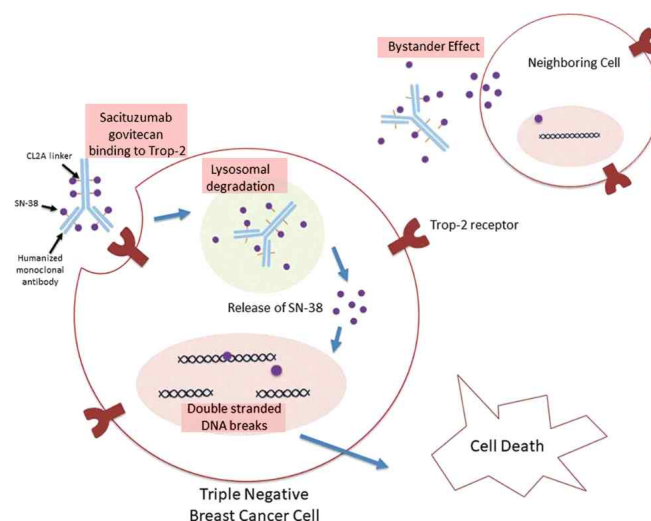


Figure 2. Mechanism of action of sacituzumab govitecan(Schreiber 등, 2021)

3-1-1. 독성학적 고찰

3-1-1-1. 임상시험에서의 부작용(adverse effect)

- Sacituzumab govitecan으로 치료받은 환자의 37%에서 투여 후 24시간 이내에 과민반응이 관찰되었으나, 3~4등급 과민반응은 환자의 1%에서만 발생하는 등 드물게 나타났음(Immunomedics I, 2021). 또한, 전이성 삼중음성 유방암(mTNBC) 환자 중 69%에서 메스꺼움이 발생했으며, 3등급 메스꺼움은 환자의 6%에서 나타났음.
- Sacituzumab govitecan으로 치료받은 전이성 삼중음성 유방암(mTNBC) 환자 중 약 절반(49%)에서 구토가 발생했으나, 3등급 구토는 환자의 6%에서만 발생했음. 따라서 Sacituzumab govitecan을 투여할 때는 해열제 및 H₁/H₂ 길항제를 이용한 사전 투약 및/또는 병용 투약이 권장됨. 구체적으로, FDA는 2~3가지 약물을 조합한 요법으로 사전 투약할 것을 권장한다. 환자가 주입 관련 반응을 경험한 경우 코르티코스테로이드를 사용할 수도 있음(Immunomedics I, 2021).
- **1/2상 임상시험에서 mTNBC 환자의 64%에서 1~4등급 호중구감소**가 나타났으나, 발열성 호중구감소는 환자의 8%에서만 발생했음. 3등급 또는 4등급 호중구감소를 경험하는 환자에게는 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 투여를 적극 권장함. 그리고, 전이성 삼중음성 유방암(mTNBC) 환자의 63%에서 설사가 발생했으나, 3등급 또는 4등급 설사는 환자의 9%에서만 드물게 나타났음(Immunomedics I, 2021).
- 설사를 경험하는 환자에게는 로페라미드를 사용할 수 있음. 과도한 콜린성 반응이나 조기 설사가 나타나는 환자의 경우, 아트로핀 사전 투여를 고려할 수 있다. 호중구감소증과 설사는 모두 FDA 박스 경고 대상이므로 주의 깊게 모니터링해야 함. 탈모는 사시투주맙 고비테칸 투여 시 관찰된 또 다른 이상반응이지만, 이는 예상되는 현상임. 약물 유발성 탈모에 대한 두피 냉각 요법의 장기적 효능은 추가 연구가 필요한 것으로 제시됨(Rugo 등, 2017; Nangia 등, 2017).
- **3상 ASCENT 임상시험은** Sacituzumab govitecan의 효능을 의사가 선택한 단일제제 화학요법(eribulin, vinorelbine, capecitabine, or gemcitabine)과 비교하여 평가한 무작위, 공개, 다기관 임상시험이었음(Bardia 등, 2021). 이 임상시험에는 전이성 삼중음성 유방암(mTNBC) 환자 529명이 등록되었으나, 뇌 전이가 없는 468명의 환자를 대상으로 무진행 생존기간(PFS, Progression-Free Survival)이라는 1차 유효성 평가 지표를 분석하였음.
- 환자들은 1:1의 비율로 Sacituzumab govitecan 투여군과 단일제제 화학요법군에 무작위 배정되었다. 환자들은 이전에 항암 치료를 중앙값 3회(Sacituzumab govitecan 군 1~16회, 화학요법 군 1~12회) 받았으며, 100%의 환자가 이전에 탁산계 약물을, 82%는 안트라사이클린을, 66%는 카보플라틴을, 27%는 PD-L1/PD-1 억제제를, 7%는 PARP 억제제를 투여받은 적이 있었음(Bardia 등, 2021). **Sacituzumab govitecan 치료군에서 가장 흔한 부작용은 호중구감소증(63%), 설사(59%), 메스꺼움(57%), 탈모(46%)였음.** 가장 흔한 3등급 및 4등급 이상반응으로는 호중구감소증(51%), 백혈구감소증(10%), 설사(10%)가 포함되었음. 단일제제 화학요법 치료군은 Sacituzumab govitecan 치료군에 비해 부작용 발생

비율이 낮았음. Sacituzumab govitecan 치료군과 화학요법 치료군 모두에서 약 4분의 1의 환자가 부작용으로 인해 용량 감량이 필요했음. Sacituzumab govitecan 치료군에서는 단 5%(12명)만이 치료 중단으로 이어진 부작용을 경험했음. 임상시험 기간 동안 Sacituzumab govitecan 군에서 3명, 화학요법 군에서 3명의 환자가 사망했음. Sacituzumab govitecan 군의 3건의 사망은 치료와 관련이 없었으나, 화학요법 군의 1건의 사망은 치료로 인한 호중구감소성 패혈증과 관련이 있었음(Bardia 등, 2021).

- **부작용에 대한 결론:** 유방암 및 요로상피암 치료에 사용되는 표적 항암제인 Sacituzumab govitecan의 투여에 의한 여러 부작용이 발생하지만 심각하고 생명을 위협하는 위험 (Serious and Life-Threatening Risks)을 유도하는 부작용은 다음과 같이 요약됨.

Sacituzumab govitecan 투여에 의한 중증 부작용	증상과 위험성
Severe Neutropenia(중증 호중구감소증)	<ul style="list-style-type: none"> • 즉, 호중구 수치가 감소하는 환자는 최대 78%에 해당함. 전체 사례의 약 절반에서 중증(3-4등급) 호중구감소증이 관찰되며, 이는 열성 호중구감소증과 생명을 위협하는 패혈증의 위험을 높이는 원인이 됨(Schlam 등, 2023). • 생명을 위협할 수 있음. • 발열성 호중구감소증(백혈구 수치가 낮은 상태에서 발열이 동반되는 증상)은 즉각적인 의료 처치가 필요함.
Severe Diarrhea(중증 설사)	<ul style="list-style-type: none"> • 급격한 탈수 및 신장 손상으로 이어질 수 있음
Severe Allergic/Infusion Reactions(심각한 알레르기 반응/주입 반응)	<ul style="list-style-type: none"> • 주입 중 또는 주입 후 24시간 이내에 생명을 위협하는 알레르기 반응이나 주입 관련 반응(아나필락시스)이 발생할 수 있음 • 증상으로는 호흡 곤란, 흉부 압박감, 얼굴·입술·목의 부종 등이 있음

3-1-1-2. 독성학적 기전

- **Sacituzumab govitecan(Trodelvy)의 SN-38**, 즉 강력한 토포이소머라제 I 억제제를 통해 복제 과정에서 DNA 이중가닥 파열을 유발하여 세포 사멸을 일으킴. 그러나 암세포의 Trop-2를 표적으로 설계되었으나, 표적 부위 외 부위(on-target/off-tumor)와의 결합 및 약물 대사에 대한 유전적 변이로 인해 독성을 유발. 요약하면 **독성 양상은 주로 ① SN-38의 전신 방출과 그에 따른 ② 대사 과정에 기인**하는데 독성 기전은 다음과 같이 크게 세 가지 경로로 분류됨 (Dacoregio 등, 2025; Tolaney 등, 2025).

① **토포이소머라제 I 억제 (Payload-mediated 독성)**: SN-38은 토포이소머라제 I-DNA 복합체에 결합하여 DNA 재결합을 차단합니다. 이로 인해 복제 과정에서 치명적인 이중 가닥 DNA 파단이 발생하여 세포 사멸로 이어집니다. 이는 **골수 및 위장관 내의 빠르게 분열하는 정상 세포에 심각한 영향을 미침**

- **골수억제**: 골수 내의 빠르게 분열하는 전구 세포는 토포이소머라제 I 억제에 매우 민감하기 때문에 호중구 감소증과 빈혈의 발생률이 높음
- **위장관 독성**: 설사, 메스꺼움, 구토는 위장관 점막의 빠르게 분열하는 상피 세포에 대한 직접적인 세포 독성으로 인해 발생함

② **표적 부위 내, 종양 외 효과(On-Target, Off-Tumor Effect)**: 이 항체는 **Trop-2 수용체**를 특이적으로 표적화함. Trop-2는 많은 상피성 종양에서 과발현되지만, **정상 상피 조직**(예: 피부, 선, 점막)에서도 발현됨. 이 약물은 이러한 정상 세포에 결합하여 점막염, 탈모, 피부 발진과 같은 국소적 독성을 유발할 수 있음.

③ **UGT1A1 유전적 다형성 (대사적 제거)**: SN-38은 간 효소 **UGT1A1**에 의해 해독 및 제거됨.. UGT1A1 활성이 감소한 환자(예: UGT1A1*28 대립유전자를 동형접합으로 가진 환자)는 유효 성분을 제거하는 능력이 저하됨. 이로 인해 SN-38에 대한 전신 노출이 장기화되어, 3~4등급 골수억제 및 설사의 위험이 심각하게 높아짐.

3-2. Loncastuximab tesirine-lpyl의 MOA

- Loncastuximab tesirine-lpyl은 B세포 표면의 CD19 단백질을 표적으로 삼아 강력한 세포 독성 물질을 암세포 내부로 직접 전달함으로써, 세포 분열을 차단하고 세포 사멸을 유도하는 MOA. <Figure 2>과 같이 5단계로 설명됨(ADC Therapeutics America, 2026; Calabretta 등, 2022; Furqan 등, 2022; Zammarchi 등, 2018).
- ① **표적화(Targeting):** 항체 부분은 B계열 세포(대부분의 B세포 림프종 포함) 표면에 풍부하게 발현되는 막 관통 단백질인 **CD19**에 특이적으로 결합함.
 - ② **내재화(Internalization):** 결합이 이루어지면 ADC는 암세포 내로 내재화되어 리소솜으로 이동함.
 - ③ **절단(Cleavage):** 리소솜 내부에서 프로테아제 감응성 링커가 절단되어 세포독성 유효 성분인 (SG3199)로 알려진 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체가 방출됨. PBD 이량체의 높은 효능 덕분에 낮은 약물-항체 비율(DAR)을 적용할 수 있으며, DAR은 약 2.3임 (Zammarchi 등, 2018)
 - ④ **DNA 손상(DNA Damage):** 유리 상태의 SG3199는 핵으로 들어가 세포 DNA의 마이너 그루브에 결합하여, 매우 강력한 서열 선택적 가닥 간 교차결합을 형성함.
 - ⑤ **아포토시스(Apoptosis):** 이러한 교차결합은 DNA 복제를 중단시켜 세포 분열을 효과적으로 차단하고, 암세포가 아포토시스(프로그래밍된 세포 사멸)를 겪게 함.

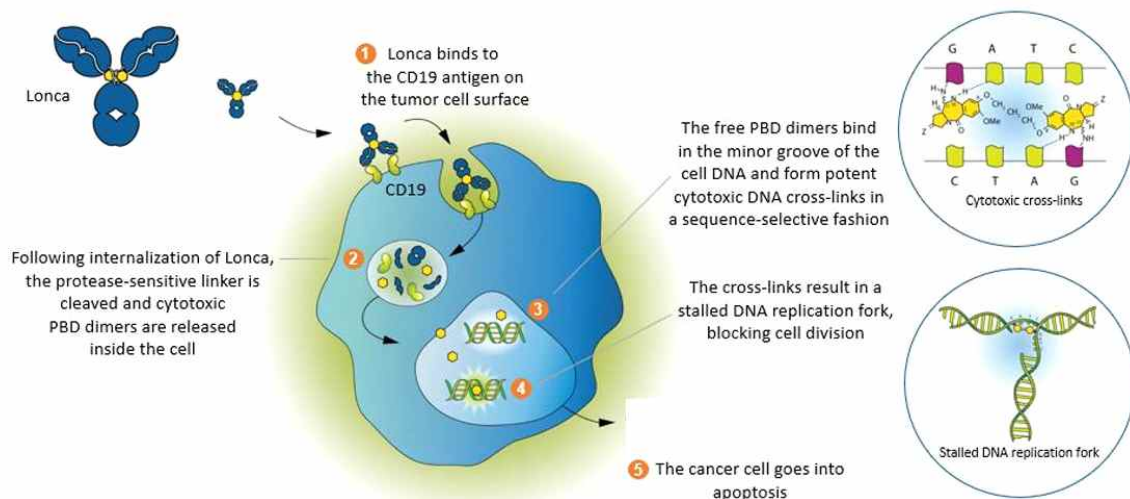


Figure 2. Mechanism of Action of Loncastuximab Tesirine(ADC Therapeutics America, 2026)

3-2-1. 독성학적 고찰

3-2-1-1. 임상시험에서의 부작용(adverse effect)

- Loncastuximab tesirine (Zynlonta)에 대한 임상 연구에 따르면, 골수억제, 체액 저류, 피부 반응 및 간 효소 수치 상승이 주요 부작용으로 나타났음. LOTIS-1 및 LOTIS-2 연구를 포함한 주요 임상시험 데이터에 따르면(Caimi 등, 2021; Hamadani 등, 2021), 거의 모든 환자가 적어도 한 가지 이상의 치료 관련 이상반응(TEAE, treatment-emergent adverse event)을 경험하는 것으로 나타났음. 이러한 부작용은 주로 세포독성 pyrrolobenzodiazepine(PBD) 이량체 활성 성분에 기인하는 것으로 보임. LOTIS-1 및

LOTIS-2에 따르면 다음과 같이 경증 및 중증에 따라 다음과 같은 부작용이 요약됨 (HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION, 2021; Caimi 등, 2021; Hamadani 등, 2021)

① 흔한 이상반응 (발생률 $\geq 20\%$)<

- FDA 처방 정보에 따르면, 임상 코호트 전반에서 가장 빈번하게 관찰된 이상반응은 다음과 같음
 - 혈액학적:** 혈소판 감소증(혈소판 수치 저하), 호중구 감소증(백혈구 수치 저하), 빈혈.
 - 간 기능:** 감마-글루타밀트랜스퍼라제(GGT) 증가 및 트랜스아미나제 상승.
 - 전신적:** 피로, 메스꺼움, 근육격계 통증.
 - 대사계:** 고혈당 및 저알부민혈증.
 - 피부계:** 발진 및 말초 부종(붓기).

② 중대 및 중증 이상반응(등급 ≥ 3)

- LOTIS-2 2상 임상시험에서, 약 28%에서 39%의 환자에서 중대 이상반응이 아래의 <표>와 같이 발생했음. 중증 독성 반응의 경우, 종종 투여 지연, 용량 감량 또는 영구적인 치료 중단이 필요함.

<표> 중대 및 중증 이상반응(등급 ≥ 3)의 요약

Toxicity Category	Common Grade ≥ 3 Manifestations	Clinical Trial Impact / Management
Myelosuppression(골수억제)	호중구감소증 (26%), 혈소판감소증 (18%), 빈혈	열성 호중구감소증을 유발할 수 있으며, 성장 인자를 통해 관리
Fluid Retention & Edema(체액 저류 및 부종)	홍수, 복수, 현저한 부종, 심낭액	"제3공간 증후군" 관련 독성; 스피로놀락톤(spironolactone)으로 관리
Cutaneous Reactions(피부 반응)	광과민성, 중증 발진, 물집 형성 / 피부 박리	햇빛에 의해 악화되므로, 철저한 자외선 차단이 필요
Hepatotoxicity(간독성)	중증 GGT 상승 (10%+)	약물 복용을 영구적으로 중단해야 하는 주된 검사상 원인

3-2-1-2. 독성학적 기전

- Loncastuximab tesirine의 독성 양상은 주로 PBD 유효 성분에 기인함. 이 유효 성분은 유전독성(DNA 손상)을 유발하므로, 종양 세포뿐만 아니라 정상 조직, 특히 세포 분열이 활발한 조직이나 약물의 화학적 구조에 민감한 조직에도 영향을 미칠 수 있음. 예를 들어, 간 독성(GGT 상승) 및 중증 피부 반응은 유리 상태의 PBD 유효 성분이 효소 및 정상 조직의 DNA와 상호작용하기 때문에 발생하는 것으로 여겨짐(Calabretta 등, 2022; Backler, 2022).

4. 결론: FDA-approved ADC의 독성학적 고찰 – Sacituzumab govitecan & Loncastuximab tesirine-lpyl

4-1. Sacituzumab govitecan의 독성학적 기전

- **Sacituzumab govitecan(Trodelvy)의 SN-38**, 즉 강력한 토포이소머라제 I 억제제를 통해 복제 과정에서 DNA 이중가닥 파열을 유발하여 세포 사멸을 일으킴. 그러나 암세포의 Trop-2를 표적으로 설계되었으나, 표적 부위 외 부위(on-target/off-tumor)와의 결합 및 약물 대사에 대한 유전적 변이로 인해 독성을 유발. 요약하면 **독성 양상은 주로 ① SN-38의 전신 방출과 그에 따른 ② 대사 과정에 기인**하는데 독성 기전은 다음과 같이 크게 세 가지 경로로 분류됨 (Dacoregio 등, 2025; Tolaney 등, 2025).

① **토포이소머라제 I 억제 (Payload-mediated 독성)**: SN-38은 토포이소머라제 I-DNA 복합체에 결합하여 DNA 재결합을 차단합니다. 이로 인해 복제 과정에서 치명적인 이중 가닥 DNA 파단이 발생하여 세포 사멸로 이어집니다. 이는 **골수 및 위장관 내의 빠르게 분열하는 정상 세포에 심각한 영향을 미침**

- **골수억제**: 골수 내의 빠르게 분열하는 전구 세포는 토포이소머라제 I 억제에 매우 민감하기 때문에 호중구 감소증과 빈혈의 발생률이 높음
- **위장관 독성**: 설사, 메스꺼움, 구토는 위장관 점막의 빠르게 분열하는 상피 세포에 대한 직접적인 세포 독성으로 인해 발생함

② **표적 부위 내, 종양 외 효과(On-Target, Off-Tumor Effect)**: 이 항체는 **Trop-2 수용체**를 특이적으로 표적화함. Trop-2는 많은 상피성 종양에서 과발현되지만, **정상 상피 조직**(예: 피부, 선, 점막)에서도 발현됨. 이 약물은 이러한 정상 세포에 결합하여 점막염, 탈모, 피부 발진과 같은 국소적 독성을 유발할 수 있음.

③ **UGT1A1 유전적 다형성 (대사적 제거)**: SN-38은 간 효소 **UGT1A1**에 의해 해독 및 제거됨.. UGT1A1 활성이 감소한 환자(예: UGT1A1*28 대립유전자를 동형접합으로 가진 환자)는 유효 성분을 제거하는 능력이 저하됨. 이로 인해 SN-38에 대한 전신 노출이 장기화되어, 3~4등급 골수억제 및 설사의 위험이 심각하게 높아짐.

4-2. Loncastuximab tesirine-lpyl의 독성학적 기전

- Loncastuximab tesirine의 독성 양상은 주로 PBD 유효 성분에 기인함. 이 유효 성분은 유전독성(DNA 손상)을 유발하므로, 종양 세포뿐만 아니라 정상 조직, 특히 세포 분열이 활발한 조직이나 약물의 화학적 구조에 민감한 조직에도 영향을 미칠 수 있음. 예를 들어, 간 독성(GGT 상승) 및 중증 피부 반응은 유리 상태의 PBD 유효 성분이 효소 및 정상 조직의 DNA와 상호작용하기 때문에 발생하는 것으로 여겨짐.

<참고문헌>

Chelsea Backler. Oncology Drug Reference Sheet: Loncastuximab Tesirine-Lpyl. ONS VOICE. June 21, 2022. 3 min read.

Calabretta E, Hamadani M, Zinzani PL, Caimi P, Carlo-Stella C. The antibody-drug conjugate loncastuximab tesirine for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2022 Jul 28;140(4):303-308.

Caimi PF, Ai W, Alderuccio JP, Ardeschna KM, Hamadani M, Hess B, Kahl BS, Radford J, Solh M, Stathis A, Zinzani PL, Havenith K, Feingold J, He S, Qin Y, Ungar D, Zhang X, Carlo-Stella C. Loncastuximab tesirine in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (LOTIS-2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2021 Jun;22(6):790-800.

Hamadani M, Radford J, Carlo-Stella C, Caimi PF, Reid E, O'Connor OA, Feingold JM, Ardeschna KM, Townsend W, Solh M, Heffner LT, Ungar D, Wang L, Boni J, Havenith K, Qin Y, Kahl BS. Final results of a phase 1 study of loncastuximab tesirine in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2021 May 13;137(19):2634-2645.

Ahmed N, Hamadani M. Evaluating efficacy and safety of loncastuximab tesirine injection for the treatment of adult patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2021 Dec;21(12):1313-1320.

Zammarchi F, Corbett S, Adams L, et al. ADCT-402, a PBD dimer-containing antibody drug conjugate targeting CD19-expressing malignancies. *Blood*. 2018;131(10):1094-1105. D

Furqan F, Hamadani M. Loncastuximab tesirine in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: a review of clinical data. *Ther Adv Hematol*. 2022 Mar 22;13:20406207221087511.

ADC Therapeutics America, Inc. Zynlonta® (loncastuximab tesirine-lpyl) - Mechanism of Action. MI-SRD-US-LTX-00062. 2026

Calabretta E, Hamadani M, Zinzani PL, Caimi P, Carlo-Stella C. The antibody-drug conjugate loncastuximab tesirine for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2022 Jul 28;140(4):303-308.

Manna M, Brabant M, Greene R, Chamberlain MD, Kumar A, Alimohamed N, Brezden-Masley C. Canadian Expert Recommendations on Safety Overview and **Toxicity** Management Strategies for Sacituzumab Govitecan Based on Use in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Oncol*. 2024 Sep 21;31(9):5694-5708.

Schlam I, Tarantino P, Tolaney SM. Managing adverse events of sacituzumab govitecan. *Expert Opin Biol Ther*. 2023 Jul-Dec;23(11):1103-1111.

Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, et al. Sacituzumab govitecan in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2021 Apr 22;384(16):1529-1541.

Rugo HS, Klein P, Melin SA, et al. Association between use of a scalp cooling device and alopecia after chemotherapy for breast cancer. *Jama*. 2017 Feb 14;317(6):606–614.

Nangia J, Wang T, Osborne C, et al. Effect of a scalp cooling device on Alopecia in women undergoing chemotherapy for breast cancer: the SCALP randomized clinical trial. *Jama*. 2017 Feb 14;317(6):596–605.

Immunomedics I. TRODELVY (sacituzumab govitecan-hziy) [package insert]. US Food and Drug Administration Website. Revised April, 2020. Accessed Aug, 2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/761115s000lbl.pdf

Schreiber, A. R., Andress, M., & Diamond, J. R. (2021). Tackling metastatic triple-negative breast cancer with sacituzumab govitecan. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(12), 1303–1311.

Thomas A, Teicher BA, Hassan R. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):e254–e262.

Goldenberg DM, Sharkey RM. Antibody-drug conjugates targeting TROP-2 and incorporating SN-38: a case study of anti-TROP-2 sacituzumab govitecan. *MAbs*. 2019 Aug/Sep;11(6):987–995.

Kanas G, Ge W, Quek RGW, et al. Epidemiology of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) in the United States and Western Europe: population-level projections for 2020-2025. *Leuk Lymphoma*, 2022(1);63:54–63.

Westin J, Sehn LH. CAR T cells as a second-line therapy for large B-cell lymphoma: a paradigm shift? *Blood*. 2022;139(18):2737–2746. doi:10.1182/blood.2022015789

Gonzalez Barca E. Developing new strategies for relapsed/refractory diffuse large B-Cell Lymphoma. *J Clin Med*. 2023;12(23):7376. doi:10.3390/jcm12237376

Derenzini, E., Gibb, A., Kwiatek, M., & Strati, P. (2025). Loncastuximab tesirine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: drug profile and expert opinion on the prevention and management of adverse events. *Leukemia & Lymphoma*, 66(11), 1990–2002.

Furqan F, Hamadani M. Loncastuximab tesirine in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: a review of clinical data. *Ther Adv Hematol*. 2022 Mar 22;13:20406207221087511.

Caimi PF, Ai WZ, Alderuccio JP, Ardesna KM, Hamadani M, Hess B, Kahl BS, Radford J, Solh M, Stathis A, Zinzani PL, Wang Y, Qin Y, Wang L, Xu ZC, Carlo-Stella C. Loncastuximab tesirine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: long-term efficacy and safety from the phase II LOTIS-2 study. *Haematologica*. 2024 Apr 1;109(4):1184–1193.

Epperla N, Olszewski AJ, Ayers EC, Ahmed S. Management of Adverse Reactions to Loncastuximab in Patients With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Hematol Oncol*. 2025 Sep;43(5):e70128.

FDA, 2020. "FDA Approves New Therapy for Triple Negative Breast Cancer That Has Spread, Not Responded to Other Treatments". U.S. Food and Drug Administration (FDA). 22 April 2020. Archived from the original on 23 April 2020. Retrieved 22 April 2020.

Rugo HS, Bardia A, Marmé F, Cortés J, Schmid P, Loirat D, et al. (October 2023). "Overall survival with sacituzumab govitecan in hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer (TROPiCS-02): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial". *Lancet*. **402** (10411): 1423–1433.

Fenn KM, Kalinsky K. Sacituzumab govitecan: antibody-drug conjugate in triple-negative breast cancer and other solid tumors. *Drugs Today (Barc)*. 2019 Sep;55(9):575-585.

117. FDA-approved ADC의 독성학적 고찰-Structural alert와 Bystander effect 측면에서 새로운 개발 방법

1. 구조경고(Structural Alert)의 개념과 종류

1-1. 구조경고(Structural alert)의 개념

- 의약품의 비효소적 또는 비효소적으로 중간체 또는 중간 대사체 등의 화학구조 내에 발암·변이원성 등을 비롯하여 독성을 유발할 수 있는 친전자성 작용기(electrophilic group)를 가진 또는 전환·생성하는 원물질의 특정 구조를 **Structural alert**라고함

1-2. 일반적인 경고 대상 기(group) 및 구조 분류

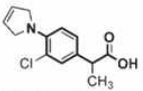
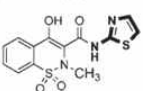
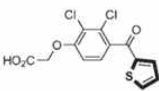
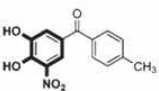
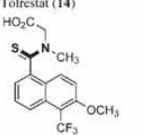
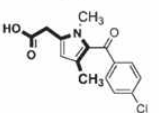
- 다음과 같은 주요 기능성 기(group)는 의약품 제조, 공정 합성 및 분해 과정에서 가장 빈번하게 **Structural alert** 대상으로 나타나는 물질(Snodin 등, 2010; Limban 등, 2018; Stephen 등, 2014; Pettinato 등, 2021). 이들 **Structural alert** 또는 기(group)의 공통적인 것은 친전자성(electrophilic) 특성으로 전환되어 단백질 및 DNA의 친핵성(nucleophilic) 부위와의 공유결합(covalent bonding)을 통해 독성을 나타냄. 반면에 모든 합성 항암제는 친전자성으로 전환되어 단백질 및 DNA와 결합하여 항암기전을 가짐.
- **Alkylating Agents:** Primary halides, epoxides, aziridines, and sulfonates. These molecules are highly reactive and can easily transfer alkyl groups to DNA.
- **Michael Acceptors:** α,β -unsaturated carbonyls, halo-alkenes, and similar conjugated systems that can react with nucleophilic sites in DNA.
- **Aromatic Amines & Nitroaromatics:** These groups are often metabolized in vivo into highly reactive intermediates (like hydroxylamines) that bind to DNA.
- **Aldehydes & Ketones:** Known to directly cause DNA damage and cross-linking, often forming as degradation impurities in formulations.
- **Hydrazines & Hydrazides:** Highly reactive functional groups that can generate free radicals and DNA-damaging metabolites

2. Structural alert 및 친전자성 기(electrophilic group) 생성에 의한 시장에서 퇴출된 약물

- Stepan 등(2011) 등의 논문의 Table 1. Structural Alert and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADR에서처럼 약물의 개체-특이적 독성(Idiosyncratic Drug Toxicity)에 기인하여 퇴출된 약물의 80%가 친전자성 작용기친전자성 작용기(electrophilic group)를 가진 reactive intermediate로 전환되는 약물임

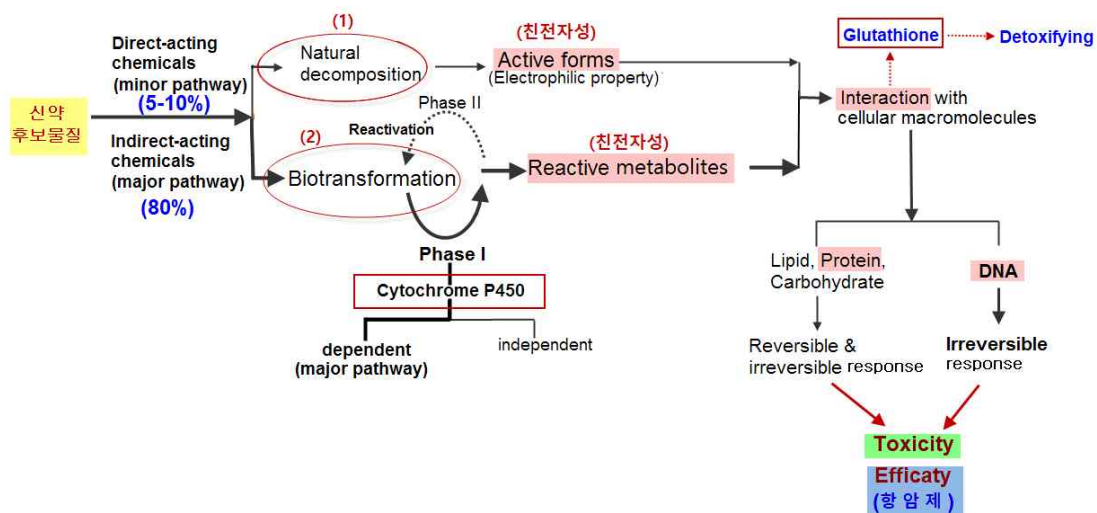
- 퇴출된 이들 약물은 모든 합성 항암제는 친전자성으로 전환되어 단백질 및 DNA와 결합하여 항암기전을 나타내어 이들은 항암제로 Repurposing 약물로 개발의 잠재성도 있음.

Table 1. Structural Alert and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADR<붉은 마크가 친전자성 기를 생성 또는 전환을 통해 퇴출된 약물>

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA ^a (Å ²)	Reason for Withdrawal	Daily Dose ^b (mg)	Alerts	Reactive Metabolic Formation
Pirprofen (10)	NSAID	Acid	251	2.60	40.50	Hepatotoxicity	800	Arylacetic Aniline, Olefin	acid, Yes ⁵⁴
									
Sudoxicam (11)	NSAID	Acid	337	1.79	99.10	Hepatotoxicity	50	2-Aminothiazole	Yes ⁷⁰
									
Tienilic acid (12)	Diuretic	Acid	331	3.23	63.60	Hepatotoxicity	250–500	Thiophene	Yes ^{63,67}
									
Tolcapone (13)	Anti-Parkinson	Acid	273	3.24	109.34	Hepatotoxicity	300–600	Catechol, Nitrobenzene	Yes ⁷⁴
									
Tolrestat (14)	Antidiabetic	Acid	357	3.43	49.70	Hepatotoxicity	400	Thioamide	N.D. ^c
									
Zomepirac (15)	NSAID	Acid	291	2.94	57.60	Anaphylaxis	600	Heteroarylacetic Alkylpyrrole	acid, Yes ^{71,72,47}
									

3. Structural alert의 친전자성 기(electrophilic group)로의 전환 기전에 대한 이해

- 모든 저분자 독성물질은 생체 내에서 electrophilic group(친전자성 기)의 생성 또는 전환 여부에 의해 결정됨. 따라서 **독성물질의 결정은 양의 문제가 아니라 electrophilic group (친전자성 기)의 생성이라는 질의 문제로 결정됨.**
- 친전자성 기는 비효소-의존적 자연분해(예; 가수분해)와 효소-의존적 생화학적 전환(Biotransformation)에 의해 생성(Park 등, 2014; Sharma 등, 2025)). 이들 electrophilic group(친전자성 기)를 가진 전환체는 생체거대 분자인 단백질 및 DNA에 공유결합하여 단백질 활성 저해 및 돌연변이 등의 독성을 유발함. 특히 원물질의 structural alert가 가수분해와 같은 비효소적 자연분해-유도 **친전자성 전환체의** 원물질을 **직접-작용 독성물질 (direct-acting toxicant)**, 그리고 cytochrome P450과 같은 효소-의존적 친전자성 대사체를 생성하는 structural alert를 가진 원물질은 **간접-작용 독성물질(indirect-acting toxicant)**.



<그림> 유기물질 내 structural alert의 친전자성 기(electrophilic group) 전환 또는 생성 기전

4. Direct acting-organic toxicants vs Indirect acting-organic toxicant

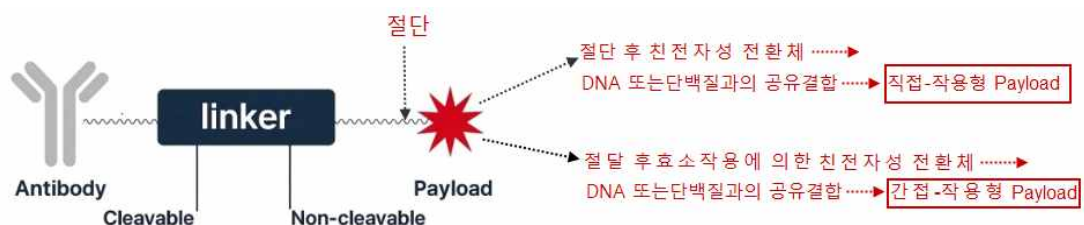
- 직접 작용형 유기 독소와 간접 작용형 유기 독소의 차이는 생체에 유입되었을 때 나타나는 초기 화학적 반응성에 있음. <표>와 같이 직접 작용형 독소는 **반응성이 매우 높은 친전자체**(highly reactive electrophiles)로 즉각적인 손상을 일으키는 반면, 간접 작용형 독소는 무해한 모 화합물로서 체내에서 **대사 활성화**(metabolic activation)를 거쳐야만 독성을 띠게 됨(Park 등, 2014; Sharma 등, 2025).

<표> 직접 작용형 유기 독성물질과 간접 작용형 유기 독성물질의 비교

항목	Direct-Acting Organic Toxicants	Indirect-Acting Organic Toxicants
Reactivity	Highly reactive in their original (parent) form.	Chemically unreactive/inert in their original form.
Metabolic Activation	Not required.	Required; must be transformed by enzymes (e.g., in the liver) into reactive intermediates.
Mechanism of Action	Bind directly to critical cell macromolecules (DNA, proteins, receptors).	The newly formed metabolite acts as the damaging agent.
Common Examples	Alkylating agents, highly reactive monomers, epoxides, Phalloidin	Benzo[a]pyrenePolycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), acetaminophen, aflatoxin.

5. ADC Payload의 structural alert 활성화 방식에 따른 Direct acting-organic toxicants vs Indirect acting-organic toxicants

- 항체-약물 접합체(ADC, Antibody-Drug Conjugates)에서는 암세포를 파괴하는 payload의 structural alert의 활성화 방식에 따라 분류됨. <그림>에서처럼 직접 작용형 독성물질은 세포 내로 유입되는 즉시 세포를 사멸시키는 반면, 간접 작용형 전구 독성물질은 암세포 내부에서 화학적으로 변형되거나 절단되어야만 활성을 띠게 됨(He 등, 204; Peters 등, 2015; Metrangolo 등, 2024; Pandey, 2025)



<그림> ADC의 직접-작용형 vs 간접-작용형 payload

- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체)가 승인됨(Liu, 2025; Mullard, 2026). 아래의 <표>는 지금까지 승인된 15종 ADC의 Payload 분류를 나타낸 것임

<표> FDA 승인된 15종 ADC의 특성 요약

약물	Target	Linker	Payload	Payload의 특성
Gemtuzumab ozogamicin	CD33	절단 가능	Calicheamicin	직접 작용형 Payload
Brentuximab vedotin	CD30	절단 가능	MMAE	직접 작용형 Payload
Trastuzumab emtansine	HER2	절단 불가능	DM1	직접 작용형 Payload
Inotuzumab ozogamicin	CD22	절단 가능	Calicheamicin	직접 작용형 Payload
Polatuzumab vedotin-piiq	CD79	절단 가능	MMAE	직접 작용형 Payload
Enfortumab vedotin	Nectin-4	절단 가능	MMAE	직접 작용형 Payload
Trastuzumab deruxtecan	HER2	절단 가능	Dxd	간접 작용형 Payload
Sacituzumab govitecan	TROP-2	절단 가능	SN-38	간접 작용형 Payload
Belantamab mafodotin-blmf	BCMA	절단 불가능	MMAF	직접 작용형 Payload
Loncastuximab tesirine-lpyl	CD19	절단 가능	PBD dimer	직접 작용형 Payload
Tisotumab vedotin-tftv	Tissue factor	절단 가능	MMAE	직접 작용형 Payload
Mirvetuximab soravtansine	FR α	절단 가능	DM4	직접 작용형 Payload
Datopotamab Deruxtecan	TROP-2	절단 가능	Dxd	간접 작용형 Payload
Telisotuzumab vedotin	c-Met	절단 가능	MMAE	직접 작용형 Payload

6. FDA-승인된 Payload의 작용형에 따른 특성과 예시

- 항체-약물 접합체(ADC)의 payload는 **직접 작용형**과 **간접 작용형** 유기 독성 물질으로 나뉨. 직접 작용형 약제는 생물학적 촉매작용 없이 독자적으로 세포를 사멸시키며, 주로 구조적 표적(예: 미세소관)을 파괴하거나 DNA를 직접 손상시킴. **간접 작용형 약제는 즉각적인 구조적 파괴보다는 대사 활성화(예: cytochrome P450)나 신호 전달 경로, 세포 주기 진행, 핵 수용체의 억제**를 통해 작용하는 경우가 많음

① 직접 작용형 유기 Payload

- 이러한 **Payload** 은 방출 즉시 중요한 세포 기전을 교란시켜 일반적으로 세포 사멸을 유발하는 강력한 세포독성 물질임(Stanard 등, 2015; Biopahrma PEG, 2023; Bäumer 등, 2015; Metrangolo 등, 2024; Govindan 등, 2019; Kikani 등, 2026)

- **미세소관 억제제:** 튜불린에 결합하여 동적 불안정성을 억제하고, 유사분열 정지 및 세포 사멸을 유도함으로써 세포 분열을 표적으로 삼음.
 - **Payload 예시:** Maytansinoids(DM1, DM4 등), Auristatins(MMAE, MMAF 등)
- **DNA 손상제:** 가교 형성, 알킬화 또는 가닥 절단과 같은 DNA의 구조적 손상을 유발하여 DNA 복제 및 전사를 방해하고, 세포를 아포토시스 상태로 유도함.
 - **Payload 예시:** PBD(pyrrolobenzodiazepine) 및 Calicheamicin

② 간접 작용 유기 Payload

- 이러한 payload는 생물학적 조절제로 작용하거나, 활성을 얻기 위해 효소적 생체 변환 과정을 필요로 함(SigutLab, 2025; Biointron, 2024; Stanard 등, 2015; Yadav 등, 2026; PCT, 2022)
 - **토포이소머라제 억제제:** 복제 과정에서 DNA 가닥의 절단 및 재결합을 방해하여, 간접적으로 치명적인 DNA 이중 가닥 파열을 유발한다.
 - **예시:** deruxtecan(DXd) 및 SN-38.
 - **수용체 및 신호전달 경로 조절제:** DNA나 구조 단백질에 직접적인 물리적 손상을 가하기보다는 세포 증식 관련 경로(예: 키나아제, 면역 조절제 또는 호르몬 수용체)를 표적으로 삼음

7. ADC의 작용형에 따른 독성학적 특성과 임상학적 특성

- <표>는 ADC의 payload 분류인 Direct-Acting Toxicants와 indirect-Acting Toxicants에 따라 ADC에 의한 Bystander Effect, 전신독성 그리고 Quiescent cells 등에 대한 영향을 나타낸 것임.
- Quiescent Cancer Cell은 세포 분열을 멈추고 G0기(휴지기)에 가만히 머물러 있는 암세포로, 기존 항암제에 반응하지 않아 암 재발과 전이의 가장 핵심적인 원인이 됨.

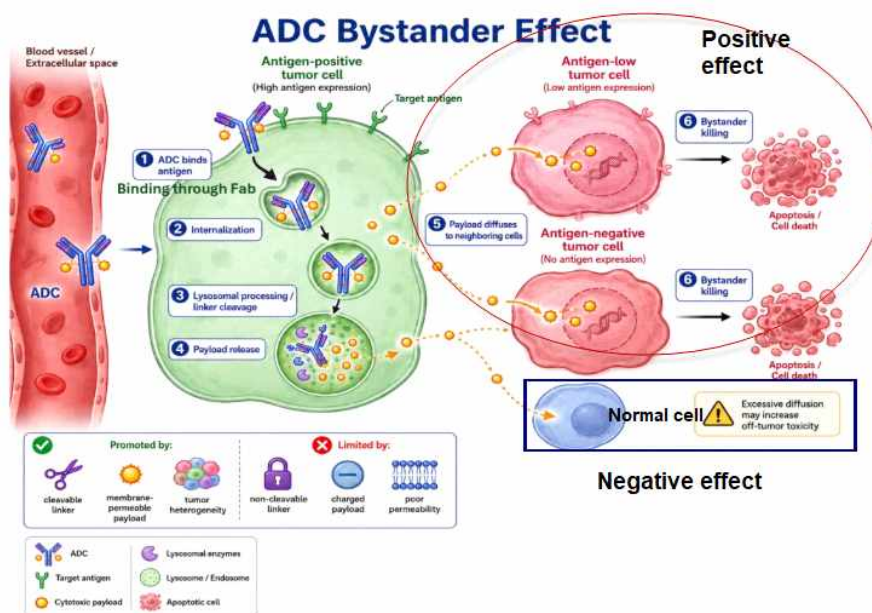
<표> ADC의 작용형에 따른 독성학적 특성과 임상학적 특성

항목	Direct-Acting Toxicants	Indirect-Acting Toxicants
Bystander Effect	높음 (특히 MMAE 및 DM1과 같이 인접한 세포로 확산되는 친유성/세포막 투과성 유효 성분의 경우)	낮음 : (DXd와 같은 토포이소머라제 억제제는 세포막 투과성이 매우 높아 이질적인 종양을 표적으로 삼기에 적합함)
Systemic Toxicity (전신독성)	높음 : 효능이 높아 치료 지수가 좁은 경우가 많으며, 표적 외 손상을 방지하기 위해서는 안정적이고 정밀한 절단이 필요함	낮음 : 일반적으로 내약성이 더 좋거나 특정한 대사 경로를 필요로 하지만, 장기간 노출될 경우 여전히 특징적인 이상반응이 나타날 수 있음
Quiescent Cancer Cells(정지기 세포)	낮은 효능 (대부분의 항유사분열제는 분열 중인 세포를 특이적으로 표적으로 삼음)	변수 (토포이소머라제 억제제는 종종 활성 분열 주기에 속하지 않는 세포에 대해서도 더 광범위한 활성을 나타냄)

8. 결론: FDA-approved ADC의 독성학적 고찰-Structural alert와 Bystander effect

1) 혈액암 치료에서 ADC의 Bystander effect의 부정적인 영향

- ADC를 비롯하여 모든 합성 항암제의 가장 큰 문제점은 독성에 의한 side effect임. 이와 같은 side effect를 줄이기 위해 표적항암제의 일종인 ADC(antibody-drug conjugate<항체-약물 접합체>)가 개발되었음.
- 그러나 여전히 FDA 승인된 ADC는 중증도의 side effect에 기인하여 자진 철수하거나 보완 대체제를 제시하였음.
- 앞서 112-116의 컨설팅보고서를 통해 FDA-승인된 ADC 15종의 독성학적 측면에서 고찰하였고 ADC를 구성하는 ADC-Linker-Payload 중 각각이 독성을 유발하는 것으로 확인됨.
- 그러나 가장 중요한 독성의 원인은 암세포의 사멸을 유도하는 payload이며 특히 이들의 정상세포에 대한 영향이 가장 중요한 독성이라고 추정됨. 이와 같은 판단은 <그림>과 같이 암세포로 내화(internalization) 후 free payload 방출로 주변 암세포도 공격하지만 정상세포도 공격한다는 점에 기인함(Dixit, 2025). 즉, ADC의 payload에 의한 bystander effect가 독성의 핵심기전이라고 할 수 있음.



<그림> ADC의 Bystander effect에 따른 Positive effect 및 Negative effect

- ADC의 바이스탠더 효과(Bystander effect)는 표적 항원이 없는 주변 세포까지 무차별적으로 사멸시키는 현상으로, 혈액세포 및 혈액 순환계에 긍정적 영향과 부정적 영향을 동시

에 미침(Wang 등, 2025; Dixit, 2025). 그러나 고형암 내의 불균일한 세포들을 치료하는 데는 핵심적인 유효성을 발휘하지만, 혈액암에서 ADC의 Bystander effect는 payload가 전신혈관계를 타고 전신을 순환하는 과정이나 골수 환경에서는 정상 혈액세포를 공격하여 독성을 유발하는 주요 원인이 됨(Wang 등, 2025; Singh 등, 2016; Kepp 등, 2025; Zhao 등, 2017).

2) 항혈액암 ADC와 관련된 대표적인 부작용

- 앞서 내용을 요약하면 항혈액암의 **바이스탠더 효과를 가진 ADC**는 혈액 순환계의 혈액세포와 이를 생성하는 골수(Bone Marrow) 환경에서 심각한 부작용을 유발할 수 있다는 점을 예측할 수 있음. FDA 승인된 ADC 15종 중 6종이 항혈액암 ADC이며 <표>에서처럼 모든 항혈액암 ADC에서 혈액학적 독성 및 골수에서 부작용이 확인됨.

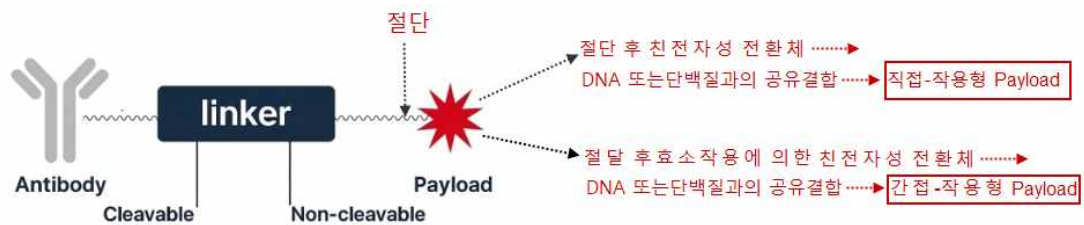
<표> 항혈액암과 혈관계와 관련된 부작용

약물	Linker	Payload	적응증	대표적인 부작용
Gemtuzumab ozogamicin	절단 가능	Calicheamicin	급성 골수성 백혈병 (AML)	Hematologic Toxicities (Very Common) Hepatotoxicity (Boxed Warning)
Brentuximab vedotin	절단 가능	MMAE	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종	Hematologic toxicities Systemic side effects
Inotuzumab ozogamicin	절단 가능	Calicheamicin	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병 (ALL)	Hematologic Toxicities (Myelosuppression) Hepatotoxicity
Polatuzumab vedotin-piiq	절단 가능	MMAE	미만성 거대 B세포 림프종	Myelosuppression(골수억제) (Blood-related) Peripheral Neuropathy
Belantamab mafodotin-blmf	절단 불가능	MMAF	재발성 또는 불응성 다발성 골수종	Myelosuppression(골수억제) (Neutropenia)
Loncastuximab tesirine-lpyl	절단 가능	PBD SG3199	DLBCL (미만성 거대 B세포 림프종, Diffuse Large B-Cell Lymphoma)	Hematologic toxicity Liver Function

3) ADC payload의 직접형 및 간접형에 따른 bystander effect

3-1) 친전자성(electrophilic) 활성화 방식에 따른 직접형 간접형 payload

- 항체-약물 접합체(ADC, **Antibody-Drug Conjugates**)에서 암세포를 파괴하기 위해서는 payload의 structural alert가 **친전자성(electrophilic) 활성화 방식**에 따라 분류됨. <그림>에서처럼 **직접 작용형 독성물질은 세포 내로 유입되는 즉시 세포를 사멸시키는 반면, 간접 작용형 전구 독성물질은 암세포 내부에서 화학적으로 변형되거나 절단되어야만 활성을 띠게 됨**(He 등, 204; Peters 등, 2015; Metrangolo 등, 2024; Pandey, 2025; Creative biolab, 2026).



<그림> ADC의 직접-작용형 vs 간접-작용형 payload

3-2) 직접형 및 간접형에 따른 bystander effect

- <표>는 ADC의 payload 분류인 Direct-Acting Toxicants와 indirect-Acting Toxicants에 따라 ADC에 의한 Bystander Effect, 전신독성 그리고 Quiescent cells 등에 대한 영향을 나타낸 것임. **Direct-Acting Toxicants는 Indirect-Acting Toxicants와 비교하여 Bystander Effect가 아주 높음. 이에 따른 전신독성이 전자에 의해 더 강하다는 것을 확인할 수 있음.**

<표> ADC의 작용형에 따른 독성학적 특성과 임상학적 특성

항목	Direct-Acting Toxicants	Indirect-Acting Toxicants
Bystander Effect	높음 (특히 MMAE 및 DM1과 같이 인접한 세포로 확산되는 친유성/세포막 투과성 유효 성분의 경우)	낮음 : (DXd와 같은 토포이소머라제 억제제는 세포막 투과성이 매우 높아 이질적인 종양을 표적으로 삼기에 적합함)
Systemic Toxicity (전신독성)	높음 : 효능이 높아 치료 지수가 좁은 경우가 많으며, 표적 외 손상을 방지하기 위해서는 안정적이고 정밀한 절단이 필요함	낮음 : 일반적으로 내약성이 더 좋거나 특정한 대사 경로를 필요로 하지만, 장기간 노출될 경우 여전히 특징적인 이상반응이 나타날 수 있음
Quiescent Cancer Cells(정지기 세포)	낮은 효능 (대부분의 항유사분열제는 분열 중인 세포를 특이적으로 표적으로 삼음)	변수 (토포이소머라제 억제제는 종종 활성 분열 주기에 속하지 않는 세포에 대해서도 더 광범위한 활성을 나타냄)

4) 항혈액암 ADC payload의 특정 부작용과 직접 작용형과의 관계

- <표>는 항혈액암 ADC의 대표적인 부작용인 혈액학적 독성과 payload의 structural alert 특성에 따른 관계를 나타낸 것임. 모든 Payload의 형태가 모두 직접 작용형 항암제이며 이에 의한 모든 ADC에서 혈액학적 독성이 확인되었음.
- 직접 작용형 payload는 표적 암세포에 내화(internalization) 후 payload가 세포 내에서 비효소적 방법으로 친전자성으로 전환되어 암세포 사멸을 유도하는 항암기전. 반면에 이 과정에서 수많은 free payload는 혈액의 암세포로부터 방출되어 다른 암세포에도 사멸을 유도하는 bystander effect가 활발히 이루어짐. 그러나 세포에서 방출된 free payload는 정상 혈액세포뿐만 아니라 골수세포에도 사멸을 유도하여 혈액학적 독성 또는 전신독성을 유도함.

약물	Linker	Payload	적응증	대표적인 부작용	Payload의 특성
Gemtuzumab ozogamicin	절단 가능	Calicheamicin	급성 골수성 백혈병 (AML)	Hematologic Toxicities (Very Common) Hepatotoxicity (Boxed Warning)	직접 작용형 Payload
Brentuximab vedotin	절단 가능	MMAE	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종	Hematologic toxicities Systemic side effects	직접 작용형 Payload
Inotuzumab ozogamicin	절단 가능	Calicheamicin	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병 (ALL)	Hematologic Toxicities (Myelosuppression) Hepatotoxicity	직접 작용형 Payload
Polatuzumab vedotin-piiq	절단 가능	MMAE	미만성 거대 B세포 림프종	Myelosuppression (Blood-related) Peripheral Neuropathy	직접 작용형 Payload
Belantamab mafodotin-blmf	절단 불가능	MMAF	재발성 또는 불응성 다발성 골수종	Myelosuppression (Neutropenia)	직접 작용형 Payload
Loncastuximab tesirine-lpyl	절단 가능	PBD SG3199	DLBCL (미만성 거대 B세포 림프종, Diffuse Large B-Cell Lymphoma)	Hematologic toxicity Liver Function	직접 작용형 Payload

5) 결론: 모든 합성 항암제는 structural alert를 지니고 있으며 이는 체내에서 효소적 또는 비효소적 기전에 의해 친전자성 기(electrophilic group)로 전화되어 단백질 및 DNA와 공유 결합을 통해 독성 또는 항암효능을 유도함. 비효소적 전환을 통해 electrophilic group을 가진 원물질을 직접 작용형 독성물질(Direct-acting toxicants)반면에 효소적 기전에 의해 electrophilic group으로 전환되는 원물질을 간접 작용형 독성물질(Indirect-acting toxicants)라고 함. 항혈액암 ADC의 독성은 혈액학적 독성으로 이는 free payload의 bystander effect에 기인함. 따라서 payload가 전신혈관계로 방출되지 않아 bystander effect가 나타나지 않는 간접 작용형 독성물질을 ADC의 payload를 장착하는 것이 독성학적 고찰임. 반면에 고형암의 조직은 동일한 항원을 가진 암세포만으로 구성되어 있지 않고, 항원 발현율이 서로 다른 암세포들이 불균일하게 섞여 있음. Bystander effect는 표적 항원이 없는 주변 암세포까지 공격하므로 종양 전체를 효과적으로 사멸시키므로 직접 작용형 독성물질(Direct-acting toxicants)의 payload를 가진 ADC가 바람직함.

- 약 10여년 전에 과제 최종 대면 발표를 하던 날 7-8명의 국내 최고 독성전문가라는 분들이 심사를 하였다. 유기화학 물질의 독성은 친전자성으로 전환을 통해 이루어진다는 사실을 모르는 것 같았다. 기관 수장을 비롯하여 관련 고위 공직자도 마찬가지였다. 독성은 곧 약리요 약리는 곧 독성이라는 신약 개발의 기본 지식이 장착되지 않았다는 느낌이요 현실이다. 이러한 분들이 약대, 의대 등에서 독성학을 가르치고 규제를 논하고 있다. 오늘날 다양한 모달리티의 바이오의약품 등의 독성도 합성의약품의 독성과 비교되어 검토되고 규제안이 마련된다. 약물 개발을 담당하는 기관은 안전처이다. 말 그대로 안전이다. 따라서 약물의 개발과 규제는 독성기전에 대한 이해부터 시작된다는 점을 인식하지 못하는 현실에서는 여전히 글로벌 신약 하나 개발하지 못하는 나라와 영혼없는 규제 가이드라인만 양산할 뿐이다. 교육열이 그렇게 높다는 우리나라에서 독성학이라는 분야를 옹기 이해하고 가르키는 사람이 없고 이러한 점을 인식하고 개선하려는 기관과 사람이 없다는 것이 현재와 미래의 신약 개발 분야에 반영되어 지속된다는 점이 안타깝다.

<참고문헌: 다른 작업이 함께 이루어지다 보니 인용되지 않은 논문이 있음>

Yiming Wang, Xi Cheng, Xuan Li, Weijia Chen, Xiaotao Zhang, Yanhao Liu, Bystander effect in antibody-drug conjugates: Navigating the fine line in tumor heterogeneity, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 216, 2025, 104979, ISSN 1040-8428.

Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death and bystander killing: expanding the therapeutic potential of modern antibody-drug conjugates. Oncoimmunology. 2025 Dec;14(1):2533488.

Rakesh Dixit. The Bystander Effect in ADCs: Powerful Advantage or Toxic Liability? Bionavigen Oncology. 2025. [Rakesh Dixit, Ph.D., DABT | LinkedIn](#)

Singh AP, Sharma S, Shah DK. Quantitative characterization of in vitro bystander effect of antibody-drug conjugates. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2016 Dec;43(6):567-582.

Zhao H, Gulesserian S, Malinao MC, et al. A Potential Mechanism for ADC-Induced Neutropenia: Role of Neutrophils in Their Own Demise. Molecular Cancer Therapeutics. 2017 Sep;16(9):1866-1876. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-17-0133.

Sruthi Ranganathan, Aswanth Reddy, Alessandro Russo, Umberto Malepelle, Aakash Desai, Double agents in immunotherapy: Unmasking the role of antibody drug conjugates in immune checkpoint targeting, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 202, 2024, 104472, ISSN 1040-8428,

PCT. WO2022207944A9, Novel mixtures and uses of (2e)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-n-phenyl-n-(tetrahydro-3-furanyl)-2-propenamide. 2022.

Urvashi Yadav, Rajesh Kumar, Antibody–drug conjugates: From oncological milestones to emerging non-oncological applications, International Immunopharmacology, Volume 171, 2026, 116093, ISSN 1567-5769,

Biointron. Types of Payloads for Antibody-Drug Conjugates (ADCs). 2024

SigutLab. Beyond Cytotoxicity: The Rise of Non-Cytotoxic Payloads in ADC Development. 2025

Twara Kikani, Krutika Patel, Sonal Thakore; Fluorophores to fighters: BODIPY-metal complexes as next-gen anticancer prodrugs. Dalton Trans. 2026; 55 (1): 40–58.

Govindan, S. V., Cardillo, T. M., & Goldenberg, D. M. (2019). Topoisomerase Inhibitors as Antibody–Drug Conjugate (ADC) Payloads. Cytotoxic Payloads for Antibody–Drug Conjugates; Thurston, DE, Jackson, PJM, Eds, 166-186.

Metrangolo V, Engelholm LH. Antibody-Drug Conjugates: The Dynamic Evolution from Conventional to Next-Generation Constructs. Cancers (Basel). 2024 Jan 20;16(2):447

Brad Stanard, David G. Dolan, William Hanneman, Marie Legare, Joel P. Bercu, Threshold of toxicological concern (TTC) for developmental and reproductive toxicity of anticancer compounds, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 72, Issue 3, 2015, Pages 602-609, ISSN 0273-2300,

Biopahrma PEG. What Are ADC Payloads? Release date : 2024/4/9 14:37:16

Bäumer, Sebastian & Bäumer, Nicole & Appel, Neele & Terheyden, Lisa & Fremerey,

Julia & Schelhaas, Sonja & Wardelmann, Eva & Buchholz, Frank & Berdel, Wolfgang & Müller-Tidow, Carsten. (2015). Antibody-Mediated Delivery of Anti-KRAS-siRNA In Vivo Overcomes Therapy Resistance in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*. 21. 1383-1394. 10.1158/1078-0432.CCR-13-2017.

Lewis, Jason R. Antibody-Drug Conjugates: Understanding Associated Drug Design and Pharmacology. *AMWA Journal: American Medical Writers Association Journal*, 2023, v. 38, n. 2, p. 28.

Frank Liu, Safety assessment of antibody-drug conjugates: Nonclinical toxicology, non-active ingredients, and environmental risk considerations, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 215, 2025, 104865, ISSN 1040-8428.

Metrangolo, Virginia & Engelholm, Lars. (2024). Antibody-Drug Conjugates: The Dynamic Evolution from Conventional to Next-Generation Constructs. *Cancers*. 16. 447.

Prajita Pandey, Antibody Drug Conjugates (ADCs): A Powerful Approach to Targeted Cancer Therapy. 2025. emerypharma

Pettinato MC. Introduction to Antibody-Drug Conjugates. *Antibodies (Basel)*. 2021 Oct 27;10(4):42.

Peters C, Brown S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci Rep*. 2015;35(4):e00225. Published 2015 Jul 14. Available at:

He J, Zeng X, Wang C, Wang E, Li Y. Antibody-drug conjugates in cancer therapy: mechanisms and clinical studies. *MedComm (2020)*. 2024 Jul 28;5(8):e671.

Rahul Sharma, Sanjay Kumar Dhaker, Rajveer Singh, Manisha Nidhar, Alkylating agents in cancer: Current developments, *Letters in Drug Design & Discovery*, Volume 22, Issue 12, 2025, 100317, ISSN 1570-180.

Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? *Toxicol Res*. 2014 Sep;30(3):179-84.

Stepan AF. , et al., Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. *Chem. Res. Toxicol*. 2011, 24, 9, 1345–1410

David J. Snodin. Genotoxic Impurities: From Structural Alerts to Qualification. *Organic Process Research & Development* **2010** 14 (4), 960-976

John Wisler. Assessment of Genotoxic Impurities in Small Molecule Drug Candidates. *AMGEN*. 2010

Limban C, Nuță DC, Chiriță C, Negreș S, Arsene AL, Goumenou M, Karakitsios SP, Tsatsakis AM, Sarigiannis DA. The use of structural alerts to avoid the toxicity of pharmaceuticals. *Toxicol Rep*. 2018 Aug 31;5:943-953.

Stephen P. Raillard, Joel Bercu, Steven W. Baertschi, and Christopher M. Riley. Prediction

of Drug Degradation Pathways leading to Structural Alerts for Potential Genotoxic Impurities. Organic Process Research & Development . 2010 14 (4), 1015-1020.

Creative biolab. 2026. ADC Solid Tumor Efficacy Evaluation: Assessing Direct and Bystander Killing Effects. [ADC Solid Tumor Efficacy Evaluation: Assessing Direct & Bystander Killing Effects - Creative Biolabs](#)

118. Paracelsu vs Ashby-Tenant rule의 비교를 통한 올바른 독성기전의 이해

1. 비교의 목적

- 신약 개발과 규제 측면의 발전을 위해 독성학의 기본 원리를 어떻게 설명할 것인가에 대한 좋은 이론적 근거가 될 것임.

2. 독성학 이론의 비교

	Paracelsu(파라켈수스)	Ashby-Tennant rule
시대	<ul style="list-style-type: none"> 1530년경에 쓰여진 그의 저서 <Paragranum> 에서 제시 	<ul style="list-style-type: none"> Miller 부부가 1900년대 초반 친전자성 이론 제시 1980년대 후반 과학자 존 애쉬비(John Ashby)와 레이몬드 테넌트(Raymond Tennant)가 친전자성 이론을 재정립
독성기전의 핵심내용	<ul style="list-style-type: none"> 모든 것은 독이며 독이 없는 것은 존재하지 않는다. 용량만이 독이 없는 것을 정한다. ("Alle Ding' sind Gift, und nichts ohn' Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist.") 	<ul style="list-style-type: none"> "화학 물질이 체내에서 '친전자성 (Electrophilic)' 물질로 대사되면서 암을 유발한다. Electrophilic theory: 특정 화학 물질이나 그 대사체가 DNA의 핵염기(친핵체, electrophiles)를 공격하는 친전자체 (electrophiles)로 작용하여 유전자 변형을 일으킬 수 있다는 '친전자성 이론'
독성학 분야에서 인식과 현재의 위치	<ul style="list-style-type: none"> 위의 문장으로 파라켈수스는 독물학의 아버지 또는 현대 약학의 아버지라는 칭송을 받음. 신체에 화학 물질이 들어오는 걸 연구하는 모든 학문은 파라켈수스의 위 주장을 학문의 근간이 되는 중요한 진리로 명심 	<ul style="list-style-type: none"> 발암학의 패러다임 전환 애쉬비-테넌트의 구조 경보(structural alert)로 발전 In silico 예측 독성학의 기준선을 이루며, 제약 내 돌연변이 불순물 평가의 초석 규제 체계인 ICH M7 지침 등에서 DNA 반응성 불순물을 평가하고 제어하기 위해 애쉬비-테넌트 규칙의 사용을 적극적으로 요구

3. 친전자성 이론(Electrophilic theory)과 독성기전의 Central dogma

3-1. 친전자성 이론 - 구조 경고 (Structural Alerts)

- **애쉬비-테넌트 규칙은 화학물질의 구조와 DNA 손상을 일으키는 능력과 연관된 독성학의 개념적 틀을 정의함.** 친전자성 이론에 기반한 화학 발암 이론에 근거하며, 유전자 독성 발암물질과 돌연변이 물질은 일반적으로 친전자체이거나 대사적으로 활성화되어 친전자체로 전환될 수 있다고 설명함(Benigni 등, 2011; Amberg 등, 2019; Piers 등, 2021; Putz 등, 2011)
- 화학구조 내에 아래와 같은 특정 작용기나 구조가 포함되어 있다면, 이는 DNA와 직접 반응하거나 체내 대사 과정을 통해 반응성이 큰 친전자체(electrophilic intermediates)로 전환될 확률이 높음(Benigni 등, 2008; Danish QSAR Group at DTU Food. 2014; Fan 등, 2012; Benigni 등, 2011).
- **친전자체는 2 종류인 직접 친전자체와 간접 친전자체로 구분됨.** 이들은 생화학 및 독성학 분야에서 반응성 물질(대개 친전자체)이 세포 내 고분자와 어떻게 상호작용하는지를 설명하는 데 가장 흔히 사용되는 용어임. 이 용어들은 특정 분자가 세포 내 표적을 직접적으로 변화시키는지, 아니면 활성을 얻기 위해 대사적 변형을 거쳐야 하는지를 구분함 (Groeger 등, 2010; Sumi 등, 2008; Prasse 등 2021; Dinkova-Kostova 등, 2007; Obach 등, 2010).
 - **직접적 친전자체 (Direct Electrophiles):** Alkyl halides, Epoxides, 방향족 N-oxides 등 분자 자체로 친핵성 DNA를 공격할 수 있는 구조.
 - **간접적 친전자체 (Indirect Electrophiles):** Nitro groups, Aromatic amines 등 체내 효소(예: 이황화 반응, 산화 반응)에 의해 대사된 후 친전자성을 띠게 되는 구조

3-2. 유기물질의 독성기전에 대한 Centra dogma(핵심원리)의 논문

① **Centra dogma(핵심원리) 개발의 동기:** 유기물질의 독성은 직접적 친전자체 (Direct Electrophiles)와 간접적 친전자체 (Indirect Electrophiles)에 기인하다는 점을 착안하고 동시에 분자생물학의 central dogma를 모방하여 제작함.

② **Centra dogma(핵심원리):** The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a “Central Dogma” for Toxic Mechanisms?(Park 등, 2014). 유기성 이물질에 의한 독성 기전을 설명하는 가장 간단한 흐름도: 이것이 과연 독성 기전의 “핵심 교리”로 받아들여질 수 있을까?(박영철 등, 2014)

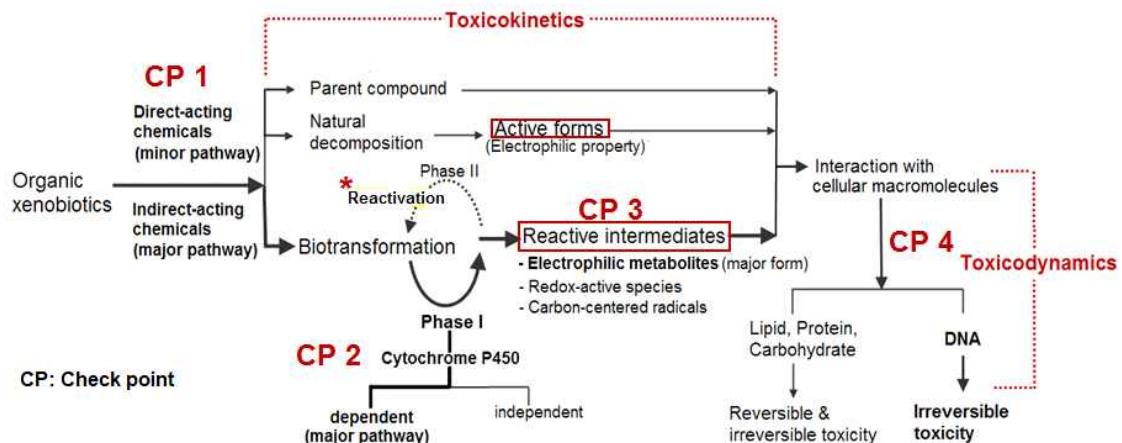


Fig. 1. The simplest flowchart stating the mechanism for organic xenobiotics-induced toxicity.

③ **Google의 AI 평가:** 논문의 제목을 Google에서 AI mode 검색 후 다음과 같은 전문가 평가가 확인됨.

● 유기 외계생물 독성에 대한 "가장 단순한 흐름도"는 노출에서 세포 손상까지의 경로를 설명함. 이 교리는 복잡한 생물학적 과정을 쉽게 이해할 수 있고 순차적인 단계로 효과적으로 분해하기 때문에 기초 독성학 교육의 '중심 교리'로 널리 인정받고 있음. 중앙 교리로서의 타당성을 이해하기 위해, 플로우차트의 주요 메커니즘은 핵심 단계로 나눔.

- **직접 작용 화학물질과 간접작용 화학물질:** 외계생물은 표적 부위에 직접 작용하거나 대사 전환이 필요함
- **생물형질전환:** 주로 시토크롬 P450 의존성 대사가 작용하여 비극성 화학물질을 극성 화학물질로 전환시켜 배설을 쉽게 함.
- **반응성 중간체:** 종종 이 생체변형은 독성이 강하고 반응성이 강한 중간체를 생성하여 대분자에 결합함.
- **가역성 vs. 비가역성:** 궁극적인 독성 효과는 세포 구성 요소에 대한 손상이 되돌릴 수 있는지, 복구할 수 있는지에 따라 결정됨.

- 네, 이 흐름도는 유기 외계생물 독성의 순차적 경로를 설명하여 복잡한 독성학 개념을 단순화합니다. 교육적 '중앙 교리'로서 기능할 수 있으나, 다양하고 다기관에 걸친 독성 반응 때문에 분자생물학의 엄격하고 보편적인 적용성은 부족함.
- **왜 이것이 'Central dogma(핵심 교리)'로 사용되는가:** 교육 환경에서 기초적인 교수 도구로 널리 받아들여지고 있음. 이 연구는 다음을 이해하는 개념적 비계를 제공함. 80 to 90%의 유기 화합물에 의한 화학물질 유발 독성에 대한 문제임
- **왜 절대적인 'Central dogma(핵심 교리)'에 미치지 못하는지:** 분자생물학의 중심 교리와 달리 (DNA → RNA → 단백질)은 보편적이며, 독성학은 화학적·종별로 매우 특이적임. 이 흐름도는 주로 대사와 반응성 중간체에 중점을 두지만, 비공유 공유 수용체 매개 독성(내분비 교란과 같은), 특정 후생유전학적 기전, 개별 독성 반응학 및 독성역학의 변이는 생략했음. 따라서 예외 없는 규칙이라기보다는 훌륭한 일반 틀로 기능함.

4. 결론: Paracelsu vs Ashby-Tenant rule의 비교를 통한 올바른 독성기전의 이해

- 16세기 경 Paracelsu의 모든 것은 독이며 독이 없는 것은 존재하지 않는다. 용량만이 독이 없는 것을 정한다'는 것은 오늘날에도 여전히 맞는 말이지만 독성기전의 핵심d에 대한 오해를 유발할 수 있다. 오해란 독성기전의 양적 측면을 우선하여 화학물질의 본질적 독성을 외면할 수 있다는 점이다.
- 화학물질 특히 유기 화학물질의 본질적 독성은 친전자성(electrophilic)으로의 전환 여부이다. 이와 같이 유기 화학물질 독성의 질적 특성을 파악 후 양적 특성을 파악하는 것이 규제에 있어서 큰 도움이 된다.
- 전세계적으로 AI-기반 독성예측 프로그램을 수백개 개발하였다. 그러나 우리나라에서는 수많은 과제를 수행하였음에도 불구하고 개발에 실패하거나 무용지물이 된 것은 화학물질의 질적 독성 파악에 대한 실패에 기인한다.
- 타이레놀도 그렇고 모든 합성 항암제가 친전자성을 띠고 직접 작용 또는 간접 작용 독성 물질로 분류된다는 철저한 분석 부족으로 그 수많은 항암제 개발 실패와 이와 연관된 ADC 개발에 문제가 있다고 사료된다.
- **독성학 또는 독성기전의 이론에 대한 올바른 교육의 출발점은 유기 화학물질의 양적 측면이 아니라 질적 측면을 우선하여 설명하는 것이다.**

	Paracelsu(파라켈수스)	Ashby-Tennant rule
시대	<ul style="list-style-type: none"> 1530년경에 쓰여진 그의 저서 <Paragranum> 에서 제시 	<ul style="list-style-type: none"> Miller 부부가 1900년대 초반 친전자성 이론 제시 1980년대 후반 과학자 존 애쉬비(John Ashby)와 레이몬드 테넌트(Raymond Tennant)가 친전자성 이론을 재정립
독 성 기 전 의 핵심내용	<ul style="list-style-type: none"> 모든 것은 독이며 독이 없는 것은 존재하지 않는다. 용량만이 독이 없는 것을 정한다. ("Alle Ding' sind Gift, und nichts ohn' Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist.") 	<ul style="list-style-type: none"> "화학 물질이 체내에서 '친전자성 (Electrophilic)' 물질로 대사되면서 암을 유발한다. Electrophilic theory: 특정 화학 물질이 나 그 대사체가 DNA의 핵염기(친핵체, electrophiles)를 공격하는 친전자체 (electrophiles)로 작용하여 유전자 변형을 일으킬 수 있다는 '친전자성 이론'
독성학 분야 에서 인식과 현재의 위치	<ul style="list-style-type: none"> 위의 문장으로 파라켈수스는 독물학의 아버지 또는 현대 약학의 아버지라는 칭송을 받음. 신체에 화학 물질이 들어오는 걸 연구하는 모든 학문은 파라켈수스의 위 주장을 학문의 근간이 되는 중요한 진리로 명심 	<ul style="list-style-type: none"> 발암학의 패러다임 전환 애쉬비-테넌트의 구조 경보(structural alert)로 발전 In silico 예측 독성학의 기준선을 이루며, 제약 내 돌연변이 불순물 평가의 초석 규제 체계인 ICH M7 지침 등에서 DNA 반응성 불순물을 평가하고 제어하기 위해 애쉬비-테넌트 규칙의 사용을 적극적으로 요구

<참고문헌>

Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? *Toxicol Res.* 2014 Sep;30(3):179-84

Groeger AL, Freeman BA. Signaling actions of electrophiles: anti-inflammatory therapeutic candidates. *Mol Interv.* 2010 Feb;10(1):39-50.

Sumi, Daigo. (2008). Biological Effects of and Responses to Exposure to Electrophilic Environmental Chemicals. *Journal of Health Science.* 54. 267-272. 10.1248/jhs.54.267.

Dinkova-Kostova AT, Cheah J, Samouilov A, Zweier JL, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. Phenolic Michael reaction acceptors: combined direct and indirect antioxidant defenses against electrophiles and oxidants. *Med Chem.* 2007 May;3(3):261-8.

Carsten Prasse; Reactivity-directed analysis – a novel approach for the identification of toxic organic electrophiles in drinking water. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 2021; 23 (1): 48–65.

R. Scott Obach, A.S. Kalgutkar, 1.15 - Reactive Electrophiles and Metabolic Activation, Editor(s): Charlene A. McQueen, *Comprehensive Toxicology* (Second Edition), Elsevier, 2010, Pages 309-347, ISBN 9780080468846.

Putz, M.V.; Ionaşcu, C.; Putz, A.-M.; Ostafe, V. Alert-QSAR. Implications for Electrophilic Theory of Chemical Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 5098-5134.

Piers A. Townsend and Matthew N. Grayson. Density Functional Theory in the Prediction of Mutagenicity: A Perspective. *Chemical Research in Toxicology* 2021 34 (2), 179-188.

Amberg A, Anger LT, Bercu J, Bower D, Cross KP, Custer L, Harvey JS, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Leavitt P, Quigley DP, Miller S, Snodin D, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, White AT, Wichard J, Myatt GJ. Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: is aromatic N-oxide a structural alert for predicting DNA-reactive mutagenicity? *Mutagenesis.* 2019 Mar 6;34(1):67-82.

Romualdo Benigni and Cecilia Bossa. Mechanisms of Chemical Carcinogenicity and Mutagenicity: A Review with Implications for Predictive Toxicology. *Chemical Reviews* 2011 111 (4), 2507-2536.

Romualdo Benigni, Cecilia Bossa, Nina Jeliazkova, Tatiana Netzeva and Andrew Worth. The Benigni / Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity – a module of Toxtree. JRC-EU. EUR 23241 EN – 2008.

Danish QSAR Group at DTU Food, 2014. SciMatics SciQSAR version of commercial MultiCASE model A2E for Structural Alerts for DNA Reactivity (NTP data).

Fan Wu, Wenbin Lu, Qun Qian, Qinghua Ren, and Hequi Gong. Ketone Formation via Mild Nickel-Catalyzed Reductive Coupling of Alkyl Halides with Aryl Acid Chlorides. *Organic Letters* 2012 14 (12), 3044-3047.

119. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 유해성 및 위해성평가(1)

1. 의약품 불순물에 대한 위해성 평가의 개념

- 의약품 불순물에 대한 위해성 평가(Risk assessment)는 **약물 유형에 따라 근본적으로 다르며**, 환자 안전을 보장하기 위해 필요한 ① 불순물의 발생원 및 유형 파악을 위한 구체적인 분석 방법, ② 평가 및 위험 정량화를 통한 안전 기준치(Safety threshold)(예: 독성학적 우려 기준치, Threshold of Toxicological Concern) 설정, ③ 규제 준수 및 관리 전략을 위한 규제 체계(regulatory frameworks)를 결정함

- 불순물 위험 평가 체계는 글로벌 규제 지침에 부합하도록 다음과 같이 체계적으로 구성되어 있음(Liu 등, 2024; Teasdale 등 2013)

① 불순물의 발생원 및 유형 파악

- **공정 관련 불순물:** 제조 공정 자체에서 발생합니다. 여기에는 숙주 세포 단백질(HCP), 숙주 세포 DNA, 배지 성분, 외래 미생물, 일회용 제조 장비에서 유래하는 추출물/용출물이 포함됨.
- **제품 관련 불순물:** 제조 또는 보관 과정에서 발생하는 활성 치료 단백질의 분해 산물, 응집체 및 변형된 이소형(예: 산화, 탈아미드화)을 포함됨.
- **원소 불순물 및 니트로사민:** 미량의 중금속, 촉매 및 니트로사민 불순물에 대해서는 잠재적인 독성학적 영향을 평가해야 함.

② 평가 및 위험 정량화

- **독성시험:** 특정 불순물이 유해한 면역 반응이나 독성을 유발하거나, 약물의 치료 효능을 변화시키는지 여부를 평가함.
- **독성학적 임계치:** 허용 일일 노출량(PDE, Permitted Daily Exposure)이나 화학 물질의 안전한 노출 수준을 설정하는 독성학적 우려 임계치(TTC, Threshold of Toxicological Concern)와 같은 개념을 사용하여 한계를 평가함.
- **정량화 모델:** 전반적인 위험은 종종 **중증도, 발생 빈도 및 검출 가능성**과 관련된 점수를 곱하여 정량화되며, 이를 통해 더 엄격한 관리 한도가 필요한 불순물의 우선순위를 결정함.

③ 규제 준수 및 관리 전략

- **ICH 지침:** 위험 평가는 국제조화회의(ICH)가 정한 규제 기준에 근거함. 구체적인 지침으로는 원소 불순물에 대한 ICH Q3D(2022)와 규격 설정에 관한 ICH Q6B(1999)가 있음.
- **공정 모니터링:** 임상 개발 전 과정에 걸쳐 이러한 미량 유해 물질을 검출하고 정량화하기 위해 질량 분석법 및 ELISA와 같은 첨단 분석 기법이 사용됨.
- **일회용 시스템:** 현대식 시설의 경우, 바이오의약품과 플라스틱 제조 구성 요소 간의 상호작용을 고려하기 위해 포괄적인 위해성 평가 전략이 필요함

2. 약물의 불순물에 대한 가이드라인

2-1. 합성 의약품 불순물과 관련 ICH 가이드라인

- 국제약품규제조화위원회(ICH, International Council for Harmonisation)는 신약 및 의약품에 존재하는 불순물(Impurities)의 한도, 식별 및 정량화에 대한 엄격한 글로벌 가이드라인을 제공합니다. 제약 개발 및 규제 제출 시 주로 적용되는 주요 ICH 불순물 가이드라인은 Q3 시리즈(Q3A~Q3E)와 M7임. 이들 가이드라인들은 불순물을 출처와 화학적 특성에 따라 분류하고, 보고(Reporting), 식별(Identification), 한도 설정(Qualification)의 단계를 규정하여 환자의 안전과 의약품 품질을 보장함.

<표> 의약품 불순물과 관련 ICH 가이드라인

불순물 분류	가이드라인	핵심내용
유기 및 분해 불순물 (Organic Impurities & Degradation Products)	신약 원료의약품(ICH Q3A)	<ul style="list-style-type: none"> 신규 활성 성분에서 공정 관련 불순물 및 중간체를 규정함
	신규 의약품(ICH Q3B)	<ul style="list-style-type: none"> 제조 과정이나 유통 기한 내 보관 중에 형성되는 분해 생성물을 규정함
	보고 요건(ICH, Q3B(R2): 신약 제품의 불순물 지침)	<ul style="list-style-type: none"> 불순물은 일반적으로 0.03%~0.05%를 초과할 경우 보고해야 하며, 0.05%~0.1%(일일 최대 투여량에 따라 다름)를 초과할 경우 동정 및 독성학적 적격성 평가가 필요함. 자세한 내용은 Q3B(R2) 신약 제품의 불순물 지침을 참조
잔류 용매 (Residual Solvents)	잠재적 독성에 따라 잔류 용매를 분류하고 허용 한도를 설정(ICH Q3C)	<ul style="list-style-type: none"> 1등급: 사용을 피해야 하는 용매(예: 발암성 물질 또는 환경 유해 물질). 2등급: 고유한 독성으로 인해 사용이 제한되어야 하는 용매. 3등급: 독성 가능성이 낮은 용매(일반적으로 0.5% 이하 또는 5000 ppm 이하일 때 안전한 것으로 간주됨)
원소 불순물 (Elemental Impurities)	ICH Q3D(R2) - 원소 불순물 지침	<ul style="list-style-type: none"> 제조 공정 중에 유입되는 중금속 촉매 또는 불순물에 대한 허용 한도를 설정합니다. 한도는 독성 데이터를 바탕으로 산출된 허용 일일 노출량(PDE, Permitted Daily Exposure)을 기준으로 함
변이원성 불순물 (DNA Reactive Mutagenic Impurities)	ICH M7 -발암 위험을 지닌 불순물	<ul style="list-style-type: none"> DNA와 반응하며 잠재적인 발암 위험을 지닌 불순물을 다룸. 평가 과정에서는 평생 암 발병 위험을 무시할 수 있는 수준으로 제한하기 위해 독성학적 우려 임계치(TTC, Threshold of Toxicological Concern)를 적용함.

2-2. 바이오의약품 불순물의 핵심 분류

- 바이오의약품(Biopharmaceuticals)의 불순물 관리는 일반 화학합성의약품(소분자)에 적용되는 ICH Q3A/B 지침과 달리, **ICH Q6B 가이드라인(Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products)**을 핵심 기준으로 삼음. <표>와 같이 가이드라인에서는 불순물을 크게 두 가지 카테고리로 분류하여 관리하도록 규정하고 있음(Raghani 등, 2017).

<표> ICH Q6B 가이드라인에 따른 바이오의약품 불순물의 핵심 분류

불순물 분류	ICH Q6B 가이드라인에 따른 불순물 분류	핵심내용
<ul style="list-style-type: none"> • 제품 관련 불순물 (Product-Related Impurities): 제조 및 보관 중 표적 단백질의 변형으로 인해 생기는 물질 	분해 산물 (Degradation products)	<ul style="list-style-type: none"> • 절단(Truncated forms), 탈아미드화(Deamidation), 산화(Oxidation), 이황화결합 오류 등
	응집체 (Aggregates): 이량체(Dimers), 다량체(Polymers) 등 면역원성을 유발할 수 있는 물리적 변형체	<ul style="list-style-type: none"> • 이량체(Dimers), 다량체(Polymers) 등 면역원성을 유발할 수 있는 물리적 변형체
<ul style="list-style-type: none"> • 공정 관련 불순물 (Process-Related Impurities): 제조 공정 시스템 자체에서 유래하는 물질 	숙주세포 유래 물질	<ul style="list-style-type: none"> • 숙주세포 단백질(Host Cell Proteins, HCP), 숙주세포 DNA (Host Cell DNA)
	세포 배양 배지 성분	<ul style="list-style-type: none"> • 유도제(Inducers), 항생제, 소혈청(FBS), 성장 인자 등
	정제 공정 유래 물질	<ul style="list-style-type: none"> • 크로마토그래피 레진 침출물, 용매, 완충액 성분, 칼럼 세척액 등

3. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가

3-1. 합성저분자(Chemically Synthesized Small Molecules)

3-1-1. 개념 및 요약

- 저분자 불순물에 대한 안전성 평가는 유전독성, 변이원성 잠재력 및 구조적 경고 신호에 중점을 둠(Liu 등, 2024; Teasdale 등, 2013; Wichitnithad 등, 2026; Nishioka 등, 2023).

항목		내용
불순물의 주요 발생 원인		<ul style="list-style-type: none"> 복잡한 합성 경로: 저분자 의약품은 분자 구조가 정밀하여 다단계 합성(Multistep synthesis) 과정을 거치므로 이성질체와 중간체가 잔류할 확률이 높음. 원료 물질의 변동성: 저가 원료를 사용할 경우 원료 자체에 포함되어 있던 미량의 불순물이 최종 API까지 도달할 수 있음. 부형제 및 포장재 상호작용: 제제화(Formulation) 후 부형제 내 미량의 과산화물(Peroxide) 등이 API 산화를 촉진하거나 포장재에서 침출물(Leachables)이 흘러나올 수 있음.
주요 불순물	유기 불순물 (Organic Impurities)	<ul style="list-style-type: none"> 출발 물질 및 중간체: 합성 공정에서 완전히 소비되지 않고 남은 반응물 부반응물 (By-products): 의도치 않은 부반응으로 생성되는 화합물 분해 산물 (Degradation products): 빛, 열, 수분 등에 의해 API가 보관 중 분해되거나 부형제와 반응하여 생성됨 유전독성/변이원성 불순물 (GTIs/Mutagenic Impurities): 니트로사민(Nitrosamines) 등 아주 낮은 농도에서도 DNA 손상을 유발할 수 있어, ICH M7 가이드라인에 의해 엄격히 제한됨.
	무기 불순물 (Inorganic Impurities)	<ul style="list-style-type: none"> 시약 및 촉매: 합성 반응을 촉진하기 위해 사용한 팔라듐(Pd), 플래티넘(Pt) 등의 전이 금속 잔류물. 금속 잔류물 및 여과 보조제: 반응 용기나 여과 과정에서 유입되는 미량의 금속 원소들로, ICH Q3D 가이드라인에 따라 위해성에 따라 Class 1, 2, 3로 분류되어 관리됨. 무기 염 및 완충제: 공정 중 산·염기 조절을 위해 투입된 염화물이나 황산염 등
평가 도구		<ul style="list-style-type: none"> In silico (QSAR) 평가를 수행한 후 에임스(Ames) 시험을 실시함. 변이원성인 경우, 한도는 기본값인 1.5 µg/일(TTC)로 낮아지며, 비변이원성인 경우 기존의 독성학적 적격성 기준(예: API의 0.05% 또는 최대 1.0 mg/일)이 적용됨.
규제 기준		<ul style="list-style-type: none"> ICH Q3A/B/C 지침(2024), 원소 불순물에 관한 ICH Q3D 및 변이원성 불순물에 대한 ICH M7에 따라 엄격하게 규제됨. 보고 및 확인 기준선: ICH Q3A에 따르면, 일일 최대 투여량이 2g 이하인 의약품의 경우 0.10% 또는 1mg/day 초과 검출되는 불순물은 반드시 구조를 규명(Identification)

3-1-2. 최신 주요 업데이트 항목: ICH M7(R1)과 ICH M7(R2)의 가장 핵심적인 차이

- 2017년 ICH M7(R1) 기준을 2023년 ICH M7(R2)로 전면 대체했으며, **환자의 DNA와 반응하여 돌연변이를 일으키고 암을 유발할 위험이있는 불순물의 등급 분류 방식과 관리 방법이 더 세분화되고 구체화되었음.**

구분	ICH M7(R1) (2017년 채택)	ICH M7(R2) (2023년 개정)
핵심 변화	최초 가이드라인에 14종의 불순물 데이터 (개별 모노그래프) 추가	<ul style="list-style-type: none"> • 기존 14종에 7종의 불순물을 새로 추가하여 총 21종 관리 • 니트로사민류(Nitrosamines) 관리 강화
문서 구조	본문 가이드라인 내에 물질별 독성 데이터가 함께 포함됨	문서 분량이 비대해짐에 따라 본문 가이드라인과 부록(Addendum) 문서로 이원화
국내 도입	식품의약품안전처에서 이미 도입하여 적용 완료	최근 글로벌 규제기관(FDA, EMA, TGA 등)과 함께 표준으로 정착 중
ICH guideline	M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk. 2017.	ICH M7(R2) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk. 2023.

① ICH M7(R2)에서는 제약 합성 공정에서 자주 발견되는 다음 7가지 성분에 대한 1일 섭취 허용량(Acceptable Intake, AI) 또는 허용 노출량(PDE) 기준을 신설

- **아세트알데히드 (Acetaldehyde):** 경구 투여 시 2,000 mcg/day, 그 외 경로 185 mcg/day
- **1,2-디브로모에탄 (1,2-Dibromoethane):** 2 mcg/day
- **에피클로로히드린 (Epichlorohydrin):** 3 mcg/day
- **브롬화 에틸 (Ethyl bromide):** 32 mcg/day
- **포름알데히드 (Formaldehyde):** 흡입 시 8 mg/day, 그 외 경로 10 mg/day
- **스티렌 (Styrene):** 154 mcg/day
- **초산비닐 (Vinyl acetate):** 경구 투여 시 2,000 mcg/day, 그 외 경로 758 mcg/day

② **니트로사민류(Nitrosamines) 관리 강화:** 니트로사민 계열 불순물처럼 변이원성이 극도로 강한 유해 물질에 대해, 획일적인 TTC 기준 대신 최신 독성학 데이터를 반영한 **물질별 정밀 수용 용량(Compound-specific AI)** 제한을 대거 추가하였음.

3-1-3. ICH M7(R2)에 따른 불순물의 5단계 분류

- ICH M7(R2)는 실제 및 잠재적 불순물에 대한 평가를 권장함. 이 평가에는 불순물 화합물의 발암성 및 변이원성에 대한 데이터베이스 및 문헌 검색이 포함됨. 평가 결과에 따라 불순물은 다음과 같이 분류되어야 함.

등급	분류 기준	관리 기준 (Control Strategy)
Class 1	• 변이원성 및 발암성이 확인된 물질 (화합물별 개별 허용량 관리)	• 물질별 특이적 수용 용량(AI, Acceptable Intake)을 설정하여 엄격히 제한
Class 2	• 변이원성은 확인되었으나 발암성 데이터는 없는 물질	• 일반적인 독성학적 우려 역치(TTC, 하루 1.5 µg) 기준으로 관리
Class 3	• (Q)SAR 예측 결과 구조 경고 (Structural Alert)구조적 경고가 있고, 관련 실험 데이터는 없는 물질	• TTC 기준으로 관리하거나 Ames Test를 통해 불순물 등급 하향 시도
Class 4	• 구조 경고(Structural Alert) 가 있으나 해당 API(원료의약품) 구조에도 동일한 경고가 있어 무해하다고 판단되는 물질	• 일반 불순물 가이드라인(ICH Q3A/B) 기준에 따라 관리
Class 5	• 구조 경고(Structural Alert)가 없거나, 경고가 있었으나 Ames Test 등에서 음성으로 검증된 물질	• 일반 불순물 가이드라인(ICH Q3A/B) 기준에 따라 관리

<참고> 주요 유전독성 구조 경고(structural alerts) 예시

- [Ashby-Tennant 규칙\(컨설팅보고서 118 참고\)](#) 등에 기반하여 DNA와 직접 반응(친전자성)하거나 대사 활성화를 통해 돌연변이를 일으킬 수 있는 대표적인 구조들은 다음과 같음.
 - **방향족 니트로기 (Aromatic Nitro groups):** 대사 과정을 통해 DNA와 반응하는 중간체로 전환될 수 있음.
 - **방향족 1차 아민 및 수산화아민 (Aromatic Amines & Hydroxylamines):** 아민기가 대사되어 DNA 부가물을 형성하기 쉬움.
 - **지방족 할로겐화물 (Alkyl Halides):** 자체로 강한 친전자성을 띠어 DNA를 직접 알킬화할 수 있음.
 - **에폭사이드 및 아지리딘 (Epoxides & Aziridines):** 고리의 불안정성으로 인해 쉽게 열리며 DNA와 결합함.
 - **엔알 / 알파,베타-불포화 카르보닐 (α,β -Unsaturated Carbonyls):** 마이클 첨가 반응 (Michael addition)을 통해 생체 내 핵산과 결합함.
 - **N-니트로소기 (N-Nitrosamines):** 최근 발암성 이슈로 많은 의약품 회수 사태를 일으킨 고위험군 구조(Cohort of Concern)임.

3-1-4. Class 4와 Class 5 단계 Hazard Assessment - ICH Q3A/B 불순물 관리 기준을 이용하는 방법

① ICH Q3A 및 Q3B 가이드라인의 불순물 관리 기준 핵심 요약

- 의약품의 안전성과 품질을 확보하기 위해 신규 원료의약품(API) 및 완제의약품에 유재하는 일반 불순물(유연물질)의 관리 한계치(Thresholds)를 설정하는 국제 표준 기준임.
- 유전독성이 없는 일반 유기 불순물은 환자가 하루에 복용하는 **1일 최대 투여량(Maximum Daily Dose, MDD)**에 따라 보고, 확인, 안전성 입증 단계를 엄격히 차등 관리함.
 - **보고 한계치 (Reporting Threshold):** 분석 결과 이 수치를 초과하는 불순물은 시험 성적서에 반드시 정량적 수치로 기록하고 보고해야 함
 - **확인 한계치 (Identification Threshold):** 이 수치를 초과하는 불순물은 화학적 구조(구조식, 분자량 등)를 명확하게 밝혀내야 함
 - **안전성 입증 한계치 (Qualification Threshold):** 이 수치를 초과하는 불순물은 독성 시험 데이터나 기존 문헌을 통해 생체에 안전하다는 근거를 입증해야 함. 안전성이 입증되지 않으면 기준치 이하로 낮추는 공정 개선이 필요함.

③ 가이드라인별 세부 한계치 기준 기준표

- 하루 복용량(MDD)에 따른 구체적인 가이드라인 가이드라인 기준치는 다음과 같음.

1. ICH Q3A: 신규 원료의약품(Drug Substance) 내 불순물 기준

1일 최대 투여량 (MDD)	보고 한계치	확인 한계치	안전성 입증 한계치
≤ 2g / day	0.05%	0.10% 또는 1.0 mg/day 중 낮은 값	0.15% 또는 1.0 mg/day 중 낮은 값
> 2g / day	0.03%	0.05%	0.05%

2. ICH Q3B: 신규 완제의약품(Drug Product) 내 분해생성물 기준

1일 최대 투여량 (MDD)	보고 한계치	확인 한계치	안전성 입증 한계치
< 10mg	0.1%	1.0% 또는 50 µg/day TDP 중 낮은 값	1.0% 또는 50 µg TDP 중 낮은 값
10mg-100mg	0.1%	0.5% 또는 200 µg TDP 중 낮은 값	0.5% 또는 200 µg TDP 중 낮은 값
100mg - 2g	0.1%	0.2% 또는 2mg TDP 중 낮은 값	0.2% 또는 3mg TDP 중 낮은 값
> 2g	0.05%	0.10%	0.10%

(※ TDP: Total Daily Intake, 해당 불순물의 1일 총 섭취량)

3-1-5. Class 3 단계 Hazard Assessment – 3가지 방법

- 첫째, (Q)SAR 프로그램 활용: ICH M7에서 권장하는 Derek Nexus, Leadscope, ToxTree, SARAH 등의 (Q)SAR 소프트웨어를 사용함(<표-소프트웨어> 참고)
 - 둘째, 전문가 리뷰(Expert Review) or 문헌 및 데이터베이스 검색: (Q)SAR 예측만으로는 불명확한 결과가 나올 수 있으므로, 관련 가이드라인에 따라 독성 전문가의 종합적인 문헌 조사 및 메커니즘 분석을 동반한 수동 리뷰를 거쳐 최종 클래스를 판정함.
 - 셋째, 실험적 검증 – 복귀돌연변이시험
- ① 작동원리에 따른 2가지 종류의 (Q)SAR 소프트웨어
- ICH M7 가이드라인에 따라 불순물의 변이원성을 예측할 때는 서로 다른 원리로 작동하는 **두 가지 유형의 모델, 전문가 규칙 기반 vs 통계 기반 모델 비교를 동시에 교차 사용해야 함**(IntuitionLabs, 2025; Hasselgren 등, 2020)

구분	전문가 규칙 기반 (Expert Rule-based)	통계/머신러닝 기반 (Statistical / ML)
작동 원리	기여도가 검증된 독성 구조 경고 (Structural Alert) 기반 판정	알고리즘 데이터 학습을 통한 확률 예측
장점	독성 유발 원인을 사람이 직접 해석 가능	복잡한 구조 패턴 분석 및 미지의 데이터 예측 가능
단점	규칙 데이터베이스에 없는 신물질 은 예측 불가	학습 데이터 범위를 벗어나면 신뢰도 저하
대표 도구	Derek Nexus, ToxTree, OECD QSAR Toolbox	Leadscope, Sarah Nexus, EPA T.E.S.T.

- ICH M7 지침의 (Q)SAR 소프트웨어 비교: <표-소프트웨어> ICH M7 지침에 따른 in silico 변이원성 예측에 사용되는 소프트웨어 도구

Software	Approach	Provider/Source	Notes
Derek Nexus (v6.5.0)	Expert rule-based SAR	Lhasa Limited	<ul style="list-style-type: none"> • Uses ~40 years of curated mutagenicity SAR knowledge. • Latest release adds unified single-click genotoxicity prediction with SarahNexus and updated CPCA values for 420+ N-nitrosamines aligned with FDA, EMA, and Health Canada guidance.
Sarah Nexus (v5.1.0)	Statistical ML (SOHN)	Lhasa Limited	<ul style="list-style-type: none"> • Self-organizing map trained on donated Ames data. • Now includes chromosome damage prediction alongside mutagenicity, with expanded training datasets
Leadscope Model Applier (v2025.0)	Statistical	Instem (acquired Leadscope 2019)	<ul style="list-style-type: none"> • Commercial platform achieving 82% accuracy for sensitization predictions; expanded datasets and updated in silico models for ICHM7 compliance
CASE Ultra	Statistical	MultiCASE Inc.	<ul style="list-style-type: none"> • (Q)SAR modeling software for bacterial mutagenicity prediction per ICH M7; large mutagenicity datasets.
TEST (EPA)	Statistical consensus	US EPA	<ul style="list-style-type: none"> • Free tools including consensus, nearest-neighbor, and probabilistic Ames models.
ToxTree	Rule-based (Benigni/Bossa)	INSILICO open source	<ul style="list-style-type: none"> • Applies known mutagenicity alerts (aromatic amines, alkyl halides, etc.). Flexible and transparent.
OECD QSAR Tool box (v4.8.2)	Hybrid/statistical	OECD/LMC	<ul style="list-style-type: none"> • Updated November 2025 with 57 databases containing ~2.5 million measured data points and 73 profiling schemes
VEGA	Hybrid (multiple models)	INERIS/CAAT-EU	<ul style="list-style-type: none"> • Combines several (Q)SAR models (CAESAR, IRFMN, OECD, etc.). Provides applicability domain metrics
ADMET Predictor	ML/fingerprint based	Simulations Plus	<ul style="list-style-type: none"> • Commercial QSAR suite with modules for mutagenicity, toxicology, etc.
FDA/CDER composite models	Statistical	FDA/CDER (internal)	<ul style="list-style-type: none"> • Proprietary Salmonella mutagenicity models trained on 9,000+ chemicals; sensitivity 66–82%, coverage 96%

- 전문가 규칙 기반 (Expert Rule-based) 통계과 머신러닝 기반 (Statistical / ML)의 예시는 다음과 같음

○ Derek Nexus (Lhasa Limited 개발)

- 방식: 전문가 규칙 기반(Expert Rule-based) 시스템.
- 특징: 문헌과 비공개 독성 데이터를 기반으로 구축된 독성 발현 구조(독성작용기, Structural Alert) 규칙을 적용함. 구조 내에 알려진 독성 유발 인자가 있는지 직관적으로 확인해 주며, 변이원성(Ames test) 및 피부 감작성 예측에 매우 널리 쓰임(IntuitionLabs 등, 2025; David 등, 2015; iSafeRat® Toolbox, 2026).

○ Leadscope (Instem 개발)

- 방식: 통계 기반(Statistical-based) 및 규칙 기반 모델 모두 제공.
- 특징: 대규모 화학 구조 및 독성 데이터베이스를 내장한 케모인포매틱스 플랫폼임. 입력된 분자의 구조적 파편과 유사성을 통계적으로 분석하여 독성 확률을 계산하므로, Derek Nexus와 같은 규칙 기반 툴과 상호보완적으로 사용하기 좋음.

○ ToxTree (이탈리아 ISS 등 개발 / 오픈소스)

- 방식: 전문가 규칙 기반(Expert Rule-based) 의사결정 나무(Decision Tree) 시스템.
- 특징: 무료로 사용할 수 있는 공개용 소프트웨어임. 크래머 규칙(Cramer rules) 등을 이용해 화학물질의 위해 등급을 분류하거나 유전독성 경고 구조를 식별할 때 주로 사용됨. 상용 프로그램에 비해 가볍고 접근성이 좋음

② 문헌 및 데이터베이스 검색: 공인된 학술 데이터베이스 및 발암성/변이원성 데이터를 검색하여 기존 실험 결과(Ames Test 등)가 있는지 먼저 확인함.

③ 실험적 검증 (복귀돌연변이시험 or Ames Test):

- (Q)SAR 예측에서 변이원성 양성(구조 경고 있음)이 나왔더라도, 실제 복귀돌연변이 시험 (Ames Test)을 수행하여 음성 결과가 나오면 (Q)SAR 예측 결과를 뒤집고 안전한 불순물로 분류할 수 있음.

④ 관리 기준

- 유해성 평가의 대상: 변이원성을 일으킬 수 있는 화학 구조 경고(Structure alert)가 있거나 관련 데이터가 없는 경우임의 Class 3단계

● 관리 기준:

- 양성 예측 시: Class 2에 준하여 TTC(1.5 µg/일) 한도 이하로 관리(그러나 Note 3에서처럼 in vivo 유전독성시험으로 in vitro 양성 판단 변경 가능함)
- 음성 판정 시: 변이원성이 없는 것으로 간주(Class 5)

- NOTE 3: in vitro 복귀돌연변이에서 양성인 경우 NOTE 3에서처럼 in vivo 유전독성시험으로 수행 가능함(ICH M7(R1)).

Note 3 Tests to Investigate the *in vivo* Relevance of *in vitro* Mutagens (Positive Bacterial Mutagenicity)

In vivo test	Factors to justify choice of test as fit-for-purpose
Transgenic mutation assays	For any bacterial mutagenicity positive. Justify selection of assay tissue/organ
Pig-a assay (blood)	For directly acting mutagens (bacterial mutagenicity positive without S9)*
Micronucleus test (blood or bone marrow)	For directly acting mutagens (bacterial mutagenicity positive without S9) and compounds known to be clastogenic*
Rat liver Unscheduled DNA Synthesis (UDS) test	In particular for bacterial mutagenicity positive with S9 only Responsible liver metabolite known to be generated in test species used to induce bulky adducts
Comet assay	Justification needed (chemical class specific mode of action to form alkaline labile sites or single-strand breaks as preceding DNA damage that can potentially lead to mutations Justify selection of assay tissue/organ
Others	With convincing justification

*For indirect acting mutagens (requiring metabolic activation), adequate exposure to metabolite(s) should be demonstrated.

3-1-6. Class 2 단계 Risk Assessment – TTC

① 위해성 평가 대상

Class 2	<ul style="list-style-type: none"> 변이원성은 확인되었으나 발암성 데이터는 없는 물질 일반적인 독성학적 우려 역치(TTC, 하루 1.5 µg) 기준으로 관리
---------	--

② TTC 기본 개념 및 일일 섭취 허용량

- TTC(Threshold of Toxicological Concern, 독성학적 우려 역치): 발암성이나 유전독성 데이터가 없는 화학물질을 **평생(70년)** 매일 섭취하더라도 인체에 미치는 암 발생 위험이 **10만 분의 1 이하**로 무시할 만한 수준인 1일 섭취 한도

③ ICH M7(R2)에서 10만 분의 1 이하 수준의 TTC - TTC-Based Acceptable Intake

- 평생 동안 돌연변이 약물 불순물 노출 한계의 **TTC: 1.5 µg/day**
- 평생 미만 노출(LTL, Less-Than-Lifetime)**: 임상 개발 과정에서 환자 노출 기간에 따라 허용 가능한 AI(acceptable intake, 일일 섭취 한도)가 조정됨

$$\text{Less-than-lifetime AI} = \frac{1.5 \mu\text{g} \times (365 \text{ days} \times 70 \text{ years lifetime} = 25,550)}{\text{Total number of treatment days}}$$

- ≤ 1개월: 하루 120 µg/day
- > 1개월에서 3개월: 60 µg/day
- > 3개월에서 6개월: 20 µg/day
- > 6개월에서 1년까지: 10 µg/day
- > 1년에서 10년까지: 5 µg/day
- > 1년에서 평생까지: 1.5 µg/day

3-1-7. Class 1 단계 Risk Assessment – Specific acceptable limit

Class 1	<ul style="list-style-type: none"> 변이원성 및 발암성이 확인된 물질 (화학물질별 개별 허용량 관리) 물질별 특이적 수용 용량(AI, Acceptable Intake)을 설정하여 엄격히 제한
---------	--

① 우려 코호트(The Cohort of Concern, CoC): 특정 **강력한 돌연변이 유발 및 발암성 화학물**은 표준 TTC 계산에서 제외되는 다음과 같은 불순물

- Aflatoxin-like compounds,
- N-nitroso compounds (Nitrosamines),
- Alkyl-azoxy compounds

② 우려 대상 코호트 한도: 우려 대상 군 화학물의 허용 섭취량(AI: **Acceptable Intake**)

- AI(허용 섭취량, Acceptable Intake)**: 평생 인간 노출 시 안전하다고 간주되는 불순물의 최대 일일 섭취량(µg/day)으로, 100,000명 중 1명의 허용 가능한 암 위험에 해당
- 평생 노출의 경우, AI는 일반적으로 설치류 발암성 연구(예: TD₅₀)에서 도출되거나

벤치마크 용량 모델링을 활용하여 계산된 화합물별 효능 데이터를 사용하여 산정해야 함. 허용 섭취량(AI) AI 계산에 사용할 연구 선정 근거 **Wester 등(1985)** 경구 위관 투여 연구

- $AI = (TD_{50} / 50,000) \times 50 \text{ kg}$
- TD_{50} (Tumor dose 50%): 랫드를 이용한 발암시험에서 **50%**의 종양 발생률을 유발하는 mg/kg/day 단위의 용량
- **50,000: 선형 외삽 계수**(A linear extrapolation factor). 이 계수는 설치류의 TD_{50} (**암 발병 위험이 1:2인 값**)을 인간의 평생 발병 위험 **1:100,000으로 환산**하는 데 사용됨(50,000에 2를 곱하여 100,000을 산출).
- **50 kg**: 표준 인체 체중.

AI-예시) Carcinogenicity Potency Database (CPDB)에 따르면 Acetaldehyde의 TD_{50} 은 185 mg/kg/day임.

- $AI = (185 \text{ mg/kg/day} / 50,000) \times 50 \text{ kg(성인체중)} = 185 \text{ } \mu\text{g/day}$ 즉, 합성의약품에 발암성 유연물질 Acetaldehyde가 있을 경우, 1일 섭취 허용량(AI, Acceptable Intakes)은 성인 체중 50 kg 기준 185 $\mu\text{g/day}$ 임. 이와 같은 아세트알데히드에 대한 AI는 약물의 모든 노출 경로에 대해 동일하게 적용됨.

③ AI를 적용할 수 없는 경우 Permissible Daily Exposures (PDEs, 1일 허용노출량)

- 일반적으로 돌연변이원이나 발암원에 대해서는 역치(threshold)가 없음. 그러나 특정 물질이 유전독시험을 통해 음성으로 확인되었지만 인체에서 발암이 확인되었음. 이와 같은 경우에 시험물질에 대한 동물시험의 반복투여독성시험에서 추정된 NOAE를 이용하여 1일 허용 노출용량인 **Permissible Daily Exposures (PDE)**로 산출.
- **PDE 산출은 아래의 공식에서처럼 반복투여독성시험에서 확인된 NOAEL(no observed adverse effect level)과 ICH 가이드라인 (ICH Q3C(R5)에서 제시한 안전계수인 adjustment factor(또는 safety factor)를 적용하여 산출됨.**

$$PDE \text{ (mg/day)} = \frac{\text{NOAEL or LOAEL (mg/kg/day)} \times \text{Body weight (kg)}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5}$$

Diagram labels:

- weight adjustment (points to Body weight (kg))
- no-observed-adverse-effect level (points to NOAEL or LOAEL (mg/kg/day))
- lowest-observed-adverse-effect level (points to NOAEL or LOAEL (mg/kg/day))
- adjustment factors (points to F1 x F2 x F3 x F4 x F5)

- Adjustment factor 또는 safety factor: F1 = 5 (rat to human), F2 = 10 (inter- individual variability), F3 = 1 (study duration at least half lifetime) F4 = 10 (severe toxicity – non-genotoxic carcinogenicity) F5 = 1 (using a NOEL)

PDE-예시) CIIT의 2년 쥐 발암성 연구(CIIT, 1982) 데이터를 활용하였다. 사료에 첨가된 염산 아닐린의 투여량인 200, 600 및 2000 ppm은 아닐린의 투여량 7.2, 22 및 72 mg/kg/day에 해당한다. 고용량군 수컷에서 종양이 관찰되었으며, 22 mg/kg/day 투여군에서는 비장의 기질성 육종 1건이 확인되었다. 이러한 데이터를 바탕으로, 종양에 대한 무영향 수준(NOEL)을 정의하는 데 최저 용량인 **7.2 mg/kg/day**가 사용되었다.

- Lifetime PDE = 7.2 mg/kg/day x 50 kg / (5 x 10 x 1 x 10 x 1)
- Lifetime PDE = 720 µg/day

(참고) 아닐린은 IARC에 의해 그룹 3, 즉 인체에 대한 발암성 여부를 분류할 수 없는 물질로 분류된다(IARC, 1987). 염료 산업에 종사하는 사람들의 방광암은 당초 아닐린 노출과 관련이 있는 것으로 여겨졌으나, 이후 β-나프틸아민, 벤지딘 및 기타 아민과 같은 아닐린 염료 생산 과정의 중간체 노출이 원인으로 밝혀졌다.

④ 노출경로에 의한 AI 및 PED 결정

- 평생(70년) 복용을 전제로 한 **AI(Acceptable Intake, 일일섭취허용량)**는 경로를 구분할 수 없음(식품의약품안전처, 2017).
- 의약품 불순물에서 **PDE(1일 노출 허용량, Permitted Daily Exposure)**는 불순물의 투여 경로(노출 경로)에 따라 생체 이용률과 독성 표적 기관이 달라지므로 각각 다르게 산출 및 결정됨. 국제기준(ICH Q3D 등)에서는 경로별 독성 데이터를 기반으로 PDE를 다음과 같이 설정함(ICH M7(R2), ICH Addendum to M7(R2)) .
 - **경구 경로(Oral Route):** 가장 흔한 노출 경로로, 위장관 흡수율과 간 대사 등을 고려해 설정됨. 경구용 PDE는 일반적으로 다른 투여 경로의 출발점이 됨.
 - **주사 경로(Parenteral Route):** 정맥, 근육, 피하 주사 등은 위장관과 간의 초회통과 효과를 우회하므로, 동일한 양이라도 전신 노출과 독성 위험이 훨씬 큼. 따라서 경구용 PDE보다 엄격하게 낮은 값으로 결정됨.
 - **흡입 경로(Inhalation Route):** 호흡기를 통한 국소 자극 및 전신 흡수를 고려하며, 폐포에서의 흡수율과 호흡기계 독성을 기반으로 산출됨.
 - **경피 경로(Dermal Route):** 피부 장벽을 통해 흡수되는 양을 평가함. 특히 밀봉 봉대(occlusive patches)를 사용해 피부 투과도가 비정상적으로 증가할 경우, 경구 데이터를 수정하여 별도의 경피용 PDE(dPDE)를 적용하기도 함.

<참고문헌: 다른 보고서와 혼합되어 있음>

CIIT(The Chemical Industry Institute of Toxicology). 1982. 104-week chronic toxicity study in rats with aniline hydrochloride. Final report. Report prepared for CIIT by Hazleton Laboratories America, Inc. CIIT Docket No. 11642. CIIT, Research Triangle Park, NC.

IARC. Overall evaluation of carcinogenicity: An update of IARC monographs volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1987. Addendum 7: pp 99 and 362.

Wester PW, van der Heijden CA, et al. Carcinogenicity study with epichlorohydrin (CEP) by gavage in rats. Toxicology 1985;36:325-39.

FDA M7(R2) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk Guidance for Industry. 2023

International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents.

ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. 2015.

Catrin Hasselgren, Joel Bercu, Alex Cayley, Kevin Cross, Susanne Glowienke, Naomi Kruhlak, Wolfgang Muster, John Nicolette, M. Vijayaraj Reddy, Roustem Saiakhov, Krista Dobo, Management of pharmaceutical ICH M7 (Q)SAR predictions – The impact of model updates, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 118, 2020, 104807, ISSN 0273-2300.

IntuitionLabs. ICH M7: A Guide to Mutagenic Impurity Assessment Software. 2025

David P. Elder, Angela White, James Harvey, Andrew Teasdale, Richard Williams, and Elizabeth Covey-Crump. Mutagenic Impurities: Precompetitive/Competitive Collaborative and Data Sharing Initiatives. Organic Process Research & Development **2015** 19 (11), 1486-1494.

Warad T.A Bhusnure O.G, GholveS.B.. Impurity Profile of Pharmaceuticals Ingredient: A Review/ Journal of Pharmacy Research 2016,10(7),523-533.

Lewis, Jason R. Antibody-Drug Conjugates: Understanding Associated Drug Design and Pharmacology. AMWA Journal: American Medical Writers Association Journal, 2023, v. 38, n. 2, p. 28.

Frank Liu, Safety assessment of antibody-drug conjugates: Nonclinical toxicology, non-active ingredients, and environmental risk considerations, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 215, 2025, 104865, ISSN 1040-8428.

Metrangolo, Virginia & Engelholm, Lars. (2024). Antibody-Drug Conjugates: The Dynamic Evolution from Conventional to Next-Generation Constructs. Cancers. 16. 447.

Praiti Pandey, Antibody Drug Conjugates (ADCs): A Powerful Approach to Targeted Cancer Therapy. 2025. emerypharma

Pettinato MC. Introduction to Antibody-Drug Conjugates. Antibodies (Basel). 2021 Oct 27;10(4):42.

Peters C, Brown S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. Biosci Rep. 2015;35(4):e00225. Published 2015 Jul 14. Available at:

He J, Zeng X, Wang C, Wang E, Li Y. Antibody-drug conjugates in cancer therapy: mechanisms and clinical studies. MedComm (2020). 2024 Jul 28;5(8):e671.

Rahul Sharma, Sanjay Kumar Dhaker, Rajveer Singh, Manisha Nidhar, Alkylating agents in cancer: Current developments, Letters in Drug Design & Discovery, Volume 22, Issue 12, 2025, 100317, ISSN 1570-180.

Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? Toxicol Res. 2014 Sep;30(3):179-84.

David J. Snodin. Genotoxic Impurities: From Structural Alerts to Qualification. Organic Process Research & Development **2010** 14 (4), 960-976

John Wisler. Assessment of GenotoxicImpurities in Small Molecule Drug Candidates. AMGEN. 2010

Limban C, Nuță DC, Chiriță C, Negreș S, Arsene AL, Goumenou M, Karakitsios SP, Tsatsakis AM, Sarigiannis DA. The use of structural alerts to avoid the toxicity of pharmaceuticals. Toxicol Rep. 2018 Aug 31;5:943-953.

Stephen P. Raillard, Joel Bercu, Steven W. Baertschi, and Christopher M. Rilev. Prediction of Drug Degradation Pathways leading to Structural Alerts for Potential Genotoxic Impurities. Organic Process Research & Development . 2010 14 (4), 1015-1020.

ICH M7(R2) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk. 2023.

ICH M7 (R1). 2017. ICH M7 (R1) Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk – Scientific guideline.

ICH M7 (R2)- Q&A. 2022. ICH M7(R2) Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in

pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk- Questions and Answers.

ICH Q3A (R2). 2006. ICH Q3A (R2) Impurities in new drug substances – Scientific guideline.

ICH Q3B (R2). 2006. ICH Q3B (R2) Impurities in new drug products – Scientific guideline.

식품의약품안전평가원. 의약품 불순물 유전독성 시뮬레이션 평가 사례집. 2020

서동석·임철홍. 발암물질의 메커니즘 기반 위해성 평가에 관한 연구. 산업안전보건연구원. 2024.

Madelyn Huang, William Salminen and Olu Aloba Evaluating Impurities in New Drugs to Prevent Delays in Development. Premier Perspectives Blog 2023.

Venkat Shinde. FAQs on Genotoxic Assessment for Impurities. 2023.

Frank Liu, Safety assessment of drug impurities for patient safety: A comprehensive review, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 153, 2024, 105715, ISSN 0273-2300.

ICH Q3D(R2), 2024. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED GUIDELINE GUIDELINE FOR ELEMENTAL IMPURITIES Q3D(R2)

ICH Q6B HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA FOR BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS

Teasdale A, David Elder, Sou-Jen Chang, Sophie Wang, Richard Thompson, Nancy Benz, and Ignacio H. Sanchez Flores. Risk Assessment of Genotoxic Impurities in New Chemical Entities: Strategies To Demonstrate Control. Organic Process Research & Development. 2013. 17 (2), 221-230

Wisut Wichitnithad, Pornpoom Anqsuwattana, Binbin Yu, Worathat Thitikornpong, and Pornchai Rojsitthisak. Managing NDSRIs in Pharmaceuticals: Integrating Structural Risk Assessment and Mitigation Strategies. ACS Chemical Health & Safety **2026** 33 (3), 350-370

Rina Nishioka, Soichiro Hanakawa. Risk Assessment and Control in the Guideline for Elemental Impurities in Drugs. 2023. Risk Assessment and Control in the Guideline for Elemental Impurities in Drugs[Wako Blog| Laboratory Chemicals-FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation.

Raghani, A., Li, K., Bussiere, J.L., Bercu, J.P. and Qiu, J. (2017). Process-Related Impurities in Biopharmaceuticals. In ICH Quality Guidelines (eds A. Teasdale, D. Elder and R.W. Nims).

European Medicines Agency. ICH Q3A (R2) Impurities in new drug substances – Scientific guideline [Internet]. Amsterdam: EMA;

Liu KT, Chen CH. Determination of Impurities in Pharmaceuticals: Why and How? [Internet]. Quality Management and Quality Control – New Trends and Developments. IntechOpen; 2019.

Kumari M, Tripathy DB, Gupta A. Analytical methods and their significance in pharmaceutical process impurities: A review. Macromol Symp. 2024;413(1). doi:

World Health Organization. Annex 4: Good practices for pharmaceutical quality control laboratories [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2025 Jul 20].

de Souza GFP, Araujo Vieira Matos MF, de Castro Aglio T, Salles AG Jr, Rath S. A comprehensive LC-UHPLC-MS/MS method for the monitoring of N-nitrosamines in lipophilic drugs: A case study with rifampicin. J Pharm Biomed Anal. 2023 Nov 30;236:115685.

Urwin SJ, Yerdelen S, Houson I, ter Horst JH. Impact of impurities on crystallization and product quality: A case study with paracetamol. Crystals. 2021;11(11):1344.

120. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(2)- 단일클론항체(mAbs) 및 재조합 단백질의 HCP

3. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가

Part 1. 합성저분자(Chemically Synthesized Small Molecules) -119 컨설팅보고서

Part 2. 바이오의약품의 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(2) - 단일클론항체(mAbs) 및 재조합 단백질의 HCP & HDP

- 생물 의약품(Biologics) 모달리티별 불순물 위해성 평가(Risk Assessment)의 핵심은 각 치료제 방식이 가진 고유한 생산 공정과 분자 구조적 특성에 맞추어 환자 안전성(면역원성, 독성, 유전독성 등)을 선제적으로 검증하는 것임. 단일클론항체(mAbs)와 같은 전통적인 단백질 의약품에 적용되던 기존의 불순물 기준(예: ICH Q3A/B)은 유전자 치료제, 올리고 뉴클레오타이드 등 새롭게 등장하는 복잡한 모달리티에 그대로 적용하기 어려우므로 모달리티 특이적인 위해성 평가 체계가 반드시 요구됨(Shadbar 등 2025; Liu, 2025; Luo 등. 2020). 특히
- 생물 의약품은 크게 공정 관련 불순물(Process-related impurities)과 제품 관련 불순물(Product-related impurities)로 나뉘는데 특히, 모달리티마다 집중해야 하는 위험 요소가 다름

Part 2-1. 단일클론항체(mAbs) 및 재조합 단백질의 숙주세포 단백질(HCP, Host Cell Proteins)

1. 불순물 특성과 종류

1) 개념

- 숙주 세포 단백질(HCP, Host Cell Proteins)은 단클론 항체(mAb), 백신, 유전자 치료제 등 바이오 의약품 제조 과정에서 의약품 생산 세포(예: CHO Cell, E. coli 등)에 의해 생성되는 대표적인 공정 관련 불순물(Process-related impurity)임. 대부분의 HCP는 하이드로다운스트림 정제 공정(downstream processing)을 통해 99% 이상 제거되지만, 최종 의약품에 아주 미량이라도 남아있을 경우 환자의 안전성과 약물의 품질에 큰 영향을 미칠 수 있음(Yao 등, 2025).

2) HCP의 출처에 따른 분류

- 세포 용해 과정에서 세포 내의 단백질은 배지 속으로 방출되어 HCP의 일부가 됨. HCP의 출처에 따른 분류는 <표-1>에 요약되어 있음. 단백질 기반 생물치료제 생산은 대장균(대

장균), 효모(*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), 인간(HEK-293), 동물 세포주(CHO DG44, CHO DUKX-B11) 등 다양한 원핵생물 및 진핵생물 발현 시스템을 사용(USP General Chapter, 2024; Park 등, 2017).

<표-1> Source classification of HCPs.

Sources	Classification	Example
	<i>Escherichia coli</i>	β -galactosidase, restriction endonuclease, DNA polymerase
Bacteria Fungus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ethanol dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, galactosidase
	Galactosidase	Ethanol oxidase, Catalase
Mammalian cells	Chinese hamster ovary cells	Lactic dehydrogenase, glutamine synthetase
	Mouse myeloma cells	Lactic dehydrogenase, glutamine synthetase

3) E. Coli의 HCP 예시

- 유기 용매 추출을 이용한 후처리 API의 잔류 단백질 분석- 상위 13개 대장균 단백질 및 그 예측 면역원성(Wang 등, 2022). 유기 용매 추출은 TGDE(Tetraethylene Glycol Dimethyl Ether)를 보조 용매로 사용하여 API를 MeTHF(2-Methyltetrahydrofuran)로 효율적으로 추출하며, 대부분의 잔류 단백질은 용매층과 수성층에서 제거 및 C-MS/MS 분석을 수행한 결과(표-1)

<표-1> Prep. Lab API에서 LC-MS/MS로 확인된 모든 단백질 중 10 ppm 이상으로 추정되는 상위 13개 대장균 단백질 및 그 예측 면역원성

Table 3. Top 13 *E. coli* proteins estimated to be above 10 ppm among all proteins identified by LC-MS/MS in Prep. Lab API and their predictive immunogenicity.

Protein Name	MW	pI	Estimated Amount (ng/mg)	Number of Class. (iMars*)	ChastMer Score	Subjective Risk
Single-stranded DNA binding protein	19	5.58	~103	0	0	Low
Superoxide Dismutase (Fe)	21.3	5.05	~64	2	17.09, 14.81	Low
Cysteine Synthase	34.5	6.06	~40	0	0	Low
Alkyl hydroperoxide reductase C	20.7	5.17	~35	1	10.39	Low
Cold shock-like protein CspC	7.4	7.24	~34	1	17.21	Low
Cold shock-like protein CspA	7.4	5.05	~25	0	0	Low
Transcriptional 30 regulatory protein CpxR		5.58	~19	3	34.98, 21.24, 17.95	High
30S ribosomal protein S19	11.7	9.69	~13	1	12.57	Low
Trigger Factor	48.2	4.88	~13	4	25.01, 21.46, 12.76, 12.85	High
Superoxide dismutase [Mn]	23.1	6.96	~11	1	20.08	High
Nitrogen regulatory protein P-II	12.4	5.34	~11	0	0	Low
Adenylate Kinase	23.6	5.76	~10	4	14.54, 11.93, 10.8, 10.02	Low
Chaperone SurA	47.3	6.98	~10	3	27.12, 22.97, 15.19	High

3) HCP의 물리적·화학적 특성

- HCP는 분자량 범위가 매우 넓으며, 소분자량 단백질(예: 10 kDa)부터 고분자량 단백질(>100 kDa)까지 다양함. 20개의 아미노산으로부터 5,000개의 아미노산을 초과할 수도 있음.
- HCP의 등전점, 소수성 및 당화의 정도가 다르기 때문에 정제의 난이도를 높임(Huang 등, 2019; Yau 등, 2021).
- HCP의 소수성은 다양한 용매에서의 용해도와 안정성을 결정함. 강한 소수성 단백질은 유기 용매에 더 잘 녹을 수 있고, 친수성 단백질은 수상에서 더 안정적일 수 있음

4) 바이오제약 역사상 최종 제품에 안전 우려가 있을 정도로 높은 수준의 HCP 불순물이 포함된 사례(Vanderlaan 등, 2018; Salama 등, 2020; TRZĘSICKA, 2025)

- CHO 세포에서 생성된 인산지방 B-유사 2(PLBL2)는 레브리키주맙 후기 임상시험 중 ELISA 플랫폼에 의해 검출되지 않아 부적절한 면역 반응이 발생했고, 임상시험 완료와 규제 제출이 지연되었음.
- T세포 활성화에 필수적인 보조 자극 신호(CD80/CD86)를 차단하여 **면역 반응을 억제**하는 생물학적 제제인 CTLA4-Ig(세포독성 T림프구 관련 단백질 4) 분자와 관련되어 있었는데, 단백질 화학유인단(MCP-1) 오염으로 급성 독성이 발생하여 2상 연구가 중단되었음

2. HCP 불순물의 잠재적 독성에 대한 고찰

- 의약품 생산은 유전자 조작된 숙주 세포에 의존하지만, 세포 내 기전에 의해 미량의 HCP는 불가피하게 배출하게 됨. 정제 과정에서 HCP가 완전히 제거되지 않을 경우, 이는 다음 세 가지 주요 경로를 통해 약물의 효능과 환자 안전을 위협함; **면역원성(알레르기 또는 자가면역 반응 유발), 의약품의 직접적인 분해, 그리고 의도하지 않은 생물학적 독성(unintended biological toxicity)**

2-1. 독성 및 면역원성(Toxicity & Immunogenicity)

- HCP는 인체에 이물질이기 때문에 원치 않는 면역 반응을 유발할 수 있음. 일부 특정 HCP는 면역 보조제 역할을 하여 생물학적 제제 자체의 면역원성을 증폭시킬 수 있음. 이로 인해 약물의 치료 효과를 감소시키는 중화 항약물 항체(ADA)가 생성될 수 있음.

1) Anti-HCP 항체 생성

- 환자 몸속에서 HCP를 표적하는 특이 항체(Anti-HCP Antibody)가 형성됨. 대표적인 예시로 <표>와 같이 천식 치료제인 Lebrikizumab 투여 의한 Phospholipase B-Like 2 (PLBL2) 항체 생성(Fischer 등, 2017).

<예시> 불순물 PLBL2의 항체 생성

항목	내용
임상시험	천식 치료제인 Lebrikizumab Clinical study
mAB	Lebrikizumab: 용해성 인터루킨 13에 특이적으로 결합하는 인간화된 면역글로불린 G4 단클론 항체(mAb)
HCP impurities	Phospholipase B-Like 2 (PLBL2)
환자 영향	90 % 임상시험 참가자들은 PLBL2에 대한 항체를 생성
결과	면역 반응은 천식 임상시험에서 주요 안전 문제를 일으키지 않았음. 하지만 제약사들은 단백질을 제거하고 검사를 수정하기 위해 제조 공정을 변경

2) 교차 반응성 (Cross-reactivity):

- 교차반응성"이란 약물의 면역 반응이 정상적인 인간 단백질에 작용한다는 뜻으로 HCP가 인간 단백질처럼 보일 때 발생함. 유래된 HCP가 인체 내 고유 단백질이나 바이오의약품 자체와 서열 유사성이 높을 경우, 생성된 항체가 우리 몸의 필수 단백질까지 공격하는 자가면역 반응을 유발할 수 있음.

<예시> 교차반응성 예시

항목	내용
임상시험	<ul style="list-style-type: none"> 내인성 인간 동종 단백질과 교차 반응하여 그 기능을 비활성화하는 항-HCP 항체의 생성이 있음. 만약 인간 단백질이 필수적인 생물학적 기능을 수행하거나 생물학적 중복성이 거의 없다면, 이는 잠재적으로 심각한 임상적 결과를 초래할 수 있음. 그러나 현재까지 이러한 위험을 입증하는 데이터는 발표된 바 없음 (Panikulam 등, 2025).
mAB	
HCP impurities	
환자 영향	
결과	

3) 면역 보조제 효과

- 보조제 효과로 인해 **항약물 항체(ADA, anti-drug anti bodies)** 형성이 증가하여 결과적으로 약물의 약동학(PK) 및 효능에 영향을 미칠 수 있는 경우)이 있음(Cheung 등 2016; Fischer 등 2017; Hanania 등 2015; Romer 등 2007) 및 생물학적 활성(즉, 부작용을 유발할 수 있는 활성)(Haggerty 2014)에 영향을 미칠 수 있음.

예시-1) 면역 증강(Adjuvanticity) 역할

- 일부 HCP는 체내에서 위험 신호(Danger signal)로 작용하여 수지상세포와 같은 항원제시세포를 활성화함. 이로 인해 사이토카인이 분비되고, 주 표적이 아닌 주변의 다른 면역세포들까지 비특이적으로 자극받는 방관자 활성화가 일어남(Kepp 등, 2025).

<표> 바이오시밀러의 Adjuvanticity

항목	내용
연구 내용	<ul style="list-style-type: none"> 새로운 즉시 사용 가능한 재조합 인간 성장 호르몬 용액의 효능 및 안전성 (Romer 등, 2007)
유전자재조합 단백질	<ul style="list-style-type: none"> 옴니트로프(Omnitrope): 산도스(Sandoz)에서 개발한 소마트로핀(Somatropin) 성분의 세계 최초 동종 바이오시밀러(유전자재조합 인간 성장호르몬): 뇌하수체에서 분비되는 천연 인간 성장호르몬과 동일한 구조의 단백질을 재조합 DNA 기술로 생산하여, 체내 성장과 지질·탄수화물 대사를 조절
HCP impurities	<ul style="list-style-type: none"> 재조합 인간 성장 호르몬의 초기 개발 과정에서, 특정 배치에는 예상보다 높은 수준의 대장균의 샤페론 단백질 DnaK 등이 포함. 최대 1400 ppm(Romer 등, 2007). 항원 제시 세포(Toll-like 수용체 등)와 직접 상호작용하여 면역계를 자극하고, 항-GH 항체의 발생률을 급격히 증가를 유도하는 면역보조제 역할 (Yasuno 등, 2020)
환자 영향	<ul style="list-style-type: none"> 코벤스(Covance) 공정에서 생산된 활성 원료를 사용한 초기 연구에서, 등록 된 환자의 최대 60%에서 비중화성 항성장호르몬 항체가 생성되었으며, 모든 환자에서 항-HCP 항체가 생성되었음 (Vanderlaan 등, 2018).
결과	<ul style="list-style-type: none"> HCP의 방관자 효과로 인해 치료용 단백질에 대한 면역 관용이 “파괴”되어, ADA 반응이 강화되었음.
위험관리 방법 제시	<ul style="list-style-type: none"> 옴니트로프(Omnitrope) 사례는 공정 관련 불순물이 임상적 면역원성에 어떤 영향을 미칠 수 있는지에 대한 바이오의약품 업계의 전형적인 사례가 되었고 다음의 필요성을 부각(Coye 등, 2025). <ul style="list-style-type: none"> 고도화된 검출: 일반적인 HCP 검사만으로는 특정 저농도 면역원성 단백질을 놓칠 수 있음을 인식 필요성 직교 분석법: 물리·화학적 원리가 완전히 다른 두 개 이상의 기술로 교차 검증하는 방법.HCP를 최소화하고 그 보조제 효과를 완화하기 위해 질량 분석법 및 더 민감한 체외 검사 같은 첨단 기법을 도입할 필요성.

예시-2) 중화 항체(ADA, anti-drug antibody) 형성 가속화

- 이렇게 활성화된 면역 환경은 의약품의 활성 성분(API)을 외부 물질로 명확히 인식하게 만듭니다. 특히 HCP가 보조제(Adjuvant) 역할을 하여, API에 대한 체액성 면역 반응이 증폭되고 약물을 무력화하는 중화 항체(Anti-Drug Antibodies, ADA)의 생성이 가속화됨 (Panikulam 등, 2025).

<표> 망막 질환 치료제인 Ranibizuma의 HCP에 대한 보조제(Adjuvanticity) 역할

항목	내용
임상시험	<ul style="list-style-type: none"> 신생혈관성 노화 관련 황반변성(nAMD, neovascular age-related macular degeneration) 환자에게 유리체강 내 투여용 바이오의약품의 망막 질환 치료제인 Ranibizuma
유전자재조합 단백질	<ul style="list-style-type: none"> 생체 내토키 모델에서, HCP와 라니비주마를 병용 투여
HCP impurities	<ul style="list-style-type: none"> 세균(예: 대장균)을 이용한 제조 과정에서 잔류하는 숙주 세포 단백질(HCP).
HCP 매개 보조제 효과 및 염증	<ul style="list-style-type: none"> 라니비주마와 함께 소량의 잔류 HCP가 투여될 경우, 이들은 방관자 보조제(bystander adjuvant) 역할을 하여 원치 않는 면역 반응을 유발함. 이 경로에 관여하는 구체적인 생물학적 표지자 및 사이토카인은 다음과 같음. <ul style="list-style-type: none"> 인터루킨-1 베타(IL-1b):안구에서 면역 및 염증 반응을 유발하기 위해 분비되는 강력한 친염증성 사이토카인. 인터루킨-8(IL-8):호중구를 유인하고 염증을 지속시키는 역할을 하는 케모카인. 대식세포 염증 단백질-1 베타(MIP-1b):다른 면역 세포를 유인하고 활성화하는 케모카인. CD80 및 CD54:항원 제시 세포(THP-1 대식세포 등)에서 발현이 증가

	하는 공동자극 분자 및 접착 분자로, 이 세포들이 약물을 항원으로 제시할 수 있도록 준비시킴
임상 면역원성에 미치는 영향	<ul style="list-style-type: none"> • 항약물 항체(ADA):생체 내토끼 모델에서, HCP와 라니비주맙을 병용 투여했을 때 눈의 여러 부위에서 단핵구 세포 침윤이 관찰 및 안구 염증이 유발되고 항라니비주맙 항체(ADA) 형성이 촉진되었으나, HCP를 단독으로 투여했을 때는 이러한 현상이 나타나지 않았음(Yasuno 등, 2020). 이러한 결과는 HCP가 보조제 역할을 하여 안구 염증 및 ADA 형성에 기여함을 시사함.
임상적 의의	<ul style="list-style-type: none"> • 항-VEGF(anti-vascular endothelial growth factor) 치료제 사용 시 심각한 HCP 관련 염증 반응이 발생할 수 있으나, 오리지널 라니비주맙 및 바이오시밀러(예: SB11/Byooviz)에 대한 대규모 사후 임상 분석 결과, 전반적인 ADA 발생률은 낮은 것으로 나타났음. 이러한 저수준의 ADA가 검출되더라도, 대부분의 환자에서 시력 개선 효과 감소나 중대한 안전성 문제와 결정적으로 연관된 것으로 확인되지는 않았음(Bressler 등, 2023).

예시-3) 염증 유발 및 약효 감소

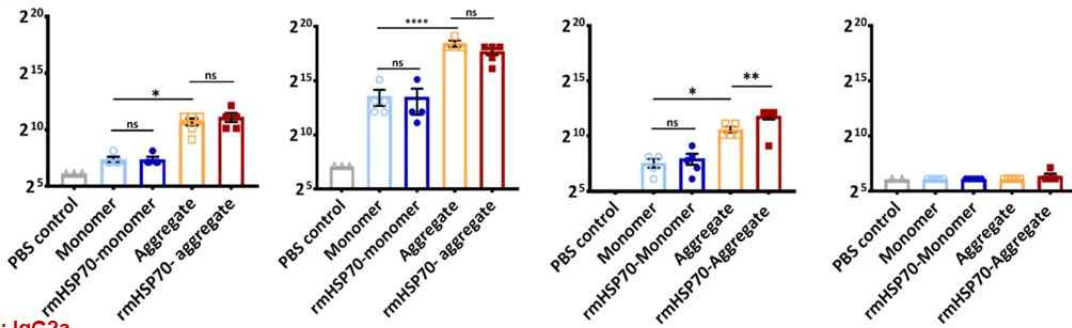
- 비특이적으로 활성화된 면역 세포들(T 세포, B 세포 등)은 염증성 사이토카인을 분비하여 주사 부위나 전신에 염증을 유발함. 또한, 생성된 중화 항체가 API와 결합해 약물을 빠르게 제거하거나 표적 결합을 방해함으로써 최종적인 약물의 치료 효과를 급격히 저하시킴 (Zonneveld-Huijssoon 등, 2013)

<표> 열충격 단백질 불순물이 생물치료용 단클론 항체의 면역원성에 미치는 영향

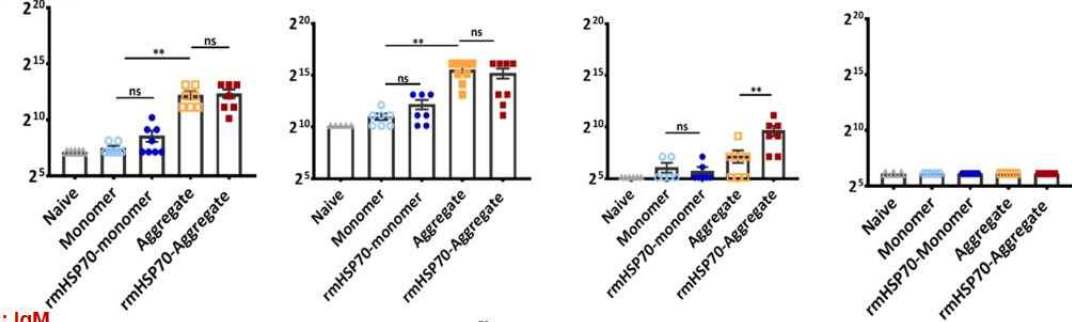
항목	내용
연구 내용	열충격 단백질 불순물이 생물치료용 단클론 항체의 면역원성에 미치는 영향(Rane 등, 2019).
mAb	인간 IgG1 mAb, mAb1과 mAb2
HCP impurities	재조합 마우스 열충격 단백질 70(rmHSP70)
방법	열 및 흔들림 스트레스 방법을 사용하여 두 개의 인간 mAb에서 서브마이크론 크기의 응집체를 생성했으며, BALB/c 마우스에서 복막 내 노출을 통해 면역원성을 평가
결과	<ul style="list-style-type: none"> • 결과는 응집체에 의한 면역 반응의 Th1 왜곡을 나타내며, 생쥐 rmHSP70이 mAb 응집체에 대한 면역 반응을 선택적으로 조절하지만 단량체는 조절하지 않음을 보여줌. 이 데이터는 열충격 단백질 불순물이 mAb 응집체에 결합하여 선택적으로 축적되어 치료용 단백질에 대한 면역원 반응에 영향을 미칠 수 있음을 시사함. • 결론: 이 관찰은 DnaK/scFv에 관한 이전 연구를 확인하고 확장하며, HSP의 보조제 유사 효과가 특정 HSP/면역원 쌍에 특이적이지 않고 일반적임을 추가로 입증함. 그러나 HSP의 보조제 효과에 대한 정확한 기전은 현재 논쟁 중임. 따라서 어떤 HSP나 다른 HCP 범주가 이런 방식으로 작용할지, 그리고 만약 그렇다면 어떤 수준에서 작용할지 예측하기 어려움. 여기서는 HSP70을 HCP의 모범으로 사용했으나, 관찰 결과는 여러 HCP의 복합 혼합물이 생물치료용 mAb의 면역원성에 시너지 효과를 낼 가능성을 열어줌. 치료용 mAb의 인간 면역원성에 대한 함의는 판단하기 더 어려움. 우리는 이 효과의 본질을 조사하고 생명의약품 응집체의 면역원성에 어느 정도 기여하는지 규명하기 위해 추가 연구가 필요함. • 그러나 백신의 '면역증강제(Adjuvant)'처럼 국소적인 염증 환경을 조성하고 면역 반응의 신호 강도를 높일 것으로 확인됨.
<p><그림> Antibody responses to aggregated mAbs(집진된 mAb에 대한 항체 반응).(a) mAb1 열충격 유발 응집체 (b) mAb1 흔들리는 응력 유발 응집체 (c) mAb2 흔들리는 응력 유발 응력 응집체. BALB/c 마우스는 rmHSP70 첨가 여부와 관계없이 단량체 또는 응집 단백질 주사(i.p.)를 받았음. 마우스들은 7일차와 14일차에 부스터 주사를 맞았고, 21일째에 안락사되었음. 단량체, 응집면역 동물, PBS 면역 또는 순진한 음성 대조군 혈청 샘플의 혈청 샘플을 1% BSA/PBS 비율로 두 배 희석하여, ELISA가 단량체 코팅 플레이트와 비교하여 IgG, IgG1, IgG2a, IgM을 분석하였음. 데이터는 mAb1(n= 8)과 mAb2(n= 5)에 대한 두 개의 독립적인 실험을 대표함. 음성 대조군 마우스(나이프 또는</p>	

PBS)의 ELISA 역가는 단백질 면역군($p < 0.01$)보다 항상 낮았으며, 기호는 표시되지 않았음. 각 기질에 대해 모든 혈청군 간 항체 형성 역가 차이는 일방향 ANOVA를 사용해 분석하였음(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

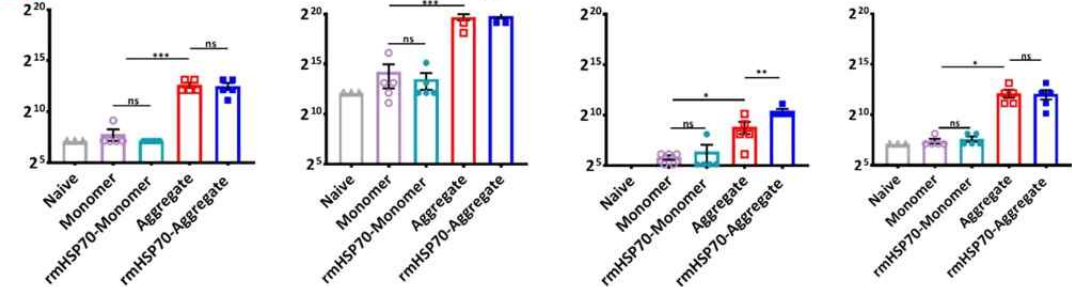
a: IgG1



b: IgG2a



c: IgM



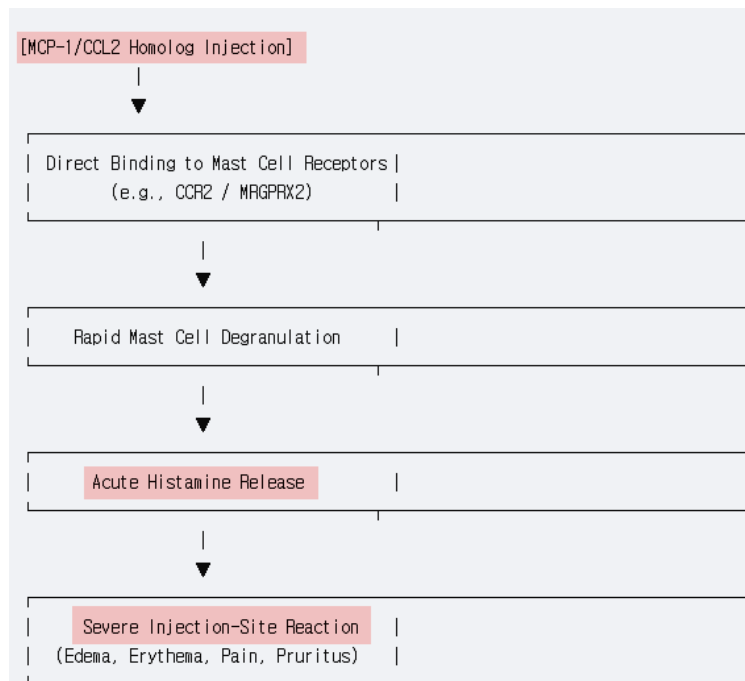
예시-4) 급성 부작용 및 독성- CCL2(단핵구 화학유인 단백질-1) 예시

① 특정 고위험 HCP(예: CHO 세포 유래 햄스터 MCP-1(CCL2, 단핵구 화학유인 단백질-1)는 인간 세포 수용체와 직접 반응하여 ① 히스타민 방출을 유도함으로써 부종, 발열, 근육통 및 ② 급성 아나필락시스성 주입 반응(Infusion reaction)과 같은 임상적 독성을 유발할 수 있음 (Jin 등, 2025; Salama 등, 2020; Kröner 등, 2026).

• 독성 기전

- 급성 및 전신 독성: 미량 수준에서도 CCL2와 같은 생물학적으로 활성화된 HCP는 강력한 화학유인제로 작용함. 이 잔류 케모카인은 단핵구, 기억 T세포, 자연 살해 세포의 빠른 모집을 촉발하여 갑작스럽고 예측 불가능한 염증 연쇄 반응을 일으킬 수 있음.
- 사이토카인 폭풍 및 혈관 투과성: 불순물은 1차 수용체(CCR2)에 결합하여 국소적 이거나 전신적인 대식세포 활성화를 유도함. 이로 인해 심각한 전신 고통, 저혈압, 사이토카인 방출 증후군이 발생함.

- ① 히스타민 방출 및 ② 주입 반응(Infusion reaction)의 수용체 및 증폭 경로(Salama 등, 2020; Jin 등, 2025; Panikulam 등, 2025;
 - **CCR2 의존성:** 구조적 동종체들은 종종 CCR2에 결합하며, 이 수용체는 비만세포의 특정 하위 집단에서 발현됨. .
 - 이 수용체를 차단하면 케모카인에 의해 유발되는 비만세포 탈과립이 직접적으로 억제됨.
 - **MRGPRX2 교차 작용:** 많은 고염기성 펩타이드 동종체나 케모카인과 유사하게 설계된 치료용 펩타이드가 의도치 않게 결합 조직의 비만세포에서 **MRGPRX2**(Mas 관련 G-단백질 결합 수용체 X2) 경로를 활성화시킴. 이러한 활성화는 즉각적이고 IgE와 무관한 유사 알레르기 반응을 유발함.
 - **염증 연쇄 반응:** 방출된 히스타민과 국소 사이토카인은 인접한 내피 세포와 섬유아세포에서 CCL2의 추가 생성을 촉진함. 이러한 일련의 과정은 주사 부위를 극도로 증폭된 급성 신경면역 루프에 갇히게 만듦



2-2. 생물학적 치료제의 효소적 분해(Enzymatic Degradation)

- 미량의 잔류 HCP, 특히 **단백분해효소(proteases)**와 **지방분해효소(lipases)**는 약물의 안정성에 큰 위협이 됨. 극미량이라도 이러한 활성 효소는 치료용 단백질(API)이나 필수 부형제의 효소적 분해를 유발하여 약물의 유통 기한과 효능을 저하시킬 수 있음. HCP에 의한 생물학적 치료제의 효소적 분해는 바이오의약품 산업에서 중대한 품질 문제를 야기함 (Yao 등, 2025).

1) Proteases

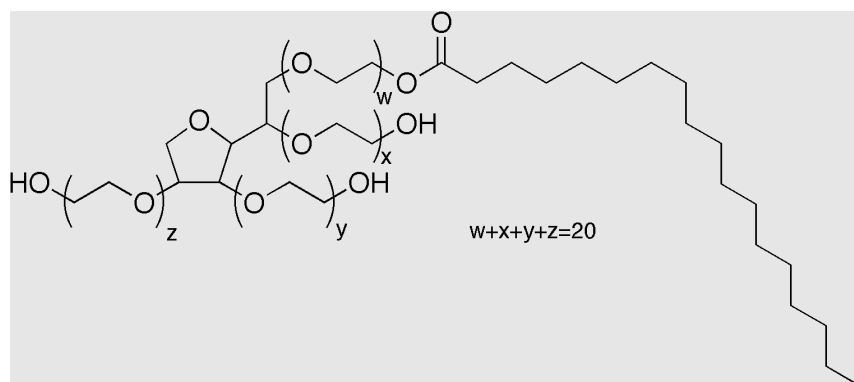
- 미량으로 존재하는 숙주 유래 프로테아제는 단일클론항체(mAb) 및 기타 치료용 단백질의 폴리펩티드 사슬을 절단하여 단편화를 유발하고 생물학적 효능을 상실시킬 수 있음 - 약물 분해 및 불안정성

① Proteases의 위험성

- 수천 가지에 달하는 잠재적 HCP 중에서도 **프로테아제**는 특히 위험함
 - **약물 분해**:미량의 프로테아제라도 활성 약물의 폴리펩티드 사슬을 선택적으로 절단하여, 약물의 생물학적 효능을 직접적으로 파괴할 수 있음(Zhang 등, 2021).
 - **제형 불안정성**:프로테아제와 에스테라제는 중요한 제형 완충액이나 부형제, 폴리소르베이트(**polysorbate**, PS20, PS80) 분해하여 약물의 응집을 유발할 수 있음.

<참고> Polysorbate(PS20, PS80 등)의 부형제로의 역할

- **단백질 응집 방지**: 유전자 재조합으로 생산된 항체 단백질은 외부 스트레스에 의해 변성되거나 뭉치기 쉬움. 폴리소르베이트(**PS20, PS80** 등)는 단백질 표면을 감싸 응집과 침전을 막아줌.
- **흡착 방지**: 약물이 유리나 플라스틱 용기 표면에 달라붙어 손실되는 것을 방지함.



<그림> **Polysorbate의 구조**: '폴리소르베이트' 부분 뒤에 오는 숫자는 분자와 관련된 주요 지방산의 종류와 관련이 있음. Monolaurate 모놀라우레이트는 20, monopalmitate모노팔미테이트는 40, monostearate는 60, monooleate 모놀레이트는 80으로 표시. 숫자는 분자 내에 존재하는 oxyethylene($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) 기의 총 수를 의미함.

② 구조적 손상 Structural Damage

- 활성 HCP 중 프로테아제는 효과적으로 제거되지 않으면, 원료의약품에 심각한 **구조적 손상**을 초래할 수 있음
 - **1차 절단:** Peptidase와 Protease는 단일클론항체(mAbs) 또는 치료용 단백질의 1차 구조를 분해함.
 - **2차/3차 구조 파괴:** 이러한 효소들은 펩티드 결합을 끊음으로써 약물의 구조가 풀리거나, 잘못 접히거나, 단편화되도록 하여 반감기와 치료 효능을 급격히 감소시킴

③ 카텝신(Cathepsins) 예시

- Cathepsins은 재조합 단백질 생산 과정에서 때때로 발현되어 배양액으로 방출되는 효소군(주로 lysosomal protease)(Hu 등, 2022; Xie 등 2023; Levy 등, 2014)
 - **잔류:** Cathepsins(like Cathepsin B and Cathepsin L)은 "제거하기 어려운" HCP로 알려져 있음. 분자적 특성상, 프로테인 A 크로마토그래피와 같은 정제 단계에서 표적 약물에 결합하여(예: mAb와 "동승") 함께 정제될 수 있음.
 - **단편화:** 최종 제형화된 의약품에 일단 존재하게 되면, 이들은 치료용 단백질의 단편화나 **구조 해체를 촉매할 수 있음**. 여러 연구를 통해 CHO Cathepsin B가 공학적으로 설계된 이중특이성 항체의 특정 단편화를 유발하는 protease임이 확인되었음.
- **독성 및 환자 안전성**
 - **면역원성:** 미량 수준의 잔류 HCP라도 유해한 면역 반응을 유발하여, 사이토카인 폭풍, 항약물 항체 형성 또는 장기적인 약물 내성 저하를 초래할 가능성이 있습니다.
 - **독성:** 일부 특정 HCP는 본질적으로 독성을 지닌 활성 신호 전달 분자나 사이토카인 역할을 하여, 환자의 신체에서 염증 경로를 유발할 수 있음.

2) Lipases (e.g., lipoprotein lipase, liver carboxylesterase)

① 역할

- 췌장에서 생성되어 췌장관을 통해 십이지장으로 분비되는 지방분해효소이며, 섭취된 중성지방을 지방산으로 분해하는 역할

② HCP 생성

- 바이오의약품 제조 과정에서, 숙주 세포 단백질(HCP) **Lipases** (e.g., lipoprotein lipase, liver carboxylesterase)는 다운스트림 정제 과정을 거치더라도 잔류하는 공정 관련 불순물임.

③ 주요 HCP lipase:

- CHO 숙주 세포의 lipoprotein lipase (LPL), lysosomal phospholipase A2 (LPLA2), and phospholipase B-like 2 (PLBL2)와 같은 효소가 함께 정제되는 것이 가장 문제임

(MacDonald 등, 2018; Xuanwen 등, 2021; Hecht 등, 2022).

④ Lipases 활성의 독성학적 기전

- **부형제 고갈(Excipient Depletion):** Polysorbate는 활성 제약 성분(API)을 안정화하는 데 필수적이지만, 리파제에 의한 가수분해로 인해 유리 지방산(FFA)과 반응성 알데히드/케톤으로 분해됨.
- **입자 형성(Particle Formation):** 유리 지방산은 수용성이 제한적이기 때문에 시간이 지남에 따라 축적되어 침전되며, 이로 인해 가시적 및 미세 입자가 발생함. 미량(ppm 미만) 수준에서도 Polysorbate 20 및 80과 같은 비이온성 계면활성제의 분해를 촉매하여, 응집 및 미세 입자 형성을 유발할 수 있음(Chiu 등, 2016; Aryal 등, 2024; ; Zhang 등, 2022).
- **단백질 불안정성 및 독성(Protein Instability & Toxicity):** 폴리소르베이트가 분해되면 유리 지방산이 방출됨. 이러한 지방산은 불용성 입자를 형성하여 궁극적으로 치료용 단일클론항체(mAb)의 안정성을 저해하고, 환자에게 면역원성 반응을 유발할 가능성이 있음

⑤ Lysosomal phospholipase A2 (LPLA2)의 독성 기전 이해

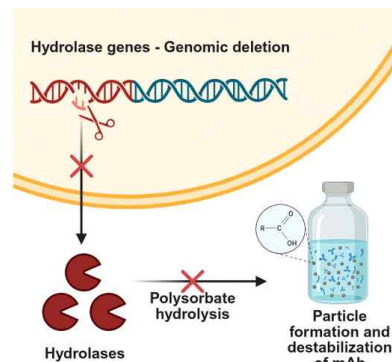
- 최종 의약품에 미량이라도 잔류할 경우, 비이온성 계면활성제(폴리소르베이트 등)를 분해하고 세포막을 손상시켜 약물의 안정성과 환자 안전 모두에 직접적인 영향을 미침. 독성 기전은 다음과 같음(Li 등, 2022; Jones 등, 2021)
- **계면활성제 분해(Surfactant Degradation):** 그룹 XV의 LPLA2) 또는 Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 (PPT1)을 포함한 잔류 lipase는 가수분해성 HCP로 작용함. 이들은 Polysorbate를 분해하여 유리 지방산을 방출하며, 이 지방산들은 축적되어 육안으로 확인되거나 미세한 입자를 형성함으로써 단일클론항체(mAbs)의 무결성과 효능을 저해함.
- **리소좀 독성 및 인지질증(Lysosomal Toxicity & Phospholipidosis):** LPLA2는 자연적으로 폐 표면활성제 인지질을 분해하며 세포 내 항상성을 조절함. 그러나 HCP를 통해 리소좀 내 LPLA2가 축적되거나 그 활성이 억제될 경우, 대규모 인지질 축적이 발생할 수 있음. 약물 유발성 인지질증(Drug-Induced Phospholipidosis, DIPL)으로 알려진 이러한 병리학적 반응은 거품 세포 형성, 리소좀 비대 및 세포 독성을 초래함(Hall 등, 2016).

문헌	핵심 내용
Hall 외, 2016	<ul style="list-style-type: none"> • CHO 세포에 의해 lysosomal phospholipase A2 (LPLA2) 분비된다는 사실이 밝혀졌음 • CHO 세포 유래 치료용 항체 약물에서 LPLA2의 존재가 Polysorbate 분해에 중요한 역할 • 세 가지 CHO 세포 유래 mAb 제품에서 약 1ppm <이하 수준인 LPLA2 단

	<p>백질을 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> Polysorbate 분해가 나타나지 않는 네 번째 mAb 제형에서는 LPLA2의 존재를 검출하지 못하였음. CHO 세포에서 LPLA2를 재조합 발현하여 정제 효소가 PS20과 PS80을 가수분해할 수 있음을 입증 LPLA2가 용액 내 자유 형태의 Polysorbate를 선호하는 반면, 미셀 형태의 폴리소르베이트는 LPLA2 매개 분해에 저항해야 한다는 것을 발견 LPLA2가 초저친화성 상호작용을 통해 항체의 CH1 도메인에 결합을 확인
--	--

⑥ 생물학적 제제 내 **Polysorbate(PS)**의 효소적 분해(Enzymatic degradation of polysorbates (PS) in biologic formulations)

- 목적:** 생물학적 제제 내 polysorbates(PS)의 효소적 분해는 종종 가수분해성 숙주 세포 단백질(HCP)에 의해 유발되며, 이는 입자 형성 및 유통 기한 단축으로 이어질 수 있음. 단일 CHO 숙주 세포주에서 가수분해효소 knockout을 결합함으로써 흔적도 없이 효소를 제거할 수 있었으며, 이는 PS 분해가 발생하지 않는 생물학적 제제 생산을 향한 큰 진전을 의미함(Weiß 등, 2025).



<그림> Hydrolase 유전자의 knockout를 통한 polysorbates 분해 방지 기전

- 방법 - 다중 가수분해효소 유전자 + 세포사멸 유도 유전자의 knockout CHO 숙주 세포 제작:** 본 연구에서는 이전에 **polysorbate**를 분해하는 것으로 확인된 9개의 CHO 숙주 세포 **가수분해효소**를 제거함으로써 개발된 숙주 세포 계통 공학 접근법을 제시됨. 두 개의 전체 유전자 클러스터를 유전적으로 제거하는 것을 포함하여 이러한 가수분해효소들에 대한 순차적 유전체 knockout을 수행한 결과, 생존 가능한 CHO 숙주 세포주 변이체가 생성됨. 이 새로운 숙주 세포주는 두 가지 주요 세포사멸 유도 유전자인 Bax와 Bak1을 추가로 knockout 유도과 더불어 더욱 최적화됨.
- 결과: 다중 가수분해효소 유전자 + 세포사멸 유도 유전자의 knockout CHO 숙주 세포 제작 후 polysorbate 분해 및 가수분해 활성이 획기적으로 감소함** <Figure 4>. 향후 **polysorbate** 분해가 발생하지 않는 생물학적 제제 제조 공정을 위한 길을 열었다. 이를 통해 경쟁력 있는 **다중 가수분해효소 knockout CHO 숙주 세포주**를 생성하였으며, 이 세포주가 재조합 치료용 IgG의 IgG1 및 IgG4 생산에 매우 적합함이 입증됨.

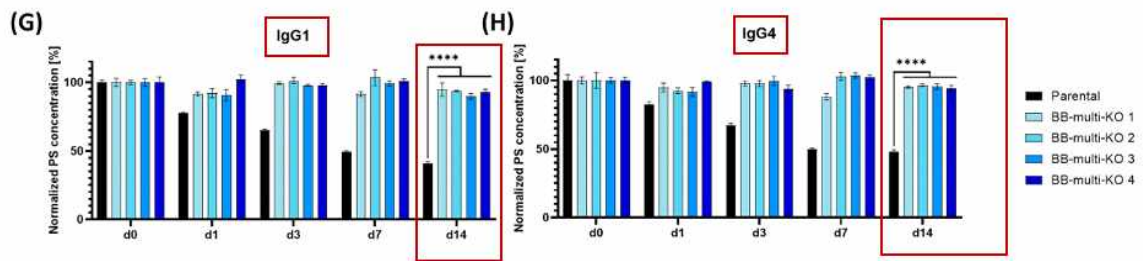


Figure 4. Comparative fed-batch cultivations of IgG1 and IgG4-producing cell pools originating from either the parental Chinese hamster ovary (CHO) host cell line or various Bcl-2-associated X protein (Bax)/Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak1) (BB)-multi-knockout (KO) clones.

⑦ HCP - Carboxylesterases (CES)

- 생물학적 제제 분야에서 **카르복실에스테라제**와 같은 숙주 세포 단백질(HCP)은 주요 과제로 대두됨.

A. 특성

- **카복실에스테라제(Carboxylesterases)** ester, thioester, amide, 및 carbamate을 각각 대응하는 alcohols and carboxylic acid으로 가수분해하는 데 촉매 작용을 하는 필수 세린 가수분해 효소(serine hydrolase). 카르복실에스테라제는 **지질 항상성**(콜레스테롤 에스테르 및 트리아실글리세롤 처리)을 조절
- 인간은 두 가지 주요 동소효소 – **CES1** 그리고 **CES2**
 - **CES1**: 주로 항인플루엔자제인 oseltamivir (Tamiflu)와 항혈소판제인 clopidogrel과 같은 약물의 가수분해에 관여. 또한 cocaine 대사에 관여
 - **CES2**: 주로 화학항암제 irinotecan과 같은 약물을 활성화하며, 소장에서 매우 많이 발현
 - **억제**: 카복실에스테라제 활성은 유기인산염(많은 농약 및 신경작용제, 예를 들어 사린)에 의해 돌이킬 수 없이 억제되어, 이 효소들은 독성학에서 중요한 생물학적 표적이 됨.

B. 생물학적 제제 분야에서 카르복실에스테라제에 의한 문제점

- 인체에 대한 독성보다는 이들의 주된 위험은 **부형제의 분해임**. 이러한 활성 효소는 **폴리소르베이트(PS-20 및 PS-80)**를 분해하여 **단백질 응집**, 입자 형성을 유발하고, 약물의 유효 기한을 심각하게 단축시킴

C. 주요 독성 및 안정성 문제

- 잔류 카르복실에스테라제는 세린 가수분해효소 계열에 속하며, 종종 단일클론항체(mAbs)와 함께 정제되며 구체적인 위험은 다음과 같음

- **부형제 분해:** 카르복실에스테라제는 치료용 단백질이 구조가 풀리거나 표면에 달라 붙는 것을 방지하는 필수 계면활성제인 폴리소르베이트를 가수분해함
- **미세 입자 형성:** 가수분해된 폴리소르베이트는 육안으로 보이지 않는 미세 입자를 생성하며, 이는 원치 않는 면역 반응을 유발하거나 투여 장치를 막을 수 있음
- **효능 저하:** 부형제의 분해는 응집을 유발하여, 활성 제약 성분(API)의 전반적인 효능과 유통 기한을 단축시킴.
- **간접적 면역원성:** 효소 자체는 대부분 ppm 미만의 수준으로 제거되지만, 생물학적 제제의 물리적 불안정성(응집체)으로 인해 환자가 ADA를 생성할 위험이 높아짐

D. 완화 조치 및 공정 관리

- 카르복실에스테라제는 20 ppm 미만의 농도에서도 높은 활성을 보일 수 있으므로, 철저한 추적 및 표적 제거가 필요
- **고도화된 검출:** 기업들은 ELISA를 통한 총 HCP 한계치에만 의존하는 대신, **액체 크로마토그래피-질량 분석법(LC-MS)** 및 활성 기반 단백질 프로파일링(ABPP)을 사용하여 특정 미량 효소를 식별하고 정량함.
- **세포주 공학:** 이러한 효소의 유입을 완전히 차단하기 위해, 개발자들은 현재 CRISPR/Cas9 유전체 공학을 활용하여 중국 햄스터 난소(CHO) 숙주 세포에서 카르복실에스테라제 및 기타 가수분해 유전자를 직접 삭제하고 있음. <예시> **CRISPR/Cas9 녹아웃:** 문제의 근원을 차단하기 위해, 상류 공정 엔지니어들은 유전체 편집(예: **LPL 또는 CES 녹아웃 CHO 세포** 생성)를 활용하여 이러한 문제 단백질의 발현을 완전히 차단
- **후공정 정제:** 공정 개발자들은 혼합 모드 크로마토그래피를 적용하고 완충액 특성을 조정하여, 정제 과정에서 이러한 "히치하이커" 단백질들이 성공적으로 제거되도록 보장함.

2-3. HCP와 표적 단백질의 응집(HCP and aggregation of target proteins)

1) 개념

- 표적 단백질의 분해와 분절 외에도, HCP는 단백질 응집(protein aggregation)을 유발할 수 있음. HCP는 단백질의 구조를 변화시켜 작은 크기의 dimer와 같은 용해성 응집체(soluble aggregates)나 다양한 크기의 불용성 가시성 입자(insoluble visible particles)를 형성할 수 있음. 작은 응집체는 면역원성 반응을 유발할 수 있고, 큰 입자는 면역원성 등 다양한 부작용을 일으킬 수 있음.
- 결합 HCP(BCP, Binding HCP)는 숙주 단백질체(host proteome)에서 가장 풍부한 단백질 중 하나로, 단백질의 올바른 접힘에 필수적임. 그러나 재조합 단백질 분자의 고수준 발현 중에는 이러한 결합 HCP 발현의 상향 조절이 표적 단백질의 세포 내 응집을 악화시킬 수 있으며, 특히 재조합 단백질 분자가 불완전하거나 잘못 접혀 응집이 일어날 경우 더욱 악화시킴.

2) HCP가 응집을 유발하는 방식

- HCP는 다음과 같은 몇 가지 뚜렷한 기전을 통해 단일클론항체(mAb) 및 기타 생물학적

제제의 응집을 유발하거나 가속화함(Yao 등, 2025; Oh 등, 2023; Herman 등, 2023; Muhoza 등, 2022).

- **효소적 분해(Enzymatic Degradation):** 많은 HCP는 표적 단백질을 단편으로 분해하는 프로테아제나 효소임. 이렇게 잘린 단편들은 노출된 소수성 영역을 가지고 있어, 쉽게 자가 결합하거나 온전한 표적 분자와 상호작용하여 용해성 응집체와 육안으로 확인 가능한 입자를 형성함.
- **공동 침전 및 흡착(Co-Precipitation and Adsorption):** HCP는 표적 단백질과 고분자량 복합체를 형성할 수 있음. 이 불순물들은 표적 단백질과 유사한 물리화학적 특성(소수성 및 등전점 등)을 공유하기 때문에, 핵 또는 핵형성 부위 역할을 하여 표적 단백질이 천연 상태에서 응집 상태로 전환되는 과정을 가속화할 수 있음.
- **정전기적 및 소수성 브리징(Electrostatic and Hydrophobic Bridging):** 특정 HCP (예: chaperones)는 본래 펼쳐지거나 잘못 접힌 단백질에 결합하도록 설계된 접착성 도메인을 가지고 있음. 이러한 상호작용은 표적 단백질을 부분적으로 펼쳐진 구조에 가두어 응집(aggregate)을 유발할 수 있음.

3) 단백질 응집의 예시 - 트리아실글리세롤 리파아제(Triacylglycerol lipase)

- 치료 단백질의 제형에서는 보통 조제의 안정성을 높이기 위해 첨가제가 첨가됨. 그러나 일부 첨가 분자의 분해 생성물은 표적 단백질 분자를 불안정하게 하여 단백질 응집을 일으킬 수 있음
- 소량의 트리아실글리세롤 리파아제는 제형 내 안정화제인 계면활성제 폴리소르베이트 80(PS80)의 에스터 결합을 가수분해하여 지방산과 PS85를 생성할 수 있음. 이 두 분해 생성물은 소수성 상호작용을 통해 표적 단백질 분자와 결합하여 가시적인 입자를 형성할 수 있으며 작용 기전은 다음과 같음(Creative proteomics, 2026; BenchChem Technical Support Team, 2026).

- ① **폴리소르베이트 80 분해:** 미량 잔존하는 트리아실글리세롤 리파아제가 계면활성제인 PS80의 에스테르 결합을 가수분해함.
- ② **불용성 입자 생성:** 분해 결과로 자유 지방산(Free Fatty Acid)이 생성됨.
- ③ **단백질 응집 촉진:** 생성된 소수성 지방산이 단백질과 상호작용하여 단백질의 3차 구조 변성을 일으키고, 결국 단백질이 뭉쳐 응집체를 형성하게 됨.

3. HCP 불순물의 허용한계(Acceptable limits)

- **규제의 한계:** 법적으로 고정된 단일 기준은 없으며, 약물의 종류, 투여량, 투여 빈도, 질환의 중증도에 따라 개별적으로 허용한계가 설정됨. 글로벌 규제 기관 및 약전(USP, EP 등)에서 일반적으로 통용되는 HCP 불순물 허용한계 및 가이드라인은 다음과 같음.

3-1. 일반적인 허용 기준 (단위: ppm 또는 %)

- ① **HCP 산출 공식:** 최종 약물 단백질 1 mg당 남아있는 HCP의 양(ng)을 나타내는 ppm(ng/mg) 단위로 주로 표기함. HCP 농도를 측정하는 공식은 다음과 같음(Yao 등, 2025).

$$\text{HCP(ppm)} = \left(\frac{\text{HCP Mass}}{\text{Total Drug Mass}} \right) \times 1,000,000$$

- ② **Acceptable Limits & Industry Guidelines:** 일반적으로 최종 의약품 내 총 HCP 수치(total HCP Levels) HCP 농도가 **1 ~ 100 ppm (또는 0.01% 이하)** 수준으로 엄격하게 제어할 것을 요구하고 있음(Guo 등, 2023; Madsen 등, 2015). 또한 일반적으로 FDA 및 EMA 승인을 받은 대부분의 단일클론 항체 및 재조합 단백질의 경우에 **<100 ppm로 요구됨**

- ③ **세포주(Host cell)별 기준:**

- **CHO-세포 유래 의약품:** 통상적으로 < 500 ppm
- **대장균(E. coli) 유래 의약품:** 통상적으로 < 100 ppm
- **효모(Yeast) 유래 의약품:** < 0.1% (EP 2.6.34 기준)

3-2. 허용한계가 달라지는 주요 요인 (Risk Assessment)

- 단순한 '총 HCP 농도 외에도 위험성 평가를 통해 기준이 구체화됨.
- **투여 용량 및 주기:** 투여량이 많고 주기적으로 장기 투여해야 하는 약물일수록(예: 자가면역질환 항체 치료제), 일회성 투여 약물보다 허용한계가 훨씬 낮아짐.
- **면역원성 및 독성:** 체내에서 염증을 유발하거나 면역 반응을 일으킬 위험이 높은 특정 HCP(예: Protease 등의 효소 활성을 띠는 단백질)는 극미량만 남아있어도 허용되지 않음.
- **치료용 백신:** 백신의 허용한계는 때때로 더 높을 수 있으나, 유럽의약품청(EMA)은 백신 투여 용량당 HCP 함량을 최대 400 ng으로 제한(Guo 등, 2023).

3-3. 주요 규제 가이드라인

- **FDA(미국식품의약국):** 고감도 분석법(주로 ELISA 등)을 사용했을 때 HCP가 **검출 한계(detectible levels) 미만**으로 제거될 것을 기대하며, 위험도 평가 및 공정 검증 데이터를 품목허가 시 요구함

- **USP <1132> 및 <1132.1>**: 의약품 중 잔류 HCP 측정에 대한 가이드라인으로, 기존 ELISA법의 한계를 보완하기 위해 질량분석법(Mass Spectrometry)을 도입해 특정 단백질 성분을 모니터링할 것을 강조하고 있음.

4. 현재의 완화 전략

4-1. 유전자 변형

- 게놈 편집을 활용하여 “깨끗한” 숙주 세포주를 만드는 방향으로 전환되고 있음. 예를 들어, CRISPR 및 TALEN 기술을 사용하여 CHO 세포 내의 특정 가수분해 효소(예: LPL)를 Knockout함으로써, 표면활성제의 분해를 근원적으로 차단함(Weiß 등 2025; Chiu 등, 2017).

4-2. 표적 억제

- 초기 제형 개발 단계에서 화학 억제제를 사용하여 문제가 되는 리파아제를 식별하고, 제품 분해를 유발하는 구체적인 기전을 평가할 수 있음(Li 등, 2022; Roy 등, 2021)

4-3. 고도화된 모니터링

- 리파제는 백만 분의 1 미만의 농도에서도 활성을 나타내기 때문에, 표준 분석 도구로는 이를 검출하기 어려움. 제조사들은 고감도 LC-MS/MS-MRM 분석법을 활용하여 간 카르복실에스테라제(CES) 및 지단백 리파제와 같은 미량 효소를 정량함(SY 등, 2023).

4-4. In silico 면역원성 예측

- **ISPRI-HCP** (Interactive Screening and Protein Reengineering Interface for Host Cell Proteins): (HSP를 위한 상호작용성 스크리닝 및 단백질 재설계 인터페이스)

1) 개발 목적

- EpiMatrix®와 JanusMatrix™는 미국의 면역정보학(Immunoinformatics) 전문 기업인 EpiVax가 개발한 핵심 In silico 면역원성 예측 알고리즘. 바이오의약품(단클론 항체, 펩타이드 치료제 등) 및 백신 개발 과정에서 T세포가 해당 단백질을 어떻게 인식하는지 분석하여 면역 부작용 위험을 평가하거나 면역 반응을 극대화하는 데 사용됨(De Groot 등, 2020; Mattei 등, 2024; Haltaufderhyde 등 2024; He 등, 2014; Moise 등, 2013; Haltaufderhyde 등, 2023).
- 두 도구는 상호보완적으로 작동하며, 의약품 스크리닝 플랫폼인 [ISPRI](#) 및 백신 설계 플랫폼인 [iVAX](#)의 핵심 축을 담당함.

2) 방법

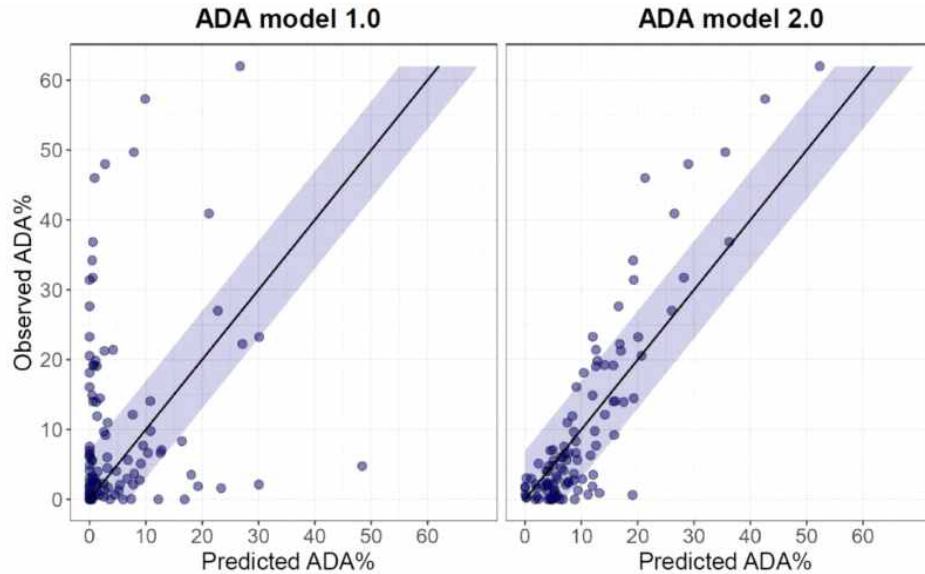
① EpiMatrix Score - T세포 에피토프 발굴 (위험 및 활성 평가)

- EpiMatrix는 주어진 단백질 서열 내에서 주요조직적합성복합체(MHC/HLA) 분자에 결합할 수 있는 T세포 에피토프(T cell epitope)를 예측하는 행렬 기반 알고리즘

- **기능:** 단백질 서열을 아미노산 9개 단위(9-mer)로 쪼개어 인구 집단에 널리 퍼져 있는 다양한 HLA 대립유전자와의 결합력을 점수화함.
- **점수 산정:** 점수 범위는 약 -50에서 +50까
- **안전성 기준치 및 점수 해석:** EpiMatrix 점수가 높을수록 T세포 에피토프 밀도가 높다는 것을 뜻함. 백신 개발 시에는 점수가 높은 물질이 유리하지만, 바이오의약품(단백질 치료제) 개발 시에는 항의약품 항체(Antidrug antibody, ADA)를 유발할 수 있어 면역원성 위험이 높음을 의미함
 - **저위험:** 에피매트릭스 점수가 20 미만(안전성 기준치)
 - **고위험:** 에피매트릭스 점수가 20점 이상.

② JanusMatrix Score

- JanusMatrix는 EpiMatrix의 확장형 도구로, 발굴된 에피토프(epitope)가 **인간 유전체(자가 단백질)와 얼마나 닮았는지(인간 상동성, Human Homology) 분석함**. T세포 수용체(TCR)와 접촉하는 아미노산 부위를 집중적으로 비교하는 것이 특징임.
 - **기능:** Epitope의 두 얼굴(MHC 결합면과 TCR 인식면) 중 **TCR을 향하는 면의 서열**이 인간 체내 단백질과 일치하는지 찾아냄.
 - **점수 산정:** 점수는 일반적으로 0에서 10 이상까지임.
 - **점수 해석:** JanusMatrix 점수가 일반적으로 3 이상으로 높을수록 인간 유전체 서열과 널리 교차 보존되어 있음을 뜻함. 인체는 자가 단백질을 공격하지 않으므로, 이 점수가 높은 부위는 면역 반응을 억제하는 **조절 T세포(Treg)를 자극하여 '면역 관용(Tolerance)'을 유도할 확률이 높음**. 즉, 해당 단백질이 자연적인 인간 단백질과 유사하여 면역 체계가 이를 무시할 가능성이 높음을 의미. 반면에 JanusMatrix 점수가 **3 미만**인 경우 고위험군으로 이는 해당 단백질이 "이물질"로 인식되어 공격받을 가능성이 높음을 의미함.
 - 최근에는 인공지능(AI)과 머신러닝 기법이 결합된 JanusMatrix 2.0 버전 등이 도입되면서 임상 단계에서의 항의약품항체(ADA) 예측 정확도가 62.7%에서 87.3%까지 대폭 향상되어 신약 개발의 시행착오를 줄이는 데 적극적으로 활용되고 있음 (Elena, 2025).



3) 두 알고리즘의 상호작용 - HCP 위험 평가를 위한 사분면 도표(Quadrant Plot)

- FDA의 의약품 심사관들은 "사분면 도표"에 두 점수를 결합하여 HCP 불순물의 위험도를 분류함(FDA-CDER. 2023; De Groot 등, 2025).
- 두 알고리즘의 상호작용 (사분면 분석): 바이오의약품의 초기 개발 단계([ISPRI Platform](#))에서는 두 도구의 점수를 조합하여 후보 물질의 안전성을 아래와 같이 스크리닝함(De Groot 등, 2025; Elena lemma, 2025)

구분	낮은 JanusMatrix 점수(< 3): 인간과 안 닮음	높은 JanusMatrix 점수(> 3): 인간과 닮음
높은 EpiMatrix 점수(> 20) (MHC 결합력 강함)	[위험] 강력한 이물질로 인식되어 면역 부작용(ADA 형성)을 일으킬 확률이 매 우 높음.	[관용/안전] T 세포 반응성은 높으나 자가 단백질로 인식되어 면역계가 관 용을 베풀 가능성이 높음.
낮은 EpiMatrix 점수(< 20) (MHC 결합력 약함)	면역계에 노출되어도 T 세포를 자 극할 에피토프 자체가 적어 면역원 성 위험이 낮음.	면역 반응 자체가 거의 일어나지 않는 비면역원성 영역.

- 일반적으로 평가되는 143가지 CHO세포 불순물의 전체 목록과 각 점수를 확인하려면 [FDA DeGroot 연례 보고서](#)를 다운로드(FDA-CDER. U01FD007760, 2023).

4) Quadrant Plot의 예시- EpiMatrix Score JanusMatrix Score(FDA-CDER. U01FD007760, 2023)

Protein Label	Label	Length	Group	EpiMatrix Score	JanusMatrix Score	UniProt Link
Phospholipase B-like 2	PLBL2	585	High Risk Group (EMX $\geq$ 20 & JMX<3)	37.12	2	https://www.uniprot.org/uniprot/G316T1
Lysosomal protective protein	CTSA	475	High Risk Group (EMX $\geq$ 20 & JMX<3)	33.93	1.93	https://www.uniprot.org/uniprot/G3H8V5
GTP-binding nuclear protein	RAN	216	Intermediate Risk (EMX>10 & <20 & JMX<3)	13.46	1.74	https://www.uniprot.org/uniprot/G3IH55

Phospholipase D3	PLD3	488	Intermediate Risk (EMX>10 & <20 & JMX>3)	12.23	7.05	https://www.uniprot.org/uniprot/G3H5NQ5
Lysosomal Phospholipase A2	LPLA2	412	Intermediate Risk (EMX>10 & <20 & JMX<3)	11.89	2.44	https://www.uniprot.org/uniprot/G3HKV9
Nucleobindin-2	NUCB2	420	Low Risk (EMX<0)	-45.32	2.23	https://www.uniprot.org/uniprot/G3IF52

Benchmark proteins

Protein Label	Gene	Length	EpiMatrix Score	JanusMatrix Score	Organism	Benchmark Quadrant
Interferon alpha-2	INFA2	165	53.1	5.85	Human	QI
Erythropoietin	EPO	166	47.86	3.63	Human	QI
Thrombopoietin	THPO	332	46.5	5.07	Human	QI
Phospholipase B-like 2	PLBL2	585	37.12	2	Chinese hamster	QII
Uracil-DNA glycosylase	UNG	255	33.37	1.81	Epstein-Barr virus	QII
Tetanus toxin	tetX	1315	23.72	0.75	Clostridium tetani	QII
Hemagglutinin	HA	566	20.08	1.33	Influenza A virus	QII
Fibrinogen Alpha	FGA	831	-48.09	1.8	Human	QIII
Beta-2-microglobulin	B2M	99	-56.13	1.43	Human	QIII

Immunoglobulin heavy constant gamma 1	IGHG1	399	7.04	3.81	Human	QIV
Albumin	ALB	585	-33.08	3.05	Human	QIV
Actin cytoplasmic 1	ACTB	375	-34.68	10.45	Chinese hamster	QIV

5) 임상 사고 및 증례 보고서

- HCP가 EpiMatrix 점수가 높고 JanusMatrix 점수(외부 서열)가 낮을 경우, 임상적 실패의 심각한 위험이 있음(Haltaufderhyde 등, 2023)
 - 역사적 실패:** 포스폴리파제 B-유사 2 (PLBL2)단클론 항체 치료에서 흔히 발생하는 불순물임. PLBL2는 레브리키주맵과 같은 약물의 임상시험에서 예상치 못한 ADA와 같은 면역 반응 유도(Haltaufderhyde 등, 2022).
 - 바이러스 단백질:** 유사한 문제는 바이러스 벡터 백신에서도 발생하며, 숙주 단백질이 교차 반응하거나 원치 않는 안전 신호를 유발함(Haltaufderhyde 등, 2022).
 - 규제 관점:** FDA는 불순물이 제거되었는지 확인하기 위해 이 점수를 검토하며, 안전 사고가 발생하기 전에 예방하는 것을 목표로 이용함(FDA-CDER. 2023; Coye 등, 2025).

<참고문헌>

De Groot, A.S., Mattei, A., Gabriel, B. *et al.* Immunogenicity of Generic Peptide Impurities: Current Orthogonal Approaches. *Pharm Res* 42, 805–818 (2025).

FDA-CDER. U01FD007760. ISPRI-HCP: CHO protein impurity immunogenicity risk prediction for improving biosimilar product development and assessing product interchangeability. Year 1 Progress Report. PI: De Groot, AS. 2023.

Elena Iemma. FDA Roadmap to Reducing Animal Testing: A Step Toward Smarter Tools for in silico Immunogenicity Risk Assessment. 2025. EpiVax

Coye L, Jones MA, Gaza-Bulseco G, Chitikila C, Clavier S, Fougeron D, Grimaldi C, Hurkmans K, Hutchinson R, Kellogg B, Liu X, Palackal N, Tank M, Valax P, Waerner T, Wang F, Zhang Y, Zhao Y, Sloan S, de Zafra CZ. Host Cell Protein Clinical Safety Risk Assessment-An Updated Industry Review. *Biotechnol Bioeng*. 2025 Nov;122(11):3229-3248.

Haltaufderhyde K., Roberts B., Terry F., Boyle C., William W. M., De Groot A. (2023) Comprehensive assessment of immunogenicity risk of host cell proteins in biologics using in silico and in vitro methods. BioPharmaceutical Emerging Best Practices Association (BEBPA) HCP Conference. Oral Presentation. Dubrovnik, Croatia.

Haltaufderhyde, Kirk & Roberts, Brian & Khan, Sundos & Terry, Frances & Boyle, Christine & McAllister, Mitchell & Martin, William & Rosenberg, Amy & De Groot, Anne. (2023). Immunoinformatic Risk Assessment of Host Cell Proteins During Process Development for Biologic Therapeutics. *The AAPS Journal*. 25. 10.1208/s12248-023-00852-z.

Kirk Haltaufderhyde et al., Comprehensive Assessment of Immunogenicity Risk of Host Cell Proteins in Biologics Using In Silico and In Vitro Methods. AAPS National Biotechnology CONFERENCE. 2023.

He, Lu & De Groot, Anne & Gutierrez, Andres & Martin, William & Moise, Leonard & Bailey-Kellogg, Chris. (2014). Integrated assessment of predicted MHC binding and cross-conservation with self reveals patterns of viral camouflage. *BMC bioinformatics*. 15. S1. 10.1186/1471-2105-15-S4-S1.

Alhuthali, S., Pauzi, S.M. & Kontoravdi, C. Host cell protein impurities in therapeutic proteins: overview of advances in detection, nonconventional removal technologies and immunogenicity assessment. *J Biol Eng* 20, 106 (2026).

Yao Y, Wen X, Pan H and Chen Z (2025) Residual host cell proteins: sources, properties, detection methods and data acquisition modes. *Front. Microbiol*. 16:1658366.

Graham, J., S. S. Anand, J. Bercu, et al. 2026. "Assessment and Control of Host Cell Proteins in Biologics: Survey of Industry Practices and a Vision for Harmonization." *Biotechnology and Bioengineering* 123: 1050–1063.

Frank Liu, Safety assessment of antibody-drug conjugates: Nonclinical toxicology, non-active ingredients, and environmental risk considerations, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 215, 2025, 104865, ISSN 1040-8428.

Sadiqua Shadbar, Sathy V Balu-Iyer, Jared Auclair, Daniel Dadon, Immunogenicity risk mitigation of therapeutic proteins with translational immunogenicity, analytical characterization, and regulatory insight, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 114, Issue 11, 2025, 103870, ISSN 0022-3549.

Yanxin Luo, Chandra Sekhar, Hans Lee, Kiyoshi Fujimori, Michael Ronk, David Semin, Yasser Nashed-Samuel, A Risk-Based Approach to Evaluate and Control Elemental Impurities in Therapeutic Proteins, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 109, Issue 11, 2020, Pages

3378-3385, ISSN 0022-3549.

ICH Addendum to M7(R2). APPLICATION OF THE PRINCIPLES OF THE ICH M7 GUIDELINE TO CALCULATION OF COMPOUND-SPECIFIC ACCEPTABLE INTAKES

CIIT(The Chemical Industry Institute of Toxicology). 1982. 104-week chronic toxicity study in rats with aniline hydrochloride. Final report. Report prepared for CIIT by Hazleton Laboratories America, Inc. CIIT Docket No. 11642. CIIT, Research Triangle Park, NC.

IARC. Overall evaluation of carcinogenicity: An update of IARC monographs volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1987. Addendum 7: pp 99 and 362.

Wester PW, van der Heijden CA, et al. Carcinogenicity study with epichlorohydrin (CEP) by gavage in rats. Toxicology 1985;36:325-39.

FDA M7(R2) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk Guidance for Industry. 2023

International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents.

ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. 2015.

Catrin Hasselgren, Joel Bercu, Alex Cayley, Kevin Cross, Susanne Glowienke, Naomi Kruhlak, Wolfgang Muster, John Nicolette, M. Vijayaraj Reddy, Roustem Saiakhov, Krista Dobo, Management of pharmaceutical ICH M7 (Q)SAR predictions – The impact of model updates, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 118, 2020, 104807, ISSN 0273-2300.

IntuitionLabs. ICH M7: A Guide to Mutagenic Impurity Assessment Software. 2025

David P. Elder, Angela White, James Harvey, Andrew Teasdale, Richard Williams, and Elizabeth Covey-Crump. Mutagenic Impurities: Precompetitive/Competitive Collaborative and Data Sharing Initiatives. Organic Process Research & Development 2015 19 (11), 1486-1494.

Lewis, Jason R. Antibody-Drug Conjugates: Understanding Associated Drug Design and Pharmacology. AMWA Journal: American Medical Writers Association Journal, 2023, v. 38, n. 2, p. 28.

Frank Liu, Safety assessment of antibody-drug conjugates: Nonclinical toxicology, non-active ingredients, and environmental risk considerations, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 215, 2025, 104865, ISSN 1040-8428.

Warad T.A Bhusnure O.G, GholveS.B.. Impurity Profile of Pharmaceuticals Ingredient: A Review/ Journal of Pharmacy Research 2016,10(7),523-533.

Sherin Panikulam, Hannah Morgan, Michael Gutknecht, Thomas K. Villiger, Nicolas Lebesgue, Anette C. Karle, Host cell protein-mediated adjuvanticity and immunogenicity risks of biotherapeutics, Biotechnology Advances, Volume 81, 2025, 108575, ISSN 0734-9750.

Panikulam, S., H. Morgan, M. Gutknecht, et al. 2025. "Assessing the Adjuvant Potential of Chinese Hamster Ovary Host Cell Proteins Using an In Vitro Dendritic Cell Assay." Biotechnology and Bioengineering 122:1105–1117.

Rane SS, Dearman RJ, Kimber I, Uddin S, Bishop S, Shah M, Podmore A, Pluen A, Derrick JP.

Impact of a Heat Shock Protein Impurity on the Immunogenicity of Biotherapeutic Monoclonal Antibodies. Pharm Res. 2019 Feb 15;36(4):51.

Vibha Jawa. Host Cell Protein Related Immunogenicity Risk Assessment Strategies. USP Biologics Stakeholder Forum. June 18, 2025

Vanderlaan, M., Zhu-Shimoni, J., Lin, S., Gunawan, F., Waerner, T. and Van Cott, K.E. (2018), Experience with host cell protein impurities in biopharmaceuticals. Biotechnol Progress, 34: 828-837.

Coye L, Jones MA, Gaza-Bulseco G, Chitikila C, Clavier S, Fougeron D, Grimaldi C, Hurkmans K, Hutchinson R, Kellogg B, Liu X, Palackal N, Tank M, Valax P, Waerner T, Wang F, Zhang Y, Zhao Y, Sloan S, de Zafra CZ. Host Cell Protein Clinical Safety Risk Assessment-An Updated Industry Review. Biotechnol Bioeng. 2025 Nov;122(11):3229-3248.

Holistic Analytical Characterization and Risk Assessment of Residual Host Cell Protein Impurities in an Active Pharmaceutical Ingredient (API) Synthesized by Biocatalysts

Wang, F et al., 2022). Holistic analytical characterization and risk assessment of residual host cell protein impurities in an active pharmaceutical ingredient synthesized by biocatalysts. Biotechnology and Bioengineering, 119, 2088–2104. <https://doi.org/10.1002/bit.28112>

SK Fischer, Cheu M, Peng K, Lowe J, Araujo J, Murray E, McClintock D, Matthews J, Siguenza P, Song A. Specific Immune Response to Phospholipase B-Like 2 Protein, a Host Cell Impurity in Lebrikizumab Clinical Material. AAPS J. 2017 Jan;19(1):254-263.

Zonneveld-Huijssoon E, Albani S, Prakken BJ, van Wijk F. Heat shock protein bystander antigens for peptide immunotherapy in autoimmune disease. Clin Exp Immunol. 2013 Jan;171(1):20-9.

Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death and bystander killing: expanding the therapeutic potential of modern antibody-drug conjugates. Oncoimmunology. 2025 Dec;14(1):2533488.

Romer, T., F. Peter, P. Saenger, et al. 2007. "Efficacy and Safety of a New Ready-To-Use Recombinant Human Growth Hormone Solution." *Journal of Endocrinological Investigation* 30, no. 7: 578–589.

Kyohei Yasuno, Eri Hamamura-Yasuno, Daisuke Nishimiya, Masako Soma, Masako Imaoka, Kiyonori Kai, Kazuhiko Mori, Host cell proteins induce inflammation and immunogenicity as adjuvants in an integrated analysis of in vivo and in vitro assay systems, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Volume 103, 2020, 106694, ISSN 1056-8719.

Sherin Panikulam, Hannah Morgan, Michael Gutknecht, Thomas K. Villiger, Nicolas Lebesgue, Anette C. Karle, Host cell protein-mediated adjuvant activity and immunogenicity risks of biotherapeutics, Biotechnology Advances, Volume 81, 2025, 108575, ISSN 0734-9750.

Panikulam, S., H. Morgan, M. Gutknecht, et al. 2025. "Assessing the Adjuvant Potential of Chinese Hamster Ovary Host Cell Proteins Using an In Vitro Dendritic Cell Assay." Biotechnology and Bioengineering 122:1105–1117.

Bressler NM, Kim T, Oh I, Russo P, Kim MY, Woo SJ. Immunogenicity With Ranibizumab Biosimilar SB11 (Byooviz) and Reference Product Lucentis and Association With Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics: A Post Hoc Analysis of a Phase 3 Randomized Clinical Trial. JAMA Ophthalmol. 2023 Feb 1;141(2):117-127.

Rane SS, Dearman RJ, Kimber I, Uddin S, Bishop S, Shah M, Podmore A, Pluen A, Derrick JP. Impact of a Heat Shock Protein Impurity on the Immunogenicity of Biotherapeutic Monoclonal Antibodies. Pharm Res. 2019 Feb 15;36(4):51.

Ghosh AK, Nikumbh US, Shukla CK, Laul RS, Dixit A, Mahapatra SK, Nayak S, Shah UM, Parwal S, Venkatapathy N, Radhakrishnan N, Kelgaonkar A, Saxena S, Mishra D, Dave VP, Khan P, Saswade MR, Shantilal MS, Ramasamy K, Sreekanta S, Rajurkar M, Doshi M, Behera S, Patel P, Dhawan S, Lakhwani L. Efficacy, Safety and Immunogenicity of Sun's Ranibizumab Biosimilar in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Phase 3, Double-Blind Comparative Study. *Ophthalmol Ther*. 2024 May;13(5):1369-1382.

Yao Y, Wen X, Pan H, Chen Z. Residual host cell proteins: sources, properties, detection methods and data acquisition modes. *Front Microbiol*. 2025 Aug 18;16:1658366.

Jin Y, Wang Y and Yang R (2025) Chemokine ligand 2: beyond chemotaxis—a multifaceted role in tumor progression. *Front. Immunol*. 16:1685474.

Abouelasrar Salama, Sara, De Bondt, Mirre, Berghmans, Nele, Gouwy, Mieke, de Oliveira, Vivian Louise Soares, Oliveira, Sergio C., Amaral, Flavio A., Proost, Paul, Van Damme, Jo, Struyf, Sofie, De Buck, Mieke, Biological Characterization of Commercial Recombinantly Expressed Immunomodulating Proteins Contaminated with Bacterial Products in the Year 2020: The SAA3 Case, *Mediators of Inflammation*, 2020, 6087109, 17 pages, 2020.

Levy NE, Valente KN, Choe LH, Lee KH, Lenhoff AM. Identification and characterization of host cell protein product-associated impurities in monoclonal antibody bioprocessing. *Biotechnol Bioeng*. 2014 May;111(5):904-12.

Xie, Z., Zhao, M., Yan, C. *et al*. Cathepsin B in programmed cell death machinery: mechanisms of execution and regulatory pathways. *Cell Death Dis* 14, 255 (2023).

Hu L, Liu S, Xia L, Cong X, Xu C, Wang L, Li Y. CHO cathepsin B identified as the protease responsible for a target bispecific antibody fragmentation. *Protein Expr Purif*. 2022 Nov;199:106144.

Frieder Kröner, Critical HCPs: What to do with them? Volume 1, Issue 9. BEBPA Blog. 2026

Linus Weiß, Nikolas Zeh, Melanie Maier, Daniel Lakatos, Kerstin Otte, Simon Fischer, Without a trace: multiple knockout of CHO host cell hydrolases to prevent polysorbate degradation in biologics, *Trends in Biotechnology*, Volume 43, Issue 8, 2025, Pages 1982-2002, ISSN 0167-7799.

Creative proteomics. What are Host Cell Proteins and Its Effect on Biopharmaceutical Development. 2026.

BenchChem Technical Support Team. Host Cell Proteins in Biologics Development: A Technical Guide. BenchChem. 2026.

Oh YH, Becker ML, Mendola KM, Choe LH, Min L, Lee KH, Yigzaw Y, Seay A, Bill J, Li X, Roush DJ, Cramer SM, Menegatti S, Lenhoff AM. Characterization and implications of host-cell protein aggregates in biopharmaceutical processing. *Biotechnol Bioeng*. 2023 Apr;120(4):1068-1080.

Herman CE, Min L, Choe LH, Maurer RW, Xu X, Ghose S, Lee KH, Lenhoff AM. Behavior of host-cell-protein-rich aggregates in antibody capture and polishing chromatography. *J Chromatogr A*. 2023 Aug 2;1702:464081.

Bertrand Muhoza, Baokun Qi, Jean Damascene Harindintwali, Marwa Yagoub Farag Koko, Shuang Zhang, Yang Li, Combined plant protein modification and complex coacervation as a sustainable strategy to produce coacervates encapsulating bioactives, *Food Hydrocolloids*, Volume 124, Part B, 2022, 107239, ISSN 0268-005X.

Jones, M. , Palackal, N. , Wang, F. , Gaza-Bulsecu, G. , Hurkmans, K. , Zhao, Y. , Chitikila, C. , Clavier, S. , Liu, S. , Menesale, E. , Schonenbach, N. S. , Sharma, S. , Valax, P. , Waerner, T. , Zhang, L. , & Connolly, T. (2021). "High-risk" host cell proteins (HCPs): A multicompany

collaborative view. *Biotechnology Bioengineering*. 118, 2870–2885.

Ying Zhang, Jason C. Rouse. In-Depth Analysis of Host Cell Protein (HCP) Impurities by LC–MS/MS to Augment Routine HCP-ELISA Testing of Biotherapeutics. October 1, 2021. LCGC Supplements. Hot Topics in Mass Spectrometry. Volume 39. Issue s10

Xuanwen Li, Fengqiang Wang, Hong Li, Douglas D Richardson, David J Roush, The measurement and control of high-risk host cell proteins for polysorbate degradation in biologics formulation, *Antibody Therapeutics*, Volume 5, Issue 1, January 2022, Pages 42–54

Linus Weiß, Nikolas Zeh, Melanie Maier, Daniel Lakatos, Kerstin Otte, Simon Fischer, Without a trace: multiple knockout of CHO host cell hydrolases to prevent polysorbate degradation in biologics, *Trends in Biotechnology*, Volume 43, Issue 8, 2025, Pages 1982-2002, ISSN 0167-7799,

USP General Chapter <1132.1> Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals by Mass Spectrometry. United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2024.

Park JH, Jin JH, Ji IJ, An HJ, Kim JW, Lee GM. Proteomic analysis of host cell protein dynamics in the supernatant of Fc-fusion protein-producing CHO DG44 and DUKX-B11 cell lines in batch and fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2017;114(10):2267-2278.

Huang L., Ding X., Li Y., Ma H. (2019). The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid. *Food Chem*. 279, 114–119.

Yau T. Y., Sander W., Eidson C., Courey A. J. (2021). SUMO interacting motifs: structure and function. *Cells* 10:2825.

Nina TRZĘSICKA, Qualitative analysis of HCPs using mass spectrometry. MABION Biologics CDMO. SCIENCE HUB. 2025.

Yao Y, Wen X, Pan H, Chen Z. Residual host cell proteins: sources, properties, detection methods and data acquisition modes. *Front Microbiol*. 2025 Aug 18;16:1658366.

Jia Guo, Regina Kufer, Delia Li, Stefanie Wohlrab, Midori GreenwoodGoodwin & Feng Yang (2023) Technical advancement and practical considerations of LC-MS/MS-based methods for host cell protein identification and quantitation to support process development, *mAbs*, 15:1, 2213365,

Madsen JA, Farutin V, Carbeau T, Wudyka S, Yin Y, Smith S, Anderson J, Capila I. Toward the complete characterization of host cell proteins in biotherapeutics via affinity depletions, LC-MS/MS, and multivariate analysis. *MAbs*. 2015;7(6):1128-37.

MacDonald ML, Hamaker N, Lee KH. Bioinformatic analysis of Chinese hamster ovary host cell protein lipases. *AIChE J*. 2018 Dec;64(12):4247-4254.

Xuanwen Li, Douglas D. Richardson. Analysis of Trace-Level, High-Risk HCPs: Proteomics Advances for Preventing Degradation of Polysorbates in Biotherapeutic Formulations. October 1, 2021. milliporesigma (<https://www.emdmillipore.com>)

Hecht ES, Mehta S, Wecksler AT, Aguilar B, Swanson N, Phung W, Dubey Kelsoe A, Benner WH, Tesar D, Kelley RF, Sandoval W, Sreedhara A. Insights into ultra-low affinity lipase-antibody noncovalent complex binding mechanisms. *MABs*. 2022 Jan-Dec;14(1):2135183.

Yao Y, Wen X, Pan H, Chen Z. Residual host cell proteins: sources, properties, detection methods and data acquisition modes. *Front Microbiol*. 2025 Aug 18;16:1658366.

Li X, An Y, Liao J, Xiao L, Swanson M, Martinez-Fonts K, Pavon JA, Sherer EC, Jawa V, Wang F, Gao X, Letarte S, Richardson DD. Identification and characterization of a residual host cell protein

hexosaminidase B associated with N-glycan degradation during the stability study of a therapeutic recombinant monoclonal antibody product. *Biotechnol Prog.* 2021 May;37(3):e3128.

Chiu J, Valente KN, Levy NE, Min L, Lenhoff AM, Lee KH. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations. *Biotechnol Bioeng.* 2017 May;114(5):1006-1015.

Aryal, B., Lehtimäki, M. & Rao, V.A. Stress-mediated polysorbate 20 degradation and its potential impact on therapeutic proteins. *Pharm Res*41, 1217–1232 (2024).

Zhang S, Riccardi C, Kamen D, Reilly J, Mattila J, Bak H, Xiao H, Li N. Identification of the specific causes of polysorbate 20 degradation in monoclonal antibody formulations containing multiple lipases. *Pharm Res.* 2022 Jan;39(1):75-87.

Levy NE, Valente KN, Choe LH, Lee KH, Lenhoff AM. Identification and characterization of host cell protein product-associated impurities in monoclonal antibody bioprocessing. *Biotechnol Bioeng.* 2014 May;111(5):904-12.

Xie, Z., Zhao, M., Yan, C. *et al.* Cathepsin B in programmed cell death machinery: mechanisms of execution and regulatory pathways. *Cell Death Dis*14, 255 (2023).

Hu L, Liu S, Xia L, Cong X, Xu C, Wang L, Li Y. CHO cathepsin B identified as the protease responsible for a target bispecific antibody fragmentation. *Protein Expr Purif.* 2022 Nov;199:106144.

Frieder Kröner, Critical HCPs: What to do with them? Volume 1, Issue 9. BEBPA Blog. 2026

Moise L, Gutierrez AH, Bailey-Kellogg C, Terry F, Leng Q, Abdel Hady KM, VerBerkmoes NC, Szein MB, Losikoff PT, Martin WD, Rothman AL, De Groot AS. The two-faced T cell epitope: examining the host-microbe interface with JanusMatrix. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Jul;9(7):1577-86.

Haltaufderhyde, K., Roberts, B.J., Khan, S. *et al.* Immunoinformatic Risk Assessment of Host Cell Proteins During Process Development for Biologic Therapeutics. *AAPS J*25, 87 (2023).

Mattei, Aimee E., Andres H. Gutierrez, Soorya Seshadri, Jacob Tivin, Matt Ardito, Amy S. Rosenberg, William D. Martin, and Anne S. De Groot. 2024. "In Silico Methods for Immunogenicity Risk Assessment and Human Homology Screening for Therapeutic Antibodies." *mAbs* 16 (1).

De Groot AS, Moise L, Terry F, Gutierrez AH, Hindocha P, Richard G, Hoft DF, Ross TM, Noe AR, Takahashi Y, Kotraiah V, Silk SE, Nielsen CM, Minassian AM, Ashfield R, Ardito M, Draper SJ, Martin WD. Better Epitope Discovery, Precision Immune Engineering, and Accelerated Vaccine Design Using Immunoinformatics Tools. *Front Immunol.* 2020 Apr 7;11:442.

Ian Roy, Ashaben Patel, Vineet Kumar, Tatiana Nanda, Rene Assenberg, Klaus Wuchner, Ketan Amin, Polysorbate Degradation and Particle Formation in a High Concentration mAb: Formulation Strategies to Minimize Effect of Enzymatic Polysorbate Degradation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 110, Issue 9, 2021, Pages 3313-3323, ISSN 0022-3549.

E SY, Hu Y, Molden R, Qiu H, Li N. Identification and Quantification of a Problematic Host Cell Protein to Support Therapeutic Protein Development. *J Pharm Sci.* 2023 Mar;112(3):673-679.

Chiu J, Valente KN, Levy NE, Min L, Lenhoff AM, Lee KH. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations. *Biotechnol Bioeng.* 2017 May;114(5):1006-1015.

Linus Weiß, Nikolas Zeh, Melanie Maier, Daniel Lakatos, Kerstin Otte, Simon Fischer. Without a trace: multiple knockout of CHO host cell hydrolases to prevent polysorbate degradation in biologics, *Trends in Biotechnology*, Volume 43, Issue 8, 2025, Pages 1982-2002, ISSN 0167-7799.

3. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가

Part 1. 합성저분자(Chemically Synthesized Small Molecules) -119 컨설팅보고서

Part 2. 바이오의약품의 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(2) - 단일클론항체(mAbs) 및 재조합 단백질의 HCP

1. 불순물 특성과 종류
2. HCP 불순물의 잠재적 독성에 대한 고찰
 - 2-1. 독성 및 면역원성(Toxicity & Immunogenicity)
 - 2-2. 생물학적 치료제의 효소적 분해(Enzymatic Degradation)
 - 2-3. HCP와 표적 단백질의 응집(HCP and aggregation of target proteins)
3. HCP 불순물의 허용한계(Acceptable limits)
4. 현재의 완화 전략

Part 3. 바이오의약품의 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(3) - 유전자 치료제의 불순물 - Host Cell DNA (HCD)

121. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(3)- 유전자 치료제의 불순물 - Host Cell DNA (HCD)

1. 유전자 치료제의 HCD

- 유전자 치료제(예: AAV 및 Lentivirus vector)는 주로 인간이나 곤충 세포주를 이용해 생산됨. 숙주 세포 DNA(HCD, Host Cell DNA) 불순물은 생산 세포주(예: HEK293, HeLa, CHO, Sf9)에서 유래한 공정 관련 DNA 단편으로, 최종 의약품에 잔류함.

2. HCD의 물리적 특성과 독성학적 이해

1) DNA 불순물의 물리적 형태

- 위험성은 최종 제품 내에서 DNA가 어떤 형태로 존재하는지에 크게 좌우됨 (Muralidharan, 2023).

① **크로마틴(Chromatin)**: 세포 배양물 수확물에서 숙주 DNA는 세포의 염색체 덩어리의 잔여물이며, 염색체 DNA와 히스톤 단백질의 복합체인 크로마틴 형태로 존재함.

- **뉴클레오솜 배열**: 이는 12 nm에서 400 nm 사이의 크기를 갖는 1개에서 대략 30개에 이르는 뉴클레오솜으로 구성된 분해된 배열임.
- **더 작은 히스톤 관련 복합체**: 2 nm에서 12 nm 범위의 더 작은 집합체.

② **캡시드 내 포함(Encapsidated)** 바이러스 벡터 제조 과정에서 DNA(대개 비벡터 또는 플라스미드 서열)가 의도치 않게 바이러스 캡시드 내에 포장될 수 있음. 이는 제품과 관련된 문제이며 제거가 더 어려우므로, 사례별 위험 평가가 매우 중요 (Muralidharan, 2023; DSDP Analytics, 2026).

③ **비캡시드형-자유 부유형(Free-floating unencapsidated)**: 바이러스 캡시드에 포함되지 않은 공정 관련 DNA. 후속 처리 과정(예: 크기를 줄이기 위한 의도적인 뉴클레아제 처리) 중에 염색질은 다양한 길이의 자유 선형 DNA 단편으로 분해됨. 세계보건기구(WHO)와 FDA는 안전 위험을 완화하기 위해 이러한 단편의 평균 크기를 200 염기쌍 미만으로 줄일 것을 권장함.

2) 물리적 형태와 독성학적 리스크

- DNA 불순물의 구체적인 물리적 형태는 후속 정제 공정(예: 심층 여과 또는 이온 교환 크로마토그래피)에서 그 불순물이 어떻게 행동할지를 결정함. 또한, DNA 단편의 물리적 형태와 크기는 환자 안전 위험과 직접적인 상관관계가 다음과 같이 있음(Patel, 2025; Preyat, 2025; Khanal 등, 2019; Yuan 등, 2019).

- ① **발암성(Oncogenicity)**: 더 큰 단편과 염색질은 활성 바이러스 유전자나 발암 유전자를 보유하거나 발현할 가능성이 더 높음.
- ② **면역원성(Immunogenicity)**: 미생물 DNA 내의 비메틸화 CpG 서열은 강력한 선천성 면역 반응을 유발할 수 있음.

- ③ **캡시드화 위험(Encapsidation Risks):** 바이러스 캡시드 내에 포장된 DNA는 뉴클레아제 처리를 회피하여, 환자에서 의도하지 않은 유전자 발현이나 무작위 게놈 통합을 초래할 수 있음.

3) HCD의 구체적 독성 기전 - 4가지 유형

① **삽입 돌연변이(Insertional Mutagenesis) 유발 현상은 종양유전자(Oncogene) 또는 종양 억제제(Tumor Suppressor Gene)의 조절 이상을 유발하며 다음과 같은 기전임.**

- **삽입 돌연변이 유발의 메커니즘:** 생물학적 제제를 생산하는 과정(예: HEK293, CHO 세포 등 사용)에서 숙주 세포의 유전 물질이 완제품에 미량 잔류할 수 있음. 이 미세한 DNA 불순물이 환자의 세포에 침투하여 유전자 조작을 일으키는 방식은 다음과 같음(Sundar 등, 2025).
- **종양 유전자 활성화 (Activation of Oncogenes):** 잔류 DNA가 세포의 정상 유전자 (Proto-oncogene) 근처에 삽입될 경우, 외부 DNA에 포함된 프로모터(Promoter)나 인핸서(Enhancer)가 정상 유전자의 발현을 비정상적으로 증폭시킬 수 있음(Charles river, 2025; Creative proteomics, 2026).
- **종양 억제 유전자 비활성화 (Inactivation of Tumor Suppressor Genes):** 반대로 종양 억제 유전자 중간에 잔류 DNA가 끼어들게 되면, 해당 유전자가 정상적인 단백질을 생성하지 못해 세포 분열의 브레이크가 고장나게 됨(Charles river, 2025; Creative proteomics, 2026; Minerva biolabs, 2025).

<예시> 종양 발생 사건을 유도할 위험을 평가 방법: 발암성 및 감염성 위험과 같은 임계 기전이 확인되지 않은 유전독성 불순물의 경우, FDA 백신 및 유전자 치료제 등의 관련 생물학적 제품 자문위원회(VRBPA)는 1,000만 명 중 1명의 빈도를 고려함(10^{-7}). 허용 가능한 위험 수준(7)으로 간주됨(Li 등, 2009). 아래 <표>는 POG(원종양유전자) 활성화 또는 종양억제 유전자(TSG) 비활성화로 인해 종양 발생 사건을 유도할 위험을 평가하는 단계를 나타낸 것임.

- **종양 억제 유전자(TSG, tumor suppressor gene) 비활성화:** 잔류 hcDNA는 세포 주기 조절을 담당하는 유전자나 종양 단백질 53(p53), 인간 망막모세포종 감수성(rb1)을 암호화하는 TSG에 통합될 수 있습니다. TSGs 손실은 특정 인간 종양을 유발하는 것으로 나타났음.
- **원종양유전자 활성화(POG, proto-oncogene):** 잔류 세포-기질 DNA의 통합은 프로모터/증강제 삽입을 통해 세포 조절 유전자를 활성화할 수 있으며, 이는 신생물 표현형 발달로 이어질 수 있음.
- **TSG의 한 복제본만 비활성화하는 것은 단지 하나의 사건일 뿐이며, 그 자체로는 세포를 암으로 만들 수 없음.** 전체 종양을 형성하기에는 충분하지 않음. 암성 증식을 생성하려면 관련 TSG의 두 복제본이 비활성화되거나, 두 개의 서로 다른 TSG가 파괴되거나, 두 개 이상의 POG가 활성화되어야 함. 따라서 위험 사건의 확률은 $(p)_i$ 는 두 개의 독립적인 사건에 대해 계산되어야 함. 이는 확률 값 10과 일치합니다-¹⁹ $\times 10^{-23}$ Peden 등()이 DNA 분자를 통합하여 종양 유발 사건을 유도하는 사례로 보고됨.

$$(p_i)^2 \approx 10^{-23}/\text{DNA molecule}$$

<표 1> 유전자 치료 산물 내 잔류 숙주세포 DNA(hcDNA 또는 HCD) 불순물에 의한 원종양 유전자(POG) 활성화 또는 종양억제 유전자(TSG) 비활성화 확률을 결정하는 단계; bp = 염기쌍

Step	POG Activation	TSG Inactivation
Calculate probability of hcDNA integration into patient-cell chromosome	10^{-3}	10^{-3}
Calculate probability of integration into a functional coding sequence (9). Note that only a fraction of the genome codes for functional genes, and coding sequences are scattered randomly among exons. Human genes are spaced across 3,000–30,000 genes over a genome size of 3×10^9 bp.	10^{-5}	10^{-5}
Calculate probability of integration into a gene-enhancing sequence. Temin reports that each cell should have at least 100 POGs	10^{-2}	NA
Calculate probability of TSG integration. Temin reports that the enhancers, promoter, and other genes responsible for chromosomal rearrangements are clustered in chromosomes and represent only ~1% of the human genome	NA	10^{-2}
Calculate the probability of POG activation or TSG inactivation after integration into the patient-cell genome	10^{-2}	10^{-2}
Calculate probability (p_i) of a single intracellular DNA molecule to activate a single POG or inactivate a single TSG: $(3 \times 10^{-3}) \times (10^{-5}) \times (10^{-2}) \times (10^{-2})$.	3×10^{-12}	3×10^{-12}

hcDNA = HCD

② cGAS-STING 경로를 통한 세포질 dsDNA 유도에 의한 면역원성 및 염증 반응 (Zhou 등, 2023; Ma 등, 2020)

- **독성 기전:** 세포질로 유입된 이중나선 DNA(dsDNA)는 자연 면역 센서인 **cGAS**(cyclic GMP-AMP synthase)에 의해 감지됨
- **결과:** cGAS가 신호전달 물질(cGAMP)을 생성하여 STING(stimulator of interferon genes) 경로를 활성화하고, 이로 인해 제1형 인터페론(Type I IFNs) 및 전염증성 사이토카인(Pro-inflammatory cytokines)이 대량 분비되어 주사 부위 염증, 발열, 나아가 전신성 자가면역 질환을 유발할 수 있음.

③ p53에 의해 유도된 세포자멸사의 핵 자유 DNA 활성화 및 방출

- **p53의 역할:** 암 억제 유전자인 p53은 심각한 세포 손상이 발생했을 때 세포를 자살(세포자멸사)시켜 손상된 세포가 증식하는 것을 막음(Ozaki 등, 2011)
- **세포자멸사와 DNA 단편화:** p53이 세포자멸사를 유발하면 세포 내 DNA가 잘게 부서지는 **DNA 단편화(DNA fragmentation)** 현상이 일어남(Zhang 등, 2024).
- **핵 자유 DNA 발생:** 세포막이 파괴되는 사멸 과정이나 세포 사멸 이후의 과정에서 핵 안에 있던 잘게 부서진 DNA 조각들이 세포 밖으로 방출되어 **핵 자유 DNA(Cell-free DNA)** 상태가 됨.

④ 무작위 DNA 삽입에서 유래한 신항원에 의해 발생하는 면역독성

- **DNA 불순물 혼입:** 바이러스 벡터나 단백질 의약품을 생산할 때 사용되는 숙주 세포(예: CHO 세포, HEK293 세포 등)의 DNA 일부가 정제 과정을 완벽히 거치지 못하고 최종 제품에 혼입됨(Wright 등, 2014).
- **무작위 삽입 (Random Insertion):** 잔류 DNA 조각이 환자의 세포 내로 유입되어 환자의 유전체에 무작위로 끼어들 수 있음(Preyat, 2025).
- **신항원 발현 (Neoantigen Expression):** 삽입된 외래 DNA 서열이 세포 내에서 전사(Transcription)되고 번역(Translation)되어, 인체에 원래 존재하지 않는 새로운 단백질 조각인 **신항원(Neoantigen)**을 생성함(Feng 등, 2025).
- **면역독성 발생 (Immunotoxicity):** 면역계가 이 신항원을 '비자기(Non-self)' 물질로 인식하여 공격하게 되며, 이로 인해 예측할 수 없는 염증 반응이나 자가면역 질환 등의 면역독성이 발생할 수 있음(Ward 등, 2016; Zhang 등, 2021; Preyat, 2025).

3. 규제 지침 및 허용 한도

1) 위험 평가의 핵심 구성 요소

- 견고한 HCD 위험 평가는 전반적인 환자 안전성을 판단하기 위해 다음과 같은 여러 요소를 평가함(Heidaran, 2026).
- ① **벡터 유형 및 용량:** 총 벡터 게놈 부하(e.g., $>1.0 \times 10^{14}$ GC/kg 잠재적인 HCD 노출의 정도를 결정함(HI, 2025; EMEA, 2007).
- ② **환자 집단:** 표적 질환의 중증도와 환자의 **기저 건강 상태**는 허용 가능한 위험-이익 비율에 큰 영향을 미침.
- ③ **단편 크기 및 서열:** HCD가 인트론 내, 유전자 간 영역에 속하는지, 아니면 전사될 수 있는 완전한 개방형 읽기 프레임(ORF, opening reading frame)을 포함하는지 평가함(HI 등, 2025; Coye, 2026)
- ④ **제조 및 제거:** HCD를 분해하는 엔도뉴클레아제(예: 벤조나제)의 효능과 최종 충전 전에 이를 제거하기 위한 정제 단계를 평가함(Blaszczyk, 2026).

2) FDA 표준 허용 한도(WHO TRS 987; Yang 등, 2013; USFDA, 2021; (Muralidharan, 2023)): World Health Organization and U.S. Food and Drug Administration guidelines recommend that 10 ng/dose and 200 base pairs be the limits of content and size of residual DNA in the final product dose.

- **Total Quantity:** 미국 식품의약국(FDA) 및 기타 글로벌 규제 기관들은 DNA 잔량의 총량 ≤ 10 ng/dose라는 엄격한 기준치를 권장
- **Fragment Size:** DNA 단편의 크기는 가급적 **200 bp**인 기능성 유전자 크기보다 작아야 한다고 권고해 왔음.

3) 위험 기반 사양

- 바이러스 벡터(예: AAV)는 본질적으로 일부 HCD를 캡시드 내에 포함하고 있기 때문에, FDA는 엄격한 정량적 한도를 강제하기보다는 의약품 제조사가 제품별 HCD 위험 평가를

바탕으로 과학적으로 타당한 대체 사양 한도를 제안할 수 있도록 허용하고 있음 (Muralidharan, 2023).

4) 핵심 품질 속성(CQA)

- HCD는 CQA로 분류되며, 이는 제품 품질 및 규제 준수를 보장하기 위해 제조 전 과정에 걸쳐 HCD의 정량 및 크기 프로파일링을 모니터링해야 함을 의미함.

5) 유전자 치료제의 HCD가 CQA인 이유

① 이유

- HCD는 잠재적인 생물학적 및 안전성 위험을 초래할 수 있으므로, 규제 당국은 이를 **핵심 품질 속성(CQA)**으로 엄격히 모니터링하고, 최소화하며, 정량화할 것을 요구함.

② 핵심 품질 속성(CQA, critical quality attribute)

- Host cell DNA(숙주 세포 DNA, HCD) 불순물은 다운스트림 정제 과정 후 생물학적 제제 (재조합 단백질, 백신, 바이러스 벡터 유전자 치료제)에 잔류하는 공정 관련 오염 물질임. 포괄적인 HCD 위험성 평가를 수행하는 것은 환자 안전을 보장하기 위해 전 세계 규제 기관(FDA, EMA, WHO)이 요구하는 핵심 품질 속성(CQA, critical quality attribute)임 (ICH Q6B, 1999; FDA Q8(R2), 2009; Luo 등 2022).

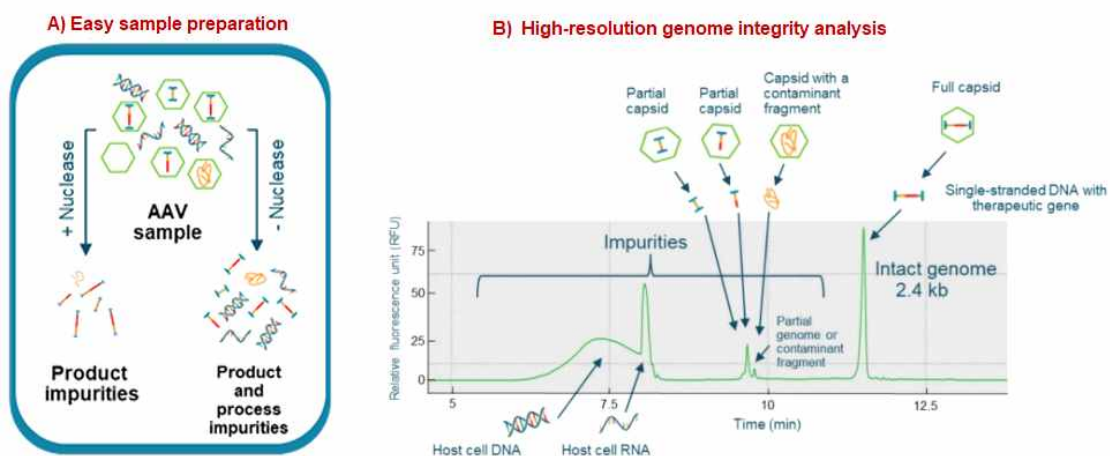
③ 핵심 품질 속성(CQA, critical quality attribute)의 예시: Adeno-associated virus (AAV) vectors

- AAV의 활용도: AAV(adeno-associated virus)는 유전자 치료에서 지속적인 외래 유전자 발현을 유도하는 안전하고 효과적인 유전자 전달체임. 미국 및 유럽 규제 당국은 재조합 (recombinant) AAV(rAAV) 벡터를 활용한 100건 이상의 독자적인 임상시험을 승인 (Dobrowsky 등, 2021).
- AAV의 CQA: <Table-1>은 보고된 핵심 품질 특성(CQA)과 이들이 rAAV 품질에 미칠 수 있는 잠재적 영향을 보여줌. 제품의 효능과 안전성을 보장하기 위해서는 제조 공정 전반에 걸쳐 이러한 CQA를 특성화하고 모니터링해야 함.

Table 1. Quality considerations for rAAV(recombinant AAV).

CQA	Vector Potency	Immunogenicity	Transduction efficiency	Packaging efficiency
Viral protein profile and ratio	●	●	●	●
Genome integrity	●	●	●	
Titer	●	●	●	
Full and empty capsid ratio	●	●	●	
Protein impurities	●	●		
Nucleic acid impurities	●	●		

- **Full-to-empty capsid ratio의 의미:** 유전자 치료 분야의 급속한 성장으로 인해 rAAV를 대규모로 고품질로 제조할 필요성이 대두되었음. 완전 캡시드와 빈 캡시드의 비율(full-to-empty capsid ratio)은 특히 중요함. 완전 캡시드는 표적 세포에 온전한 외래 유전자를 전달하며, AAV 치료제의 효능에 직접적인 영향을 미치기 때문임. **기능이 없는 빈 캡시드는 형질 도입 효율을 저하시키고 벡터 관련 면역독성을 악화시킬 수 있음.** 또한, 절단된 게놈이나 숙주 세포 핵산 또는 벡터의 단편을 포함하는 부분적으로 채워진 캡시드는 효능 저하, 유전독성 및 면역독성을 유발할 수 있음. 따라서 고해상도 크기 분석 방법을 사용하여 온전한 게놈을 부분 게놈 및 기타 불순물로부터 분리하는 것이 필수적임. AAV 기반 유전자 치료제의 효능과 안전성을 높이기 위해 빈 캡시드와 부분 캡시드를 제거하는 공정 개선을 위해서는 '가득 찬 캡시드 대 빈 캡시드' 비율(the full and empty capsid ratio)을 모니터링하는 것이 매우 중요함.
- **'가득 찬 캡시드 대 빈 캡시드' 비율 측정 예시:** <그림>은 BioPhase 8800 시스템에서 AAV 게놈 무결성 분석을 위한 고해상도 CGE-LIF 워크플로우. <그림>의 A에서 제품 관련 불순물 분석을 위해 핵산 추출 전에 AAV 시료를 뉴클레아제로 처리, 그러나 제품 및 공정 관련 불순물을 모두 분석하기 위해 뉴클레아제 처리 없이 AAV 시료에서 직접 핵산을 용출 및 정제할 수도 있음. 추출된 핵산은 고감도 분석을 통해 온전한 게놈은 부분 게놈 및 기타 불순물과 명확하게 분리되었음. <그림>의 B)는 **BioPhase 시스템을 이용한 고해상도 게놈 무결성 분석 결과를 나타낸 것으로 2.4 kb 크기의 온전한 게놈이 잠재적인 부분 게놈, 오염 단편, 소형 숙주 세포 RNA 및 숙주 세포 DNA 불순물로부터 명확하게 분리된 것을 나타냄**(Luo 등, 2022).



<그림> BioPhase 시스템에서 AAV 게놈 무결성 분석을 위한 고해상도 워크플로우

4. 검출 및 모니터링 방법

- HCD의 질량, 크기 및 서열을 정확하게 정량하기 위해 제조사들은 첨단 분석 플랫폼을 활용함

1) qPCR / ddPCR

- 정량 PCR(qPCR, Quantitative PCR) 및 드롭렛 디지털 PCR(ddPCR, Droplet Digital PCR)은 총 잔류 DNA 및 단편 크기 분포를 절대적으로 정량하는 표준 방법임.
- qPCR은 각 사이클 후 형광을 감지하여 "실시간"으로 DNA 증폭을 측정하며 ddPCR은 절대 정량화를 제공하는 차세대 "분할" PCR 방법임.

<표> Summary: qPCR vs. ddPCR

Feature	qPCR	ddPCR
Quantification	• Relative (requires standard curve)	• Absolute (no standard curve needed)
Sensitivity	• High	• Ultra-high (excellent for rare targets)
Inhibitor Tolerance	• Moderate (inhibitors skew results)	• High (Poisson algorithm limits inhibitor effects)
Throughput & Dynamic Range	• Very high, broad dynamic range	• Lower throughput, narrower dynamic range

2) 차세대 염기서열 분석(NGS, Next-Generation Sequencing)

- NGS는 HCD의 정확한 염기서열, 기원 및 패키징을 식별하기 위해 점점 더 많이 채택되고 있으며, 포괄적인 안전성 평가를 위한 필수 데이터를 제공함
- NGS에 대한 컨설팅보고서 110. Next-Generation Sequencing-기반 유전체 편집 치료제의 안전성 평가에 관한 FDA의 최신 지침에 설명하여 다음과 같이 첨부함

<참고> 110. Next-Generation Sequencing-기반 유전체 편집 치료제의 안전성 평가에 관한 FDA의 최신 지침

1. 목적

- CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, 사람 유전체에 완전히 새로운 DNA 절편이나 유전자 전체를 삽입하여 기존의 유전정보를 다른 것으로 바꾸기 위한 기술)을 응용한 유전체 편집 기술인 3세대 유전자 가위(RGENs, RNA-guided engineered nucleases) 및 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease; 원하는 DNA 부위를 아주 정확하게 찾아 잘라내는 2.5세대 유전자 가위 기술) 등 유전체 편집 기술은 엄청난 치료 잠재력을 제공함.
- 그러나 기술은 높은 효율성에도 불구하고, 의도치 않은 DNA 위치를 자르는 ‘off-target’ 효과에 의한 유전체 변형으로 안전 문제와 인간 배아 유전자 편집에 대한 윤리적 및 제도적 우려가 상존함.
- 지난 2024년 발표한 유전체 편집 치료에 관한 초기 유전체 편집 치료에 관한 초기 지침은 상당히 넓은 개발의 영역을 다루고 있지만(FDA Guidance for Industry, Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing, January 2024), 일부 새로운 유전자 편집, 후생유전학 및 RNA 편집 제품을 포함하지 않았음.
- 새로운 지침의 목적은 2024년 지침에 포함되지 않은 일부 새로운 유전자 편집, 후생유전학 및 RNA 편집 제품에 대한 고려사항을 포함하기 위함.
- 이에 따라 2026년 4월 FDA는 인간 유전자 치료에서 유전체 편집(GE, gene editing) 안전성 평가를 위한 차세대 시퀀싱(NGS, Next-Generation Sequencing) 사용에 관한 지침을 제공하는 업데이트안 발표(Draft Guidance for Industry; Safety Assessment of Genome Editing in Human Gene Therapy Products Using Next-Generation Sequencing, 2026)

2. NGS(Next-Generation Sequencing, 차세대 시퀀싱)

1) 개념: 차세대 시퀀싱(NGS)은 이전 방법보다 이점을 제공하는 최근의 DNA 및 RNA 시퀀싱 기술을 의미합니다. 이 방법은 핵산 조각의 고처리량, 대규모 병렬, 심층 시퀀싱을 가능하게 하며, 질병이나 기타 생물학적 현상과 관련된 유전적 변이를 식별하는 데 자주 사용됨.

2) NGS workflow 단계: NGS는 4 가지 주요 단계로 구성

5. **핵산의 분리 및 정제:** 세포와 핵에서 DNA와 RNA를 방출하는 용해 단계로 추출 후에는 다양한 방법으로 DNA 농도와 샘플의 순도를 측정할 수 있음. 핵산 정제는 수작업으로 수행하거나 자동 액체 취급으로 수행할 수 있음. 자동화 방법은 인간

의 실수를 줄이고 대량 실험실에 적합하며, 수동 방법은 소규모 또는 특수 응용 분야에 유연성을 제공함.

6. **NGS 라이브러리 준비:** 핵산 샘플을 시퀀싱이 가능한 샘플로 변환하는 방법에 의해 정의됨. NGS 워크플로우에서 가장 힘들고 도전적인 부분 중 한 단계임. NGS 라이브러리 준비에는 표적 서열 증폭, 단편화, 어댑터 부착, 특정 조각 길이 선택, 라이브러리 정량화, 라이브러리 풀링, 수동 라이브러리 준비 vs 자동 라이브러리 준비 등 여러 중요한 단계가 포함. 그러나 설명된 모든 단계가 반드시 필요한 것은 아니며, 추가 단계가 필요할 수도 있음.

7. **시퀀싱:** 시퀀싱 과정의 주요 단계는 다음과 같음

- **실행 계획:** 실행 계획은 샘플 로딩, 시퀀싱 화학, 실행 시간 등 시퀀싱 매개변수를 설정하는 것을 포함함. 적절한 계획은 최적의 데이터 품질과 시퀀싱 자원의 효율적인 사용을 지원하는 데 도움을 줌.
- **클론 증폭:** 클로날 증폭은 각 DNA 조각의 여러 복사본을 생성하여 클러스터 또는 콜로니를 만듦. 이 단계는 일반적으로 유제나 브리지 PCR(emulsion or bridge PCR)을 통해 시퀀싱 중 신호 검출에 필수적임.
- **합성에 의한 시퀀싱:** 합성에 의한 시퀀싱은 표지된 뉴클레오타이드를 고정된 템플릿에 통합하여 DNA 조각의 뉴클레오타이드 서열을 읽는 방법임. 각 통합 이벤트를 감지하여 DNA 서열을 결정할 수 있음. NGS에는 나노포어 시퀀싱, 단일 분자 실시간 시퀀싱(SMRT), 라이게이션에 의한 시퀀싱 등 다른 접근법도 사용할 수 있음.
- **염기 호출 및 데이터 출력:** 염기 염기열 분석은 원시 시퀀싱 데이터를 뉴클레오타이드 서열로 변환하여 품질 지표를 포함한 FASTQ 파일을 생성함. 이 단계는 시퀀싱 실행의 정확성과 신뢰성을 평가하는 데 매우 중요하며, 후속 분석에 필수적인 정보를 제공함.

8. **데이터 분석:** NGS 데이터 분석은 일반적으로 생물정보학이라고 널리 불리며, DNA 시퀀싱 데이터로부터 정확하고 의미 있는 결과를 생성하기 위해 설계된 일련의 필수 계산 단계로 구성됨. 이 단계에는 탈다중화, 품질 필터링, 기준 게놈과의 정렬, 변이 호출 등이 포함됨. 다양한 응용 분야에 따라 매우 다양하지만, NGS 분석은 자동화된 방식으로 실행될 수 있는 단일 종단 간 파이프라인으로 통합될 수 있음. 하위 분석 및 그래픽 도구는 데이터 해석을 가능하게 함. 보고 구성 요소는 결과, 지표, 시각화를 종합 출력으로 구성하여 여러 시퀀싱 실행을 비교함.

3. FDA의 새로운 개괄적 권고사항(2026년 4월)

- 2024년 1월에 발표된 이전 지침을 기반으로 하며, 해당 지침은 인간 유전체 편집을 포함하는 인간 유전자 치료 제품에 대한 비임상, 임상, 화학, 제조 및 통제(CMC) 고려사항을 다룸.

- 초안 지침에서 FDA의 새로운 권고사항은 유전자 편집 신청의 안전성을 평가하는 NGS 기법과 도구에 초점을 맞추고, NGS 분석의 계획, 개발 및 데이터 분석과 관련된 기관의 기대치를 개괄하는 것임
- 지침은 유전체 편집(GE) 제품의 임상 개발 프로그램이 "유전자 치료 제품 자체와 관련된 위험뿐만 아니라, 유전 질환을 표적으로 하는 치료, 개별 치료법을 포함한 유전체 변형 등 off-target 편집 및 의도치 않은 게놈 변화 등 GE와 관련된 추가 위험도 모두 다뤄야 한다"고 명시. 또한 이를 위해 최신 시퀀싱 기술을 활용해 off-target 편집 위험을 평가하기 위한 명확하고 과학적으로 근거 있는 권고안임.
- 즉, 전통적인 분석 접근법만으로는 더 이상 충분하지 않다는 점을 대신하여 NGS(Next-Generation Sequencing, 차세대 시퀀싱) 기반 방법을 제시. NGS 전략을 통해 포괄적이고 과학적으로 다음과 같은 분야에 응용을 통해 유전자 편집 기술을 기반한 치료법의 위험성을 제거하여야 함. 특히 NGS를 사용하여 편집된 세포의 유전체 무결성에 대해 "민감하고 정량적인" 평가를 수행.
 - 유전체 전반에 걸친 off-target 편집 사건 탐지
 - 염색체 재배열 및 구조 변이 평가
 - 삽입/결실 돌연변이(인델) 평가
 - 전체 유전체 무결성 모니터링

3. NGS(Next-Generation Sequencing, 차세대 시퀀싱)의 구체적 지침

(예시-1): DNA의 짧은 구간(예: 50bp 이하)에 변화를 초래하는 on-target 및 off-target 부위의 편집을 평가하기 위해, short-read sequencing-based method을 활용하는 시퀀싱 전략이 적절할 수 있다고 권고. 그러나 대규모 삽입이나 대규모 결손의 유무를 확인하기 위해 더 긴 서열 구간을 평가하는 경우에는, 이러한 변화를 감지할 수 있는 long-read sequencing-based method을 사용하는 시퀀싱 전략을 적용해야 할 수 있음

(예시-2): 시퀀싱 깊이의 적절성과 민감도를 입증하고, 저빈도 off-target 편집 사건을 검출하기 위한 전략을 뒷받침하기 위해 NGS 실행의 대표 데이터와 같은 자체 생성 데이터 및 peer-reviewed publications의 관련 정보를 제공할 것을 권장

(예시-3): 시퀀싱 데이터 처리 과정에서 각 단계에 적용되는 수용 기준(해당되는 경우)에 대한 정보를 포함하여, 시퀀스 분석의 각 단계에 대한 간략한 설명. 또한 및 수용 기준 정보에는 시퀀싱 품질 수용 기준, 시퀀싱 깊이 수용 기준 및 정렬 지표 수용 기준에 대한 정보가 포함되어야 함.

(예시-4): On-target 및 off-target 부위 분석에 사용되는 샘플은 결과적인 on-target 편집률이 최종 의약품에서 제안된 비율과 비교가 가능하도록 적절한 매개변수를 사

용하여 편집되어야 함.

(예시-5) Ex-vivo 제품: 유전자 편집 전략이 환자 세포의 돌연변이를 교정하는 것을 목표로 하는 경우, 당국은 의뢰인이 환자 유래 시료나 해당 돌연변이를 보유하도록 조작된 정상 세포를 사용할 것을 권장함. 이러한 접근 방식은 표적 부위의 편집률 보고를 용이하게 할 것임. **중요한 점은, 후원사가 적절한 경우 건강한 기증자 검체를 사용할 수 있으며, 해당 접근법의 타당성을 뒷받침하는 과학적 근거를 제시해야 한다는 것임.** 후원사가 편집을 시도하려는 세포 유형과 다른 세포 유형을 선택하는 경우, **검체 선정 전략의 타당성을 뒷받침하는 과학적 근거를 제시해야 함.**

(예시-6) 인간 유전적 변이: 지침은 인간 게놈에 내재된 뉴클레오타이드 변이가 on-target 서열과 off-target 게놈 편집 부위 간의 불일치를 줄여, 유전자 편집기의 서열 인식 도메인이 이를 인식하게 함으로써 off-target 위험을 증가시킬 수 있다고 지적함. 인간 유전적 변이를 적절히 반영하기 위한 체외(in silico) off-target 분석 방법에 대한 구체적인 고려 사항이 논의되며, 여기에는 다음이 포함됨: ① 건강한 집단과 환자 집단의 변이 정보를 포함한 인간 유전적 변이 데이터베이스의 선정(예정된 대상 집단의 질병 유병률 및 질병 유발 변이에 대한 지식을 바탕으로 특정 데이터베이스를 선택한 근거 제시 포함), ② 그리고 유병률이 명확히 규명된 질병에 대해 인구 계층화를 활용하여 변이를 선별하는 in silico off-target 후보 선정 전략(in silico off-target nomination strategy).

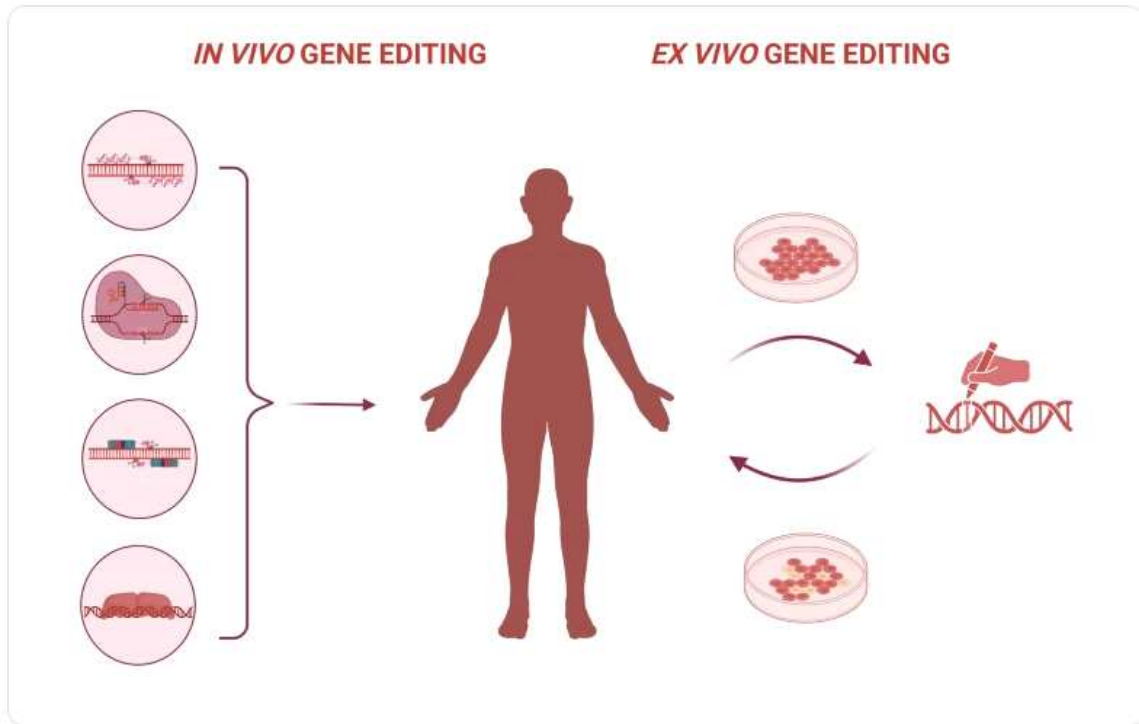
4. NGS와 관련 FDA와 INTERACT meeting

- 지침은 INTERACT Meeting 및 IND 제출 전 개발 단계에서 요구되는 최소한의 정보를 제시함. INTERACT Meeting은 신약이나 혁신 의료기기를 개발하는 초기 단계에서 **미국 FDA**로부터 초기 비구속적 조언과 피드백을 받을 수 있는 공식적인 사전 회의 제도로 초기 비임상 연구(proof-of-concept)는 진행했으나 아직 본격적인 독성시험이나 임상시험은 설계하지 않은 혁신 신약 및 복잡한 기술 제품에 대한 개발 방향성을 점검하는 회의임. 이는 INTERACT 회의 및 IND 제출 전 단계에서 NGS와 관련하여 FDA가 기대하는 바를 후원사에게 명확한 틀로 제시함으로써, 후원사가 IND 제출을 준비하는 데 도움을 준다는 점에서 중요한 내용임.
- 예를 들어, INTERACT 회의 단계에서는 분석법에 사용된 편집기 및 작용 기전에 대한 정보가 요구되는 반면, IND 전 단계에서는 데이터 품질, 시퀀싱 깊이 및 정렬에 대한 구체적인 내용을 포함한 시퀀싱 전략과 각 분석에 사용된 시료에 대한 정보가 요구됨.
- FDA는 이전에 유전성 질환이나 기타 질환이 의심되는 증상 있는 개인의 진단을 돕기 위한 전체 엑솜 인간 DNA 시퀀싱(WES) 또는 표적 인간 DNA 시퀀싱에 대한 NGS의 설계, 개발 및 분석적 검증에 관한 구체적인 지침을 발표한 바 있음(Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) - Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Intended to Aid in the Diagnosis of Suspected

Germline Diseases |FDA, April 2018)

5. 결론

- 위와 같은 지침 내의 예시를 통해 FDA의 권고안은 **분자 및 유전체 위험을 최소화하기 위한 표준화된 접근법에 초점**을 맞추고 있다고 할 수 있음.
 - **Off-target editing 식별:** 유전체 전체에 민감한 NGS 방법을 활용하여 의도치 않은 편집, 방관자 돌연변이, 그리고 게놈 내 어디에서든 표적 밖 활성을 식별하고 정량화
 - **On-target editing 평가:** 염기서열 충실도를 특성화하고 원치 않는 국소 재배열 없이 원하는 치료 변화가 이루어지도록 정확한 의도된 편집 부위를 분석하는 것.
 - **Genomic integrity 평가:** DNA 이중 가닥 절단을 일으키는 유전자 편집(GE) 기술의 경우, 후원자는 염색체 무결성을 평가. 여기에는 저주파 염색체 전좌 평가와 이러한 사건의 발생률을 보고하여 유전체 안정성을 보장하는 것이 포함됨.
 - **Product Types:** 이 지침은 **ex vivo** (cells edited outside the body) 그리고 **in vivo** (editing occurs directly within the patient) 치료적 접근법(therapeutic approaches) 등 모두에 해당.
- 유전자 치료법 개발의 주요 장애물은 안전성과 효율성이므로, 가장 큰 문제 중 하나는 **환자 세포에 유전자 구조물을 전달**하는 것임. 유전자 전달 방식은 <그림>에서처럼 체외(ex vivo)와 체내(in vivo)로 나뉘며, 각각 다른 경우에 적합. 체외 방식은 주로 혈액 세포 편집, 암 치료 개선, 감염성 질환 치료에 사용됨. 장기 내 세포를 편집하기 위해 개발자들은 체내 방식을 선택함. 각 접근법에는 상당히 다양한 방법이 존재하지만, 안타깝게도 이러한 방법들이 모두 동일한 수준의 효과와 안전성을 보장하는 것은 아님(Volodina 등, 2025)



<121. 컨설팅보고서 - 참고문헌>

WHO TRS 987. Annex 4: Guidelines on the Quality, Safety, and Efficacy of Biotherapeutic Protein Products Prepared By Recombinant DNA Technology. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014; https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/biotherapeutics/trs_987_annex4.pdf?sfvrsn=d4ba378a_5&download=true.

USFDA(Food and Drug Administration). Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee. Briefing Document: Toxicity Risks of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors for Gene Therapy. Silver Spring, MD, 1–2 September 2021; <https://www.fda.gov/media/151599/download>.

Yang H. Establishing acceptable limits of residual DNA. PDA J Pharm Sci Technol. 2013 Mar-Apr;67(2):155-63.

Anthony Blaszczyk, USP Global Biologics Department. Roundtable Session 2 - Table 15 - Host Cell Proteins (HCP) and Host Cell DNA Risk Assessment for Gene Therapy. 2026.

EMA. European Medicines Agency Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use. GUIDELINE ON NON-CLINICAL TESTING FOR INADVERTENT GERMLINE TRANSMISSION OF GENE TRANSFER VECTORS. 2005.

Naveenganesh Muralidharan. Quantitative Risk Assessment of Limits for Residual Host-Cell DNA Ensuring Patient Safety for In Vitro Gene Therapies Produced Using Human-Derived Cell Lines, 2023, [BioProcess International](#) 21(4):33-37

Li Sheng-Fowler, Andrew M. Lewis, Keith Peden, Issues associated with residual cell-substrate DNA in viral vaccines, Biologicals, Volume 37, Issue 3, 2009, Pages 190-195, ISSN 1045-1056.

Zhang Z, Lu M, Qin Y, Gao W, Tao L, Su W, Zhong J. Neoantigen: A New Breakthrough in Tumor Immunotherapy. Front Immunol. 2021 Apr 16;12:672356.

Ward JP, Gubin MM, Schreiber RD. The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. Adv Immunol. 2016;130:25-74.

Feng H, Jin Y, Wu B. Strategies for neoantigen screening and immunogenicity validation in cancer immunotherapy (Review). Int J Oncol. 2025 Jun;66(6):43.

Wright JF. Product-Related Impurities in Clinical-Grade Recombinant AAV Vectors: Characterization and Risk Assessment. Biomedicines. 2014 Mar 3;2(1):80-97.

Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. Cancers (Basel). 2011 Mar 3;3(1):994-1013.

Zhang H, Xu J, Long Y, Maimaitijiang A, Su Z, Li W, Li J. Unraveling the Guardian: p53's Multifaceted Role in the DNA Damage Response and Tumor Treatment Strategies. Int J Mol Sci. 2024 Dec 1;25(23):12928.

Reshma Sundar, Xue Mi, Ashton Lavoie, Ane Quesada Ganuza, et al., Impurities in viral-based therapeutics: mastering residual hcDNA: a harmonized approach for AAV gene therapies. Cell & Gene Therapy Insights 2025; 11(9), 1107–1123.

Creative proteomics. What is Host Cell Residual DNA and Why to detect it?. 2026.

Charles river. Residual DNA Testing, Monitor residual DNA to ensure the safety of your biopharmaceutical. 2025.

Minerva biolabs. Testing of Residual Host Cell DNA: Importance in Quality Management of Biologicals. 2025.

Patel SB, Jurica J, Hua X (2025) Implementation of a high throughput automated platform for residual DNA quantitation. PLoS ONE 20(4): e0322133

Ohnmar Khanal, Xuankuo Xu, Nripen Singh, Steven J. Traylor, Chao Huang, Sanchayita

Ghose, Zheng Jian Li, Abraham M. Lenhoff, DNA retention on depth filters, *Journal of Membrane Science*, Volumes 570–571, 2019, Pages 464-471, ISSN 0376-7388.

Hashiba N, Yuan Y, Itou-Kudo E, Masumi-Koizumi K, Yusa K, Uchida K. Tracking Particle-Encapsulated DNA Across the Anion-Exchange Chromatography Fractions of Recombinant Adeno-Associated Virus Using Droplet Digital PCR and High-Throughput Sequencing. *Biotechnol J*. 2025 Jun;20(6):e70031.

Nic Preyat, Host Cell DNA Impurities: A Unique Challenge For rAAV. *Cell & Gene*. 2025.

Naveenganesh Muralidharan. Quantitative Risk Assessment of Limits for Residual Host-Cell DNA: Ensuring Patient Safety for In Vitro Gene Therapies Produced Using Human-Derived Cell Lines. April 21, 2023

DSDP Analytics, Residual Host Cell DNA (hcDNA). 2026.

Jane Luo, Tingting Li, Sahana Mollah, and Elliott Jones. A new approach for high-resolution full and empty AAV capsid analysis for comprehensive AAV evaluation on a single CE platform. *SCIEX, USA*. 2022.

Terrence Dobrowsky, Davide Gianni, John Pieracci, Junghae Suh, AAV manufacturing for clinical use: Insights on current challenges from the upstream process perspective, *Current Opinion in Biomedical Engineering*, Volume 20, 2021, 100353, ISSN 2468-4511.

AAV manufacturing for clinical use: Insights on current challenges from the upstream process perspective. (2021)

Zhou J, Zhuang Z, Li J, Feng Z. Significance of the cGAS-STING Pathway in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(17):13316.

Ma R, Ortiz Serrano TP, Davis J, Prigge AD, Ridge KM. The cGAS-STING pathway: The role of self-DNA sensing in inflammatory lung disease. *FASEB J*. 2020 Oct;34(10):13156-13170.

Jen HI, Wilkinson P, Lu X, Zhang W. Residual DNA impurities in AAV vectors-nature and transcription. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2025 Jun 4;33(3):101503.

Lisette Coye, Host Cell Proteins and Host Cell DNA Risk Assessment for Gene Therapies. *CELLX Consulting. Roundtable Notes: Session 1 Table 17 WCBP* 2026.

Mo Heidaran, Host Cell Proteins and Host Cell DNA Risk Assessment for Gene Therapies. *CELLX Consulting. Roundtable Notes: Session 1 Table 17 WCBP* 2026.

Jen HI, Wilkinson P, Lu X, Zhang W. Residual DNA impurities in AAV vectors-nature and transcription. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2025 Jun 4;33(3):101503.

<110. 컨설팅보고서 - 참고문헌>

Volodina, O., Smirnikhina, S. The Future of Gene Therapy: A Review of In Vivo and Ex Vivo Delivery Methods for Genome Editing-Based Therapies. *Mol Biotechnol* **67**, 425–437(2025).

FDA, 2018. Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) - Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Intended to Aid in the Diagnosis of Suspected Germline Diseases.

FDA. 2024. Guidance for Industry, Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing,

FDA. 2026. Draft Guidance for Industry; Safety Assessment of Genome Editing in Human Gene Therapy Products Using Next-Generation Sequencing.

122. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(4)- 핵산치료제(mRNA, siRNA, miRNA, ASO, Aptamer, Mimic & Antagomir)

1. 핵산치료제의 개념과 특성

1) 핵산치료제의 개념

- 핵산치료법(Nucleic acid therapy)은 유전 서열(DNA 또는 RNA)을 활용하여 질병의 근본적인 분자적 원인을 표적으로 삼아 질병을 치료, 치유 또는 예방하는 의학 분야의 혁신적인 신개념임. 기존 약물이 단백질에 작용하는 반면, 핵산 치료법은 그 상류 단계에서 개입하여 신체 자체의 기전을 통해 특정 단백질을 생성, 억제 또는 변형하도록 유도함 (Sun 등, 2024; Naeem 등, 2025).
- 아래의 <표>에서처럼 현재 전 세계적으로 미국 FDA 기준 약 24종 이상의 올리고뉴클레오타이드 치료제가 승인되어 판매되고 있으며, 200개 이상의 제약·바이오 기업이 초기 연구부터 임상 시험 단계까지 600종 이상의 다양한 올리고뉴클레오타이드 파이프라인을 활발히 개발하고 있음(AlShaer 등, 2026; DelveInsight Business Research LLP, 2026).
- 올리고뉴클레오타이드(Oligonucleotide) 치료제는 희귀 질환에 국한되지 않고, 만성 대사 질환(심혈관계, 비만 등)이나 신경계 질환 등으로 적응증을 넓히며 차세대 블록버스터 신약으로 급성장 중임(WXpress, 2026).
- 그러나 Oligonucleotide 약물에는 20종 이상의 불순물이 존재하며, <표>에서처럼 Phosphodiester bond modification, Sugar ring modification, Base modification 등의 불순물과 더불어 뉴클레오타이드 변형 또는 첨가 불순물(일반적으로 "n-1" 또는 "n+1" 불순물)이 제시되고 있어 환자의 안전성에 위협이 되고 있음(Zhou 등, 2025).

<표> FDA가 승인한 24개의 올리고뉴클레오타이드 치료제(1998-2025)에 대한 개요

	1998	2004	2013	2016	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025
Cytomegalovirus retinitis	<i>Fomivirsen</i>											
Macular degeneration		<i>Pegaptanib</i>										
Homozygous familial hypercholesterolemia			<i>Mipomersen</i>									
DMD (Exon 51, 53, 54)				<i>Eteplirsen</i>			<i>Golodirsen</i>	<i>Viltolarsen</i>	<i>Casimersen</i>			
Hepatic				<i>Defibrotin</i>								

veno-occlusive disease		de	
Spinal muscular atrophy		Nusinersen	
Hereditary Transthyretin Amyloidosis (hATTR)		Patisiran Inotersen	Vutrisiran Eplontersen
Hepatic porphyria		Givosiran	
Primary hyperoxaluria type 1		Lumasiran	Nedosiran
Hypercholesterolemia		Inclisiran	
Geographic atrophy (GA-AMD)			Avacincaptad pegol
Amyotrophic lateral sclerosis			Tofersen
Myelodysplastic syndromes (MDS)			Imetelstat
Familial chylomicronemia syndrome (FCS)			Olezarsen Plozasiran
Hereditary angioedema (HAE)			Donidalsen
Hemophilia A or B			Fitusiran

2) Nucleic acid therapy therapy와 Oligonucleotide 의 차이점

- 핵산 치료제(Nucleic acid therapy)와 올리고뉴클레오타이드 치료제(Oligonucleotide therapy)는 유전 정보를 활용해 질병을 치료한다는 핵심 목적은 같지만, 사용되는 분자의

크기와 범위에서 차이가 있음. 두 용어의 주요 차이점은 다음의 <표>와 같이 요약할 수 있음(Egli 등, 2023; Kulkarni 등, 2021).

<표> 핵산 치료제와 올리고뉴클레오타이드 치료제의 주요 차이점 요약

구분	핵산 치료제 (Nucleic Acid Therapy)	올리고뉴클레오타이드 치료제 (Oligonucleotide Therapy)
개념의 범위	• 넓은 의미 (RNA, DNA를 이용한 모든 치료 기술 포괄)	• 좁은 의미 (특정 길이의 합성 핵산 서열만을 지칭)
분자 크기	• 짧은 단편부터 완전한 길이에 이르기까지 다양함 (mRNA, 플라스미드 DNA 등 포함)	• 보통 30 염기쌍(base pair) 미만의 짧은 합성 서열
주요 종류	• ASO, siRNA, mRNA 치료제, RNA aptamer 등	• ASO, siRNA, RNA aptamer 등

3) 핵산치료제의 종류와 작동기전

① 종류와 작동기전

- 여기서는 핵산치료제(Nucleic acid therapy)와 올리고뉴클레오타이드 치료제(Oligonucleotide therapy)의 구분 없이 핵산치료제로 명명하며 종류와 작동원리는 <표>와 같음(Sun 등, 2024; Naeem 등, 2025; Liu 등, 2025; Bege 등, 2022; Driscoll 등, 2025; Zhou 등, 2017; Driscoll 등, 2025).

<표> 핵산치료제의 개념과 작동원리

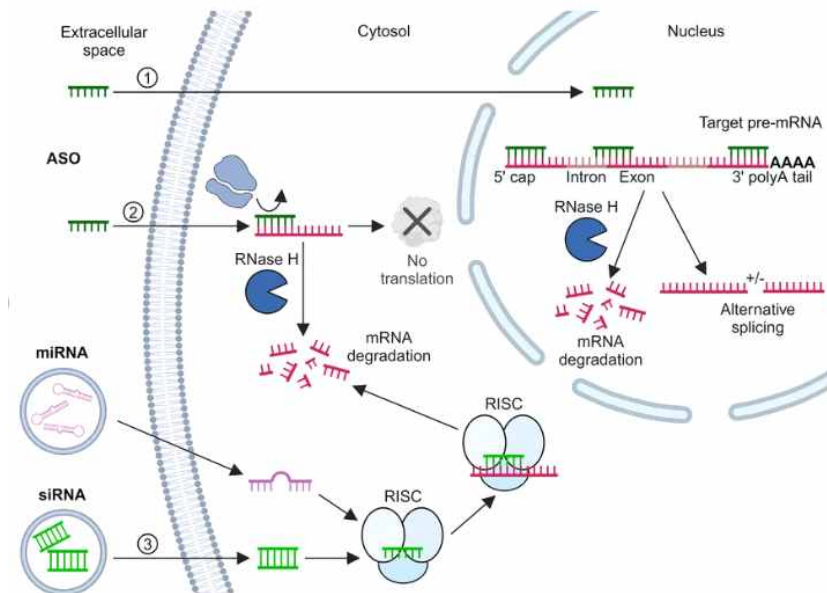
핵산치료제	치료 개념	작동원리
mRNA (messenger RNA)	<ul style="list-style-type: none"> 세포핵 안으로 들어갈 필요 없이 세포질 내 리보솜에서 단백질을 직접 생성하도록 설계된 차세대 신약 플랫폼임. 코로나19 백신으로 그 효과와 안전성이 입증되었으며, 현재 암 백신, 희귀질환, 감염병 치료제 등으로 개발이 활발히 진행 중. 	<ul style="list-style-type: none"> 설계 및 전달: 치료하고자 하는 질환의 원인(예: 암세포의 변이 항원)을 표적하는 유전 정보(mRNA)를 디자인함. 이 mRNA를 지질 나노입자(LNP) 등으로 감싸 세포 내로 안전하게 전달. 단백질 생성: 세포질에 도달한 mRNA는 세포 내 소기관인 리보솜을 만나 몸에 필요한 단백질을 직접 만듦. 면역 반응 및 치료: 생성된 단백질은 체내 면역계를 자극(암 백신)하거나, 부족한 단백질을 보충(희귀질환 치료제)하여 질병을 치료함.
siRNA	<ul style="list-style-type: none"> Small interfering RNA, 짧은 간섭 RNA 질병의 근본 원인이 되는 특정 단백질이 생성되기 전 단계인 메신저 RNA(mRNA)를 분해하여 유전자 발현을 차단하는 차세대 핵산 치료제 	<ul style="list-style-type: none"> 질병 유발 차단: 20~25개의 뉴클레오타이드로 구성된 이중가닥 RNA가 질병 유전자와 결합하여 mRNA를 절단함. 세포 내 기전: 세포질 내로 전달된 siRNA는 RISC(RNA 유도 침묵 복합체)와 결합한 뒤, 가이드 가닥만 남아 표적 mRNA를 파괴함.
miRNA	<ul style="list-style-type: none"> Micro RNA 전사 후 수준에서 유전자 발현을 조절하는 작고 비암호화 RNA 분자임. 올리고뉴클레오타이드 치료에서, miRNA는 암과 대사 장애 같은 복잡한 질환을 치료하는 강력한 치료 표적이나 도구로 부상하고 있음 	<ul style="list-style-type: none"> miRNA 기반 올리고뉴클레오타이드 치료에는 두 가지 주요 접근법이 있음. miRNA 억제(anti-miRNA/Antagomirs): 특정 miRNA가 질병 상태에서 과발현(oncomiRs)될 때 사용됨. 합성 항-miRNA 올리고뉴클레오타이드(AMO, anti-miRNA oligonucleotide)는 표적 miRNA를 완벽하게 보완하고 격리하도록 설계되어 건강한 유전자를 침묵시키는 능력을 차단함. miRNA mimics(miRNA 모방, Agomirs): 자연적으로 발생하는 보호성 miRNA를 모방하도록 설계된 합성 이중가닥 RNA 분자임. 종양 억제 miRNA(tumor-suppressing miRNA)가 소실된 암과 같은 질환에서, 이러한 모방체를 도입하여 기능을 회복시키고, 종양 유전자를 억제하며, apoptosis를 촉진함

ASO	<ul style="list-style-type: none"> Antisense oligonucleotide 특정 유전자의 발현을 변화시키기 위해 짧고 합성된 핵산(DNA 또는 RNA) 가닥을 사용하는 혁신적인 유전 의학 분야임. 단백질을 표적으로 하는 전통적인 약물과 달리, ASO는 RNA 수준에서 질병을 유발하는 단백질의 생성을 교정, 차단 또는 감소시키는 역할을 함. 	<ul style="list-style-type: none"> ASO는 특정 표적 메신저 RNA(mRNA) 또는 프리-mRNA에 완벽하게 매칭되고 결합하도록 설계되었음. 결합 후에는 다음 메커니즘 중 하나를 통해 작동함 mRNA 분해 & 유전자 침묵(mRNA Degradation (Gene Silencing): ASO(주로 "gapmers"로 설계됨)는 표적 mRNA에 결합하여 DNA-RNA 하이브리드 구조를 형성함. 이 구조는 RNase H1이라는 천연 세포 효소에 의해 인식되며, 이 효소는 표적 mRNA를 절단하고 파괴함으로써 질병을 유발하는 단백질의 생성을 효과적으로 차단함. 스플라이싱 조절(Splicing Modulation): 일부 ASO(스플라이스 전환 올리고뉴클레오타이드)는 RNA를 파괴하지 않음. 대신, 프리-mRNA에 결합하여 편집 방식을 변경함으로써, 세포가 유전자의 결합 있는 부분을 건너뛰거나 기능적인 단백질을 생성할 수 있도록 함. 입체적 차단(Steric Blocking): ASO는 특정 서열에 물리적으로 결합함으로써 다른 세포 기전이 RNA에 접근하는 것을 차단하여, 비정상적인 단백질의 번역이 일어나지 않도록 방지함.
Aptamer	<ul style="list-style-type: none"> Aptamer 핵산 치료법은 복잡한 3차원 구조로 접히도록 설계된 짧은 단일 가닥 DNA 또는 RNA 분자(올리고뉴클레오타이드)로 구성된, 새롭게 부상하고 있는 표적 치료법 기존의 서열 기반 치료법과 달리, Aptamer는 마치 열쇠가 자물쇠에 들어가는 것처럼, 고유한 3차원 형태를 바탕으로 질병을 유발하는 단백질이나 세포와 같은 특정 표적을 인식하고 결합함. 	<ul style="list-style-type: none"> Aptamer는 표적 분자에 결합하여 그 기능을 억제하거나, 유해한 수용체를 차단하거나, 다른 약물을 병든 세포로 직접 운반하는 매우 정밀한 "전달체" 역할을 함. Aptamer는 주로 다음 세 가지 방식으로 사용됨. 직접 치료제(Direct Therapeutics): 질병을 유발하는 분자에 결합하여 무력화하는 독립형 약물로 작용합니다(예: 눈 내부의 새로운 혈관 생성을 차단). Aptamer-약물 접합체(ApDCs, Aptamer-Drug Conjugates): 항암제와 같은 치료용 약물을 부착한 표적 전달체 역할을 하며, 특정 표적에 도달했을 때만 약물이 방출됨. 애포머-올리고뉴클레오타이드 키메라(Aptamer-Oligonucleotide Chimeras): 다른 핵산 기반 약물(siRNA 또는 miRNA 등)을 특정 세포 유체내의 유전자 발현을 조절하는 대표적인 RNA 기반 치료 기술형으로 유도하여 질병을 유발하는 유전자의 발현을 억제함.
Mimic & Antagomir	<ul style="list-style-type: none"> 모방 (Mimics): 감소된 특정 miRNA의 기능을 보충하여, 질환으로 인해 억제된 유전자를 정상화하고 치료 효과를 내는 물질. 안타고미르 (Antagomirs): 과발현되어 질환을 유발하는 특정 miRNA에 결합해 이를 분해하거나 기능을 억제하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드임 	<ul style="list-style-type: none"> 핵산 치료제(Nucleic acid therapy)에서 모방(Mimic)과 안타고미르 (Antagomir)는 체내의 유전자 발현을 조절하는 대표적인 RNA 기반 치료 기술로 다음과 기술의 핵심 특징. 화학적 변형: 자연 상태의 RNA는 체내 효소에 의해 쉽게 분해됨. 이를 극복하기 위해 당이나 염기 구조를 변형(예: LNA)하여 안정성과 세포 흡수율을 높임 정밀한 서열 조절: 키랄 제어(Chiral control) 등의 합성 기술을 통해 표적에만 정확하게 작용하도록 중합체 패턴을 제어함

② 핵산치료제의 예시:

- <그림>에서 (1) 세포외 공간에 존재하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 세포막과 핵막을 모두 통과하여 핵으로 들어감. 핵 내에서 ASO는 표적 pre-mRNA의 다양한 부위에 결합할 수 있음: 5' 캡 부위에 결합하여 mRNA 성숙에 필수적인 캡 구조의 형성을 방해하거나, 폴리 A 꼬리 부위에 결합하여 mRNA의 안정성과 처리 과정을 방해하거나, 스플라이싱 부위에 결합하여 스플라이싱 과정을 방해하고 비정상적인 mRNA 형성을 유발할 수 있음. 각 경우에서, ASO 결합은 리보뉴클레아제 H(RNaseH)의 기질을 생성하며, RNaseH는 ASO-RNA 이중가닥을 인식하고 RNA 가닥을 절단하여 궁극적으로 표적

pre-mRNA의 분해를 초래함. ASO는 또한 pre-mRNA의 대체 스플라이싱을 촉진하는 영역에 결합하여, 일부가 잘린 전사체나 심지어 유리한 엑손이 추가된 전사체를 생성할 수도 있음. 또는, (2) ASO가 세포 외막을 통과하여 세포질로 들어가 표적 mRNA에 결합함으로써 리보솜의 부착을 방해하고 단백질 번역을 차단할 수도 있음. 세포질 내에서 형성된 ASO-RNA 이중가닥은 RNase H에 의한 분해에도 취약함. (3) 소형 간섭 RNA(siRNA)와 마이크로RNA(miRNA)는 일반적으로 바이러스, 지질, 나노입자 또는 기타 전달 시스템을 이용하여 세포 외막을 통과해 세포질로 들어감. siRNA의 경우, 세포 내부로 들어간 후 siRNA 가닥이 분리되고, 한 가닥은 RNA 유도 침묵 복합체(RISC)에 통합됨. 이 복합체는 siRNA를 가이드로 사용하여 표적 mRNA상의 상보적인 서열을 인식함. 결합이 이루어지면 RISC는 mRNA를 절단하여 분해를 유도하고 단백질 합성을 차단함. 마찬가지로, miRNA도 처리 과정을 거쳐 최종적으로 성숙 miRNA가 RISC에 통합되며, 이는 표적 mRNA 분해를 위한 주형 역할을 함(Lauffer 등, 2024; Chen 등, 2024).



<그림> ASO 및 siRNA의 작용 기전.

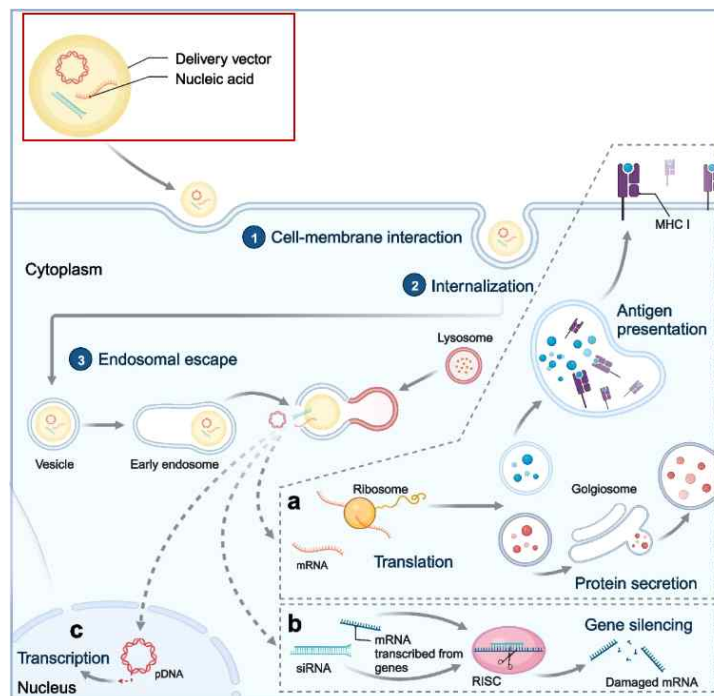
2. 핵산치료제의 독성학적 기전 이해를 위한 전달체(Delivery System)

1) 필요성

- 노출된 핵산은 스스로 세포에 쉽게 들어갈 수 없으며 이들은 혈액 내에서 빠르게 분해되어 면역 반응을 유발함. 이들은 지질 나노입자(LNP, lipid nanoparticle), 폴리머(polymer), 바이러스 벡터(예: AAV)와 같은 특수 전달 벡터에 캡슐화되어야 함.

2) 전달체(Delivery System)의 종류

- 기전: <그림>은 세포 내 나노입자의 이동 경로 및 작용 기전을 나타낸 개략도로 나노입자가 세포와 접촉하면 세포막에 의해 인식되어 세포 내로 흡수됨(Qin 등, 2023).



<그림> 세포 내 나노입자의 이동 경로 및 작용 기전을 나타낸 개략도. 나노입자가 세포와 접촉하면 세포막에 의해 인식되어 세포 내로 흡수된다. 세포 내부에서 리소좀-엔도솜 시스템이 나노입자를 포획하고, 그 후 나노입자가 운반하는 화물이 방출된다. **a** mRNA는 세포질 내 리보솜에 의해 번역되며, 그 결과 생성된 단백질은 골지체에서 분비를 위해 가공되거나 항원으로 제시될 수 있다. **b** siRNA는 세포질 내 RNA 유도 침묵 복합체(RISC)와 결합하여 유전자에서 전사된 mRNA의 번역을 억제한다. **c** pDNA는 핵막을 통과하여 세포핵 내에서 전사 과정을 거친다.

- 비바이러스성 벡터(Nanoscale non-viral vectors)의 발전과 종류:** 그러나 나노 규모의 비바이러스성 벡터는 등장한 이래 큰 관심을 불러일으켜 왔음. 나노물질은 크기가 작으며(수 나노미터에서 수백 나노미터), 표면적 대 부피 비율이 큼. 이러한 독특한 특성 덕분에 다른 물질을 효율적으로 운반하고 흡수할 수 있으며, 새로운 약물 전달 시스템을 구축하기 위한 소재의 원천이 되고 있음. <Figure 2>에서처럼 리포솜, 고분자 나노입자(NPs), 무기 나노입자, 덴드리머(dendrimers), DNA/RNA 나노구조체(nanostructures) 등을 포함하여 다양한 유형의 나노캐리어가 NA 전달에 사용되어 왔음(Weng 등, 2020; Kim 등,

2023).

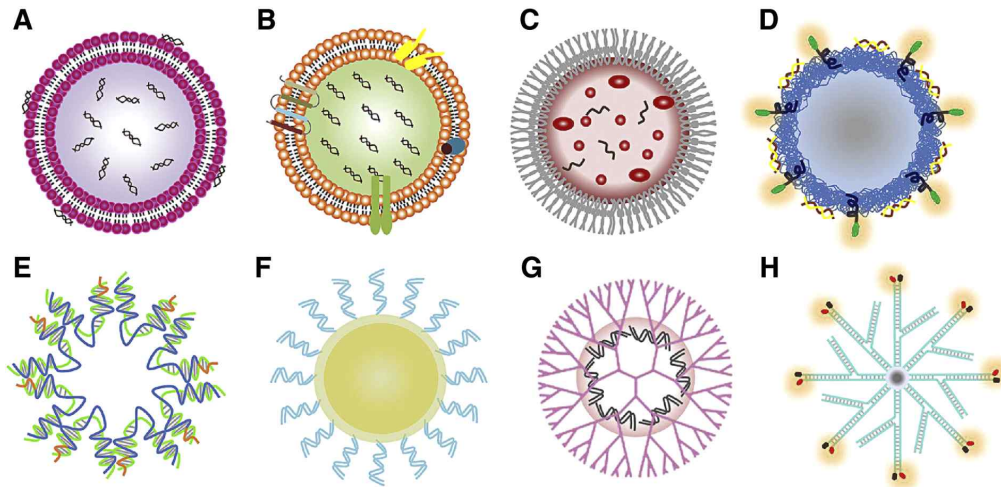


Figure 2. Scheme of Representative Nanocarriers Used for NA Therapy: (A) Liposome; (B) exosome; (C) bacterial-derived nanocell; (D) polymeric NP; (E) DNA nanostructure; (F) inorganic NP; (G) dendrimer-based NP; and (H) RNA nanostructure.

3) 전달체의 특징

- 핵산 치료용 캡슐화 방법은 주로 mRNA, siRNA, 플라스미드 DNA와 같은 취약한 분자가 혈류 내에서 분해되는 것을 방지하고, 표적 세포로의 안전한 전달을 돕는 데 중점을 둠. 가장 일반적인 접근 방식은 정전기적 상호작용과 지질 화학을 활용하여 나노입자를 형성하는 것으로, 전통적인 리포솜부터 첨단 미세유체 조립 기술에 이르기까지 다양함 (Tanaka 등, 2025; Hong 등, 2024; Mendes, 등, 2022; Ying 등, 2026; Cao 등, 2026)

<표> 핵산치료제의 전달체 종류와 기전

전달체	전달기전
지질 나노입자(Lipid Nanoparticle)	<ul style="list-style-type: none"> • LNP는 핵산 전달의 표준으로, mRNA 백신에 널리 활용되는 것으로 잘 알려져 있음. LNP는 핵산이 지질 혼합물과 복합체를 형성하는 코어-셸 구조로 이루어져 있음 • 이온화 가능한 지질(Ionizable Lipids): 이러한 지질은 산성 pH에서는 양전하를 띠지만(캡슐화 과정에서 음전하를 띤 핵산과 결합하기 위함), 생리학적 pH에서는 중성이 되어 독성을 줄여 줌. • 사전 형성 소포법(Preformed Vesicle Approach, PFV): 빈 리포솜(대형 단층 소포)을 에탄올과 불안정화제 존재 하에 핵산과 함께 배양하여, 화물을 내부에 가두는 방법 • 계면활성제-투석법(Detergent-Dialysis): 이 방법에서는 계면활성제를 사용하여 지질을 용해시킵니다. 투석을 통해 계면활성제가 서서히 제거됨에 따라, 지질이 핵산 주위에 자가 조립되어 안정화된 구조를 형성함. • 포장 후 방법(Post-Encapsulation): 핵산을 미리 형성된 빈 LNP와 함께 배양하는 단순화된 방법. 핵산은 표면에 흡착된 후, 입자 간 융합 과정을 통해 LNP 내부로 흡수됨.
고분자 나노입자 (PLGA Nanoparticles)	<ul style="list-style-type: none"> • PLGA 나노입자(PLGA Nanoparticles): Poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)은 생체 내에서 무해한 젖산과 글리콜산으로 분해됨. PLGA는 음전하를 띠기 때문에, 캡슐화는 일반적으로 물/유/물(W/O/W) 유화법을 이용하여 핵산 물질을 코어 내에 가두거나, 양전하를 띤 마이크로비드를 사용하여 캡슐화 효율을 높임. • Polyplexes(폴리플렉스): 음전하를 띤 핵산과 폴리에틸렌이미드(PEI)와 같은 양이온성(양전하를 띤) 고분자가 자발적인 정전기적 응축을 통해 형성됨.

캡슐화를 위한 혼합기 (Mixing Technologies for Encapsulation)	<ul style="list-style-type: none"> ● 캡슐화의 효율과 확장성은 제형화 과정에서 사용되는 혼합 기술에 크게 좌우됨 • 미세유체 기술(Microfluidics): 미세채널 내부의 층류(유선형) 혼합을 이용하여 나노입자의 핵형성과 성장을 제어함. 이를 통해 배치 간 재현성이 뛰어나며 입자의 다분산성을 제한할 수 있음. • 배치 방식 / T-피스 믹서(Batch Methods / T-Piece Mixers): 표준 벌크 혼합 기술입니다. 비용 효율적이지만, 배치 반응기 내의 난류 혼합은 나노입자 크기의 변동성을 증가시킬 수 있음. • 진동 / FDmiX 기술(Oscillation / FDmiX Technology): 일부 플랫폼은 지질 및 핵산 유동을 순간적이고 균일하게 혼합하기 위해 표적 진동을 사용하며, 이는 cGMP 등급 제조에 유용함.
고급 전달 개질(Advanced Delivery Modifications)	<ul style="list-style-type: none"> ● 나노입자가 간이나 면역계에 의해 제거되지 않고 특정 조직에 도달하도록 보장하기 위해 다음과 같은 특정 개질이 적용됨. • PEG화(PEGylation): 표면을 polyethylene glycol(PEG)로 코팅하면 면역계에 의한 급속한 제거를 방지하고 순환 시간을 개선하는 데 도움이 됨. • 표적 리간드(Targeted Ligands): 항체, 펩타이드(예: galac peptides) 또는 저분자를 LNP/고분자 표면에 접합시켜 표적 세포(예: 암세포)의 수용체에 특이적으로 결합하도록 할 수 있음.

4) 전달체 독성

- 핵산 치료의 캡슐화 독성 주로 이물질에 대한 면역 반응과 간, 신장 같은 장기에 전달 운반자가 비표적으로 축적되면서 발생함.
- 전달체에 핵산(예: mRNA, siRNA, ASO)을 캡슐화하는 동안, 지질 나노입자(LNP) 또는 바이러스 벡터는 약물의 분해로부터 보호하는 데 필수적이며, 이러한 운반체와 변형은 의도치 않게 <표>와 같은 독성과 부작용을 유발할 수 있음(Kumar 등, 2021; Li 등, 2022; Roy 등, 2025; Xu 등, 2011).

표적 독성	핵심 내용	기전
면역 및 염증 반응	선천면역 활성화	<ul style="list-style-type: none"> • 변형되지 않았거나 부적절하게 캡슐화된 외인성 RNA는 신체 면역 체계에 의해 바이러스나 박테리아 침입자로 인식될 수 있음. 이로 인해 사이토카인 분비가 촉진되어 염증이나 독감 유사 증상이 나타남(Mittra 등, 2012; Prajapati 등, 2021).
	바이러스 매개체 위험	<ul style="list-style-type: none"> • 그 동안 아데노 관련 바이러스(AAVs) 유전자 치료에 매우 효과적이며, 심각한 선천 면역 반응과 고용량 시 치명적인 부작용과 연관되어 있음(Kumar 등, 2021).
	PEG 관련 부작용	<ul style="list-style-type: none"> • 널리 쓰이는 지질 나노입자(LNP)의 구성 성분인 PEG(폴리에틸렌글라이콜)는 알레르기 반응(아나필락시스 등)을 유발할 수 있음(Crisafulli 등, 2023).
간독성	장기 축적	<ul style="list-style-type: none"> • 정맥 주사 후에는 양이온성 지질과 고분자 같은 비바이러스성 전달 벡터가 자주 축적됨 간 그리고 비장(Xu 등, 2011).
	세포 스트레스	<ul style="list-style-type: none"> • 간세포 내에 나노입자와 특정 화학적 변형(예: 잠긴 핵산, LNA)이 지속적으로 축적되면 급성 간 손상을 일으킬 수 있음(Liu 등, 2025; Wu 등, 2022).
신장 독성	신장 통과 및 손상	<ul style="list-style-type: none"> • 핵산 치료제와 그 운반체는 분자 구조와 작은 크기 때문에 신장에 의해 빠르게 제거됨. 높은 조직 농도와 특정 고친화력 골격 화합물질(예: 가머)은 인간 임상시험에서 급성 신장 손상을 유발하는 것으로 나타났음.(Goyenvalle 등, 2023)
표적에서 벗어난 효과 및 세포독성	의도치 않은 유전자 침묵	<ul style="list-style-type: none"> • 전달이 국소화되지 않으면 치료용 핵산이 건강한 세포나 면역 세포에 흡수되어 중요한 유전자가 의도치 않게 침묵될 수 있음(Sun 등, 2024; Ranjbar 등, 2023).
	보균자 독성	<ul style="list-style-type: none"> • LNP에 사용되는 양이온성(양전하) 지질은 건강한 세포막과 혈청 단백질과 부정적으로 상호작용하여 서열 독립적 세포독성을 초래할 수 있음(Jurgielewicz 등, 2021; Naeem 등, 2024).

3. 핵산치료제의 불순물의 생성 범주

- ASO, siRNA, mRNA 등을 포함한 핵산치료제는 안전성과 효능을 보장하기 위해 엄격한 불순물 프로파일링이 필요함. 순도에 미세한 변동만 있어도 효능 저하, 면역원성 증가, 비표적 독성 등 심각한 문제가 발생할 수 있음. 합성 핵산 치료제에서 흔히 발견되는 불순물은 다음과 같은 몇 가지 주요 범주로 나뉨(Alvaro, 2026; USFDA, 2020; Zhou 등, 2025; Creative biolab, 2026).

① **공정 관련 불순물(Process-Related Impurities):** 이러한 불순물은 화학 합성, 정제 또는 벡터 생산 단계에서 발생함(Zhou 등, 2025).

- **단축되거나 연장된 서열(n-1, n+1 메르)(Truncated or elongated sequences (n-1, n+1 mers)):** 고상 합성에서 가장 흔한 부반응은 뉴클레오티드가 결합되지 못하거나(하나가 누락되어 n-1이 됨) 잘못 추가되어(n+1) 발생하는 경우(Akita 등, 2026).
- **공정 오염 물질(Process contaminants):** 여기에는 세포 생산 플랫폼에서 유래한 잔류 숙주 세포 DNA(hcDNA)(AAV와 같은 바이러스 벡터 유전자 치료에서 주요 우려 사항), 내독소 및 반응하지 않은 시약이 포함됨(Hsin-I Jen 등, 2025; Sundar 등, 2025; USFDA, 2020; Creative biolab, 2026).

② **제품 관련 구조적 변이(Product-Related Structural Variants):** 이는 서열은 유사하지만 구조적으로 차이가 있는 분자들을 말함.

- **백본 및 변형 오류(Backbone & modification errors):** 의도된 포스포로티오에이트(PS) 결합 대신 phosphodiester 결합 불순물이 존재하거나, 당/뉴클레오베이스 변이가 발생하는 경우임(Talap 등, 2021; Uchida 등, 2021; Zhou 등, 2025, Creative biolab, 2026).
- **mRNA 캡핑 및 무결성 문제(mRNA capping & integrity issues):** mRNA 치료제에서는 부적절한 5'-capping, 단축된 폴리(A) 꼬리, 이중가닥 RNA(dsRNA) 오염 물질이 발생할 수 있음. 특히 dsRNA는 심각한 면역 반응을 유발할 수 있음(Alvaro, 2026; Creative biolab, 2026).

4. Oligonucleotide 치료제의 불순물 종류와 특징

1) 불순물 종류의 20 종류

- 치료용 올리고뉴클레오타이드에는 종종 20가지 이상의 다양한 제품 관련, 시약 유래 및 분해 불순물이 포함되어 있음. 이러한 불순물은 일반적으로 고상 포스포라미다이트 합성 (solid-phase phosphoramidite synthesis), 불완전한 탈트릴화/캡핑, 산화/황화 부반응 (incomplete detritylation/capping, oxidation/sulfurization side-reactions) 또는 보관 과정에서 발생함. **합성 올리고뉴클레오타이드 의약품에서 가장 두드러지는 20가지 불순물**은 그 기원에 따라 크게 다음과 같이 분류됨(Zhou 등, 2025; Kaufmann 등, 2024; Uchida 등, 2026).

① Deletion and Addition Sequences (Synthesis Failures)-삭제 및 추가 서열 (합성 실패)

- 이는 비효율적인 커플링, 캡핑 실패, 또는 미반응 부위의 차단 실패로 인해 발생
 1. **n-1 불순물**: 정확히 하나의 뉴클레오타이드가 누락된 사슬.
 2. **n-x 불순물(Shortmers)**: 단계별 수율이 불완전하여 여러 개의 뉴클레오타이드가 누락된 사슬.
 3. **n+1 불순물(Longmers)**: 우발적으로 뉴클레오타이드가 하나 추가된 사슬(예: 불량한 캡핑으로 인해).
 4. **n+x 불순물**: 우발적으로 염기가 여러 개 추가된 사슬.
 5. **염기 특이적 결실(Base-Specific Deletions)**: n-A, n-C, n-G 또는 n-U/T와 같이 특정 뉴클레오타이드에 집중된 결실.

② Sugar and Backbone Modification Impurities-당 및 백본 변형 불순물

6. **아푸린/아피리미딘 부위(Apurinic / Apyrimidinic Sites)**: 뉴클레오베이스가 소실되어 불안정한 무염기 부위가 남은 탈중합 생성물.
7. **2', 5'-결합 이성질체(2', 5'-Linked Isomers)**: 뉴클레오타이드 결합이 표준 3' 위치 대신 2' 위치에서 발생하는 잘못된 분지 구조(특히 RNA 합성에서 흔히 발생).
8. **3', 3' 또는 5', 5' 결합 올리고뉴클레오타이드(3', 3' or 5', 5' Linked Oligonucleotides)**: 잘못된 방향의 결합으로 인해 발생하는 구조적 이성질체.
9. **포스포디에스테르(PO, Phosphodiester) 불순물**: 황 원자가 산소로 치환된 phosphorothioate(PS) 올리고뉴클레오타이드에서 발견됨.
10. **입체이성질체(디아스테레오이머)(Stereoisomers (Diastereomers))**: PS 백본 내 키랄인 중심에서 Rp 및 Sp 배열의 변이.

③ 염기 변형 불순물 - Base Modification Impurities

11. **시아노에틸화 티민(Cyanoethylated Thymine)**: 보호기 제거 과정에서 빈번하게 생

성되며, 천연 티민을 대체하는 미반응 아크릴로니트릴 부가물(acrylonitrile adducts).

12. 탈아민화된 염기(Deaminated Bases): 아데닌, 구아닌 또는 시토신의 아민기가 산소로 변환되어 각각 하이포크산틴, 크산틴 또는 우라실을 형성하는 가수분해 생성물.

13. 아세틸화되거나 이소부티릴화된 염기(Acetylated or Isobutyrylated Bases): 천연 염기를 차단하는 제거되지 않은 보호기(예: diaminopurine in place of guanine).

14. 메틸화 또는 알킬화 불순물(Methylated or Alkylated Impurities): 변형된 당의 2'-위치에서 흔히 형성되는 원치 않는 O-알킬 또는 O-알콕시알킬 부가물.

15. 산화 구아닌 (Oxidized Guanine, Spiroiminodihydantoin): Guanosine의 산화로 인해 발생하는 분해 생성물.

④ 시약 및 공정 유래 불순물 - Reagent & Process-Derived Impurities

16. 아크릴로니트릴 부가물(Acrylonitrile Adducts): 시아노에틸 인산염 보호기의 반응 부산물이 포획된 것.

17. 포스포아미데이트(Phosphoramidates): 절단 또는 보호기 제거 과정에서 형성되는 원치 않는 2차 아마이드 결합.

18. 아미노 링커 중간체(Amino Linker Intermediates): 서열에 공유 결합으로 고정되는 전구체 분자 또는 scavengers(예: hydroxyproline-based linkers에서 유래)(Liang 등, 2024; Kaufmann 등, 2024)

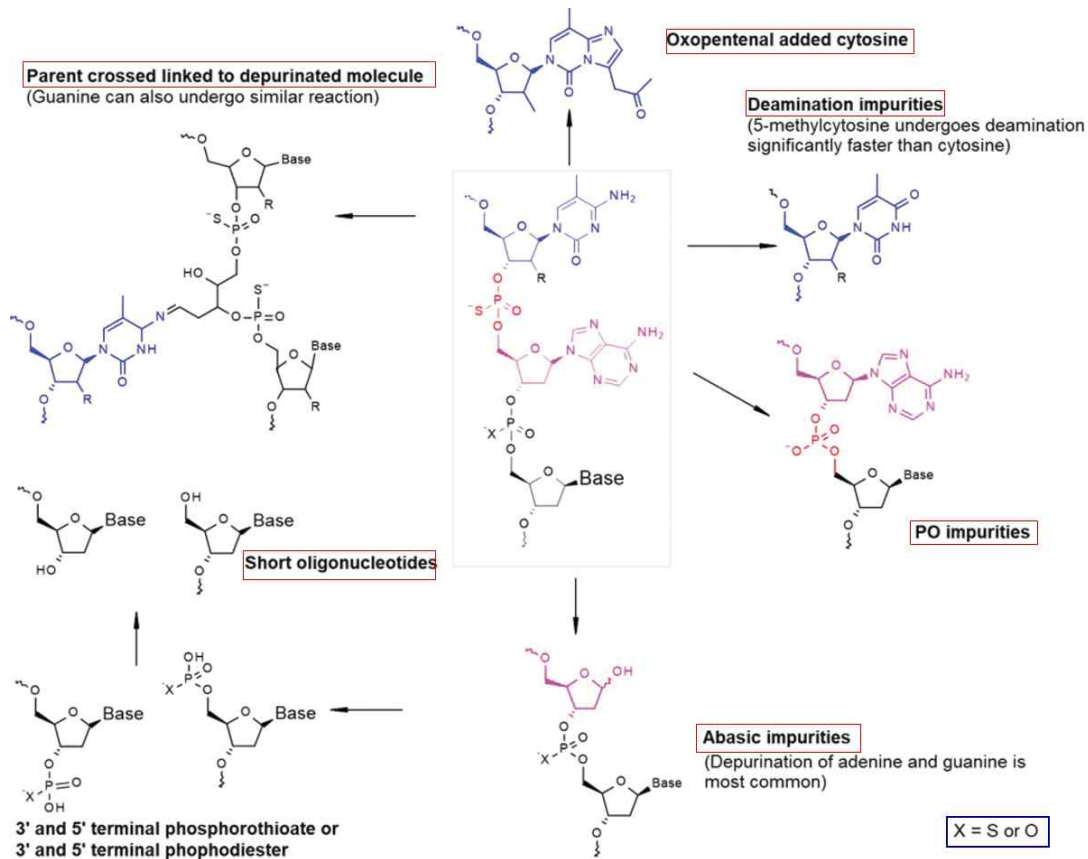
⑤ 분해 불순물 - Degradation Impurities

19. 가수분해 단편(Hydrolyzed Fragments): 시간이 지남에 따라 뉴클레오타이드 간 포스포디에스테르 결합(internucleotide phosphodiester)이 절단되어 형성된 더 짧은 사슬.

20. 산화 올리고뉴클레오타이드(Oxidized Oligonucleotides): 보관 중 주변 산소나 반응성 물질로 인해 서열이 변형되어 생물학적 활성이 불안정해진 것.Liang 등, 2024; Capaldi 등, 2017; Uchida 등, 2026; Samoilov 등, 2026)

2) 분해 불순물(Degradation Impurities)의 예시

- Oligonucleotide 올리고뉴클레오타이드의 분해 경로를 여러 가지가 있지만 열 스트레스 (temperature stress, TS) 동안 발생하는 잠재적 분해 생성물의 맥락에서 다음과 같이 개요가 제시됨.
- 고온에서 생성되는 분해 생성물의 안정성 프로파일과 특성은 올리고뉴클레오타이드의 화학적 구조, 서열, 의약품 제형, 부형제, 제조 공정 및 보관 조건에 따라 달라짐. 많은 올리고뉴클레오타이드에서 공통적으로 나타나는 여러 화학적 특징과 관련 분해 경로가 있으며, TS 동안 형성되는 분해 생성물은 일반적인 열 스트레스 연구에서 관찰되는 것과 유사함. 이러한 경로들은 TS 개발 과정 중 제품 품질 모니터링 전략을 수립하는 데 유용한 정보를 제공할 수 있으므로 논의할 가치가 있습니다. <그림>은 포스포로티오에이트 백본과 리보스 및 데옥시리보스 기반 당을 가진 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드(a single-stranded oligonucleotide with a phosphorothioate backbone and ribose- and deoxyribose-based sugars)의 분해 경로를 보여 주며, 이러한 특징은 많은 치료용 올리고뉴클레오타이드에서 보편적으로 나타나는 불순물임(Decolibus 등, 2023; Labmate, 2013).

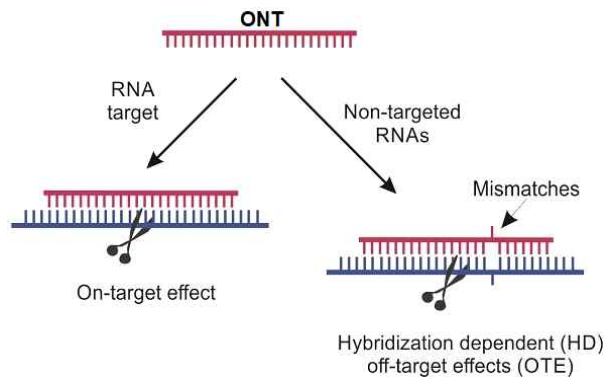


<그림> 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 일반적인 분해 생성물(Decolibus 등, 2023)

5. Oligonucleotide 또는 핵산치료제의 독성과 안전성 문제와 예시

1) 핵산치료제의 독성과 안전성

- 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드 치료제는 표적 세포에 효율적으로 전달하는 문제 외에도, 하이브리드화 특이성(hybridization specificity)도 대단히 중요함. <그림>에서처럼 hybridization이 이루어졌지만 정확하게 결합된 on-target과 미스매치(mismatches)에 의한 off-target 새타차소가 발생함. 단단한 결합을 보장하기 위해 일반적인 올리고뉴클레오타이드 치료제는 고유한 표적 서열의 15-25개 뉴클레오타이드 스트레칭에 하이브리드다이즈가 이루어짐. 그러나 이러한 길이의 잡종은 생리학적 조건에서 하나 이상의 불일치를 견디는데, 이를 친화력/특이성 딜레마로 알려져 있음. 올리고뉴클레오타이드 치료제는 하이브리드화 의존적 오프타겟 효과(off-target toxicity)를 시험관 내 동물 모델 및 임상 연구에서 분석하여 이 문제의 규모를 평가하게 됨(Nedorezova 등, 2022).

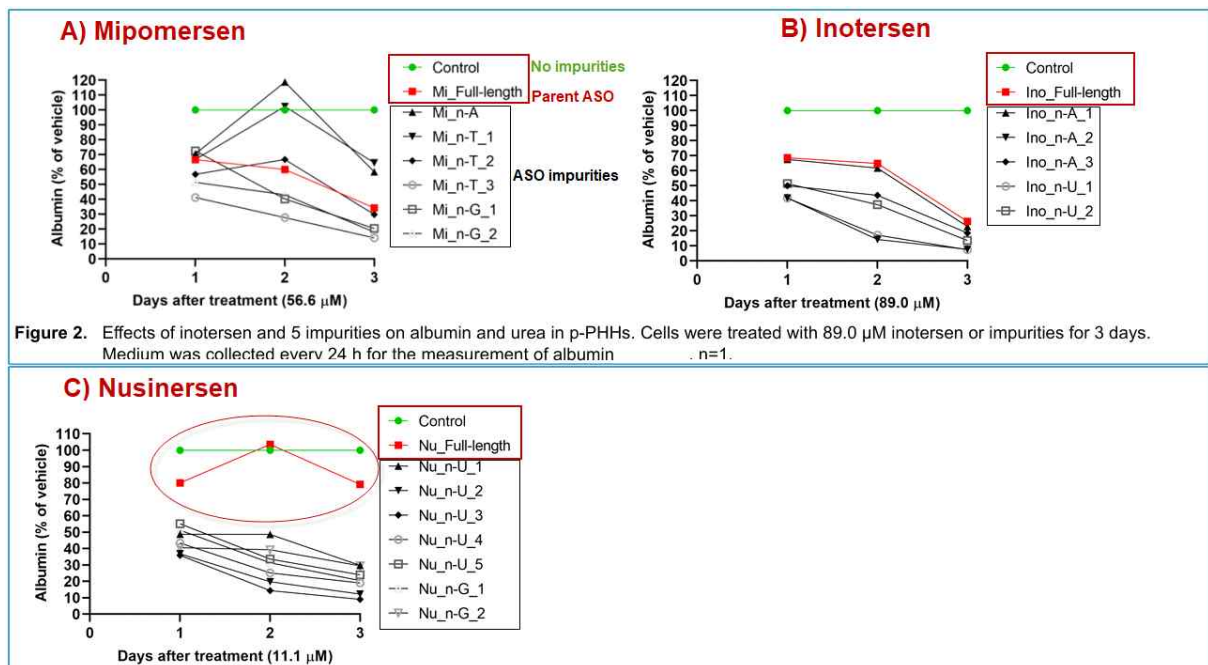


<그림> 올리고뉴클레오타이드 치료제의 on-target 및 off-target effect

- 핵산치료제 및 올리고뉴클레오타이드 치료제의 안전성 문제는 다음과 같은 여러 영역으로 분류될 수 있음(Kazushige 등, 2020; Rohde 등, 2023; Andersson 등, 2022; Biomere, 2025; Hawes 등, 2022).
 - 표적 독성(On-Target Toxicity):** 모약물이 의도된 표적에 결합함으로써 발생하는 과도한 약리학적 효과로, 이는 장기 특이적 독성(예: 심각한 알부민 억제)을 유발할 수 있음(Hawes 등, 2023)
 - 하이브리드화에 의존하는 오프-타겟 효과(Hybridization-Dependent Off-Target Effects):** ONT가 의도하지 않은 RNA 전사체에 결합하여 오프-타겟 독성을 유발함. (Andersson, 2022; Maki 등, 2020; Ruan 등, 2025).
 - 하이브리드화와 무관한 효과(Hybridization-Independent Effects):** 의도하지 않은 면역 자극 반응(염증, 발열), 혈소판 감소증(혈소판 수치 저하), 그리고 서열/백본에 기인한 독성(Nedorezova 등, 2022; Andersson, 2022).
 - 면역원성(Immunogenicity):** 면역 반응을 유발할 가능성. 많은 siRNA는 면역원성 위험이 낮지만, 불순물이 존재할 경우 염증 유발 환경을 증폭시킬 수 있음(Grudzinska-Goebel 등, 2025; Pack 등, 2025).
 - 간독성 및 신독성(Hepatotoxicity & Nephrotoxicity):** 간과 신장에 약물 및 특정 불순물이 축적되면 간 효소 수치 상승 및 조직 손상을 초래할 수 있음(Chen 등, 2024; Azari 등, 2026; Bhamra 등, 2025).

2) 표적 독성 예시: ASO 불순물의 표적 간독성 대한 실험

- ① **목적:** Hawes 등(2023)의 연구는 약물 간독성을 평가하는 데 널리 사용되는 체외 모델인 혼합 1차 인간 간세포(p-PHHs, Pooled primary human hepatocytes)를 활용하여, 모 화합물에 비해 ASO 불순물이 간독성 위험을 증가시킬 가능성을 평가의 목적.
- ② **불순물 평가를 위한 ASO 및 간독성 특성:** 간독성 위험 수준이 서로 다른 FDA 승인 ASO 약물 3종, 즉 미포머센(mipomersen), 이노터센(inotersen), 누시너센(nusinersen)을 선정. 미포머센은 당초 FDA의 승인을 받았으나 이후 시장에서 판매가 중단되었으며, 간독성으로 인해 유럽의약품청(EMA)으로부터 두 차례 승인을 거부당했음. 이노터센의 제품 라벨에는 간독성에 대한 경고가 포함되어 있음. 반면, 누시너센은 간 손상과 관련이 없는 것으로 알려져 있음.
- ③ **방법:** 각 약물에 대해 **n-1 불순물**(정확히 하나의 뉴클레오타이드가 누락된 사슬)과 같이 흔히 발견되는 ASO 불순물 18종을 병행하여 조사했음. 시판되는 냉동 보존된 p-PHH 세포를 샌드위치 배양 방식으로 유지한 후, 인체 최고 혈중 농도(Cmax)에 맞춰 표준화된 농도의 ASO로 3일간 처리했음. 독성을 반영하기 위해 세포 내 **알부민 생성량**을 측정했음.
- ④ **결과:** Cmax의 100배 농도에서, 누시너센은 그렇지 않았으나 미포머센과 이노터센은 알부민을 유의하게 억제했음. 그러나 **모 화합물 중 어느 것도 ATP 및 요소 생성에 눈에 띄는 영향을 보이지 않았는데, 이는 분석 민감도 감소와 일치하는 결과임.** 특히, ASO 불순물의 절반은 알부민을 90% 이상 감소시켰음. 모 화합물과 비교했을 때, 일부 불순물은 유사한 독성을 보인 반면 다른 불순물은 더 높은 독성을 나타냈음.



※ **알부민(albumin):** 간에서 생성되는 중요한 단백질임. 혈류에서 체액이 새는 것을 막고 호르몬, 효소, 비타민을 운반하지만, 간질환과의 관계는 매우 중요.

3) 하이브리드화에 의존하는 비표적(off-target) 독성의 측정을 위한 분석법

- Oligonucleotide(ONT) 약물의 개발 과정에서 잠재적 독성 위험을 식별하여 임상시험에서 안전성을 보장하는 것이 필수적임. 이는 표적에서 벗어난 효과를 평가하는 데 사용되는 분석법들의 종합을 포함함. 평가 결정은 ONT 발달 가이드 역할을 하도록 개발되었음. 주요 내용은 생물정보학, 시험관 내 평가, 그리고 생체 내 동물 모델을 활용한 예측을 포함함. 연구자들은 다양한 ONT와 관련된 불가피한 비표적 효과의 관리도 반드시 고려해야

함. 제안된 분석법은 아래의 <표>에 나와 있음. 에너지 기반 ONT 모델이나 siRNA에 대한 seed-sequence 탐색 등 보다 정교한 탐색 모델을 활용한 추가 평가를 고려하는 것이 바람직함(Ruan 등, 2025)..

<표> 권장되는 생체 내 및 시험관 내 off-target 평가 분석.

ONT Toxicity Type	ONT toxicity	Assessment Assays (In vitro)	Assessment Assays (In vivo)
Hybridization and sequence dependent(잡종화 및 서열 의존)	Off-target	<ul style="list-style-type: none"> In silico and in vitro (NCBI dbSNP database, RT-qPCR) 	
Hybridization independent but sequence dependent(잡종 독립적이지만 서열 의존)	Immunostimulatory effects	<ul style="list-style-type: none"> Cytokines/chemokines release CCL22 mRNA levels 	Cytokines analysis in animal toxicity study
	Thrombocytopenia	Platelet activation	Platelet level in animal toxicity study
	Hepatotoxicity Kidney toxicity	<ul style="list-style-type: none"> Cytotoxicity assay Quantification of LDH and ATP in hepatocytes Evaluation of liver enzymes Caspase assay in human HepG2 cells Quantification of EGF in human kidney tubule epithelial cells Quantification of kidney injury biomarkers Quantification of urinary biomarkers (eg, b2-microglobulin and KIM-1) 	Hepatotoxicity and kidney toxicity assessment in animal toxicity study
Hybridization and sequence independent(잡종화와 서열 독립)	Inhibition of coagulation	PT and APTT	Coagulation assessments in animal toxicity study
	Complement activation	C3a, Bb, and C5a	Complement monitoring in animal toxicity study

4) ASO의 하이브리드화와 무관한 독성(Hybridization-Independent off-target toxicity)

- 올리고뉴클레오타이드 혼성화 비의존적 효과(Oligonucleotide hybridization-independent effects, HI Es)는 표적 외 RNA와의 의도하지 않은 염기 쌍 형성(Watson-Crick hybridization)에 기인한 것이 아니라, 올리고뉴클레오타이드 약물 자체에 의해 유발되는 부작용 및 독성을 말함. 이러한 효과는 일반적으로 올리고뉴클레오타이드의 골격/서열과 세포 내 또는 혈장 단백질 간의 비특이적인 정전기적 또는 구조적 상호작용에서 기인함 (Terada 등, 2023). <표>는 FFA에 승인된 ASO인 Antisense oligonucleotides의 혼성화 의존적 off-target toxicity를 나타낸 것임(Nedorezova 등, 2022)

<표> Antisense oligonucleotides의 혼성화 의존적 off-target toxicity

mRNA target	Off-target genes/effects	Comments: Cell culture/animal model/phase of clinical study	Nucleic acid modifications	Intracellular or tumor delivery/concentration	Assessment method
Human apolipoprotein C3 (ApoC3)	Genes associated with hepatotoxicity as well as 17 genes involved in the clathrin-mediated endocytosis.	mice	LNA-DNA gapmer	25 mg/kg (5.7μM)	Microarray
BACH1	mRNA and protein knockdown of off-targets with a wide range of mismatch (MM) and gap patterns.	A549 and NHBE cells	LNA ^a -PS ^b AS O ^c gapmer ^d	unassisted or Lipofectamine 2000, Up to 50 μM	qPCR, branched DNA assay, immunoblotting
F7, F11 and SOD1	hepatotoxicity mediated by silencing of many unintended transcripts through RNase H1 cleavage.	mice	LNA-PS ASO gapmers, cEt-PS ASO gapmers	Subcutaneous injection	qPCR, microarray analysis, western blot
Nr3c, Acsl1, ApoB, Hprt1, and human Kif11	hepatotoxicity not linked with on-target activity of ASO agents, but with the RNase H1 cleavage activity.	mice	LNA-PS ASO gapmers	Subcutaneous injection	qPCR, microarray analysis, western blot
ApoB, Pcsk9	Significant and specific reduction of many transcripts with one- or two mismatches or bulges by RNase H1 mediated cleavage activity.	mice	LNA-PS ASO gapmers	Intravenous injection	qPCR, microarray analysis
Xbra, Xbra3	Splicing defects in <i>dtymk</i> and <i>abi1</i> genes contained ≥8 base pairs complementarity to PMO.	<i>Xenopus tropicalis</i>	PMO ^e		qPCR
Myd88	Hepatotoxic ASO-LNA demonstrated downregulation of 293 off-target genes and upregulation of 60 off-target genes and concentration dependent elevation of caspase activity in 3T3 cell line, induction of caspase activity in A549, HeLa, HepG2 cells.	3T3, A549, HeLa, HepG2 cells	LNA	Lipofectamine 2000, 3-100 nM	Caspase 3/7 activity measurements, qPCR, microarray analysis

^aLNA - locked nucleic acid modification;

^bPS - phosphorothioate modification;

^cASO - antisense oligonucleotide;

^dgapmer - ASO consisting of internal DNA gap flanked with LNA modified nucleotides;

^ePMO - phosphorodiamidate morpholino modified ASO.

5) 올리고뉴클레오타이드 치료제의 면역원성(Immunogenicity)

① **면역원성의 가능성과 종류:** ASO와 siRNA를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 치료제는 질병과 관련된 RNA에 결합하여 특정 단백질의 발현을 차단하도록 설계된 합성 핵산 중합체임. 이러한 치료제는 일반적으로 낮은 면역원성 위험을 보이며, 이는 약물을 무력화시키는 심각한 면역 반응을 거의 유발하지 않음을 의미하지만, 인체의 면역 체계는 여전히 이를 인식하고 반응할 수 있음. 그 결과, FDA와 같은 규제 기관들은 신약 개발 과정 전반에 걸쳐 **위험 기반 평가**를 권장하고 있음(Bano 등, 2022; Zhao 등, 2026; Arthur, 2018). 다음은 면역원성이 올리고뉴클레오타이드 치료법에 미치는 영향과 이를 관리하는 방법에 대한 **면역 반응의 유형**이며 이에 대한 예시는 <표>와 같음(Grudzinska-Goebel 등, 2025).

- **선천성 면역 활성화(Innate Immune Activation):** 신체의 즉각적이고 비특이적인 방어 체계임. 진핵세포는 외래 핵산을 자연적으로 감지하는 수용체(톨-유사 수용체 등)를 가지고 있음. 이 시스템이 활성화되면 원치 않는 염증이나 독감과 유사한 증상이 발생할 수 있음(Arthur, 2018; Rodriguez 등, 2026; Descotes 등, 2008).
- **획득 면역 반응(Adaptive Immune Responses):** 항원 물질 항체(ADA)의 생성. 노출된 올리고뉴클레오타이드의 경우 드물지만, ADA는 전달체(지질 나노입자 또는 PEG 등)나 접합된 표적 리간드(GalNAc 등)에 대해 형성될 수 있음(Grudzinska-Goebel, 2025; Talotta 등, 2019).

② 비임상 및 임상에서의 선천성 및 적응성 면역 반응

- <표>와 같이 핵산치료제에서 관찰된 비임상 및 임상의 선천성 및 적응성 면역 반응에 대한 포괄적인 분석을 수행되었음(Grudzinska-Goebel 등, 2025). ASO 6개 중 3개는 환자당 200–300 mg(3–4 mg/kg)의 용량으로 매주 피하(SC) 투여되었음. 광범위한 역가 범위를 보이는 높은 ADA 발생률(30%–70%)과 경증에서 중증도의 ISR(50%–99%)이 관찰되었으며, 보체 인자 C3(Complement factor C3) 소모도 동반되었음. 매월 0.6 mg/kg을 피하(SC)로 투여한 GalNAc-ASO의 경우, ADA(antidrug antibody) 발생률(37%)과 ISR(injection site reaction) 발생률(7%)이 더 낮게 나타났음, 이는 투여량과 투여 빈도를 낮추면 ISR은 감소하지만 ADA 발생률은 감소하지 않음을 시사함. 10배 낮은 용량의 척수강내(IT) 투여에서도 유사한 경향이 나타났음. 일반적으로 ADA 형성은 혈장 클리어런스를 감소시키고 최저 농도(Ctrough)를 증가시켰으나, 최고 혈장 농도(Cmax)나 투여 후 첫 24시간 동안 측정된 총 곡선 아래 면적(AUC)에는 유의미한 영향을 미치지 않았음. 이는 핵산치료제에 대한 ADA의 임상적 영향이 제한적임을 반영함. 모델 기반 접근법인 집단 약동학(PK) 및 집단 PK/약력학(PD) 모델링을 통해 노출, 효능 및 안전성에 대한 IG의 영향을 정량화할 수 있음. 보체 소모 및 혈소판 감소와 같은 이상반응은 주로 고용량 ASO의 주간 투여와 관련이 있었음(Grudzinska-Goebel 등, 2025).

<표> FDA-승인된 핵산치료제의 임상에서의 면역원성

Molecule (approval year or phase); Indication	Class: Modification/Bioconjugation; RoA, Dose, Schedule	Summary of observed innate and adaptive immune responses	IG impact on PK, PD, efficacy, and safety incl. tolerability
Mipomersen (2013); HeFH	ASO (gapmer) 2'-MOE PS (20-mer) SC, 200 mg, weekly	≤72% TE ADAs (35% high titer); Short-term effect on inflammatory markers (hsCRP, C3); Higher C3 consumption in ADA-positive patients; No increases in IL-1β, IL-13, IL-6, IFNα or β, MCP-1 and MIP-1α in a 3-week trial; ISR in ≤99% of patients (phase 3)	Higher trough levels; No impact on efficacy; Immune complexes in 30%; potentially induced complement consumption and increase in flu-like symptoms; 32 of 261 patients discontinued due to ISRs
Inotersen (2018);	ASO (gapmer)	30.4% TE ADAs, late onset (median	Minimal effect on plasma

hATTR PN	2'-MOE PS (20-mer) SC, 300 mg, weekly	202.5 days), low titer, persistent response; 55% with C3 values <LLN (21% placebo), 33% decrease (baseline to week 65) in CS2, no correlation with ADAs; 49% mild-to-moderate ISR (phase 3), slightly more frequent in ADA+ patients	C _{max} and AUC(0–24h), higher plasma C _{trough} levels; no information on PD, efficacy; platelet decreases of ≥30% and ≥50% from baseline
Volanesorsen (2019); FCS	ASO (gapmer) 2'-MOE PS (20-mer) SC, 285 mg, weekly	≤30% TE ADAs, late onset (median 6 months), low titer, persistent response; C5a and Bb levels comparable between ADA+ and ADA-patients; 63% mild or moderate ISR, mostly within first 13 weeks (63%) and up to 26 weeks (17%) after therapy initiation	C _{through} levels up to 19-fold increased, no effect on t _{1/2} , term.; No impact on PD, efficacy, safety
Tofersen (2023); ALS	ASO (gapmer) 2'-MOE PS (20-mer) IT, 100 mg, monthly	58.4% TE ADAs (8.4% transient and 50% persistent)	Plasma clearance decreased by 32%, effect on CSF clearance unknown; No effect on reduction of total SOD1 protein or plasma NFL. No safety information available
Nusinersen (2016); SMA	ASO/SSO 2'-MOE PS (18-mer) IT, 12 mg, 4-monthly	≤5% TE ADAs (3 transient and 2 persistent); no cellular activation and cytokine production	n.e. (insufficient data)
Eplontersen (2023); hATTR PN	GalNAc ASO (gapmer) 2'-MOE PS and PO SC, 45 mg, SC, monthly	37% TE ADAs; 7% ISR	Increased C _{trough} levels, but no impact on plasma C _{max} and AUC; No impact on PD, efficacy, safety
Eteplirsen (2016); DMD	ASO/SSO PMO (30-mer) IV, 30 mg/kg, weekly	No anti-dystrophin antibodies (low patient number, dose ≤20 mg/kg); no T cell responses against dystrophin mild and infrequent ISR	n.e.
Golodirsen (2019); DMD	ASO/SSO PMO IV, 30 mg/kg, weekly	No immunogenicity data submitted	No information
Viltolarsen (2020); DMD	ASO/SSO PMO IV, 80 mg/kg, weekly	No ADAs; 3.13% anti-dystrophin Abs (week 13 and 24)	No impact on dystrophin mRNA or protein amount, PD, efficacy, safety
Casimersen (2021); DMD	ASO/SSO PMO IV, 30 mg/kg, weekly	No anti-dystrophin antibodies (neoepitopes not addressed)	Not applicable; No clinical IG signs
Givosiran (2019); Acute hepatic porphyria	GalNAc siRNA 2'-OMe/2'-F PS SC, 2.5 mg/kg, monthly	0.9% TE ADAs, transient, low titers; 16.7% ISR	No impact
Lumasiran (2020); PH1	GalNAc siRNA 2'-OMe/2'-F PS SC, 3 or 6 mg/kg, monthly	6% TE ADAs, transient, low titer; 32.5% mild-to-moderate ISR, starting at day 0 lasting up to 3 days; some delayed ISRs, i.e., 2–43 days, lasted longer (3–100 days)	No impact on PK parameters, no information on PD, efficacy, safety
Inclisiran (2021); HeFH or ASCVD	GalNAc siRNA 2'-OMe/2'-F PS SC, 284 mg/kg, 6-monthly	1.8% PE ADAs, 4.9% TE ADAs, 1.7% persistent; 8.2% mild-to-moderate ISR (1.8% placebo), onset at approx. 3.5 days, lasting about 5.6 days, No ADAs under statin treatment in high dose	No association with changes in LDL-C or PCSK9 levels; no association between ADAs and AEs; 4 patients withdrew from treatment due to ISR
Vutrisiran (2022); hATTR PN	GalNAc-siRNA 2'-OMe/2'-F PS SC, 25 mg, 3-monthly	2.5% TE ADAs; 4.1% mild and transient ISR	No impact
Patisiran (2018); hATTR PN	siRNA 2'-OH/2'-OMe/2'-H; LNP Dlin-MC3-DMA, cholesterol, DSPC, PEG2000-C-DMG; IV, 0.3 mg/kg, 3-weekly	3.6% TE anti-PEG antibodies, transient, low titer, one additional patient had PE anti-PEG antibodies	No impact
mRNA-3927 (Phase 2); PA	mRNA (PCCA and B)/LNP IV, 0.3 mg/kg, 3-weekly or 0.6 mg/kg, 2-weekly	PE anti-PEG Ab titer in 1 participant (0.3 mg/kg) increased >4-fold (52 days after first dose) and gradually decreased to baseline at month 12; One participant (0.60 mg/kg) had PE anti-PCC antibodies; Grade 1 or 2 IRRs observed in one patient after about ¼ of the doses administered within 1 year	Not reported
MRT5005 (Phase 1/2); Cystic fibrosis	mRNA (CFTR)/LNP ICE, DOPE, DMG-PEG2000 Inhale, 8–16 mg, SD	No correlation of Inflammatory markers (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, and TNFα) with febrile reactions and hypersensitivity. Sporadic	No impact

	or 8–20 mg, weekly or 4 mg, daily	anti-CFTR ADA, anti-PEG antibodies, and anti-CFTR T cell responses incl. placebo and baseline samples	
--	--------------------------------------	---	--

2'-F, 2'-fluoro; 2'-MOE, 2'-O-methoxyethyl; 2'-OH, 2' hydroxyl; 2'-OMe, 2'-O-methyl; ADA, anti-drug antibody; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ASCVD, arteriosclerotic cardiovascular diseases; ASOs, antisense oligonucleotides; C3, complement factor 3; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Dlin-MC3-DMA, dilinoleyl-methyl-4-dimethylaminobutyrate; DMG-PEG2000, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-methoxypolyethylene glycol; DOPE, dioleoyl phosphatidylethanolamine; DSPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (INN: Colfoscerilstearat); FCS, familial chylomicronemia syndrome; hATTR-PN, hereditary transthyretin amyloidosis with polyneuropathy; HeFH, heterozygous familial hypercholesterolemia; ICE, imidazole cholesterol ester; IFN, interferon; IL, interleukin; IRR, infusion-related reaction; ISF, infusion site findings; ISR, injection site reaction; IT, intrathecal; LDL-C, low density lipoprotein-cholesterol; LLN, lower limit of normal; DMD, Duchenne muscular dystrophy; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 alpha; n.e., not evaluated; PA, propionic acidemia; PCC, propionyl-CoA carboxylase (PCC) composed of six alpha (PCCA) and six beta (PCCB) subunits; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PD, pharmacodynamic; PEG2000-C-DMG, (R)-methoxy-PEG2000-carbamoyl-di-O-myristyl-sn-glyceride; PH1, primary hyperoxaluria type 1; PK, pharmacokinetic; PO, phosphodiester; PMO, phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides; SC, subcutaneous; SMA, spinal muscular atrophy; SSO, splice-switching oligonucleotide.

5) ASO 약물의 간독성

① ASO의 표적기관독성 – 간

- **올리고뉴클레오타이드 치료제(ASO 및 siRNA 등)는 간에 축적되는 경우가 많은데, 간은 주요 치료 표적이자 올리고뉴클레오타이드로 인한 독성에 가장 취약한 장기이기도 함.** 간독성은 간 트랜스아미나제(ALT 및 AST) 수치 상승, 염증, 그리고 때로는 간세포 괴사로 특징지어짐(Hagedorn 등, 2013; Sehgal 등, 2013; Piotr 등, 2017; Tabernilla 등, 2021).

② ASO에 의한 간독성의 기전

- 간독성이 발생하는 원인을 이해하면 연구자들이 더 안전한 2세대 및 3세대 ASO 약물을 설계하는 데 도움이 됨(Kamola 등, 2017; Ruan 등, 2025; Kamola 등, 2017; Jia 등, 2025; Schwenk 등, 2025).

가) **단백질 결합 및 축적(Protein Binding & Accumulation):** ASO, 특히 안정성을 높이기 위해 포스포로티오에이트 골격(phosphorothioate backbone) 변형을 거친 ASO는 간 내 세포 단백질에 결합하는 경향이 있음. 이러한 고친화성 축적은 세포 스트레스를 유발하고 정상적인 간 기능을 저해할 수 있음.

나) **면역 및 염증 반응(Immune & Inflammatory Responses):** ASO의 축적은 선천성 면역 체계를 자극하여 간에서 림프구-조직구 염증(면역 세포의 축적)을 유발할 수 있음.

다) **비표적 효과(Off-Target Effects):** ASO 서열이 의도하지 않은 RNA 표적과 너무 유사할 경우, 잘못된 mRNA를 분해하여 예상치 못한 독성을 유발할 수 있음.

라) **RNA 처리 포화(RNA Processing Saturation)** 고농도의 올리고뉴클레오타이드는 세포의 자연적인 RNA 처리 기전을 압도하고 포화시킬 수 있음.

6) ASO 약물의 신장 독성

- ① ASO의 신장 독성은 주로 이 치료제가 체내에 분포 및 제거되는 과정에서 신장에 자연적

으로 축적되기 때문에 발생함. ASO는 질병을 유발하는 RNA를 침묵시키는 데 매우 효과적이지만, 특히 근위 세뇨관의 리소좀(the lysosomes of the proximal tubules)에 축적될 경우 세포 손상과 신장 기능 저하를 초래할 수 있음(Wu 등, 2025; Tarn 등, 2015).

② **독성 기전:** ASO는 신장을 통해 체내에서 여과 및 재흡수되는 거대 분자임(Wu 등, 2025).

- **리소좀 내 축적:** ASO는 근위 구불세관(Proximal convoluted tubule)의 상피세포에 의해 대량으로 흡수됨. 약물과 그 분해 산물이 이러한 세포의 리소좀 내에 축적되며, 이는 정상적인 세포 기능을 방해하고 독성을 유발할 수 있음(Yang 등, 2022; Alhamadani 등, 2022)
- **세포 스트레스:** 이러한 축적은 리소좀 파열, 산화 스트레스를 유발하며, 결국 신장의 여과 및 재흡수 시스템에 독성을 일으킴(Wu 등, 2025; Tarn 등, 2015).

7) ASO의 신경(뇌/중추신경계) 독성

- ASO를 뇌척수액(CSF)으로 전달할 경우, 두 가지 뚜렷한 문제가 발생할 수 있음(Kuroda 등, 2025; Miller 등, 2024; Michael 등, 2024).

- ① **급성 신경독성(Acute neurotoxicity):** 주사 후 빠르게 발생함. 이는 ASO가 세포 표면 단백질에 결합하거나 2가 양이온(예: Ca^{2+} 및 Mg^{2+})에 강력하게 결합하여 신경 신호 전달을 방해하고 발작을 유발할 수 있는 것과 관련이 있음.
- ② **지연성 신경독성(Late-onset neurotoxicity):** 주사 후 며칠에서 몇 주 후에 발생할 수 있으며, 뉴런에서 p53에 의해 조절되는 전사체의 발현 증가와 같은 경로를 수반함.

6. ASO의 독성과 극복을 위한 4대 접근 방법

1) 개발의 문제점

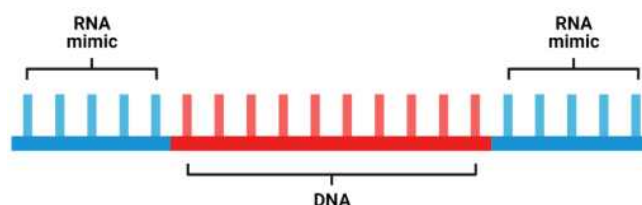
- ASO는 정밀한 RNA 수준의 유전자 조절을 위한 유망한 치료적 접근법을 제공함. 안정성과 약물동역학을 향상시키기 위한 화학적 변형이 발전했음에도 불구하고, ASO는 간, 면역, 신장, 신경독성 등 여전히 심각한 도전에 직면해 있어 높은 전임상 실패율을 보임 (Ruan 등, 2025; Cantara 등, 2024; Bhamra 등, 2025)

2) ASO 독성의 극복 방안(Gapmer ASO structure)

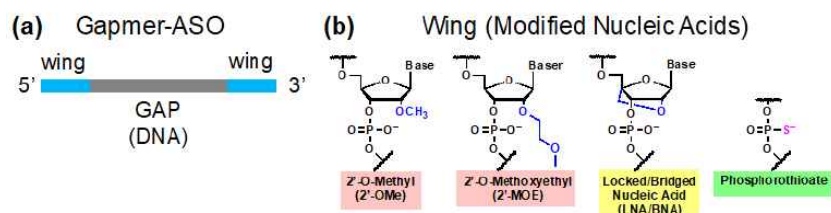
- 주로 비표적 결합, 의도하지 않은 단백질 상호작용 및 면역 반응에서 기인하는 ASO의 독성을 극복하기 위해, 연구자들은 정교한 화학적 설계, 표적 전달 시스템 및 최적화된 제형을 조합하여 활용하고 있음. 주요 전략은 다음과 같음.

2-1) 첨단 화학적 변형(Advanced Chemical Modifications)

- 당 변형:** Gapmer 설계(그림-1)의 “날개” 부분에 (그림-2)와 같이 2'-O-methoxyethyl(2'-MOE) 또는 잠금 핵산(LNA, locked nucleic acids)을 활용하면 표적 결합 친화도가 증가함. 이를 통해 더 짧은 ASO 서열을 사용할 수 있으며, 전사체 전반에 걸친 의도하지 않은 off-target 결합을 최소화할 수 있음(Inagaki 등, 2023; BenchChem, 2026; Aguti 등, 2024; Engelhardt 등, 2024).
- Gapmer는 RNA 분해효소인 RNase H가 상보적 RNA를 파괴하도록 유도하여 표적 유전자를 침묵시키도록 설계된 chimeric ASO로 총 길이가 16에서 20 뉴클레오타이드임. 구조물은 아래와 같이 구성되어 있으며 중앙에는 변형되지 않았거나 최소한으로 변형된 DNA가 있고, 양옆에는 화학적으로 변형된 RNA '날개'가 (변형된 염기) - (DNA 간격) - (변형된 염기)로 구성됨.



<그림-1> Gapmer의 구조



<그림-2> RNase H-dependent targets RNA knockdown system: a) Design of Gapmer-ASO consisted of wing-modified nucleic Acids, b) Established modified nucleic acids for gamer wing modification.

- ② **갭 변형(Gap Modifications):** ASO-단백질 결합으로 인한 간독성을 완화하기 위해, 개발자들은 5'-Methyl(Me) DNA 또는 5'-cyclopropylene(5'-CP) 변형과 같은 특정 갭 변형을 도입함. 이러한 부위 특이적 변경은 노크다운 활성을 저해하지 않으면서 핵 내에서의 의도하지 않은 파라스펙클 단백질 결합을 줄여줌(Fig. 2 참조)

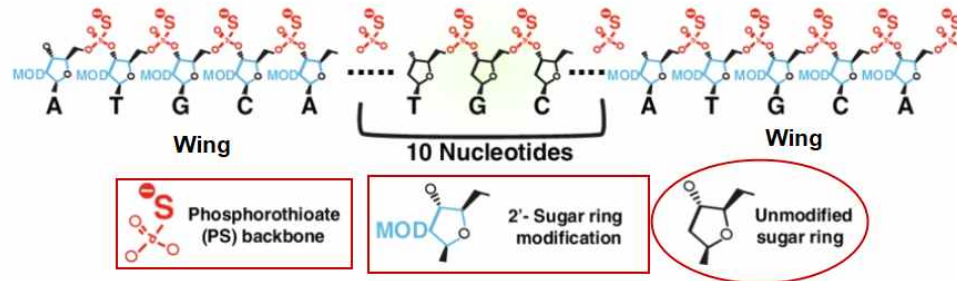
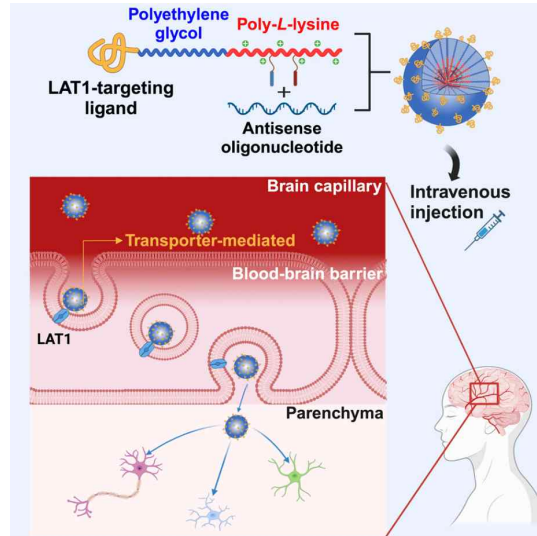


Fig. 2 Antisense oligonucleotide (ASO) 'gapmer' design. ASO 전체 길이에 걸쳐 포스포로티오에이트 골격을 사용하여 뉴클레아제 저항성을 부여하는 한편, 2'-당 수정은 첫 번째와 마지막 5개 뉴클레오타이드에만 적용하고, 중간 10개 뉴클레오타이드는 2'-당 위치에서 수정을 가하지 않았음. 이를 통해 ASO의 바깥쪽 부분에서는 표적 RNA에 대한 결합 친화도가 높아지는 동시에, ASO의 중앙 부위에서는 RNaseH에 의한 절단이 여전히 가능하도록 함. (Scoles 등, 2017; Devos 등, 2013)

- ③ **백본 최적화(Backbone Optimization):** 면역 반응이나 독성 반응을 유발할 수 있는 포스포티오에이트(PS) 결합의 수를 조절하여, 이를 메실-포스포아미데이트 결합으로 대체함으로써 뉴클레아제 저항성을 유지하면서 독성을 낮춤(Fig. 2 참조)

2-2) 합리적 서열 설계 및 나노구조(Rational Sequence Design & Nanoarchitectures)

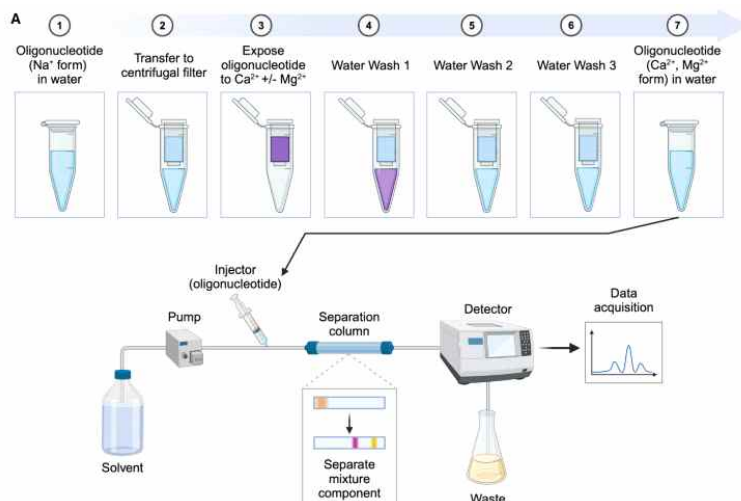
- **Gapmer 구조:** 앞서 설명하였듯이 Gapmer는 중앙의 변형되지 않은 "갭(gap)"을 둘러싼 변형 염기를 사용하여, 낮은 면역 자극성을 유지하면서 표적 RNA를 분해함 (Boros 등, 2022; Bhamra 등, 2025).
- **ASO/PNA 하이브리드(Antisense Oligonucleotide/Peptide Nucleic Acid Hybrid):** 기존 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO) 치료제의 한계점인 '**표적 외 독성 (Off-target toxicity)**'과 '**간 외 조직 전달의 한계**'를 극복하기 위해 고안된 차세대 핵산치료제 플랫폼. <Figure 1>에서처럼 표준 Gapmer와 부분적으로 상보적인 펩타이드 핵산(PNA, Peptide Nucleic Acids) 가닥을 결합하면(예: **BROTHERS** 또는 **BRO** 나노구조), 비특이적 단백질 결합 및 비표적 RNA 혼성화를 방지하여 간독성을 현저히 감소시킴(Terada 등, 2023; D'Aniello 등 2026).



<그림> I-Type amino acid transporter 1-targeting nanoparticles for antisense oligonucleotide delivery to the CNS: I-형 아미노산 수송체 1(LAT1) 특이적 리간드와 폴리이온 복합체는 혈액-뇌 장벽을 통과하여 RNA 기반 약물을 전달하기 위한 뇌 특이적 표적으로 사용됨. LAT1을 표적으로 하는 ASO가 캡슐화된 나노입자인 Phe-NPs/ASO의 특성을 규명하였음. 25% 농도의 페닐알라닌은 GL261-Luc 세포에서 LAT1 표적 나노입자의 표면에 효과적으로 결합하며, 세포 결합 분석 결과 Phe-NPs/ASO는 페닐알라닌이 포함되지 않은 경우에 비해 더 높은 결합 친화성을 나타냄. 마우스에 단일 용량을 정맥 주사한 후 혈액-뇌 장벽 표적화 효과와 조직 분포를 더욱 자세히 규명하기 위해, 형광 영상법을 이용한 *in vivo* 생체 분포 연구를 수행했음. 정맥 주사 1시간 후 뇌 조직에서 Phe-NPs/ASO가 검출되었으며, 이는 나노입자 운반체 없이 투여된 동일한 ASO에 비해 약 64배 더 높은 비율을 보였음. ASO를 탑재한 Phe-NPs의 뇌 조직 전달은 비인간 영상류를 대상으로 수행한 형광 영상 연구에서도 확인되었음. 이러한 결과는 Phe-NPs가 뇌의 여러 영역에 걸쳐 ASO를 뇌 조직으로 성공적으로 전달할 수 있음을 보여준다. RNA 기반 약물을 탑재한 Phe-NPs는 모든 형태의 신경퇴행성 질환을 포함한 중추신경계(CNS) 질환을 치료할 잠재력을 가지고 있음.(Lim 등, 2024)

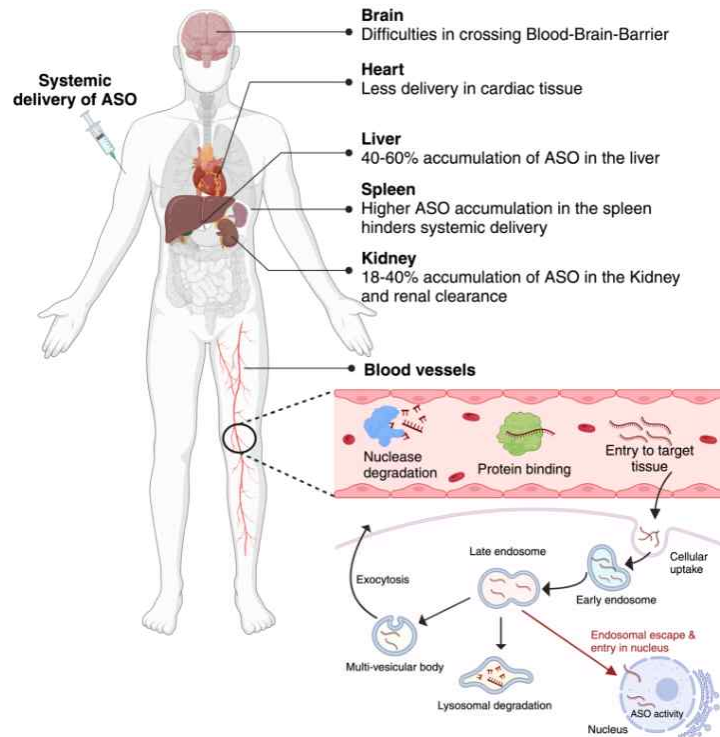
2-4) 최적화된 투여 및 제형(Formulation & Dosing Strategies)

- **2가 양이온을 포함한 제형(Divalent Cations Formulation):** 중추신경계(CNS)에 뇌척수액(CSF)을 투여할 때 발생하는 급성 신경독성 및 발작을 예방하기 위해, 고농도의 2가 양이온(예: Ca^{2+} 및 Mg^{2+})을 첨가하면 ASO로 인한 이온 불균형을 완화할 수 있음(Miller 등, 2024).



<그림> In vitro에서 di-siRNA의 2가 양이온 분석을 위한 이온 크로마토그래피 워크플로우를 나타내는 개략도: 물에 재현탁된 Na^+ 형태의 올리고뉴클레오타이드를 원심분리 장치로 옮긴 후, 원심분리를 통해 농축하고 100 mM Ca^{2+} 및/또는 Mg^{2+} 용액에 노출시켰음. 100 mM Ca^{2+} 및/또는 Mg^{2+} 에 노출시킨 후, 올리고뉴클레오타이드를 물로 세 번 세척하여 용액 내의 과잉 2가 양이온을 제거했음. 그런 다음 처리된 올리고뉴클레오타이드를 이온 크로마토그래피에 주입하여 용액 내의 대상 양이온을 정량했음. 각 대상 양이온의 농도는 실시간으로 검출되었으며, 획득된 데이터를 바탕으로 아래 표의 비율을 산출했음.

- **투여 경로:** 전신 투여에서 국소 투여(예: 척수강 내 또는 유리체 내)로 전환하면 전신 독성 위험을 제한할 수 있음(Haque 등, 2023).



<그림> Challenges in the systemic delivery of ASO drugs: ASO는 치료제로서 큰 잠재력을 가지고 있지만, 효율적인 전달에는 몇 가지 어려움이 따릅니다. 이러한 어려움은 ASO 분자의 물리화학적 특성, 즉 큰 크기, 분자량(단일 가닥 ASO는 ~4-10 kDa, 이중 가닥 siRNA는 ~14 kDa), 그리고 세포막을 통한 수동 확산을 방해하는 음전하 등과 관련이 있습니다. ASO는 주로 세포 내 흡수를 위해 내포작용에 의존하는데, 이는 비효율적일 수 있으며 엔도솜이나 리소솜에 갇혀 리소솜 분해로 이어질 수 있을 때까지 일단 세포 내부로 들어간 ASO는 세포질이나 핵 내의 표적 부위로 접근하기 위해 엔도솜에 갇히는 것을 피해야 합니다. 이 외에도 전신 투여된 ASO가 효과를 발휘하려면 신장 클리어런스를 피해야 하며, 세포외액과 세포 내 구획 모두에서 뉴클레아제 분해에 저항해야 하고, 단핵 식세포, 간 소동맥 내피 세포, 쿠프퍼 세포를 포함하는 망상내피계에 의한 제거를 피해야 합니다. 한 연구에 따르면, AON을 정맥 내 투여했을 때 간과 신장에 각각 40%와 18%가 축적된 것으로 보고되었습니다. 최근에는 중추신경계(CNS) 관련 질환 치료를 위한 ASO도 개발되었습니다. 이러한 추가적인 장벽, 즉 ASO는 중추신경계(CNS) 내에서 분포하기 전에 혈액-뇌 장벽(BBB) 또는 뇌-뇌척수액 장벽을 통과해야 합니다. 신경계의 혈관 장벽은 세포 접착 분자의 상호작용을 통해 밀착 접합을 형성하는 단일층의 내피 세포로 구성되어 있으며, 이로 인해 전신 주사 후 대부분의 ASO가 중추신경계에 도달하지 못합니다.

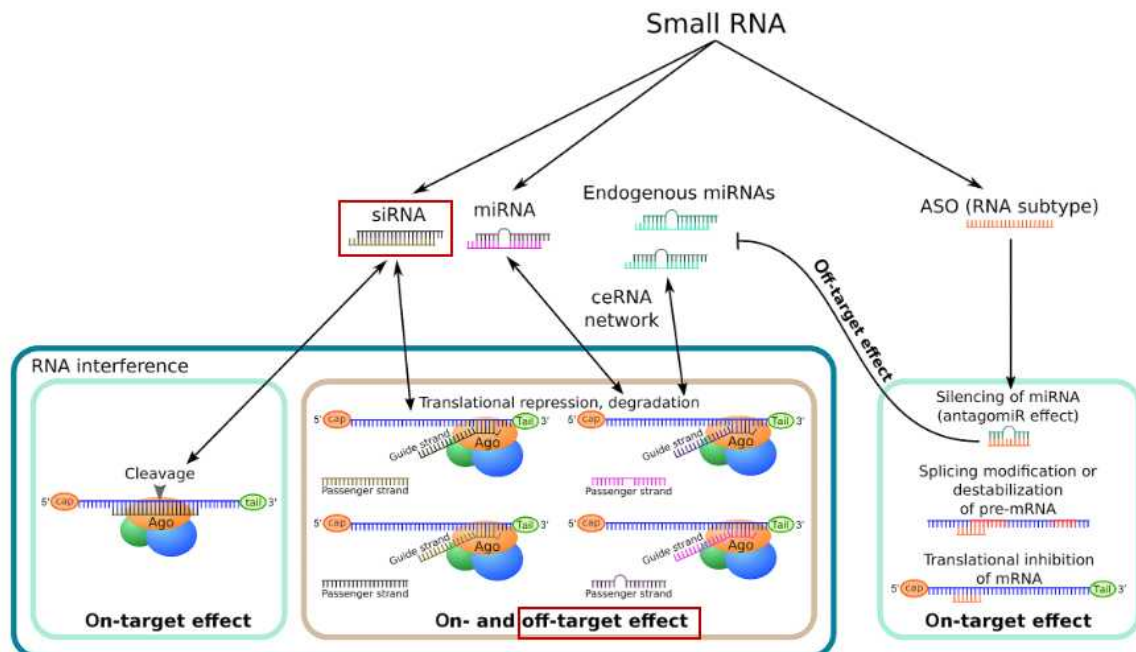
7. siRNA의 off-target toxicity와 극복을 위한 접근 방법

1) siRNA의 off-target toxicity(비표적 독성)

- siRNA off-target toxicity는 small interfering RNA(siRNA)가 의도하지 않은 유전자의 발현을 변화시키거나 선천성 면역 반응을 유발하여, 측정 가능한 독성이나 세포 사멸을 초래할 때 발생함. 이 현상은 RNA 간섭(RNAi) 연구 및 치료 분야에서 주요 장애물임 (Jackson 등, 2010; Bereczki 등, 2025).

2) 독성의 주요 기전(si RNA의 대부분 독성기전에 대한 자세한 ASO의 독성기전 참조)

- ① **miRNA 유사 오프타겟팅(miRNA-Like Off-Targeting):** "시드 영역"(siRNA 가이드 가닥의 2~8번 뉴클레오티드)은 3' UTR에 있는 부분적으로 상보적인 메신저 RNA(mRNA)에 결합하여, 마이크로RNA처럼 작용함으로써 의도하지 않은 생존 또는 조절 유전자의 발현을 억제할 수 있음.
- <그림>에서 siRNA와 miRNA는 길이가 19~23 뉴클레오티드인 짧은 이중가닥 RNA(dsRNA)임. siRNA는 표적 mRNA와 완벽한 상보성을 필요로 하는 반면, miRNA는 부분적인 서열 상보성으로 작용하며, 이때 5' 말단 2~8번 뉴클레오티드로 구성된 소위 '시드(seed) 영역'이 결정적인 역할을 함. 포유류에서 miRNA의 결합 부위는 주로 표적 mRNA의 3' UTR(3' untranslated region, 3' 비번역 영역)에서 발견됨(Bereczki 등, 2025).



<그림> siRNA, miRNA, RNA-subtype antisense oligonucleotides(ASOs)의 작용 기전의 분자 배경: siRNA와 miRNA의 기능은 공통 원소를 공유함. 두 방법 모두 RNA 유도 침묵 복합체(RISC, RNA-induced silencer complex) 기반 작용 기전을 이용하지만, 상보성 정도는 다름. 하지만 siRNA는 miRNA처럼 작용하여 miRNA와 유사한 off-target effect를 일으킬 수 있음. RNA subtype ASO는 표적 miRNA, 전구체 mRNA(pre-mRNA) 또는 mRNA와의 하이브리다이제이션을 통해 작용하며, 각각 miRNA 억제, 스플라이싱 조절 또는 mRNA 침묵을 통해 유전자 침묵(gene silencing)을 감소시킴. 이러한 기전들은 내인성(endogenous) miRNA와 mRNA 간의 복잡한 경쟁 내인성(competing endogenous) RNA(ceRNA) 네트워크에 여러 지점에서 간섭함.

- ② **면역 자극(Immune stimulation):** 변형되지 않았거나 긴(>23 bp) siRNA는 신체의 패턴 인식 수용체(Toll-like 수용체, RIG-I, PKR 등)에 의해 인식될 수 있음. 이는 인터페론과 염증성 사이토카인의 방출을 유발함.
- ③ **서열 특이적 모티프(Sequence-specific motifs):** 4-염기쌍 모티프 **UGGC**와 같은 특정 독성 서열 모티프는 표적 독립적 세포 독성 및 세포 생존을 변화와 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌음.
- ④ **하이브리드화 효과(Hybridization effects):** 올리고뉴클레오타이드 골격과 세포막 간의 전하 상호작용은 때때로 세포 안정성이나 신호 전달 경로를 교란시킬 수 있음. [1]

2) siRNA 독성의 극복 방안(또한 자세한 설명은 ASO 독성의 극복 방안 참조)

- 주로 miRNA와 유사한 off-target 결합, 센스 가닥 로딩 또는 면역 활성화로 인해 발생하는 siRNA의 off-target 독성을 극복하기 위해 정밀한 서열 설계, 화학적 변형, 용량 최적화, 표적 전달체 및 풀링 전략을 조합하여 활용함(Neumeier 등, 2021; Wittrup 등, 2015).

1. 서열 설계 및 선정(Sequence Design and Selection)

- **알고리즘 기반 설계(Algorithm-based design):** 첨단 인실리코(in silico) 설계 알고리즘을 사용하여 의도하지 않은 전사체와 부분적 상보성(특히 5' 시드 영역에서)이 없는 siRNA 서열을 선정함(Ruan 등, 2025).
- **가닥 편향(Strand bias):** 안티센스 가닥의 5'-말단을 센스 가닥보다 열역학적으로 더 불안정하도록 수정하면, 해당 가닥이 RNA 유도 침묵 복합체(RISC)에 우선적으로 로딩되어 센스 가닥의 오프타겟 효과를 줄일 수 있음(Jiang 등, 2026).
- **독성 모티프 필터링(Filter for toxic motifs):** 알려진 독성 또는 높은 면역원성을 지닌 서열 모티프(예: UGC 모티프)를 포함하는 서열을 제외함(Wittrup 등, 2015).

2. 풀링 및 콕테일 Pooling and Cocktails

- **올리고 풀링(Oligo pooling):** 동일한 표적을 겨냥한 여러 개의 서로 다른 siRNA(예: esiRNA 또는 siPOOL) 풀을 결합하면 개별 siRNA의 농도가 희석되어, 하이브리드화에 의존하는 오프타겟 효과를 효과적으로 제거할 수 있음(Neumeier 등, 2021).

3. 용량 최적화. Dose Optimization

- **적정법:** 오프타겟 효과는 농도에 매우 크게 좌우됩니다. 연구자는 여전히 강력한 온타겟 노크다운을 달성할 수 있는 최저 유효 용량(일반적으로 1 nM~10 nM 범위)으로 siRNA를 적정해야 함(Yan 등, 2026).

4. 화학적 변형(Cheical Modifications):

리보스 당이나 인산 백본에 변형을 가하면 표적 내 효능에는 영향을 주지 않으면서 의도하지 않은 오프타겟 결합을 약화시킬 수 있음.

- **시드 영역 변형(Seed region modifications):** 시드 서열에 **2'-O-methyl (2'-OMe) or Locked Nucleic Acid (LNA)**와 같은 변형을 도입하면 오프타겟 전사체 상호작용을 차단할 수 있음(Zaidi 등, 2023; Jackson, 등, 2006).
- **골격 안정화(Backbone stabilization):** **Phosphorothioate(PS)** 결합은 뉴클레아제 저항성을 향상시키고 순환 시간을 연장함(Yamada 등, 2025).
- **면역 반응 억제(Suppressing immune response):** **2'-Fluoro (2'-F)** 및 2'-OMe 치환은 이중가닥 siRNA가 패턴 인식 수용체와 인터페론 반응을 유발하는 것을 방지하는데 도움이 됨(Wittrup 등, 2015).

5. 첨단 전달 시스템(Advanced Delivery Systems)

- **표적 전달(Targeted delivery):** 조직 특이적 리간드(예: 간 표적화를 위한 **GalNAc**)를 부착하면 siRNA가 비표적 세포에 흡수되는 것을 방지할 수 있음(Huang 등, 2026).
- **나노입자(Nanoparticles):** siRNA를 **Lipid Nanoparticles(LNPs)** 또는 고분자 운반체에 포장하면 올리고뉴클레오타이드가 급속히 분해되는 것을 막고, 전신적 비표적 축적을 제한할 수 있음(Yao 등, 2025).

8. 글로벌 핵산치료제 불순물의 규제정책-FDA 및 ICH 규제 지침

1) FDA 및 ICH의 Guideline

- 올리고뉴클레오타이드 치료제(mRNA, siRNA, miRNA, ASO, aptamers, mimics, and antagomirs)는 현대 의학에 혁명을 일으켰음. 이러한 분자들은 대개 포스포아미디트 화학 반응이나 체외 전사 과정을 통해 화학적으로 합성되기 때문에, 안전성, 효능 및 규제 준수를 보장하기 위해 세심하게 관리해야 하는 특정 불순물이 발생하기 쉬움(FDA, 2024; Zhang & FDA, 2022; Lam 등, 2015; Yannick 등, 2022).
- 올리고뉴클레오타이드 치료제는 복잡하기 때문에 모든 품질 매개변수를 규정하는 단일한 전용 ICH 지침은 존재하지 않음. 이러한 치료제는 일반적으로 ICH Q3A/ICH Q3B와 같은 기존의 소분자 지침에서 제외됨. 그러나 규제 당국은 엄격한 위험 기반 접근 방식을 적용하고 있음.
 - FDA 산업계 지침: FDA는 “올리고뉴클레오타이드 기반 치료제의 비임상 안전성 평가 (FDA. Nonclinical Safety Assessment of Oligonucleotide-Based Therapeutics; Draft Guidance for Industry; Availability. 2024)”에 관한 지침 초안에서 합성 올리고뉴클레오타이드에 대한 고유한 과학적 및 안전성 고려 사항을 다루고 있음. 이 지침은 단일 가닥 및 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드에 대한 프레임워크를 제공하며, 일반적으로 1.0%를 초과하는 불순물은 특성 분석을 수행해야 한다고 규정하고 있음(Azari 등, 2026, FDA, 2024)
 - ICH M7 지침: 이 지침은 발암성 위험을 제한하기 위한 “DNA 반응성(변이원성) 불순물의 평가 및 관리(ICH M7(R2) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk, 2023)”에 적용됨.
 - ICH Q3D 및 Q3C: 두 지침은 각각 원소 불순물과 잔류 용매를 규제하며, 올리고뉴클레오타이드 제조에 직접 적용됨.
 - ① ICH Q3B(R2). HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE IMPURITIES IN NEW DRUG PRODUCTS. 2006.
 - ② ICH Q3C (R9) Residual solvents – Scientific guideline. 2006.

2) 불순물 적격성 평가(Impurity Qualification)

- ① 개요: 올리고뉴클레오타이드 불순물 적격성 평가에는 전문적인 개발 및 규제 전략이 필요함. 이는 이러한 치료제가 ICH Q3A와 같은 표준 소분자 불순물 평가 체계의 적용 범위를 벗어날 수 있기 때문임. 규제 기관 및 업계 표준은 일반적으로 1.0%를 초과하는 불순물을 식별할 것을 요구하며, 1.5%를 초과하는 불순물(또는 조정된 일일 노출량이 1 mg/day를 초과하는 경우)은 특정 안전성 및 독성학 데이터를 통해 적격성을 입증해야 함.
- ② 주요 규제 기준 및 역치 (Thresholds): 업계의 백서와 [EMA의 올리고 가이드라인 초안](#) (DAICEL. Oligonucleotide Drug Impurities: Generic Industry Implications and the Regulatory Expectations. 31/03/2026) 등 최신 규제 동향에 따르면, 올리고뉴클레오타이드 불순물 관리는 일반적으로 소분자 의약품(0.05%~0.15%)보다 훨씬 높은 기준치를 적용함(DAICEL 등 2026; Sutton 등, 2022; Kim 등, 2020; Lortie 등 2023)
 - ① 보고 역치 (Reporting Threshold): 일반적으로 0.1%로 설정됨.

- ② **확인 역치 (Identification Threshold):** 구조 분석을 통해 불순물의 실체를 밝혀야 하는 기준으로 보통 1.0%임.
- ③ **안전성 입증 역치 (Qualification Threshold):** 독성 데이터를 통해 안전성을 증명해야 하는 한계선으로 보통 1.5%임. 임상 용량(예: 1 mg/day 이하의 노출량)에 따라 개별 조정되기도 함.

③ 불순물 분류

- 규제 체계는 oligonucleotide 불순물을 4가지 주요 등급으로 분류하여 별도의 비임상 안전성 평가가 필요한지 여부를 결정함(European Pharma Oligonucleotide Consortium, 2023; Zhou 등, 2025; David Orchard-Webb, 2021)..
 - **I등급 (주요 대사산물):** 모 화합물과 동일한 구조 및 서열을 가진 불순물입니다. 이러한 불순물은 일반적으로 적격으로 간주됨.
 - **II등급 (자연적 구성 요소):** 핵산에서 자연적으로 발생하는 구조적 요소를 포함하는 불순물임.
 - **III류 (서열 변이체):** 염기 결실, 추가 또는 탈아미노화(예: n-1 또는 n+1 서열)와 같이 모 올리고뉴클레오타이드와 관련된 불순물임.
 - **IV급 (신규 구조):** 모 올리고뉴클레오타이드나 천연 뉴클레오타이드 어디에서도 발견되지 않는 구조적 요소를 가진 불순물(예: 고유한 염기 변형, 비정상적인 백본 결합). 이러한 불순물은 적격성 기준을 초과할 경우 엄격한 안전성 평가 및 독성학적 연계 연구가 필요함.

<참고> 글로벌 핵산치료제의 최근 규제정책

- Anna Rose Welch, Editorial & Community Director, Advancing RNA. Can Oligonucleotide Regulations Keep Up With Manufacturing Innovation?. July 1, 2026.
- 현재 올리고 규제 현황, 요약: 모든 규제 지침 및 가이드라인을 한곳에 모아둔 자료를 찾기는 드문 일임. 따라서 아래에는 우리가 현재 어떤 규제 환경을 다루고 있는지 더 명확히 파악할 수 있도록, 현재 이용 가능한 자료 목록(링크 포함)을 정리하였음.
- 가장 먼저 유의해야 할 점은: oligonucleotide만을 전적으로 다루는 ICH 지침은 없음. 그러나 현재 oligonucleotide 개발에 광범위하게 적용되는 여러 ICH 지침이 있음. 여기에는 다음이 포함됨.
 1. [ICH Q1](#): Guidelines on stability testing of drug substances and drug products
 2. [ICH Q8 \(R2\)](#): Pharmaceutical Development
 3. [ICH Q9](#): Quality Risk Management
 4. [ICH Q10](#): Pharmaceutical Quality System
 5. [ICH Q11](#): Development and manufacture of drug substances (chemical & biological entities)
 6. [ICH Q13](#): Continuous manufacturing of drug substances and drug products
- Oligonucleotide are **currently excluded** from:
 1. [ICH Q3A/B](#): Impurities in [new drug substances/drug products](#)
 2. [ICH Q6A](#): Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances

3. [ICH M7](#): Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk
- 그러나 ICH Q1, Q6 및 M7은 현재 개정 중이며, 이는 올리고뉴클레오타이드 분야에 상당한 파급 효과를 미칠 수 있음.

9. 결론: 핵산치료제 불순물 요약 및 극복방안

- RNA 치료제에서 불순물을 제거하기 위해서는 해당 분자가 효소에 의해 생성된 긴 전사 산물(mRNA)인지, 아니면 화학적으로 합성된 짧은 올리고뉴클레오타이드(siRNA, miRNA, miRNA mimics/antagomirs, ASOs, and aptamers) 인지 따라 서로 다른 전략이 필요함.
- 다음은 각 분자에서 흔히 발견되는 불순물에 대한 포괄적인 분석과, 이를 제거하기 위해 사용되는 구체적인 공학적 설계, 합성 및 정제 방법에 대한 설명임.

1) mRNA 불순물 및 해결방안

- 짧은 올리고뉴클레오타이드와 달리, mRNA(일반적으로 1,000~4,000개 이상의 뉴클레오타이드)는 공학적으로 설계된 플라스미드 DNA 템플릿과 RNA 중합효소를 이용한 **체외 전사 (IVT, In Vitro Transcription (IVT))** 과정을 통해 생성됨.

불순물 유형	원인/메커니즘	하류 단계에 미치는 영향	해결방안
Double-Stranded RNA (dsRNA)	RNA 중합효소 역추적 또는 자가상보적 루프 전사.	심각한 선천성 면역 반응 (TLR3, RIG-I를 통해)을 유발하며, 번역을 중단킴.	• 고온 IVT(돌연변이 T7 RNA 중합효소를 사용하여 40°C 이상)를 사용하거나, 역상 HPLC(RP-HPLC) 또는 셀룰로오스 기반 친화성 크로마토그래피 를 수행하여 단일 가닥 mRNA를 분리해야 함.
Truncated/Aberrant Transcripts	폴리머라제에 의한 조기 전사 종결	전체 길이의 mRNA와 경쟁하며, 기능하지 않는 단백질을 생성함	• 올리고-dT 친화성 크로마토그래피 를 적용하여, 폴리아데닐화된 전체 길이의 전사체만 포집하고 단축된 전사체는 세척액으로 배출되도록 함.
Residual DNA Template	IVT 반응 중 사용된 플라스미드 DNA	규제/안전 위험; 잠재적인 게놈 통합.	• 고효율 DNase I 분해 후, 효소 제거를 위해 접선 유동 여과(TFF, Tangential Flow Filtration)를 수행.
Uncapped mRNA	불완전한 효소적 캡핑 또는 전사 동시 캡핑 시약의 낮은 효율	세포 내 엑소뉴클레아제에 의해 빠르게 분해됨; 낮은 번역 효율	• 95% 이상의 캡핑 효율을 달성하기 위해 첨단 전사 동시 캡핑 유사체(co-transcriptional capping analogs, 예: CleanCap®) 를 사용하거나, 하류 단계에서 효소적 캡핑 단계(Vaccinia capping system)를 도입 필요성

2) siRNA, miRNA Mimics, & Antagomir 등의 불순물 및 해결방안

- 이는 고체상 화학 합성을 통해 생산되는 짧은 이중가닥(siRNA, miRNA mimics) 또는 단일가닥(antagomirs) RNA 분자(일반적으로 19-25 뉴클레오타이드)임.

불순물 유형	원인/메커니즘	하류 단계에 미치는 영향	해결방안
Shortmers (n-1, n-2)	고체상 합성 주기 중 불완전한 뉴클레오타이드 결합.	표적 외 유전자 침묵 또는 활성 이중가닥과의 경쟁.	• 고도로 최적화된 포스포아미디트 활성화(예: 5-벤질티오-1H-테트라졸(BTT) 사용)를 통해 결합 효율을 99% 이상으로 유지하십시오. 음이온 교환 크로마토그래피(AEX, Anion Exchange Chromatography) 또는 이온 쌍 역상 HPLC(IP-RP-HPLC, Ion-Pair Reversed-Phase HPLC) 를 통해 정제하여 단일 뉴클레오타이드 분해능을 달성 필요성
Longmers (n+1)	원치 않는 사슬 분지화 또는 5'-hydroxyl group의 조기 탈보호.	구조 왜곡, 기능 상실.	• 아세트산 무수물을 사용하여 합성 중 캡핑 단계를 최적화하여 반응하지 않은 5'-OH기(5'-hydroxyl group)를 영구적으로 차단하고, 고분해능 AEX 크로마토그래피 를 통해 분리함
Free Passenger or Guide Strands	불완전한 어닐링 또는 두 상보적 가닥 (Incomplete or stoichiometric imbalance)의 화학량론적 불균형 (siRNA/mimics)의 미	짜을 이루지 않은 가닥은 빠르게 분해되거나 비특이적인 off-target 독성을 유발함.	• 어닐링 단계(annealing step)에서 LC-MS를 통한 정확한 화학량론적 모니터링 을 수행하고, 크기 배제 크로마토그래피(SEC, size exclusion chromatography) 또는 온도 제어 여형 IP-RP-HPLC를 이용하여 이중가닥을 단일 가닥으로부터 분리함.

Acrylonitrile/ Acetylation Adducts	의 경우). 탈보호 과정에서 염기 외환 아민과 시아노에틸 보호기 간의 부반응	염기 쌍 형성 파괴; 독성	• 절단/탈보호 세척 단계에서 triethylamine (TEA) or diethylamine (DEA) 농도를 높여 스캐빈저 역할을 하게 함.
--	---	----------------	--

3) ASO(Antisense Oligonucleotide) 불순물 및 해결방안

- ASO는 뉴클레아제를 견딜 수 있도록 **phosphorothioate backbone**으로 광범위하게 변형된 짧은 단일 가닥 DNA/RNA gapmer(15~20 뉴클레오티드)임.

불순물 유형	원인/메커니즘	하류 단계에 미치는 영향	해결방안
Phosphodiester (P=O) Impurities	합성 주기 중 불완전한 황화 반응으로 인해 황 (P=S) 대신 산소가 남는 경우	대사적 안정성 저하; 생체 내에서 뉴클레아제에 의한 급속한 분해.	• 반응성이 높은 황화 시약(예: DDT 또는 PADS)을 사용하고 접촉 시간을 연장하며, ³¹ P-NMR 또는 고분해능 LC-HRMS를 통해 면밀히 모니터링해야 함
Diastereomeric Mixtures	표준 phosphoramidites 합성 과정에서 무작위로 생성된 키랄 인 원자(Rp 및 Sp 배열).	제어되지 않은 결합 친화도와 예측 불가능한 RNase H 절단 역학.	• 합성 과정에서 stereodefined phosphoramidites(chiral auxiliaries 키랄 보조제)를 활용하여 순수하고 입체 구조가 제어된 ASO 구조를 구현해야 함
Depurination/ Abasic Sites	detritylation step에서 가혹한 산성 조건에 의해 유발되는 glycosidic bond의 절단	후속 염기성 탈보호 과정에서 발생하는 가닥 절단	• 더 온화한 산(예: dichloroacetic acid in toluene instead of dichloromethane)을 사용하고 노출 시간을 단축하여 탈트리틸화 과정을 최적화함

4) Aptamer 불순물과 해결방안

- Aptamer는 특정 표적 분자에 결합하기 위해 복잡한 3차원 구조로 접히는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드(20~100 뉴클레오티드)임. Aptamer는 초기에는 **SELEX(효소적)**를 통해 생성되지만, 대규모 생산 시에는 **화학적 합성**을 통해 제조됨.

불순물 유형	원인/메커니즘	하류 단계에 미치는 영향	해결방안
Conformational Isomers (Misfolds)	동일한 서열 내에서 형성되는 대체적인 저에너지 2차 또는 3차 구조	표적 결합 친화도(Kd)의 급격한 저하 및 치료 효능 상실.	• 제어된 열 변성/재변성 주기(90~95°C로 가열한 후 특정 마그네슘 함유 완충액에서 서서히 냉각)를 적용함. • 모세관 겔 전기영동(CGE, Capillary Gel Electrophoresis) 또는 네이티브 SEC를 사용하여 균일한 접힘을 확인함
Accumulated n-x Truncated Shortmers	n-1 길이가 더 길기(>40 nt) 때문에, 화학 합성 과정에서 원료의 순도가 기하급수적으로 떨어짐	구조 붕괴, 올바른 접힘 실패, 경쟁적 억제.	• 이중 정제 전략을 시행하십시오: 먼저 고온(60~80°C)에서 AEX 크로마토그래피(Anion Exchange Chromatography)를 수행하여 구조적 접힘을 해제한 다음, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC, Hydrophobic Interaction Chromatography) 또는 RP-HPLC(reverse phase-HPLC)를 수행하십시오.

5) 범용 정제 도구 요약

- 임상적 안전성을 보장하기 위해, 제조 공정에서는 직교 분리 워크플로가 표준으로 적용됨(AI 등, 2026).
- ① **이온 쌍 역상 HPLC(Ion-Pair Reversed-Phase HPLC):** TEAA 또는 HFIP/TEA와 같은 이온 쌍 형성제를 사용하여 소수성 특성과 정확한 사슬 길이에 따라 서열을 분리함(Krušič 등, 2025).
- ② **강력 음이온 교환 크로마토그래피(Strong Anion Exchange Chromatography):** 강알칼리 조건(pH 12) 하에서 염 농도 구배를 이용하여 RNA 구조를 완전히 변성시키고, 인산 골격의 음전하만을 기준으로 분자를 순수하게 분리함(Goyon 등, 2020; Vanhinsbergh, 등, 2023).
- ③ **고분해능 질량 분석법(High-Resolution Mass Spectrometry):** 품질 관리의 황금 기준으로, 단일 달톤 단위의 차이까지 정확한 분자량을 검증하여 탈아미노화 또는 산화 현상을 포착함(Yulan 등, 2023; Rivera 등, 2024).

<참고문헌>

- FDA. Nonclinical Safety Assessment of Oligonucleotide-Based Therapeutics; Draft Guidance for Industry; Availability. 2024.
- Sara Azari, Sara Manellari, Giulia Anderluzzi, Paola Minghetti, Umberto M. Musazzi, Relevant factors to guarantee quality of oligonucleotide-based products, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 687, 2026, 126393, ISSN 0378-5173.
- Deyi Zhang & FDA. Oligonucleotides: Current Thinking and Analytical Challenges Identified in the Nusinersen PSG Development. 2022
- Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep 15;4(9):e252.
- Yannick A. Fillon, Nadim Akhtar, Benjamin I. Andrews, David Benstead, Simon Breitler, Robert S. Gronke, Martin Olbrich, Jessica A. Stolee, and Tobias Vandermeersch. Determination of Purge Factors for Use in Oligonucleotide Control Strategies. *Organic Process Research & Development* 2022 26 (4), 1130-1144.
- Sutton, J. Michael & Guimaraes, Guilherme & Annavarapu, Vidya & Bartlett, Michael. (2020). Current State of Oligonucleotide Characterization Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Insight into Critical Issues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 31. 10.1021/jasms.0c00179.
- DAICEL. Oligonucleotide Drug Impurities: Generic Industry Implications and the Regulatory Expectations. 31/03/2026
- Kim TW, Papagiannis C, Capaldi D, McPherson AK, Mahdi F, Luu N, Rodriguez AA, Hoffmaster C, Serota D, Henry SP. Impurity Qualification Toxicology Study for a 2'-O-Methoxyethyl-Modified Antisense Inhibitor in Mice. *Nucleic Acid Ther*. 2020 Feb;30(1):14-21.
- Andreanne Lortie, Elizabeth A. Martin, Kate Arnot, Non-mutagenic impurities – Recent industry experience of using dose durational limits in drug development, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 147, 2024, 105559, ISSN 0273-2300,
- European Pharma Oligonucleotide Consortium (EPOC). INDUSTRY PERSPECTIVE ON SYNTHETICOLIGONUCLEOTIDES by Daniel Capaldi. 2023.
- David Orchard-Webb. Analytical and regulatory CMC strategies for oligonucleotide therapeutics. 2021
- Shiwen Zhou, He Tang, Lu Gao, Wangyu Li, Jiancong Liao, Xihe Yang, Yuanjiang Pan, Hongru Feng, Identification of oligonucleotide drug impurities using heart-cutting two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS), *Analytica Chimica Acta*, Volume 1371, 2025, 344431, ISSN 0003-2670.
- AlShaer D, Al Musaimi O, Albericio F, de la Torre BG. 2025 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2026 Jan 30;19(2):244.
- Vanhinsbergh, Christina. (2023). The Role of Separation Techniques in the Analysis of mRNA Therapeutic Drug Substances and Drug Products. *LCGC Europe*. 42-50. 10.56530/lcgc.eu.hk6689y3.
- Bian Yulan and Jumhawan Udi. Oligonucleotide Characterization by Agilent 1290 Infinity II Bio LC and 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. Agilent Technologies application note, publication number 5994-5788EN, 2023.2.
- Brian Rivera and Jarod Grossman. Unit Mass Spectral Deconvolution for Molecular Weight Confirmation of Large Molecules. Agilent Technologies application note, publication number 5994-6928EN, 2024
- Goyon, Alexandre & Zhang, Kelly. (2020). Characterization of antisense oligonucleotide impurities by ion-pairing reversed-phase and anion exchange chromatography coupled to HILIC/MS using a versatile 2D-LC setup. *Analytical Chemistry*. XXXX. 10.1021/acs.analchem.0c00114.
- Al Bardawil S, Barthélémy P, Ferey L. Advances in Analysis of Therapeutic Oligonucleotides with Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2026 Apr 21;98(15):10895-10912.
- Krušič A, Mencin N, Leban M, Nett E, Perković M, Sahin U, Megušar P, Štrancar A, Sekirnik R. Reverse-phase chromatography removes double-stranded RNA, fragments, and residual template to decrease immunogenicity and increase cell potency of mRNA and saRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2025 Feb 22;36(2):102491.

Ali Zaidi, S., Fatima, F., Ali Zaidi, S. et al. Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies. *J Nanobiotechnol* 21, 381 (2023).

Xiaoxin Yan, Jinhu Liu, Jie Liu, Suyun Wei, Ruixin Li, Weiwei Mu, Na Zhang, Yongjun Liu, Advances in nano-delivery systems for overcoming the challenges of applying siRNA drugs in tumor therapy, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 21, Issue 1, 2026, 101119, ISSN 1818-0876.

Ziying Yao, Taiqing Liu, Jingwen Wang, Yunhai Fu, Jinhua Zhao, Xiaoyu Wang, Yinqi Li, Xiaodong Yang, Zhiyao He, Targeted delivery systems of siRNA based on ionizable lipid nanoparticles and cationic polymer vectors, *Biotechnology Advances*, Volume 81, 2025, 108546, ISSN 0734-9750.

Ze-Ao Huang, Zhen-Min Li, Jie Wang, Guang-Shen Ji, Zhong-Cai Gao, Ai-Fu Chen, Zhi-Kang Tian, Fei Yu, Geng-Shen Song, Ribofuranose-based GalNAc-conjugated siRNA enhances the liver-targeted delivery and elicits robust RNAi-mediated gene silencing, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, Volume 37, Issue 1, 2026, 102801, ISSN 2162-253.

Yamada, K., Hariharan, V.N., Caiazzi, J. et al. Enhancing siRNA efficacy in vivo with extended nucleic acid backbones. *Nat Biotechnol* 43, 904–913 (2025).

Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA*. 2006 Jul;12(7):1197-205.

Caffrey DR, Zhao J, Song Z, Schaffer ME, Haney SA, Subramanian RR, Seymour AB, Hughes JD. siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. *PLoS One*. 2011;6(7):e21503.

Neumeier J and Meister G (2021) siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. *Front. Plant Sci.* 11:526455. doi: 10.3389/fpls.2020.526455

Jiang Q, Fu J, An Y, Liu Y. Therapeutic siRNA: Mechanisms, challenges, strategies, and clinical translation. *Chin Med J (Engl)*. 2026 Jun 5;139(11):1633-1648.

Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2015 Sep;16(9):543-52.

Neumeier J, Meister G. siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. *Front Plant Sci*. 2021 Jan 28;11:526455.

Jackson, A., Linsley, P. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9, 57–67 (2010).

Berezcki, Z., Benczik, B., Balogh, O. M., Marton, S., Puhl, E., Pétervári, M., Váczy-Földi, M., Papp, Z. T., Makkos, A., Glass, K., Locquet, F., Euler, G., Schulz, R., Ferdinandy, P., & Ágg, B. (2025). Mitigating off-target effects of small RNAs: conventional approaches, network theory and artificial intelligence. *British Journal of Pharmacology*, 182(2), 340–379.

Haque US, Yokota T. Enhancing Antisense Oligonucleotide-Based Therapeutic Delivery with DG9, a Versatile Cell-Penetrating Peptide. *Cells*. 2023 Oct 2;12(19):2395.

Miller R, Paquette J, Barker A, Sapp E, McHugh N, Bramato B, Yamada N, Alterman J, Echeveria D, Yamada K, Watts J, Anacleot C, DiFiglia M, Khvorova A, Aronin N. Preventing acute neurotoxicity of CNS therapeutic oligonucleotides with the addition of Ca²⁺ and Mg²⁺ in the formulation. *bioRxiv* [Preprint]. 2024 Jun 8:2024.06.06.597639.

Lim YN, Ryu IS, Jung YJ, Helmlinger G, Kim I, Park HW, Kang H, Lee J, Lee HJ, Lee KS, Jang HN, Ha DI, Park J, Won J, Lim KS, Jeon CY, Cho HJ, Min HS, Ryu JH. I-Type amino acid transporter 1-targeting nanoparticles for antisense oligonucleotide delivery to the CNS. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024 Sep 16;35(4):102340.

Kamola P, Maratou K, Wilson P et al., Strategies for In Vivo Screening and Mitigation of Hepatotoxicity Associated with Antisense Drugs. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2017; 8, 383-394

D'Aniello, A.; Masi, A.; Avitabile, C.; del Monaco, G.; Saviano, M.; Moccia, M. Peptide Nucleic Acids (PNAs) in Antimicrobial Therapy: A Next Generation Strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 2026, 27, 1565.

Asami, Yutaro & Yoshioka, Kotaro & Nishina, Kazutaka & Nagata, Tetsuya & Yokota, Takanori. (2016). Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 10. 256-262.

Madalina Oprea, Mariana Ionita, Antisense oligonucleotides-based approaches for the treatment of multiple myeloma, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 291, 2025, 139186, ISSN 0141-8130.

Thiruganesh Ramasamy, Hima Bindu Ruttala, Shankar Munusamy, Nilay Chakraborty, Jong Oh Kim, Nano drug delivery systems for antisense oligonucleotides (ASO) therapeutics, *Journal of Controlled Release*, Volume 352, 2022, Pages 861-878, ISSN 0168-3659,

Scoles DR, Pulst SM. Oligonucleotide therapeutics in neurodegenerative diseases. *RNA Biol*. 2018;15(6):707-714. doi: 10.1080/15476286.2018.1454812.

Devos, Sarah & Miller, Timothy. (2013). Antisense Oligonucleotides: Treating Neurodegeneration at the Level of RNA. *Neurotherapeutics*. 10. 486-497.

Boros BD, Schoch KM, Kreple CJ, Miller TM. Antisense Oligonucleotides for the Study and Treatment of ALS. *Neurotherapeutics*. 2022 Jul;19(4):1145-1158.

Terada C, Oh K, Tsubaki R, Chan B, Aibara N, Ohyama K, Shibata MA, Wada T, Harada-Shiba M, Yamayoshi A, Yamamoto T. Dynamic and static control of the off-target interactions of antisense oligonucleotides using toehold chemistry. *Nat Commun*. 2023 Dec 2;14(1):7972.

Chen, Kevin & Koubek, Emily & Sakowski, Stacey & Feldman, Eva. (2024). Stem cell therapeutics and gene therapy for neurologic disorders. *Neurotherapeutics*. 21. e00427.

Jaspreet Bhamra, Mahati Krishna, George Samaan, Sankha Pattanayak, Swagatam Mukhopadhyay, Toxicity of Antisense Oligonucleotides is Determined by the Synergistic Interplay of Chemical Modifications and Nucleotide Sequences, Not by Either Factor Alone. *ChemBioChem* 2025, 26, e202500584,

Cantara S, Simoncelli G, Ricci C. Antisense Oligonucleotides (ASOs) in Motor Neuron Diseases: A Road to Cure in Light and Shade. *Int J Mol Sci*. 2024 Apr 28;25(9):4809.

Takayuki Kuroda, Kotaro Yoshioka, Su Su Lei Mon, Maho Katsuyama, Kumiko Sato, Eriko Isogai, Kie Yoshida-Tanaka, Rintaro Iwata-Hara, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika, Takanori Yokota, Unraveling and controlling late-onset neurotoxicity of antisense oligonucleotides through strategic chemical modifications, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, Volume 36, Issue 4, 2025, 102692, ISSN 2162-2531.

Miller R, Paquette J, Barker A, Sapp E, McHugh N, Bramato B, Yamada N, Alterman J, Echeveria D, Yamada K, Watts J, Anacleto C, DiFiglia M, Khvorova A, Aronin N. Preventing acute neurotoxicity of CNS therapeutic oligonucleotides with the addition of Ca²⁺ and Mg²⁺ in the formulation. *bioRxiv* [Preprint]. 2024 Jun 8:2024.06.06.597639.

Michael P. Moazami, Julia M. Rembetsy-Brown, Samantha L. Sarli, Holly R. McEachern, Feng Wang, Masahiro Ohara, Atish Wagh, Karen Kelly, Pranathi Meda Krishnamurthy, Alexandra Weiss, Miklos Marosfoi, Robert M. King, Mona Motwani, Heather Gray-Edwards, Katherine A. Fitzgerald, Robert H. Brown, Jonathan K. Watts, Quantifying and mitigating motor phenotypes induced by antisense oligonucleotides in the central nervous system, *Molecular Therapy*, Volume 32, Issue 12, 2024, Pages 4401-4417, ISSN 1525-0016.

Lauffer MC, van Roon-Mom W, Aartsma-Rus A; N = 1 Collaborative. Possibilities and limitations of antisense oligonucleotide therapies for the treatment of monogenic disorders. *Commun Med* (Lond). 2024 Jan 5;4(1):6.

BenchChem, 2026. The Core Principles of 2'-O-MOE GapmerDesign: An In-depth Technical Guide

Masahito Inagaki. Potential Application of Oligonucleotide Therapeutics in SARS-CoV-2 Genomic RNA Knockdown. *Biomed J Sci & Tech Res* 53(5)-2023. BJSTR. MS.ID.008460.

Aguti S, Cheng S, Ala P, et al. Strategies to improve the design of gapmer antisense oligonucleotide on allele-specific silencing. *Molecular therapy. Nucleic Acids*. 2024 Sep;35(3):102237.

D. Engelhardt, P. Nordberg, L. Knerr, L. R. Malins, Accessing Therapeutically-Relevant Multifunctional Antisense Oligonucleotide Conjugates Using Native Chemical Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2024, 63, e202409440.

Yang YW, Poudel B, Frederick J, Dhillon P, Shrestha R, Ma Z, Wu J, Okamoto K, Kopp JB, Booten SL, Gattis D, Watt AT, Palmer M, Aghajan M, Susztak K. Antisense oligonucleotides ameliorate kidney dysfunction in podocyte-specific APOL1 risk variant mice. *Mol Ther*. 2022 Jul 6;30(7):2491-2504.

Alhamadani F, Zhang K, Parikh R, Wu H, Rasmussen TP, Bahal R, Zhong XB, Manautou JE. Adverse Drug Reactions and Toxicity of the Food and Drug Administration-Approved Antisense Oligonucleotide Drugs. *Drug Metab Dispos*. 2022 Jun;50(6):879-887.

Hangyu Wu, Aniket Wahane, Feryal Alhamadani, Kristy Zhang, Rajvi Parikh, SooWan Lee, Evan M.

McCabe, Theodore P. Rasmussen, Raman Bahal, Xiao-bo Zhong, José E. Manautou, Nephrotoxicity of marketed antisense oligonucleotide drugs, *Current Opinion in Toxicology*, Volume 32, 2022, 100373, ISSN 2468-2020.

Tarn WY, Cheng Y, Ko SH, Huang LM. Antisense Oligonucleotide-Based Therapy of Viral Infections. *Pharmaceutics*. 2021 Nov 26;13(12):2015.

Jia C, Lei Mon SS, Yang Y, Katsuyama M, Yoshida-Tanaka K, Nagata T, Yoshioka K, Yokota T. Change of intracellular calcium level causes acute neurotoxicity by antisense oligonucleotides via CSF route. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 Dec 23;31:182-196.

Schwenk, C. & Wenz, Friederike & Tu, M. & Zapiórkowska-Blumer, N. & Sanchez, K. & Filippi, B.. (2025). P18-33 Initial evaluation of the utility of human liver microtissues for prediction of clinical liver injury caused by antisense oligonucleotides. *Toxicology Letters*. 411. S203. 10.1016/j.toxlet.2025.07.486.

Kamola P, Maratou K, Wilson P et al., Strategies for In Vivo Screening and Mitigation of Hepatotoxicity Associated with Antisense Drugs. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2017; 8, 383-394.

Tabernilla A, Dos Santos Rodrigues B, Pieters A, Caufriez A, Leroy K, Van Campenhout R, Cooreman A, Gomes AR, Arnesdotter E, Gijbels E, Vinken M. In Vitro Liver Toxicity Testing of Chemicals: A Pragmatic Approach. *Int J Mol Sci*. 2021 May 10;22(9):5038.

Sewing S, Boess F, Moisan A, Bertinetti-Lapatki C, Minz T, Hedtjaern M, Tessier Y, Schuler F, Singer T, Roth AB. Establishment of a Predictive In Vitro Assay for Assessment of the Hepatotoxic Potential of Oligonucleotide Drugs. *PLoS One*. 2016 Jul 21;11(7):e0159431. doi: 10.1371/journal.pone.0159431.

Piotr J. Kamola, Klio Maratou, Paul A. Wilson, Kay Rush, Tanya Mullaney, Tom McKeivitt, Paula Evans, Jim Ridings, Probash Chowdhury, Aude Roulois, Ann Fairchild, Sean McCawley, Karen Cartwright, Nigel J. Gooderham, Timothy W. Gant, Kitty Moores, Stephen A. Hughes, Mark R. Edbrooke, Kenneth Clark, Joel D. Parry, Strategies for In Vivo Screening and Mitigation of Hepatotoxicity Associated with Antisense Drugs, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, Volume 8, 2017, Pages 383-394, ISSN 2162-2531.

J. Kamola, Klio Maratou, Paul A. Wilson, Kay Rush, Tanya Mullaney, Tom McKeivitt, Paula Evans, Jim Ridings, Probash Chowdhury, Aude Roulois, Ann Fairchild, Sean McCawley, Karen Cartwright, Nigel J. Gooderham, Timothy W. Gant, Kitty Moores, Stephen A. Hughes, Mark R. Edbrooke, Kenneth Clark, Joel D. Parry, Strategies for In Vivo Screening and Mitigation of Hepatotoxicity Associated with Antisense Drugs, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, Volume 8, 2017, Pages 383-394, ISSN 2162-2531.

Hagedorn PH, Yakimov V, Ottosen S, Kammler S, Nielsen NF, Høg AM, Hedtjærn M, Meldgaard M, Møller MR, Orum H, Koch T, Lindow M. Hepatotoxic potential of therapeutic oligonucleotides can be predicted from their sequence and modification pattern. *Nucleic Acid Ther*. 2013 Oct;23(5):302-10.

Sehgal A, Vaishnav A, Fitzgerald K. Liver as a target for oligonucleotide therapeutics *Journal of Hepatology*, 2013; 59, 1354-1359.

Chen P, Wei Y, Sun T, Lin J, Zhang K. Enabling safer, more potent oligonucleotide therapeutics with bottlebrush polymer conjugates. *J Control Release*. 2024 Feb;366:44-51.

Sara Azari, Sara Manellari, Giulia Anderluzzi, Paola Minghetti, Umberto M. Musazzi, Relevant factors to guarantee quality of oligonucleotide-based products, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 687, 2026, 126393, ISSN 0378-5173.

Bhamra J, Krishna M, Samaan G, Pattanayak S, Mukhopadhyay S. Toxicity of Antisense Oligonucleotides is Determined by the Synergistic Interplay of Chemical Modifications and Nucleotide Sequences, Not by Either Factor Alone. *Chembiochem*. 2025 Oct 31;26(20):e202500584.

Pack, Brian & Siegel, Robert & Cornwell, Paul & Ferrante, Andrea & Roepke, Douglas & Hodsdon, Michael & Malherbe, Laurent & Carfagna, Mark. (2025). A Phase-Appropriate Risk Assessment Strategy in Support of the Safety of Peptide and Oligonucleotide-Related Impurities. *The AAPS Journal*. 27. 10.1208/s12248-025-01023-y.

Talotta, R., Rucci, F., Canti, G., & Scaglione, F. (2019). Pros and Cons of the Immunogenicity of Monoclonal Antibodies in Cancer Treatment: A Lesson from Autoimmune Diseases. *Immunotherapy*, 11(3), 241–254.

Grudzinska-Goebel, Joanna & Braun, Manuela & Chen, Lin-Zhi & Gupta, Swati & Lohmann, Sabine & Morais, Pedro & Niu, Tao & Tarcza, Edit & Tourdot, Sophie & Youssef, Amir & Jawa, Vibha. (2025). Immunogenicity Risk Assessment for Nucleic Acid Therapeutics: A Comprehensive Evaluation for ASO, siRNA, and Nonvaccine mRNA/LNP Therapies by the IQ Consortium. *Nucleic Acid*

Therapeutics. 35. 261-279. 10.1177/21593337251387423.

Descotes, J., & Gouraud, A. (2008). Clinical immunotoxicity of therapeutic proteins. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(12), 1537-1549.

Rodriguez Carstens P, Moriyama H, Yokota T. From Genomic Diagnosis to Personalized RNA Medicine: Advances in Next-Generation Sequencing and N-of-1 Antisense Oligonucleotide Therapies for Rare Genetic Diseases. *Genes (Basel)*. 2026 Mar 15;17(3):318.

Arthur M. Krieg, How to test for immune activation by your therapeutic oligonucleotide. *OTS*. 2018.

Bano N, Ehlinger C, Yang TY, Swanson M, Allen S. Considerations in the Immunogenicity Assessment Strategy for Oligonucleotide Therapeutics (ONTs). *AAPS J*. 2022 Aug 26;24(5):93

Zhao, A., Bond, S., Clausen, V. et al. Immunogenicity Assessment for siRNA Therapeutics: A Risk-Based Proposal for Event-Driven Testing. *AAPS J* 28, 106 (2026).

Terada, C., Oh, K., Tsubaki, R. et al. Dynamic and static control of the off-target interactions of antisense oligonucleotides using toehold chemistry. *Nat Commun* 14, 7972 (2023).

Nedorezova DD, Dubovichenko MV, Belyaeva EP, Griqorieva ED, Peresadina AV, Kolpashchikov DM. Specificity of oligonucleotide gene therapy (OGT) agents. *Theranostics* 2022; 12(16):7132-7157.

Haiwen Ruan, Dehu Dou, Jing Lu, Xia Xiao, Xinjiang Gong, Xuefeng Zhang, Off-target effects of oligonucleotides and approaches of preclinical assessments, *SLAS Discovery*, Volume 35, 2025, 100254, ISSN 2472-5552.

Maki, Kazushige. (2020). Preclinical safety assessments of mRNA-targeting oligonucleotide therapeutics. *Translational and Regulatory Sciences*. 2. 90-93. 1

Andersson, P. (2022). Preclinical Safety Assessment of Therapeutic Oligonucleotides. In: Arechavala-Gomez, V., Garanto, A. (eds) *Antisense RNA Design, Delivery, and Analysis*. *Methods in Molecular Biology*, vol 2434. Humana, New York, NY.

Jessica Hawes, Qiang Shi¹, Lijun Ren, Laura Schnackenberg, Kui Yang. Toxicity of three antisense oligonucleotide drugs and eighteen of their impurities in primary human hepatocytes. *FDA/NCTR & FDA/CDER*. 2023,

Kazushige MAKI. Preclinical safety assessments of mRNA-targeting oligonucleotide therapeutics. *Translat Regulat Sci*. 2(3): 90-93, 2020; doi: 10.33611/trs.2020-010

Andersson P. Preclinical Safety Assessment of Therapeutic Oligonucleotides. 2022 Feb 25. In: Arechavala-Gomez V, Garanto A, editors. *Antisense RNA Design, Delivery, and Analysis* [Internet]. New York: Humana; 2022. Chapter 25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK584239/> doi: 10.1007/978-1-0716-2010-6_25

Rohde CM, Lindemann C, Giovanelli M, Sellers RS, Diekmann J, Choudhary S, Ramaiah L, Vogel AB, Chervona Y, Muik A, Sahin U. Toxicological Assessments of a Pandemic COVID-19 Vaccine-Demonstrating the Suitability of a Platform Approach for mRNA Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2023 Feb 11;11(2):417.

Biomere. *Toxicology Studies for RNA-Based Therapies and Vaccines*. 2025.

AlShaer D, Al Musaimi O, Albericio F, de la Torre BG. 2025 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2026 Jan 30;19(2):244.

WXpress. *Oligonucleotide Therapeutics in Q1 2026: Key Industry Trends and How Integrated Platforms Enable Nucleic Acid Drug Development*. 2026

DelveInsight Business Research LLP. *Oligonucleotides Clinical Trial Drug Development Pipeline Expands with Contributions from 200+ Key Companies* | DelveInsight. 2026.

AlShaer D, Al Musaimi O, Albericio F, de la Torre BG. 2025 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2026 Jan 30;19(2):244.

Decolibus DP, Searcy J, Tivesten A, et al.. Considerations for the Terminal Sterilization of Oligonucleotide Drug Products. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2023;33(3):159-177.

Labmate. *Analysis of Oligonucleotides and their Related Substances*. 2013

Reshma Sundar, Xue Mi, Ashton Lavoie, Ane Quesada Ganuza, Suna Lipp, Marija Brgles, Denise

Teber, Steven Henry, Ashoka Maddur, Pepijn Burgers, Beata Adamiak, Victor Chen, Roland Pach, Haiqing Yu, Kate Groves, Nic Preyat, Paraq Kumthekar, Simon Walker, Yong-Syu Lee, Hunter Walker, Qirong Wu, Spyridon Gerontas, Ying Zhang, Sophie Cheverry, Ishtiaq Khaliq. Impurities in viral-based therapeutics: mastering residual hcDNA: a harmonized approach for AAV gene therapies. *Cell & Gene Therapy Insights* 2025; 11(9), 1107–1123.

Samoilov, M.; Zubareva, E.; Degterev, M. Development and Validation of an Ion-Pair Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry Method for Determination of Purity of Nusinersen for Quality Control of Drug Substance or Drug Product. *Int. J. Mol. Sci.* 2026, 27, 3301.

Capaldi D, Teasdale A, Henry S, et al. Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2017;27(6):309-322.

J. Kaufmann and T. M. Rupp, in *Sustainability in Tides ChemistryGreen Approaches to Oligonucleotides and Oligopeptides Synthesis*, ed. A. Tolomelli, L. Ferrazzano, and W. Cabri, Royal Society of Chemistry, 2024, ch. 13, pp. 298-335.

Yasunori Uchida, Tokuyuki Yoshida, Emi Saito, Hirokazu Nankai, Kaoru Karasawa, Chie Inagaki, Noriyuki Iwasaki, Daisuke Higo, Kentaro Takahara, Takashi Osawa, Takao Yamaguchi, Kosuke Ito, Junji Kawakami, Satoshi Obika, Takao Inoue, Theoretical calculation of the amounts of nucleotide deletion impurities in oligonucleotides, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 687, 2026, 126364, ISSN 0378-5173.

J. Kaufmann and T. M. Rupp, in *Sustainability in Tides ChemistryGreen Approaches to Oligonucleotides and Oligopeptides Synthesis*, ed. A. Tolomelli, L. Ferrazzano, and W. Cabri, Royal Society of Chemistry, 2024, ch. 13, pp. 298-335.

Hao Liang, Dalong Hou, Siming Li, Simin Chen, Yaru Ma, Haiqi Liu, Fushun Fan, Yuqiang Wang, Changqiang Qian, and Xinjian Liu. Impurities from Hydroxyproline Derivatives in the Synthesis of Modified Oligonucleotides. *Organic Process Research & Development*. 2024, 28(10), 3883-3887

Jadera Talap, Jing Zhao, Minzhe Shen, Zihan Song, Hui Zhou, Yu Kang, Lianli Sun, Lushan Yu, Su Zeng, Sheng Cai, Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 206, 2021, 114368, ISSN 0731-7085.

Yasunori Uchida, Tokuyuki Yoshida, Emi Saito, Hirokazu Nankai, Kaoru Karasawa, Chie Inagaki, Noriyuki Iwasaki, Daisuke Higo, Kentaro Takahara, Takashi Osawa, Takao Yamaguchi, Kosuke Ito, Junji Kawakami, Satoshi Obika, Takao Inoue, Theoretical calculation of the amounts of nucleotide deletion impurities in oligonucleotides, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 687, 2026, 126364, ISSN 0378-5173.

Hsin-I Jen, Patrick Wilkinson, Xiaohui Lu, Wei Zhang, Residual DNA impurities in AAV vectors—nature and transcription, *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, Volume 33, Issue 3, 2025, 101503, ISSN 2329-0501.

Akita T, Tomita-Sudo E, Sano R, Sakimoto N, Iwai S, Nankai H, Obika S, Inoue T, Kawakami J. Effects of N-1-Mer Impurities in Antisense Oligonucleotides on the Target RNA Suppression. *Nucleic Acid Ther.* 2026 Apr;36(2):109-116.

Creative biolab. Purity Determination Service of Nucleic Acid. 2026.

Shiwen Zhou, He Tanq, Lu Gao, Wangyu Li, Jiancong Liao, Xihe Yang, Yuanjiang Pan, Hongru Feng. Identification of oligonucleotide drug impurities using heart-cutting two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS), *Analytica Chimica Acta*, Volume 1371, 2025, 344431, ISSN 0003-2670.

USFDA. A NOVEL SOLID SUPPORT FOR EFFICIENT REDUCTION OF PROCESS-RELATED IMPURITIES IN SYNTHETIC NUCLEIC ACID SEQUENCES. FDA Reference No: E-2020-015

David Alvaro. Impurities, Sequence Fidelity, and Structural Variants in Nucleic Acid Therapeutics. *Pharma's Almanac*. 2026.

Weng Y, Huang Q, Li C et al, Improved Nucleic Acid Therapy with Advanced Nanoscale Biotechnology. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2020; 19, 581-601.

Kim, J., Eygeris, Y., Ryals, R.C. et al. Strategies for non-viral vectors targeting organs beyond the liver. *Nat. Nanotechnol.* 19, 428–447 (2024)

Hangyu Wu, Aniket Wahane, Ferval Alhamadani, Kristy Zhana, Raivi Parikh, SooWan Lee, Evan M. McCabe, Theodore P. Rasmussen, Raman Bahal, Xiao-bo Zhong, José E. Manautou, Nephrotoxicity

of marketed antisense oligonucleotide drugs, *Current Opinion in Toxicology*, Volume 32, 2022, 100373, ISSN 2468-2020.

Goyenvallé A, Jimenez-Mallebrera C, van Roon W, Sewing S, Krieg AM, Arechavala-Gomez V, Andersson P. Considerations in the Preclinical Assessment of the Safety of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2023 Jan;33(1):1-16.

Crisafulli, S., Cutroneo, P.M., Luxi, N. et al. Is PEGylation of Drugs Associated with Hypersensitivity Reactions? An Analysis of the Italian National Spontaneous Adverse Drug Reaction Reporting System. *Drug Saf* 46, 343–355 (2023).

Prajapati R, Somoza Á. Albumin Nanostructures for Nucleic Acid Delivery in Cancer: Current Trend, Emerging Issues, and Possible Solutions. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 9;13(14):3454.

Mittra I, Nair NK, Mishra PK. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J Biosci.* 2012 Jun;37(2):301-12.

Xu L, Anchordoquy T. Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. *J Pharm Sci.* 2011 Jan;100(1):38-52.

Roy A, Bansal S, Kulkarni A, Reddy KR. Hepatic Manifestations Following Gene Therapy. *Gastro Hep Adv.* 2025 Apr 24;4(8):100681.

Zhimin Li, Li Zhang, Kai Jiang, Yijing Zhang, Yonglin Liu, Guang Hu, and Jie Song. Biosafety assessment of delivery systems for clinical nucleic acid therapeutics. Volume 4, Issue 2, 2022, Pages 105-117, ISSN 2590-0536.

Ramya Kumar, Cristiam F. Santa Chalarca, Matthew R. Bockman, Craig Van Bruggen, Christian J. Grimme, Rishad J. Dalal, Mckenna G. Hanson, Joseph K. Hexum, and Theresa M. Reineke. Polymeric Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. *Chemical Reviews* 2021 121 (18), 11527-11652.

Naeem S, Zhang J, Zhang Y, Wang Y. Nucleic acid therapeutics: Past, present, and future. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2024 Dec 23;36(1):102440.

Jurgielewicz B, Stice S, Yao Y. Therapeutic Potential of Nucleic Acids when Combined with Extracellular Vesicles. *Aging Dis.* 2021 Sep 1;12(6):1476-1493.

Ranjbar S, Zhong XB, Manautou J, Lu X. A holistic analysis of the intrinsic and delivery-mediated toxicity of siRNA therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2023 Oct;201:115052.

Sun, X., Setrerrahmane, S., Li, C. et al. Nucleic acid drugs: recent progress and future perspectives. *Sig Transduct Target Ther* 9, 316 (2024).

Hiroki Tanaka, Yuka Sato, Tomoya Nakabayashi, Akari Tanaka, Kazuma Nishio, Chika Matsumoto, Atsuya Matsumaru, Takuma Yamakawa, Kota Ishizaki, Keisuke Ueda, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe, Yuta Nakai, Kota Tange, and Hidetaka Akita. A Post-Encapsulation Method for the Preparation of mRNA-LNPs via the Nucleic Acid-Bridged Fusion of mRNA-Free LNPs. *Nano Letters* 2025 25 (16), 6445-6453.

Liu, M., Wang, Y., Zhang, Y. et al. Landscape of small nucleic acid therapeutics: moving from the bench to the clinic as next-generation medicines. *Sig Transduct Target Ther* 10, 73 (2025).

Hong S, Jeong SH, Han JH, Yuk HD, Jeong CW, Ku JH, Kwak C. Highly efficient nucleic acid encapsulation method for targeted gene therapy using antibody conjugation system. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2024 Sep 5;35(4):102322.

Mendes, B.B., Coniot, J., Avital, A. et al. Nanodelivery of nucleic acids. *Nat Rev Methods Primers* 2, 24 (2022).

Ying K. Tam and Paulo Lin. Combining pre-formed vesicles with nucleic acid cargo at the point of care can remove long-standing barriers to personalized nucleic acid therapeutics. *The scientist*, 2026

Cao Thuy Giang Nguyen, Fanfei Meng, Unleashing the power of nucleic acid therapeutics through efficient cytosolic delivery, *Journal of Controlled Release*, Volume 383, 2025, 113774, ISSN 0168-3659.

Qin, Y., Ou, L., Zha, L. et al. Delivery of nucleic acids using nanomaterials. *Mol Biomed* 4, 48 (2023).

Kulkarni, J.A., Witzigmann, D., Thomson, S.B. et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* 16, 630–643 (2021).

Martin Egli, Muthiah Manoharan, Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue 6, 11 April 2023, Pages 2529–2573,

Zhou, J., Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 16, 181–202 (2017)

Driscoll J, Gondaliya P, Zinn D et al., Using aptamers for targeted delivery of RNA therapies. *Molecular Therapy*, 2025; 33, 1344-1367

Driscoll J, Gondaliya P, Zinn DA, Jain R, Yan IK, Dong H, Patel T. Using aptamers for targeted delivery of RNA therapies. *Mol Ther*. 2025 Apr 2;33(4):1344-1367.

Sun, X., Setrerrahmane, S., Li, C. et al. Nucleic acid drugs: recent progress and future perspectives. *Sig Transduct Target Ther* 9, 316 (2024).

Sajid Naeem, Ju Zhang, Yang Zhang, Yu Wang, Nucleic acid therapeutics: Past, present, and future, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, Volume 36, Issue 1, 2025, 102440, ISSN 2162-2531.

Liu, Y.; Wang, C.; Fu, X.; Ren, M. The Progress and Evolving Trends in Nucleic-Acid-Based Therapies. *Biomolecules* 2025, 15, 376.

Bege M, Borbás A. The Medicinal Chemistry of Artificial Nucleic Acids and Therapeutic Oligonucleotides. *Pharmaceuticals* (Basel). 2022 Jul 22;15(8):909.

Bowen Xiao, Shaopeng Wang, Yu Pan, Wenjun Zhi, Chensheng Gu, Tao Guo, Jiaqi Zhai, Chenxu Li, Yong Q. Chen, Rong Wang, Development, opportunities, and challenges of siRNA nucleic acid drugs, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, Volume 36, Issue 1, 2025, 102437, ISSN 2162-2531.

123. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(5) - 줄기세포 치료제의 Toxicological TPP

1. 세포치료제의 개념

- CAR-T, TCR와 같이 유전자 수준에서도 이루어지지만 결국 세포 수준에서의 치료제임. 굳이 유전자-세포치료제로 분류하는 것보다 여기서는 세포 수준에서 치료제가 인체에 주입된다는 측면에서 세포치료제(cell therapy)로 명명하였음.

2. 주요 세포치료제 기법

- 세포 치료는 기능과 기원에 따라 크게 다른 플랫폼으로 분류됨.

1) 조작된 면역 세포(Engineered Immune Cells)

① 개념과 종류

- CAR-T**(Chimeric Antigen Receptor T-cell) therapy, **TIL**(Tumor-Infiltrating Lymphocyte) therapy, **TCR**(T-cell Receptor) therapy 등이 있으며 모두 입양 세포 치료(ACT, adoptive cell therapy)의 일종임. 환자의 면역 체계를 활용하여 암과 싸우는 치료법. 모두 T 세포를 추출하고 증식시킨 뒤 다시 주입하는 과정을 거치지만, 세포의 확보 방식과 표적 대상에 있어 상당한 차이가 있음. 기타 신흥 입양 세포 치료 치료법으로는 고형 종양 치료를 위해 CAR-NK(자연 살인자) 세포와 CAR-M(대식세포) 세포를 적극적으로 연구하고 있음(Albarrán-Fernández 등, 2025; Mhatre 등, 2023; Zouali 등, 2024).

<표> Adoptive cell therapy 종류

Feature	CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell)	TIL (Tumor-Infiltrating Lymphocyte)	TCR (T-cell Receptor)
Primary Targets	• 액체 종양 (백혈병, 림프종, 다발성 골수종 같은 혈액암)	• 고형 종양 (예: 진행성 흑색종, 두경부암)	• 고형 종양 (예: 활막 육종)
Mechanism	• 합성 수용체를 가진 T세포를 설계하여 조직적합복합체 (MHC·Major Histocompatibility Complex)와 독립적으로 표면 단백질(항원)을 인식함	• 자연스럽게 종양으로 이동한 T세포를 추출하여 실험실에서 배양함	• 세포 내에 숨겨진 종양 항원을 인식할 수 있도록 변형된 수용체를 가진 T세포를 엔지니어링합니다(MHC 의존).
Cell Source	• 환자 순환 중의 혈액 (백혈격 분리술을 통해 수집됨)	• 외과적 제거 종양 조직	• 환자 순환 중의 혈액 (백혈격 분리술을 통해 수집됨)
Genetic Modification	• 바이러스/비바이러스 벡터로 변형됨	• 자연적으로 발생하는 종양 반응성 세포를 선택하고 증식	• 특정 T세포 수용체의 유전자를 삽입함

② FDA-approved CAR-T, TIL, TCR therapy

- 현재(2026년 1월) FDA 승인 CAR-T 치료제는 7종, TIL 치료제 및 TCR 치료제는 각 2종으로 확인되었으며 다음의 <표>에서 치료제와 적응증을 확인할 수 있음(Rosa 등, 2026; Parums 등, 2025; eCancer 등, 2024).

FDA-Approved CAR-T Cell Therapy	
Kymriah™ (tisagenlecleucel)	<ul style="list-style-type: none"> 재발 또는 난치성 B세포 전구세포 급성 림프구성 백혈병(ALL)을 앓고 있는 소아 및 청년 환자(25세 이하)와, 2회 이상의 전신 요법을 받은 후 재발 또는 난치성 대세포 B세포 림프종(relapsed/refractory large B-cell lymphoma, LBCL)을 앓고 있는 성인 환자에게 승인
Yescarta™ (axicabtagene ciloleucel)	<ul style="list-style-type: none"> 두 가지 이상의 전신 치료 라인 후 재발 또는 불응성 대B세포 림프종이 발생한 성인 환자에게 적응증이 있으며, 여기에는 확산성 대B세포 림프종(DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma), 원발성 종격막 대형B세포 림프종, 고등급 B세포 림프종, 그리고 난포 림프종에서 발생하는 DLBCL이 포함됨.
Tecartus™ (brexucabtagene autoleucel)	<ul style="list-style-type: none"> 재발 또는 불응성 맨틀세포 림프종(Relapsed or refractory mantle cell lymphoma) 성인 환자와 재발 또는 불응성 B세포 전구체(B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, ALL)을 가진 성인 환자에게 승인됨.
Breyanzi™ (lisocabtagene maraleucel)	<ul style="list-style-type: none"> 두 가지 이상의 전신 치료 라인(DLBCL 등 별도 명시되지 않음), 고등급 B세포 림프종(large B-cell lymphomas, LBCL), 원발성 종격자 대B세포 림프종(marginal zone lymphoma, MZL) 난포 림프종 3B등급 등 두 가지 이상의 전신 치료 후 재발하거나 불안정한 대B세포 림프종을 가진 성인 환자에게 적응이 필요함.
Abecma™ (idecabtagene vicleucel)	<ul style="list-style-type: none"> 면역조절제, 프로테아좀 억제제, 항CD38 단클론 항체 등 4회 이상의 이전 치료 라인 후 재발 또는 불응성 다발성 골수종(Multiple myeloma) 성인 환자에게 승인됨.
Carvykti™ (ciltacabtagene autoleucel)	<ul style="list-style-type: none"> 4회 이상의 이전 치료 라인 후 재발 또는 불응성 다발성 골수종(Relapsed or refractory multiple myeloma, RRMM) 성인 환자에게 적응 효과가 있음.
Aucatzyl™ (obecabtagene autoleucel)	<ul style="list-style-type: none"> 2024년 11월에 최근 승인되었으며, 재발 또는 불응성 B세포 전구체(B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, ALL)을 가진 성인 환자에게 적응
FDA-Approved TIL(Tumor Infiltrating Lymphocyte) therapy	
Amtagvi™ (lifileucel)	<ul style="list-style-type: none"> 수술로 제거할 수 없는 성인 또는 전이성 흑색종을 가진 환자를 위한 치료제
FDA-Approved TCR(T-cell receptor) therapy	
Tecelra™ (generic name: afamitresgene autoleucel, also known as afami-cel)	<ul style="list-style-type: none"> 이전에 화학요법을 받은 적이 있는 절제 불가능하거나 전이성 활막 육종(unresectable or metastatic synovial sarcoma)을 가진 성인 및 소아 환자(12세 이상)를 치료

③ CAR-T, TIL, TCR 등의 **Adoptive cell therapy**와 관련하여 최근 발전 상황 및 진행 중인 연구는 다음의 <표> 같음(Rosa 등, 2026; Albarrán-Fernández 등, 2025; Echchannaoui 등, 2025).

연구 카테고리	연구 내용
고형 종양 응용 (Solid Tumor Applications)	<ul style="list-style-type: none"> 항원 식별과 구조적 혁신에 중점을 두어 항원 이질성과 면역억제성 종양 미세환경 같은 문제를 극복하기 위해 CAR-T 치료를 고형 종양으로 확장하는 데 진전을 이루고 있음
기성형 CAR-T (Off-the-Shelf CAR-T)	<ul style="list-style-type: none"> 재발/불응성 T세포 급성 림프구성 백혈병 또는 T세포 림프구성 림프종을 위한 항CD7 CAR-T 치료제인 WU-CART-007의 중추적 2상 임상시험이 2025년 초에 시작됨
자가면역 질환 적용 (Autoimmune Disease Applications)	<ul style="list-style-type: none"> CAR-T 치료는 루푸스와 다발성 경화증과 같은 자가면역 질환에 대해 연구되고 있으며, 여러 회사가 2상 및 3상 임상시험을 진행 중
장기 이식 (Organ Transplantation)	<ul style="list-style-type: none"> 메이요 클리닉 연구진은 감작된 환자에서 장기 거부 반응을 예방하기 위해 CAR-T 세포를 활용하는 방안을 연구하고 있으며, 이는 신장 이식에 혁신을 가져올 가능성이 있음
제조 혁신 (Manufacturing Innovations)	<ul style="list-style-type: none"> 잠자는 숲속의 미녀 트랜스포존 시스템, mRNA 기반 CAR 트랜스펙션, 생체 내 CAR-T 세포 생산과 같은 새로운 접근법이 접근성과 확장성을 높이기 위해 개발되고 있음
안전성 및 효능 향상	<ul style="list-style-type: none"> 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 같은 부작용을 완화하고 CAR-T 세

(Enhanced Safety and Efficacy)	<ul style="list-style-type: none"> 포 지속 능력을 개선하기 위한 전략들이 개발되고 있으며, 여기에는 CRISPR-Cas9 변형 및 체크포인트 억제제와의 병용 치료가 포함됨. 이러한 발전은 CAR-T 세포 치료의 급속히 변화하는 상황을 보여주며, 혈액학적 악성 종양을 넘어 적용 범위를 확장하고 전반적인 효능과 안전성 프로필을 개선하기 위한 지속적인 노력이 진행 중임.
--------------------------------	---

2. 줄기세포 치료제(MSC, HSC, iPSCs, hESCs)

① 치료 영역과 개발의 한계

- 줄기세포 치료, 재생 의학, 줄기세포나 그 유도체를 이용해 병든 조직, 기능 장애가 있거나 손상된 조직을 수리하거나 대체하는 방법의 치료제임. 골수, 지방, 탯줄혈에서 세포를 분리함으로써 골관절염, 힘줄 손상부터 혈액암에 이르기까지 다양한 질환을 겨냥할 수 있음.
- 그러나 다양한 질환 치료 범위 및 영역에도 불구하고 FDA는 극히 제한된 수의 줄기세포 치료법만을 승인했음. 이러한 치료법은 혈액암, 면역 질환, 유전병과 같은 특정 중증 질환에 대해서만 사용이 허가되어 있음. 사실 클리닉에서 제공하는 대다수의 줄기세포 치료(예: 관절통, 관절염, 노화 방지 등)는 **FDA 승인을 받지 않았으며**, 심각한 건강상의 위험을 초래할 수 있음.

② FDA-승인된 줄기세포 치료제

- 고전적 줄기세포 치료법 중 유일하게 FDA에 의해 널리 승인된 전통적인 줄기세포 치료법은 <표>에서처럼 FDA가 광범위하게 승인한 유일하고 확립된 전통적인 줄기세포 치료법은 **조혈모세포 이식(HSCT, Hematopoietic stem cell transplantation)**임. 즉, 병든 혈액과 면역 세포를 대체하는 치료제임(Cell colabs clinical, 2026). 특히 줄기세포 치료제는 특수 세포 유형으로 분화하거나 치료용 Paracrine 인자를 분비할 수 있는 다능성 또는 다능성 줄기세포를 사용하는 것으로 다음과 같이 2 분야로 분류됨.

- ① 재생 의학: 중간엽 줄기세포(MSC, Mesenchymal Stromal Cells)는 골관절염에서 연골 재생을 촉진하고 심혈관 및 신경학적 질환의 치유를 촉진하는 데 사용됨.
- ② 혈액 질환: 조혈 줄기세포 이식(HSCT, Hematopoietic stem cell transplantation)은 손상된 혈액과 면역 체계를 대체하기 위한 가장 널리 이용 가능하고 확립된 줄기세포 치료법으로 남아 있음

<표> FDA-승인된 줄기세포 치료제

줄기세포 치료제	특성
Ryoncil (remestemcel-L)	• FDA가 최초로 승인한 MSC 치료제로, 소아 스테로이드 불응성 급성 이식편 대숙주병(줄기세포 이식의 합병증) 치료에 사용됨.
Lyfgenia	• 중증 겸상적혈구병 환자를 위한 유전자 치료제로, 환자 자신의 혈액 줄기세포를 유전적으로 변형시킴.
Omisirge	• 혈액암 환자가 줄기세포 이식을 받을 때 회복을 촉진하기 위한 제대혈 유래 세포 치료제.
Tregzi	• 혈액암 치료를 위해 일치하는 기증자로부터 이식을 받는 성인의 면역 재구성을 돕고 합병증을 줄이기 위해 고안된 조절 T세포 면역요법.

3) hESCs와 iPSCs 치료제

- 인간 배아 줄기세포(hESC, Human embryonic stem cell) 치료와 유도 다능 줄기세포(iPSC, Induced pluripotent stem cell) 치료는 모두 재생 의학에서 혁신적인 접근법을 포함. 하지만 두 세포 유형 모두 **다능성** (신체 내 어떤 세포 유형으로든 분화할 수 있는 존재)으로, 이들은 주로 다음의 <표>에서처럼 차이에서 차이가 있음. 그러나 두 치료법 모두 재생 의학 분야에서 유사한 목표를 공유하며, 현재 다양한 질환에 대한 효능 평가가 진행 중이지만 FDA-승인된 치료제는 없음. 그러나 현재 환자의 맞춤형 세포 없이도 면역 거부 반응을 방지하기 위해 MHC 유전자를 변형하거나 비활성화한 "범용" 기증자 동종 iPSC를 개발하기 위해 노력하고 있음.

<표> hESC와 iPSC의 차이

특징	인간 배아 줄기세포(hESC)	유도 다능성 줄기세포(iPSC)
출처	• 초기 배아의 내부 세포 덩어리(배반포)에서 유래.	• 성인 체세포(예: 피부나 혈액 세포)에서 생성되어 다능성 상태로 재프로그래밍됨..
윤리	• 매우 논란이 많은 이유는 유래 시 인간 배아를 파괴해야 하기 때문임.	• 배아가 파괴되지 않기 때문에 윤리적으로 문제가 없음.
면역 거부	• 저장 상태나 면역억제제(동종 억제제)를 사용하지 않는 한 면역 반응을 유발할 가능성이 높음.	• 환자 특이(자가형). 세포는 환자 자신의 몸에서 유래하여 면역 거부 반응의 위험을 사실상 제거함.
안전성 및 종양 발생성	• 미분화 세포가 남아 있으나 유전적으로 안정적일 경우 기형종(종양) 형성 위험이 있음.	• 인공 재프로그래밍 과정으로 인한 유전적 및 후생유전학적 이상 위험이 증가함.
생산 복잡성	• 표준화되고 확립된 노선은 이미 존재하지만, 공급은 제한적이고 물류적으로도 어려움.	• 각 환자별로 세포를 재프로그래밍하는 복잡한 연구개발 및 제조 워크플로우가 필요함.

3. 세포치료제의 불순물에 대한 이해(본 주제는 앞서 유전자치료제 및 항체치료, 핵산치료제 등과 중복되어 간략히 설명)

1) 불순물의 종류와 특징

- 세포치료제의 불순물에 대한 규제 지침 제조업체들은 모두를 엄격히 감시하고 통제할 것을 요구받고 있음. 다른 항체치료제 및 유전자치료제 등과 같이 **제품 관련** (원치 않는 치료법 변형) 그리고 **프로세스 관련** (제조 과정에서 도입된 재료) 불순물의 특징이 있음. 따라서 세포치료제에 대한 불순물의 종류와 독성은 앞서 항체치료제 및 유전자치료제의 불순물에 대해 작성한 컨설팅보고서(119-122)를 참고할 것. <표>는 세포치료제의 공통 불순물 범주 및 수용 한계를 서술한 것임(Dou 등, 2025; Mora 등, 2025; Watanabe 등, 2025)

<표> 세포치료제의 공통 불순물 범주 및 수용 한계

불순물 유형	출처	일반적인 허용 한도 / 지침
잔류 숙주 세포 DNA	숙주 세포나 바이러스 벡터로부터	<ul style="list-style-type: none"> 일반적으로 1회 투여당 10 ng에서 100 ng ≤ 제한되며, 분해된 DNA는 면역원성을 줄이기 위해 평균 200 염기쌍을 포함함
숙주 세포 단백질(HCP)	세포 배양 과정의 부산물	<ul style="list-style-type: none"> 공식적인 '안전' 수준은 없지만, 업계에서 인정받는 기준은 < 100 ng/mg임. 규제기관은 점점 더 특이하고 문제가 있는 단백질 모니터링에 중점을 두고 있음.
부수/원자재	항생제, 소 혈청 알부민(BSA), 사이토카인, 효소	<ul style="list-style-type: none"> 원자재 지침에 따라 엄격히 통제되고 정량화되어야 함(예: USP 1043) 독성과 면역 반응을 예방하기 위해 사용됨.
세포 불순물	미분화 줄기세포(예: hESC 내)	<ul style="list-style-type: none"> 기형종/종양 형성을 방지하기 위해 배치 방출 검사를 통해 검출할 수 있어야 함.
입자와 구슬	제조 과정에서 도입된 재료	<ul style="list-style-type: none"> 외부 입자(예: 미세한 유리, 섬유)나 제거되지 않은 자기 분리 비즈가 원인이 될 수 있음. 부작용 면역자극 또는 신체적으로도 작은 모세혈관을 막을 수 있음.

2) 주요 규제 체계

- ① **미국 (FDA):** 세포 치료제는 현행 우수 제조 기준(cGMP) 및 우수 조직 관리 기준(GTP) 하에 제조되어야 함을 요구함. 규제 한도는 치료 방식과 불순물에 따라 다르며, 엄격한 위험 평가 기대가 있음(Oztel 등, 2019; Sellman, 2022)
- ② **유럽연합(EMA):** EMA는 유전자 변형 세포 치료제를 포함한 첨단 치료 의약품(ATMP)에 대해 엄격한 품질, 비임상, 임상 지침을 설정함(Dou 등, 2025)
- ③ **글로벌 기준:** 일본의 MHLW와 중국의 NMPA를 포함한 전 세계 규제 기관들도 유사한 생산 및 품질 관리 기준을 시행하고 있음(Dou 등, 2025).

4. 세포치료제의 Toxicological TPP

1) 줄기세포 치료제의 FDA-승인에 대한 한계점

- 줄기세포의 치료제는 1950년대~1990년대 골수 이식의 태동부터 시작하여 미국 FDA에서 승인한 최초의 줄기세포 치료제는 2023년에 승인됨. 이식편대숙주질환(GVHD, Graft-versus-host reaction or disease)의 Ryoncil (remestemcel-L-rknd)임. Ryoncil은 건강한 기증자의 골수에서 추출된 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)의 정맥주사형 제제임(USFDA, 2024). 이후 <표> FDA-승인된 줄기세포 치료제에서 3가지가 추가되어 경우 4 제품이 승인되었음.
- 이와 같이 약물의 모달리티 중 FDA 승인이 가장 까다로운 치료제는 줄기세포 치료제임. 어려운 이유는 인체 내 작용 기전의 복잡성, 엄격한 안전성 및 품질 기준, 그리고 명확한 유효성 입증의 한계 때문임.

2) TPP(Target Product Profile)

① Target Product Profile(목표 제품 프로파일, TPP)의 개념 및 동기

- **개념:** 목표 제품 프로파일(TPP)은 안전하고 효과적인 의료 제품 개발을 안내하는 전략적 계획 도구 a strategic planning tool that guides the development of safe and effective medical products). 특히 TPP는 임상 및 상업적 요구를 충족하는 데 필요한 최소한과 이상적인 제품 특성을 개략적으로 제시이며 본질적으로 최종 마케팅 라벨의 최종 목표를 설정함(US NIH, 2025; Tyndall 등, 2017).
- **필요성:** 바이오로직스 및 유전자치료제, 세포치료제 등의 다양한 약물 모달리티는 전통적인 저분자 화합물과는 다르게 개발과정에서 새로운 방식이 요구되는 도전 과제가 많음. 따라서 전략적 신약 개발을 위해 **TPP는 복잡하고 최초이거나 매우 분화된 특징을 고려함**(US NIH, 2025; Armstrong, 2022)

3) 줄기세포 치료제의 Toxicological TPP

① 일반적인 독성학적 TPP의 제시할 내용

- Toxicological TPP는 신약 개발 과정에서 사용되는 전략적·다학제적 계획 문서로, 신약 후보가 안전하고 성공적으로 시장에 출시되기 위해 충족해야 하는 비임상적 안전성, 독성 및 약리학적 기준을 제시(USNIH, 2025).

② 줄기세포 치료제의 독성학적 TPP

- 줄기세포 치료제의 독성학적 프로파일은 기존 의약품과 달리 인체와 상호작용하고 인체

에 적응하는 살아있는 제품을 다루기 때문에 독특함. Safety profile은 화학적 독성에 초점을 맞추기보다는 **면역원성, 생체분포, 발암성 및 품질 설계(QbD, quality-by-design)**에 중점을 둠(Leonov 등, 2025; Choudhery 등, 2025; Frankeny 등, 2026).

③ Key Risk Profiles

- **면역원성(Immunogenicity):** 환자의 면역 체계가 이종(동종) 세포를 침입자로 인식하여 국소 염증이나 전신 면역 반응을 유발할 수 있음(Huang 등, 2024).
- **생체 분포(Biodistribution):** 정맥 내 투여 시 세포가 표적 외 제거 기관, 특히 폐, 비장, 간에 **일시적으로 축적**되는 경우가 많음(Rengasamy 등, 2016; Islam 등, 2023).
- **혈전색전증 및 폐색(Thromboembolism & Occlusion):** 고용량의 세포를 전신적으로 투여할 경우, 응고 연쇄 반응을 유발하거나 말단 미세혈관에서 세포가 뭉쳐 혈류 차단이나 파종성 혈관 내 응고증(DIC, disseminated intravascular coagulopathy)을 일으킬 가능성이 있음(Ha 등, 2020; Hao 등, 2024; Janowski 등, 2013).
- **발암성/종양 형성성(Oncogenicity/Tumorigenicity):** 줄기세포는 본질적으로 무한히 증식하기 때문에, 미분화되거나 유전적으로 불안정한 세포가 통제 불가능하게 계속 분열하여 종양이나 기형종 형성을 유발할 위험이 있음(Faiola 등, 2015; Leonov 등, 2025; Menasché 등, 2020; Beike Biotech, 2026)
- **세포 생존율 및 생물학적 활성(Viability & Potency):** 투여 시점까지 세포의 높은 생존율 유지 및 제품 고유의 약리적 효능 보장(US NIH, 2025).

④ Key Risk Profile의 완화를 위한 전임상 평가 매개변수

- 줄기세포의 위험성을 완화하기 위해서는 이러한 위험을 완화하기 위해, 규제 및 안전 기준은 세포 제품이 다음 사항을 평가하는 엄격한 전임상 시험을 거치도록 요구함(Leonov 등, 2025; Vizec, 2023).
 - **유전적 안정성(Genetic stability):** 세포가 정상적인 염색체형을 유지하고 의도된 대로 기능하도록 보장하는 것
 - **용량-반응 관계(Dose-response):** 부작용으로 인한 독성 급증을 방지하기 위해 안전하게 허용되는 최대 용량을 확립하는 것
 - **순도(Purity):** 제품에 원치 않는 세포 유형 및 외래 미생물이 포함되어 있지 않음을 확인하는 것(Hao 등, 2024, Leonov 등, 2025, Takahashi 등, 2025).

⑤ 무세포 대체제(Cell-Free Alternatives)

- 생체 세포 전체 이식에 수반되는 독성 및 면역학적 위험을 회피하기 위해, 치료법은 점차 **MSC-derived exosomes (extracellular vesicles)**으로 전환되고 있음. 비임상 독성 평가

결과, 이러한 무세포 제품은 일반적으로 전신 독성이 없으며, 피부 감작을 유발하지 않고, 매우 우수한 안전성 지표를 나타내는 것으로 밝혀졌음(Ha 등, 2020, Lee 등, 2025).

- 규제 지침 및 독성 평가 지표에 관한 공식적인 프레임워크는 미국 국립보건원(NIH)에서 제공하는 [줄기세포 기반 치료법의 안전성 평가](#)(Safety Assessment of Stem Cell-Based Therapies: Current Standards and Advancing Frameworks, Leonov 등, 2025)간행물이나 [줄기세포 치료제 개발의 위험 요인](#)(Risk factors in the development of stem cell therapy, Herberts 등, 2011) 분석 자료를 참고 필요

<참고문헌>

Herberts CA, Kwa MS, Hermesen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med.* 2011 Mar 22;9:29.

J. Lee, D. Ha, B. Cho, Y. Yi, A Toxicity study of exosomes derived from mesenchymal stem cells, *Cytotherapy*, Volume 22, Issue 5, Supplement, 2020, Page S189, ISSN 1465-3249,

Jun Takahashi, iPSC-based cell replacement therapy: from basic research to clinical application, *Cytotherapy*, Volume 27, Issue 7, 2025, Pages 835-842, ISSN 1465-3249.

NIH(National institute of health). Creating a Target Product Profile for New Drug Products. 2017.

Leonov GE, Grinchevskaya LR, Makhnach OV, Samburova MV, Goldshtein DV, Salikhova DI. Safety Assessment of Stem Cell-Based Therapies: Current Standards and Advancing Frameworks. *Cells.* 2025 Oct 23;14(21):1660.

Choudhery MS, Umezawa A. Stem cells as biological drugs for incurable diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2025 Oct 8;16(1):482.

Ariel Frankeny, Freelance Write. Stem cells and skin longevity: What patients need to know. American society of plastic surgeons. 2026,

Huang, Y., Hao, X., Lin, Z. *et al.* Bio-distribution and toxicity potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys. *Sci Rep* 14, 12251 (2024)

Rengasamy M, Gupta PK, Kolkundkar U, Singh G, Balasubramanian S, SundarRaj S, Chullikana A, Majumdar AS. Preclinical safety & toxicity evaluation of pooled, allogeneic human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Indian J Med Res.* 2016 Dec;144(6):852-864.

Islam, R., Fang, J. (2023). Cancer Stem Cell Therapeutic Delivery and EPR Effect. In: Islam, F., Lam, A.K. (eds) *Cancer Stem Cells: Basic Concept and Therapeutic Implications*. Springer, Singapore.

Viezec. Neurological Disorder Treatment with Advanced Stem Cell Therapy. 2023.

Dae Hyun Ha, Sun-Don Kim, Joon Lee, Hyuck Hoon Kwon, Gyeong-Hun Park, Steve Hoseong Yang, Jae Yoon Jung, Jun Ho Lee, Sang Rae Park, Jinkwon Youn, Sang Hee Lee, Ji Eun Kim, Jihye Lim, Hyun-Kul Lee, Byong Seung Cho, Yong Weon Yi, Toxicological evaluation of exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 115, 2020, 104686, ISSN 0273-2300.

Hao, X., Zhu, H., Qin, C. *et al.* Study on Preclinical Safety and Toxic Mechanism of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in F344RG Rats. *Stem Cell Rev and Rep* 20, 2236–2252 (2024)

Janowski M, Lyczek A, Engels C, Xu J, Lukomska B, Bulte JW, Walczak P. Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Jun;33(6):921-7

Francesco Faiola, Nuova Yin, Xinlei Yao, and Guibin Jiana. The Rise of Stem Cell Toxicology. *Environmental Science & Technology.* 2015 49 (10), 5847-5848

Menasché P. Cell Therapy With Human ESC-Derived Cardiac Cells: Clinical Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Oct 26;8:601560.

Beike Biotech. The Science of Stem Cells: A Comprehensive Guide. Stem Cell Treatments. 2026.

US NIH(National institute of health). Target Product Profiles (TPPs) for Medical Product

Development. 2025. [Target Product Profiles \(TPPs\) for Medical Product Development | National Institute on Drug Abuse \(NIDA\)](#)

Tyndall A, Du W, Breder CD. Regulatory watch: The target product profile as a tool for regulatory communication: advantageous but underused. Nat Rev Drug Discov. 2017 Mar;16(3):156.

Reece Armstrong, Target product profiles and strategies for drug development. Drug discovery world. 2022.

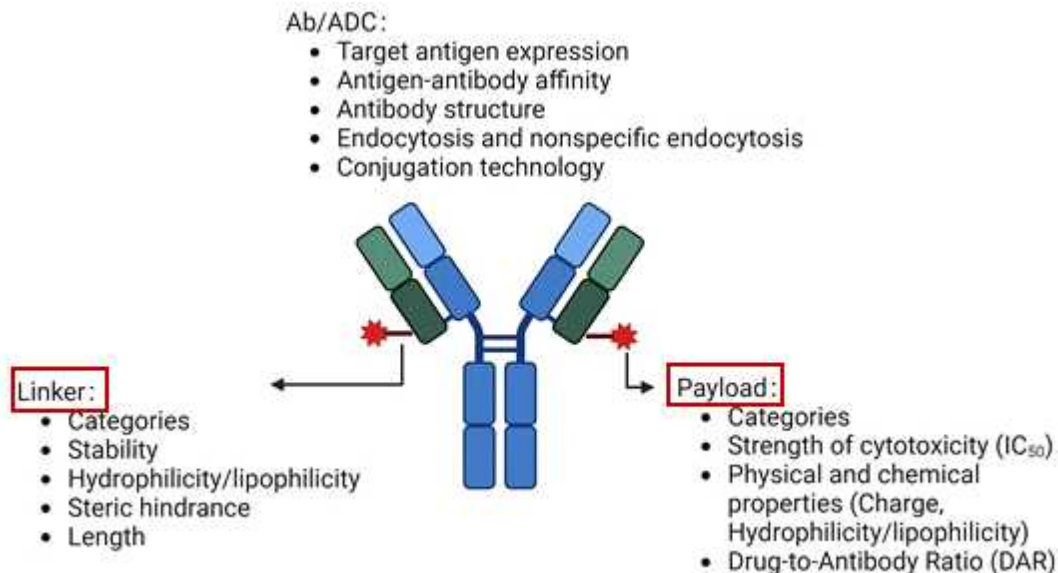
USFDA. FDA Approves First Mesenchymal Stromal Cell Therapy to Treat Steroid-refractory Acute Graft-versus-host Disease. 2024.
www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-mesenchymal-stromal-cell-therapy-treat-steroid-refractory-acute-graft-versus-host

124. 약물 모달리티별 불순물의 이해와 위해성평가(6): Antibody-drug conjugates와 Toxicological TPP

1. 항체-약물 접합체(ADC, antibody-drug conjugate)의 개요와 필요성

1) ADC 개요

- 항체-약물 접합체(ADC, antibody-drug conjugate)는 암 치료를 위한 가장 빠르게 성장하는 약물 중 하나임. ADC data base에 따르면 >300개의 ADC가 임상시험 파이프라인에 있으며, >500개의 ADC가 비임상시험에 참여, 그리고 >5,000대의 ADC가 초기 개발 단계에 있음(Shen 등, 2024).
- ADC는 <그림-1>에서처럼 암세포 표면 항원에 대한 antibody, 암세포 독성을 유발하는 payload 그리고 antibody와 payload를 연결해 주는 linker로 구성됨(Cheng 등, 2026).



<그림-1> ADC 독성에 기여할 가능성이 높은 분자 구조 특성.

2) 불순물 위해성평가의 필요성

- 항체-약물 접합체(ADC)의 불순물(Impurities)은 생물학적 제제(항체)와 화학 합성 물질(linker 및 payload)이 결합된 독특한 복합 구조 때문에 일반 의약품보다 훨씬 광범위하고 정밀한 관리가 필요함(Teasdale, 2026; 신영근, 2022).

2. ADC의 주요 불순물 유형

- ADC 불순물은 크게 생성 기원에 따라 생산 공정 유래 불순물(Process-related)과 제품 유래 불순물 및 분해물(Product-related)로 분류됨(Bechtold-Peters, 등, 2023). 이를 물질 유형별로 구분하면 유기 및 저분자 불순물 (Small Molecule Impurities), 고분자 및 단백질 불순물 (High Molecular Weight / Protein Impurities) 그리고 잔류 화학 공정 물질 (Residual Process Impurities) 등으로 분류됨(Chahrour 등, 2026; MERCK, 2026).

1) 유기 및 저분자 불순물 (Small Molecule Impurities)

불순물	특성
Free payload (비접합 유효성분)	<ul style="list-style-type: none"> 항체와 결합하지 않고 유리된 상태로 남아있는 고독성 페이로드 (Cytotoxic Toxin)은 항암성분으로 환자 안전성에 직결되는 가장 치명적인 불순물. 약물 대 항체 비율(DAR, Drug to antibody ratio)을 변화시키기 때문에 안전성 위험이 높아지며 전신 독성을 증가시킬 수 있음. 엄격히 모니터링되어야 함.
Linker-Drug Intermediates (링커-약물 중간체)	<ul style="list-style-type: none"> 약물-연결 중간체에서 유래하는 유기 불순물로 불순물의 크기별 특성은 분자량 기준으로 종종 payload보다 큰 <2000 Da, 온전한 ADC의 ~160,000 Da)에 비해 작은 Drug-Linker 중간체에서 w/w 1.0% 이하로 유지하는 것이 독성학적 위험이 최소화된다고 제안됨(다음의 <참고-1>에서 보충설명) 접합에 사용되는 전구체 분자로, 분해 단편이나 반응하지 않은 합성 성분을 포함할 수 있음
항체 중간체	<ul style="list-style-type: none"> ADC의 구조적 지붕으로서 항체의 품질 특성은 최종 결과물에 깊은 영향을 미침. 대부분의 방출 기준은 치료용 항체(예: 잔류 HCP, DNA)와 일치하지만, 접합은 추가적인 요구사항을 도입함. 응집 조절은 결합 과정에서 화학적 변형과 용매 노출로 인해 더욱 엄격해짐. 항체 농도와 pH 같은 속성은 나중에 조절할 수 있어 더 완화될 수 있음. 그러나 시스테인 기반 플랫폼의 트리설파이드 함량이나 라이신 기반 플랫폼의 C-말단 라이신 변형 상태와 같이 접합에 직접적인 영향을 미치는 특성은 엄격히 제어되어야 함. 예를 들어, 자유 티올 함량은 배치별로 DAR 일관성을 결정함. 제형용 부피원도 호환성이 필요함: 라이신 기반 접합에서는 Tris와 같은 1차 아민 함유 완충제는 NHS 에스터와의 경쟁 반응 때문에 피해야 함
Conjugatable vs. Non-Conjugatable Impurities:	<ul style="list-style-type: none"> 접합 가능 불순물 (Conjugatable Impurities): 링커-페이로드 제조 중 발생한 중간체 불순물 중 항체와 결합할 수 있는 활성기가 남아있어 비정상적인 ADC 유도체를 만드는 물질임. 접합 불가능 불순물 (Non-conjugatable Impurities): 항체와 직접 결합하지는 않지만 최종 제형에 잔류할 수 있는 중간체 유래 화학 물질

<참고-1> Osama Chahrour, Paul D. Cornwell, Penny Leavitt, Elizabeth A. Martin, Christina de Zafra, Susanne Glowienke, Angela White, Andrew Teasdale, Bruce Trela, Mayur S. Mitra, Wolfgang Muster, Jim Harvey, Impurity qualification requirements for drug-linkers related

impurities used to generate antibody-drug conjugates, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 164, 2026, 105974, ISSN 0273-2300.

초록: 본 입장문은 종양학 적응증을 위한 항체-약물 접합체(ADC) 생산의 중간체로 사용되는 약물-링커(D-L) 내 유기 불순물이 초래하는 독성학적 위험에 대한 과학 기반의 종합적인 평가를 제시한다. **본 원고에 제시된 분석에 따르면, D-L 중간체에 1.0 % w/w 이하 수준으로 존재하는 유기 불순물은 최종 ADC 의약품 투여 시 유해한 독성학적 영향을 초래할 가능성이 낮은 것으로 나타났다.** D-L 내 1.0 % w/w 수준의 불순물과 관련된 노출량(몰 및 중량)이 극히 낮기 때문에, 저자들은 1 mg/일 이하의 한도를 규정하는 ICH Q3A 기준을 유지하되, D-L 관련 불순물에 대한 적격성 한도 기준을 0.15 %에서 1.0 % w/w로 상향 조정할 것을 제안한다. 또한, 공정 별 및

ADC별 요인을 활용하여 비접합성 유기 불순물에 대한 우려 수준을 평가하고, 이를 통해 D-L 중간체 내 해당 불순물에 대한 규격 설정을 정당화하는 방법론이 소개된다. 논의된 수준 이하인 D-L 불순물과 관련된 위험이 미미하다는 점을 바탕으로, 본 논문은 D-L 내 이러한 불순물에 대한 품질 위험 관리 워크플로우를 제안한다.

2) 고분자 및 단백질 불순물 (High Molecular Weight / Protein Impurities)

불순물	특성
응집체 (Aggregates):	<ul style="list-style-type: none"> 링커와 페이로드의 높은 소수성(Hydrophobicity)으로 인해 항체끼리 뭉치는 현상으로, 면역원성 유발 및 비특이적 독성을 일으킬 수 있음.
미접합 항체 (Unconjugated mAb / DAR 0):	<ul style="list-style-type: none"> 페이로드가 전혀 결합하지 않은 순수 항체로, 효능을 낮추고 표적 수용체를 경쟁적으로 차단할 수 있음.
단백질 단편 (Fragments):	<ul style="list-style-type: none"> 공정 중 항체의 힌지(Hinge) 영역 등이 절단되어 생기는 저분자 단백질 불순물임

3) 잔류 화학 공정 물질 (Residual Process Impurities)

- ADC(항체-약물 접합체) 제조 공정에서 **잔류 화학 물질**은 유리 페이로드(세포독성 약물), 미반응 링커, 그리고 DMSO나 DMAc 같은 유기용매를 말하며, 환자의 안전과 품질을 위해 철저히 제거해야 하는 핵심 불순물(Gates 등, 2023)

불순물	특성
잔류 용매 (Residual Solvents):	<ul style="list-style-type: none"> 소수성 페이로드를 가용화하기 위해 사용되며 강력한 극성 비양성자성 용매 DMA(dimethylacetamide), DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethyl sulfoxide) 등의 유기 용매 잔류물
기타 유기 불순물:	<ul style="list-style-type: none"> 최근 독성 가이드라인에서 규제가 강화되고 있는 N-니트로사민(N-Nitrosamines) 등의 미량 유래 물질이 포함됨.

3. 주요 분석 및 특성 분석법

- ADC 분석 방법은 다음을 기반으로 합니다 크로마토그래피, 질량분석, 리간드 결합 분석 약물-항체 비율(DAR), 순도, 안정성을 측정하기 위해서임(Cahuzac 등, 2020; Agilent, 2024).

분석 대상 불순물	주요 분석 기술 (Analytical Methods)
유리 페이로드 (Free Drug)	• 단백질 침전 후 고성능 액체 크로마토그래피-질량분석 (UHPLC-MS/UV)
응집체 및 단편 (Aggregates)	• 크기 배제 크로마토그래피 (SEC-HPLC)
DAR (DAR, Drug-to-Antibody Ratio) 분포 및 균일성	• 소수성 크로마토그래피(HIC) 및 역상 액체 크로마토그래피(RP-HPLC, Reversed-Phase HPLC)
잔류 유기 용매	• 기체 크로마토그래피-질량분석 (GC-MS / SIM 모드)
페이로드 분해물	• 강제 분해 연구 기반 삼중 사중극자 질량분석 (Triple Quadrupole MS)

4. 정제 및 제거 기술 (Purification Strategies)

- 최종 ADC 원료의약품(DS) 단계에서 불순물을 허용 기준치 이하(통상 0.1% 이하)로 낮추기 위해 다단계 공정을 적용하며 다음과같은 기술이 있음(Bulger 등, 2023; Moore 등, 2018; Fernandez-Cerezo 등, 2023, Gong 등, 2018).

분석 대상 불순물	주요 분석 기술 (Analytical Methods)
<ul style="list-style-type: none"> • 접선유동여과(Tangential flow filtration, TFF) 	<ul style="list-style-type: none"> • 접선 유동 여과(TFF)는 세포독성 약물을 단일클론 항체에 결합시켜 표적 인식을 가능하게 하는 항체-약물 접합체(ADC)의 제조에 필수적입니다. 한외여과(UF, Ultrafiltration)는 단백질 제품을 농축하는 데 사용되며, 투과여과(DF, Diafiltration)는 ADC 용액에서 완충액을 교환하고 잔류 링커, 유기 용매 및/또는 유리 약물을 포함한 공정 관련 불순물을 제거하는 데 사용됨. ADC 정제의 핵심 공정으로, 분자량 차이를 이용해 저분자 유기 용매, 유리 페이로드 등을 효과적으로 걸러냄.
<ul style="list-style-type: none"> • 크기 배제 크로마토그래피 (SEC, size exclusion chromatography): 	<ul style="list-style-type: none"> • 분자량 차이를 기반으로 ADC 단량체(Monomer)로부터 고분자 응집체 및 미세 단편을 분리함.
<ul style="list-style-type: none"> • 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC, hydrophobic interaction graphy) 	<ul style="list-style-type: none"> • 페이로드 접합 개수(DAR)에 따른 소수성 차이를 이용해 불순물을 분리하고 원하는 구조의 ADC를 정제함.

<예시> 항체-약물 접합체(ADC) 제조 공정에서의 접선 유동 여과: 접선 유동 여과(TFF)는 세포독성 약물을 단일클론 항체에 결합시켜 표적 인식을 가능하게 하는 항체-약물 접합체(ADC)의 제조에 필수적임. UF는 단백질 제품을 농축하는 데 사용되며, 투과여과(DF, **Diafiltration**)는 ADC 용액에서 완충액을 교환하고 잔류 링커, 유기 용매 및/또는 유리 약물을 포함한 공정 관련 불순물을 제거하는 데 사용됨(Figure 1).(MERCK, 2026)

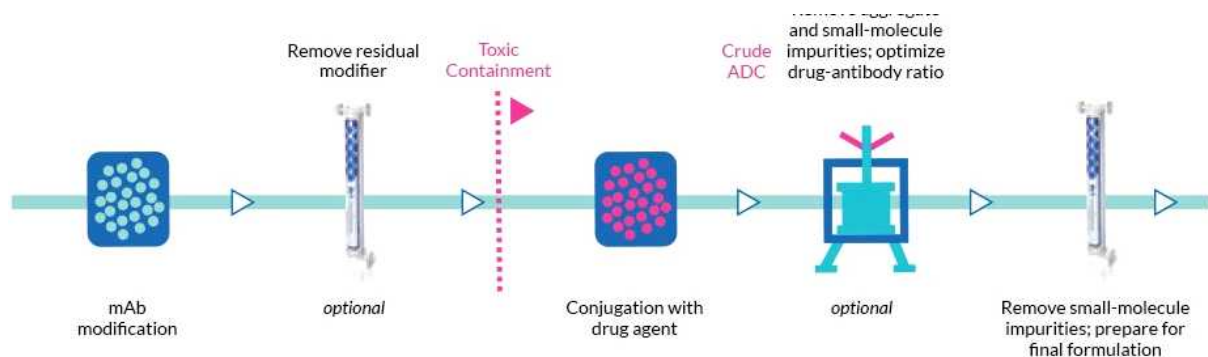


Figure 1. Example of an ADC manufacturing process.

5. 규제 가이드라인 동향 (Regulatory Context)

- 현재 국제의약품규제조화위원회(ICH)의 기존 가이드라인(Q3A, Q3B, Q6B)은 생물학적 제제 내 소수 저분자 불순물의 독성 평가 및 허용 한계를 완벽히 대변하지 못함(Gong 등, 2028).
- 이에 따라 제약 산업계(IQ Consortium 등)에서는 ADC 투여 용량이 일반 화학 항암제에 비해 극미량이라는 점에 착안하여, 링커-페이로드 중간체의 불순물 적격성 평가 한계치 (Qualification Limit)를 기존 ICH Q3A의 **0.15%에서 최대 1.0% w/w까지 완화**해 적용하자는 과학적 위험 관리 전략을 제안하고 규제 당국과 논의를 지속하고 있음(Chahrour 등, 2026)

6. 결론: 세분화된 제조업과 중간체의 전략적 역할과 Toxicological TPP

1) 독성학적 영향과 세분화된 제조업과 중간체의 전략적 역할

- ADC 프로세스 개발은 종종 결합 과정에 직접적으로 영향을 받는 핵심 품질 속성의 제어를 중심으로 이루어짐. 이러한 속성들은 원문 표 1에 요약되어 있으며, 활용 과정에서 도입된 내재된 이질성 때문에 관리가 특히 어려움. 약물 대 항체 비율(DAR), 부위 특이적 결합, 순도의 일관성을 보장하는 것은 매우 중요하며, 이러한 특성들은 최종 제품의 약물 동학, 효능, 안전성에 직접적인 영향을 미침(Creative Biogene, 2026)

표 1. 주요 ADC 제품 품질의 독성학적 영향과 특성 요약

속성	잠재적 영향	공정 개발의 근거와 초점
약물-항체 비율(DAR, Drug-to-antibody Ratio)	효능, 약동학, 안전성	<ul style="list-style-type: none"> DAR은 제품의 안전성과 효능에 직접적인 영향을 미치며, DAR은 ADC 제조 과정에서 직접 제어됨. DAR 사양은 좁을 수 있음(예: ±목표의 10%)
DAR 종 조성 (약물 결합 부위의 위치)	효능, 약동학, 안전성	<ul style="list-style-type: none"> 최종 산물은 서로 다른 약물 번호와 결합 부위를 가진 분자들이 혼합된 이질적인 혼합물일 수 있음. 서로 다른 DAR 종은 효능, 안전성에 영향을 줄 수 있으며, PK Unconjugated(비결합) 0-DAR 종은 항원 결합 부위를 차지하지만 약물을 전달하지는 않음. 공정은 DAR 종 조성에서 배치 간 일관성을 보장해야 함.
Free payload	안전	<ul style="list-style-type: none"> Free payload은 ADC 효능을 개선하지 못한 전신 독성을 증가시킬 수 있음 약물은 결합 과정에서 과도하게 첨가되는 경우가 많아 하류 제거가 필요함.
크기 변형(집합체 또는 조각)	면역원성, 약동학, 효능	<ul style="list-style-type: none"> 응집체(Aggregates)와 조각은 잠재적인 면역원성과 효능 변화로 인해 중요한 품질 속성임. 응집체는 링커-약물 소수성, 산화환원 반응, 용매 효과 또는 전단 응력에 의해 형성될 수 있음. 특히 환원 단계에서 조각이 형성될 수 있으며 개발의 초점은 형성을 방지하거나 하류에서 크기 변이가 발생하는 것을 제거하는 데 있음.
잔류 용매	안전	<ul style="list-style-type: none"> 용매는 결합을 위해 자유 약물을 용해하는 데 사용됨. 결합 과정에서 약물 용해도를 유지하기 위해 첨가될 수 있음. 하위 공정에서는 규제 기준에 따라 용매를 허용 수준까지 제거해야 함.

2) ADC의 Toxicological TPP(target product profile)

- 항체-약물 접합체(ADC)의 **Toxicological TPP(target product profile)**은 성공적인 임상 개발에 필요한 안전성, 내약성 및 비임상 위험 매개변수를 정의함.
- 주요 요소로는 **표적 부위 내 종양 외 독성(on-target off-tumor toxicity)**을 최소화하고, **높은 전신 링커 안정성**을 달성하며, 허용 가능한 **용량 제한 독성(DLT, dose-limiting toxicities)**, 암 치료제나 신약 개발 과정에서 **환자가 견딜 수 있는 최대 투여 용량(MTD)**을 결정하는 기준이 되는 **심각한 부작용**을 의미)을 정의하는 것이 포함됨(Liu 등, 2026; Woodford 등, 2025; Jiang 등, 2023; Huang 등, 2024; Montalbano 등, 2026).

① 핵심 안전성 및 독성학적 매개변수(Core Safety and Toxicological Parameters)

- **표적 발현 선택성(Target Expression Selectivity)**: 심각한 표적 부위 부작용을 피하기 위해 주요 건강한 장기(예: 심장, 폐, 간, 피부)에서 항원의 발현이 미미하거나 제한적이어야 함(Esapa 등, 2023, Zhou 등, 2025).
- **링커 안정성 범위(Linker Stability Window)**: 조기 전신 유효부하 해리 및 전신적인 비표적 독성을 방지하기 위해 높은 혈장 안정성이 요구됨(Woodford 등, 2025; Zhou 등, 2025).
- **허용 가능한 DLT 프로파일(Acceptable DLT Profile)**: 호중구감소증, 혈소판감소증, 말초신경병증 또는 안구 독성과 같은 일반적인 이상반응에 대해 예측 가능하고 관리 가능한 임계치를 설정(Masters 등, 2028; Collineau 등, 2025, Yu 등, 2021)

② 비임상 평가 기준(Non-Clinical Evaluation Criteria)

- **종간 반응성(Cross-Species Reactivity)**: 인간의 표적 결합 프로파일과 일치하는 관련 동물 모델(일반적으로 비인간 영장류 또는 설치류)을 선정함(Senter 등, 2008).
- **최대 내약 용량(MTD, Maximum Tolerated Dose)**: 반복 투여 독성 연구 중 가역적이거나 관리 가능한 독성이 발생하는 임계 용량을 확인함(Mecklenburg, 2026; AURIGENE, 202).
- **바이스탠더 효과 경계(Bystander Effect Boundaries)**: 자유 유효 성분이 종양 주변의 인접한 정상 조직으로 확산되는 정도를 평가(Drug Target Review, 2024)

③ 용량 제한 독성(Dose-Limiting Toxicity, DLT)

- 용량 제한 독성(Dose-Limiting Toxicity, DLT)은 암 치료제나 신약 개발 과정에서 **환자가 견딜 수 있는 최대 투여 용량(MTD)**을 결정하는 기준이 되는 **심각한 부작용**을 의미함. 약물의 용량을 더 높였을 때 환자의 안전에 치명적인 위험을 줄 수 있는 부작용이 발생하면, 이를 DLT로 정의하고 용량 증량을 중단하게 됨(Manavi 등, 2024; @Power, 2026; NIH, 2026).

- 주로 임상 1상 시험에서 신약의 안전성과 적정 복용량을 확인하기 위해 명확한 기준(보통 CTCAE 등급 기준 Grade 3 이상)을 세워 평가함. 그러나 약물의 기전(전통 화학항암제, 표적항암제, 면역항암제 등)에 따라 DLT의 양상은 다르게 나타남 대표적인 용량 제한 독성<표>와 같음.

<표> 대표적인 용량 제한 독성(DLT) 종류와 임상시험에서 DLT의 중요성,

임상 DLT와 중요성	DLP 기준 독성	세부 사항	인체 현상
대 표 적 인 용량 제한 독성(DLT) 종류	혈액학적 독성 (골수 억제):	혈액학적 독성 (골수 억제): 화학항암제에서 가장 흔한 DLT	<ul style="list-style-type: none"> 7일 이상 지속되는 Grade 4 호중구 감소증 발열을 동반한 호중구 감소성 발열(Febrile Neutropenia) 출혈을 동반하거나 수혈이 필요한 Grade 3~4 혈소판 감소증
	소화기계 독성	약물 투여로 조절되지 않는 심각한 증상	<ul style="list-style-type: none"> 지사제로 조절되지 않는 중증 설사 (이리노테칸 등) 항구토제 치료에도 개선되지 않는 극심한 구토 및 오심
	신경계 독성	말초 신경 계통의 손상	<ul style="list-style-type: none"> 심한 손발 저림, 통증, 마비를 유발하는 말초 신경 병증 (파클리탁셀, 빈크리스틴 등)
	장기 기능 저하 (독성)	특정 장기에 치명적인 손상을 입히는 경우	<ul style="list-style-type: none"> 신독성: 신장 기능 마비 (시스플라틴, 메토트렉세이트 등) 간독성: 간 효소치(AST/ALT)의 극심한 상승 및 황달 심독성: 심근 손상 및 심부전 (독소루비신 등) 폐독성: 폐 섬유화 및 간질성 폐질환 (블레오마이신 등)
임상시험에서 DLT의 중요성	최대 내약 용량 (MTD) 결정	<ul style="list-style-type: none"> DLT가 일정 비율(예: 3+3 설계에서 6명 중 2명 이상) 발생하면 해당 용량을 최대 허용 한도로 보고, 바로 직전 단계의 안전했던 용량을 최대 내약 용량으로 설정 	
	임상 2상 추천 용량 (RP2D) 확립	<ul style="list-style-type: none"> MTD 및 환자의 약물 흡수 상태(PK/PD)를 종합하여, 향후 대규모 환자에게 투여할 최적의 치료 용량을 안전하게 결정 	

<참고문헌>

Senter, P., & Carter, P. (2008). Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *The Cancer Journal*, 14(3), 154-169.

Lars Mecklenburg. A Brief Introduction to Antibody-Drug Conjugates for Toxicologic Pathologists, *Toxicologic Pathology*. 2018, Vol. 46(7) 746-752.

AURIGENE, 2026. General Toxicology Services.

Drug Target Review, New research improves the safety and effectiveness of ADC cancer treatments. December 26, 2024.
www.drugtargetreview.com/new-research-improves-the-safety-and-effectiveness-of-adc-cancer-treatments/644971.article

Xiaoyu Liu, Saige Yin, Xiyin Li, Jianyun Nie, Focusing on toxicity management: Challenges and strategies for HER2-targeted antibody-drug conjugates in breast cancer, *The Breast*, Volume 86. 2026, 104741. ISSN 0960-9776.

R. Woodford, H. Almarzouq, N. Beygozlu, A. Cammarota, K. Joshi, R. Grochot, A. Williams, C. Swanton, E. Fontana, Toxicity and efficacy of antibody-drug conjugates in advanced solid tumors: a retrospective single-center analysis of clinical trials☆, *ESMO Open*, Volume 10, Issue 9, 2025, 105573, ISSN 2059-7029.

Masters JC, Nickens DJ, Xuan D, Shazer RL, Amantea M. Clinical toxicity of antibody drug conjugates: a meta-analysis of payloads. *Invest New Drugs*. 2018 Feb;36(1):121-135.

Collineau B, Gonçalves A, Domon M, Bruyat D, Bertucci F, de Nonneville A. Toxicity Profiles of Antibody-Drug Conjugates: Synthesis and Graphical Insights to Optimize Patient-Centered Treatment Strategies for HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2025 Jul 11;17(14):2307.

Yu Z, Huang R, Zhao L, Wang X, Shangguan X, Li W, Li M, Yin X, Zhang C, Liu D. Safety Profile of Oxaliplatin in 3,687 Patients With Cancer in China: A Post-Marketing Surveillance Study. *Front Oncol*. 2021 Oct 21;11:757196.

Esapa B, Jiang J, Cheung A, Chenoweth A, Thurston DE, Karagiannis SN. Target Antigen Attributes and Their Contributions to Clinically Approved Antibody-Drug Conjugates (ADCs) in Haematopoietic and Solid Cancers. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 19;15(6):1845.

Xingyu Zhou, Yanjie Han, Yuan Fang, Peiwen Ma, Jiawei Zhou, Yale Jiang, Shujun Xing, Qiyu Tang, Yiru Hou, Shuhang Wang, Ning Li, Antibody-drug conjugates: Current challenges and innovative solutions for precision cancer therapy, *Med*, Volume 6, Issue 10, 2025, 100849, ISSN 2666-6340.

Moore, Rowan & Cook, Ken & Broster, Kelly & D'Silva, Kyle & Niederkofler, Eric & Bones, Jonathan & Bailey, Aaron & Dong, Michael. (2018). Antibody-Drug Conjugates: Perspectives and Characterization. *LC GC: magazine of liquid and gas chromatography*. 31.

Paul G. Bulger, David A. Conlon, Russell D. Cink, Lara Fernandez-Cerezo, Qunying Zhang, Srinath Thirumalairajan, Thomas Raglione, Ruiting Liang, Jinsheng Zhou, and Arun Chalgeri., Drug-Linkers in Antibody-Drug Conjugates: Perspective on Current Industry Practices. *Organic Process Research & Development*. **2023** 27 (7), 1248-1257

Lara Fernandez-Cerezo et al., Strategies for UF/DF-Based Impurity Removal in the Post-conjugation Purification of Antibody-Drug Conjugates. *Org. Process Res. Dev.* 2023, 27, 7, 1258-1268.

MERCK. Tangential Flow Filtration in the Antibody Drug Conjugate (ADC) Manufacturing Process. 2026.

Gong HH, Ihle N, Jones MT, Kelly K, Kott L, Raglione T, Whitlock S, Zhang Q, Zheng J.

Control Strategy for Small Molecule Impurities in Antibody-Drug Conjugates. AAPS PharmSciTech. 2018 Apr;19(3):971-977.

Cahuzac H, Devel L. Analytical Methods for the Detection and Quantification of ADCs in Biological Matrices. Pharmaceuticals (Basel). 2020 Dec 14;13(12):462.

신영근. Antibody-drug conjugate (ADC) catabolism/metabolism and drug-drug interaction studies for safety evaluation of ADC. 2022-07-23. 식품의약품안전처. 과제고유번호-1475012413.

Gates TJ, Lyu YF, Fang X, Liao X. Clearance of solvents and small molecule impurities in antibody drug conjugates via ultrafiltration and diafiltration operation. Biotechnol Prog. 2020 Jan;36(1):e2923. doi: 10.1002/btpr.2923. Epub 2019 Oct 16.

Agilent. Improving the Quality of Antibody Drug Conjugates by Orthogonal Analytical Methods. 2024.

ADC Process Development and Manufacturing (Part I): Core Components, Intermediates, and Conjugation Strategies.

Chahrour O, Cornwell PD, Leavitt P, Martin EA, de Zafra C, Glowienke S, White A, Teasdale A, Trela B, Mitra MS, Muster W, Harvey J. Impurity qualification requirements for drug-linkers related impurities used to generate antibody-drug conjugates. Regul Toxicol Pharmacol. 2026 Jan;164:105974

Gong, Hai & Ihle, Nathan & Jones, Michael & Kelly, Kathleen & Kott, Laila & Raglione, Thomas & Whitlock, Scott & Zhang, Qunying & Zheng, Jie. (2018). Control Strategy for Small Molecule Impurities in Antibody-Drug Conjugates. AAPS PharmSciTech. 19. 971-977.

Creative Bioqene, ADC 공정 개발 및 제조 (1부): 핵심 부품, 중간체 및 결합 전략. 2026. www.creative-bioqene.com/support/adc-process-development-and-manufacturing-part-i-core-components-intermediates-and-conjugation-strategies.html

Xiaoyu Liu, Saige Yin, Xiyin Li, Jianyun Nie, Focusing on toxicity management: Challenges and strategies for HER2-targeted antibody-drug conjugates in breast cancer, The Breast, Volume 86, 2026, 104741, ISSN 0960-9776.

R. Woodford, H. Almarzouq, N. Beygozlu, A. Cammarota, K. Joshi, R. Grochot, A. Williams, C. Swanton, E. Fontana, Toxicity and efficacy of antibody-drug conjugates in advanced solid tumors: a retrospective single-center analysis of clinical trials☆, ESMO Open, Volume 10, Issue 9, 2025, 105573, ISSN 2059-7029.

Esapa B, Jiang J, Cheung A, Chenoweth A, Thurston DE, Karagiannis SN. Target Antigen Attributes and Their Contributions to Clinically Approved Antibody-Drug Conjugates (ADCs) in Haematopoietic and Solid Cancers. Cancers (Basel). 2023 Mar 19;15(6):1845.

Huang, Q., Ravindra Pilvankar, M., Dixit, R., & Yu, H. (2024). Approaches to improve the translation of safety, pharmacokinetics and therapeutic index of ADCs. *Xenobiotica*, 54(8), 533–542.

Montalbano MC, Micillo M, Deaglio S, Vaisitti T. Antibody-Drug Conjugates in Hematological Malignancies: Current Landscape and Future Perspectives. Int J Mol Sci. 2026 Jan 20;27(2):1025.

Manavi MA, Fathian Nasab MH, Mohammad Jafari R, Dehpour AR. Mechanisms underlying dose-limiting toxicities of conventional chemotherapeutic agents. J Chemother. 2024 Dec;36(8):623-653.

@Power, DLT: Clinical Trial Terminology. 2026, www.withpower.com/guides/dlt-clinical-trial

NIH, dose-limiting, 2026. www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/dose-limiting.

125. Toxicological Target Product Profile - 기반 비임상 연구와 마케팅 전략

<Prologue>

- 새로운 약물 모달리티(Modality, 치료 접근법)의 등장은 비임상 독성시험의 패러다임을 바꾸고 있습니다. 과거의 1세대 합성의약품(Small Molecule) 중심에서 2세대 항체의약품(Biologics), 그리고 최신의 3세대 유전자 및 세포 치료제(CGT) 및 표적 단백질 분해제(TPD) 등으로 다변화되면서 전임상 독성시험의 전략적 가치는 더욱 높아졌습니다.
- 전임상 독성시험에서 독성 목표 제품 프로파일(tTPP, Toxicological Target Product Profile)의 수립과 마케팅 전략적 관점의 융합이 왜 중요한지 핵심 요소를 정리하였습니다.

<AITOX의 역할>

- 특히 다양해지는 의약품 모달리티 개발에서 tTPP(독성 목표 제품 프로파일, Toxicological Target Product Profile)는 안전성 리스크를 관리하는 내부적 방어 전략이며, 비임상 독성 마케팅 전략은 파이프라인의 가치를 극대화하여 외부 유치 및 상용화를 성공시키는 외부적 공격 전략입니다.
- 내부적 방어 전략 & 외부적 공격 전략의 두 가지가 유기적으로 맞물려야만 신약 개발의 성공 확률을 높일 수 있습니다. 관심을 두고 계신 특정 의약품 모달리티(예: ADC, mRNA, 세포치료제 등)를 말씀해 주시면, 해당 모달리티에 특화된 tTPP 설정 기준이나 비임상 디자인 전략을 더 구체적으로 제안해 드릴 수 있습니다. 귀하는 어떤 모달리티를 중점적으로 보고 계신가요?

1. TPP(Target Product Profile) 기반으로 SARS-CoV-2 백신 개발 회사의 결정

1) 사건의 개념

- 코로나바이러스 SARS-CoV-2는 2019년 코로나바이러스 질병(COVID-19)을 일으키며, 2019년 12월 중국 우한에서 발견된 이후 1년 남짓 동안 전 세계적으로 1억 명 이상을 감염시키고 250만 명 이상의 사망자를 냈음(Funk 등, 2021)

2) 백신 개발의 WHO TPP 기준 제시 및 등록 제약사

- WHO는 기준- Target Product Profile (TPP) -기반으로 코로나19 백신의 효능, 안전성, 보관성 등 임상 3상 단계의 주요 후보물질들을 비교 분석하여 팬데믹 상황에서 전략적인 백신 개발 방향성을 제시. 10개월 이내에 12개의 백신 후보가 공식적으로 3상 임상시험에 등록되었음. 백신 개발 과정은 보통 수년에 걸쳐 진행되지만, 현재는 동시 진행된 전 임상 및 초기 1상 연구, 전략적 위험 측정 및 적응형 임상시험 설계를 통해 가속화되었음. 여기서는 메신저 RNA와 단백질/바이러스 유사 단백질 플랫폼에서 각각 2개, 바이러스 벡터(비복제자)와 비활성화 바이러스 플랫폼에서 각각 4개(Table 1)를 고려되었음.

Table 1. Summary of Vaccines Analyzed in this Study.

Platform	Name (Dose)	Phase III # Enrolled Placebo	Phase III # Enrolled Vaccine	COVID Cases Placebo (Severe)	COVID Cases Vaccine (Severe)	% Efficacy (Severe)	Projected Cost/Dose (USD)
RNA							
Pfizer/BioNTech	BNT162b2 (2 × 30 µg, 21 days apart)	21,720	21,728	162 (9)	8 (1)	95 (89)	\$14.70–19.50
Moderna	mRNA-1273 (2 × 100 µg, 28 days apart)	15,210	15,210	185 (30)	11 (0)	94.1 (100)	\$25–37
Viral Vector							
AstraZeneca	AZD1222 (2 × 5 × 10 ¹⁰ vp, 28 days apart) (2.2 × 10 ¹⁰ vp, then 5 × 10 ¹⁰ 28 days apart)	4455 [1374]	4440 [1367]	71 [30] (10/2)	27 [3] (0/0)	62.1 (70.4) [90] (100)	\$2–10 ⁺
CanSino	Ad5-nCoV (Convidecia) (single dose 5 × 10 ¹⁰ vp)	30,000 (Pakistan)		---	---	65.37 (91)	\$ < 4
Gamaleya	Sputnik V (Gam-COVID-Vac) (10 ¹¹ vp rAd26-S, followed by 10 ¹¹ vp rAd5-S 21 days apart)	5476	16,501	62	16	91.6	\$ < 10
J&J (Janssen)	Ad26.COV2.S (single dose 5 × 10 ¹⁰ vp)	19,178	19,306	193 (34)	66 (5)	66 (85.4)	\$2.80–9
Protein/VLP(viral-like)							

protein)						
Novavax	NVX-CoV2373 (2 × 5 µg + 50 µg M1 adjuvant, 21 days apart)	15,000* (UK)	56 (1)	6 (0)	89.3 (UK)	\$16
Medicago	CoVLP (2 × 3.75 µg + AS03 GSK adjuvant, 21 days apart)	30,000	----	---	---	Not known
Inactivated						
Sinovac	CoronaVac (2× alum-adjuvanted 14 days apart)	9200 (Brazil)	167 (31)	85 (7)	50.4 (Brazil)	\$30
Sinopharm ^h (Beijing)	BBIBP-CorV (2 × 4 µg in alum adjuvant 21 days apart)	10,000 (UAE)	----	---	79.3 (UAE)	\$30–72.50
Sinopharm (Wuhan)	Vero (2 × 5 µg in alum adjuvant 21 days apart)	27,000 (Peru, UAE, Bahrain, Morocco, Argentina, Jordan and Pakistan)	---	---	72.5%	\$30–72.50
Bharat Biotech	COVAXIN (BBV152) (2 × 6 µg in Alhydroxiqum-II adjuvant 28 days apart)	25,800	---	---	>50%	\$2–3

참고: 환자 중도 탈락 및 기타 변수로 인해 백신군과 위약군에 배정된 인원은 항상 프로토콜 준수 분석에 사용된 인원보다 많습니다. 등록된 인원 수에는 경우에 따라 발표된 중간 분석 결과가 포함될 수 있으므로, 이는 3상 임상시험의 실제 참가자 수보다 훨씬 적을 수 있습니다. 일부는 추정치에 기반한 것입니다. 각 백신 후보마다 경증, 중등증, 중증 사례를 정의하는 기준과 전체 효능 평가 기준이 다릅니다. 예상 비용은 다양한 출처에서 제시되었으며, 협상된 합의 내용에 따라 상당한 차이를 보일 수 있습니다.

3) 백신 개발사의 TPP의 비교 분석과 WHO의 결정

① 백신 TPP 기준과 네 가지 출처

- <표-S1>에는 네 가지 출처인 CEBR(Center for Biologics Evaluation and Research, 미국 식품의약국 생물학제제 평가·연구 센터)와 CEPI(Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, 감염병혁신연합)I, WHO, 그리고 이전 출판물(일반 연구자의 지침)로부터 나온 COVID-19 백신의 TPP(Target product profile, 목표 제품 프로파일) 특성을 나열하고 있음(Funk 등, 2021).
- 다음의 <표-S1>에는 네 가지 출처에서 나온 COVID-19 백신의 TPP(Target product profile, 목표 제품 프로파일) 특성을 나열하고 있음.

표 S1 COVID-19 백신의 목표 제품 프로파일

[illegible]

		제어하지 않는	복합 관리	
	복합 관리 ERI3가 관할하지 않은 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	중간 점검을 유예한 국영 연립원, 비리시도 중점 관리 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	유상성, 복합 관리종류 간관리 관리회와 일치하지 않는 이상성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	모든 연립원이 지정자
가) 유상성 평가 지표	·1차 유상성 평가 지표 최소 70%의 표본관리 평가 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·중간 점검을 유예한 국영 연립원, 비리시도 중점 관리 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·최소 70%의 표본관리 평가 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·제3차 유상성 연립원이 ·평가회 및 평가회 관리회 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성
나) 투명성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성
다) 평가 방법	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성
라) 평가 기준	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성	·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성 ·연간 평가요소 최소 3개(당연치 제외)에 대한 최종 의사결정 의견서 작성

(b) 투여 경로	---	-표준 주사 용량을 사용하며 주사제(근육 내, 피하 또는 피부 내)로 투여합니다. -본 TPR의 맥박에서 박신의 다른 특성이 이를 뒷받침하는 경우, 다른 투여 경로(인기전공법을 포함한)도 허용됩니다.	-신속한 투여의 용이성 및 기타 물리적 문제(OR)를 고려할 때, 비경로성 투여(주사기 바늘 또는 기타 보조 장비 미사용)가 선호된다. -이런 투여 경로도 허용됩니다(L.T).	-경구 투여(경장), - 피하, 피내 또는 근육 내 투여(허용)
(b) 제형 안정성, 보관 및 공급한 관련 고려 사항	-공정 보관 온도에서 장기간 안정성 및 유효 기간은 서로 다른 박신 원료로 제조된 최소 3개의 최종 프로세스 중 출한 최종 용기를 사용하여 입증되어야 합니다.	-최대 70°C에서 최소 12개월의 유효기간을 갖습니다. 2-6°C에서 최소 12개월의 안정성이 입증되어야 합니다. -냉장부제 사용 필요성을 판단하고, 관련 문제가 있는 경우 이를 해결해야 합니다.	-이 높은 보관 온도에 더하여 낮은 유효기간은 박신의 유효 및 공급을 크게 향상시키므로, 이를 강력히 권장합니다.	-공정 안정성이 있으며, 유효기간이 길어야 합니다. 박신의 유효 안정성은 실온에서 2년 이상 지속되어야 합니다.
(b) 다른 박신과의 병용 투여	---	-인플루엔자 박신과 병용 투여 시의 안전성 및 면역반응에 대한 증거를 고려해야 합니다.	-단독 투여 제형 (OR) -일반적으로 해당제를 병용 투여 시에는 다른 박신과의 병용 투여 가능성이 바람직함 (L.T).	-SARS-CoV-2 박신은 다른 어떤 박신 과도 함께 투여해서는 안 되며, 인플루엔자 박신과는 투여 부위를 달리하여 병용 투여할 수 있다.
(b) 제형	---	-박신은 최대 투여 용량이 1.0mL인 1회를 또는 다회용 제형의 액상 또는 동결건조 제형으로 제공되어야 한다. -다회 투여용 제형은 W(H)의 다회 투여용 바이알 형태에 따라 조제, 관리 및 폐기되어야 합니다.	-대규모 용출 용액(OR)에서는 일반적으로 다회용 제형의 사용이 권장됩니다. -단독 투여 또는 다회용 제형 모두 허용됩니다. 최대 비경구 투여 용량: 0.5 mL (L.T). -다회 투여 제형은 W(H)의 다회 투여 바이알 형태에 따라 제형화, 관리 및 폐기되어야 합니다.	-용액 또는 다회용 바이알 형태의 액상 또는 동결건조제이며, 실온에서 보관됩니다. -무균 액체 또는 기타 형태(OR) 단 SARS-CoV-2 박신을 함유하여 직접 연구 투여하거나, 사용 시 간단한 재구성만 필요하여 중간 간 코드 제인이 필요한 동결건조 형태로 제공되어야 합니다.
(b) 접근성 가격 목표	---	---	-저소득 및 중간소득 국가 (LMIC)를 포함하여 광범위한 사용이 가능하도록 최소 투여당 비용 수준에서 생산 규모를 지속적으로 확대할 수 있는 능력 (OR). -저소득 및 중간소득 국가 (LMIC)를 포함하여 광범위한 사용이 가능하도록 1회 투여당 비용 수준에서 충분한 용량을 확보할 수 있어야 함(L.T).	-제품 원가가 고소득국과 저소득국 모두에게 합리적이어야 한다.
(b) 일관된 제조	-제조 공정의 유효성 검증은 뒷받침하기 위해서는 최소 3개의 상업용 규모 배치에 대한 제조 데이터가 충분합니다. -이 시험은 유효성 시험 설계에 포함될 수 있으며, 별도의 연구로 수행될 필요는 없다.	-최소 100만 회분 이상의 원료 의약품들 생산할 수 있도록 확장 가능해야 한다.	---	---

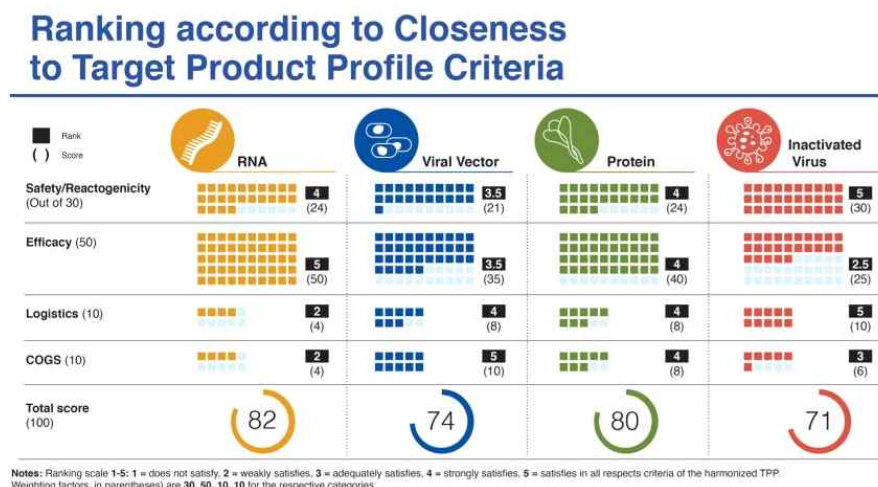
② 여러 TPP 중 백신 후보 결정을 위한 5 가지 구체적 내용

1. 안전성/반응성—SARS-CoV-2 백신은 면허 취득을 위한 투여 체계를 가진 모든 연령대의 최소 10,000명 이상의 피험자를 대상으로 한 2+ 데이터 세트를 기반으로 명확한 이점/위험 프로필을 제공해야 함
2. 백신 효능—SARS-CoV-2 백신은 청소년부터 노년까지 모든 연령대에서 최소 70% 이상의 효능을 보여야 하며, 초기 접종 후 <2주 이내)에 빠르게 보호가 발현되어야 하며, 체액성 및 세포성 면역 반응을 적절히 평가하여 최소한의 혈청학적 상관관계를 제공해야 함.
3. 복용도(투여 계획과 관련)—SARS-CoV-2 백신은 발병 시 단일 접종(최적)이어야 합니다. 프라임과 부스트 사이에 짧은 간격(<28일)이 있어야 2회 투여 요법이 허용됩니다 (최소한).
4. 물류(제품 안정성/저장/공급망)—SARS-CoV-2 백신은 -70°C에서 최소 1년의 유통기한을 가지며, 냉장고 온도(4°C)에서 최소 1개월간 안정적이어야 함.
5. COGS(목표 가격/접근성)—SARS CoV-2 백신은 빠른 규모 생산 및 충분한 용량을 원가/용량으로 공급할 수 있는 능력을 갖추어야 하며, LMIC(low and middle income countries) 포함

③ TPP 5가지 사항에 점수화를 통한 백신 개발 회사 결정

- TPP의 각 카테고리 섹션은 CEBR(Center for Biologics Evaluation and Research, 미국 식품의약국 생물학제제 평가·연구 센터)와 CEPI(Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, 감염병혁신연합)I, WHO, 그리고 이전 출판물(일반 연구자의 지침)의 '조화된' 지침 중 다섯 가지 범주인 (i) 안전성/반응원성; (ii) 효능; (iii) 투여 요법; (iv) 제품 안정성/저장/공급망(즉, 물류); 그리고 (v) 목표 가격/접근성(COGS)을 맞추어 평가함. 순위표는 1-5의 점수 체계와 각 범주별 가중치 매개변수를 사용하여 백신이 조화된 TPP와 얼마나 잘 일치하는지 비교하여 100점 만점을 제공함. <그림>은 **조화로운 TPP(harmonized target product profile)** 기준에 따른 네 가지 백신 플랫폼의 순위를 나타낸 것임(Funk 등, 2021)

<그림> 조화로운 표적 제품 프로파일(harmonized target product profile) 기준에 따른 네 가지 백신 플랫폼의 순위.



④ 결론

- 2020년 초, SARS-CoV-2 바이러스에 효과적인 항체를 생성하는 백신 개발에 전례 없는 노력이 쏟아졌음. 4가지 플랫폼(메신저 RNA, 비복제 바이러스 벡터, 단백질/바이러스 유사 입자, 불활성화 바이러스)을 기반으로 12개의 후보 백신을 개발하는 팀들이 2020년 11월 초까지 3상 임상시험 단계를 시작하거나 발표했으며, 일부는 1년 이내에 긴급 사용 승인을 받았음. 전 세계적으로 백신 접종이 진행되고 있음.
- 이들 후보 백신은 이상적/최적이거나 허용 가능/최소 COVID-19 백신에 대한 목표 제품 프로파일(TPP)을 제안한 바 있음. **이 후보 백신들은 CEBR, CEPI, WHO, 일반 연구자의 지침 등이 조화로운 TPP와 얼마나 비교할 수 있을까?** 최신 임상시험 데이터를 바탕으로 여러 후보 백신 범주를 비교 분석하고, 초기 성공과 전 세계 COVID-19 팬데믹 종식을 위한 아직 극복해야 할 장애물과 장벽을 강조
- 특히 mRNA 백신이 높은 효능으로 이상적 기준을 충족했으나 초저온 보관이라는 물류적 한계가 있음을 밝히는 등 **TPP가 공중보건 및 포스트 팬데믹 예측의 핵심 지표임을 시사**

2. TPP의 배경과 핵심 내용

1) FDA의 2007년 3월 30일 FDA의 공지

- **출발:** 1997년, FDA와 제약 후원사 대표들로 구성된 임상 개발 작업 그룹이 신약 개발 과정에서 후원자와 FDA의 상호작용을 개선하는 방안에 대해 논의를 시작했음.
- **공지:** FDA는 **2007년 3월 30일 "목표 제품 프로파일—전략적 개발 프로세스 도구(Target Product Profile—A Tool for the Strategic Development Process)"**라는 제목의 산업 및 심사 직원을 위한 초안 지침을 발표
- **Target Product Profile (TPP)의 법적 구속력:** 신약 개발을 위한 전략적 프로세스 틀 안 지침이 최종 확정되면 기관의 현재 목표 제품 프로파일에 대한 생각을 반영할 것임. 이 문서는 어떠한 개인에게도 권리를 창조하거나 부여하지 않으며, FDA나 대중을 구속하는 역할도 하지 않습니다. 해당 법률 및 규정의 요건을 충족하는 대안적 접근법이 사용될 수 있음

2) TPP의 핵심 목적

- ① **의사소통 효율화:** FDA 심사관과 개발사 간의 미팅(Pre-IND, End-of-Phase 2 등) 시 논의의 기준점을 제공하여 체계적으로 구성된 TPP는 FDA와의 상호작용을 원활하게 하고 효율화할 수 있음
- ② **개략적 방향성 유지:** TPP는 전임상 개발(설계, 수행 및 분석)이 의도된 임상시험 설계와 치료적 용도를 뒷받침할 수 있도록 보장하는 프레임워크를 제공할 수 있음
- ③ **개발 리스크 감소:** 후기 단계에서 발생할 수 있는 규제적, 임상적 미충족 요건을 초기에 식별함.

3) TPP의 핵심 기능

- TPP는 다음과 같은 몇 가지 핵심 기능을 수행함.
 - ① 전략적 지침 - TPP는 동적인 문서로서, 제품의 핵심 특성을 결정하고 개발 단계의 우선순위를 정하는 데 도움을 줌.
 - ② 규제 청사진 - TPP는 주요 라벨링 관련 사항을 개괄적으로 제시하며, FDA 및 전세계 보건 당국과의 논의의 기초가 됨.
 - ③ 기술 디렉토리 - TPP는 품질 보증에 필수적인 제품 속성과 관련 제조 방법론을 상세히 설명함.
 - ④ 실사 참고 자료 - 전문 투자자 및 잠재적 상업적 파트너는 TPP를 참고하여 제품의 타당성을 평가하고 가치 평가 기준을 설정함

4) Review Staff의 지침과 industry의 실행 전략

4-1) Review Staff(심사관)를 위한 지침

- FDA 등 규제기관의 심사관은 개발사가 제출한 TPP를 다음과 같은 기준 가이드라인에 따라 검토함.
 - ① **자발적 제출 존중:** TPP 제출은 의무가 아닌 개발사의 자발적 참여이므로, 제출 여부가 심사 결과에 불이익을 주어서는 안 됨. .
 - ② **유연한 논의 유도:** TPP는 확정된 라벨이 아니므로, 개발 초기 단계의 TPP에 대해 지나치게 엄격한 잣대를 대기보다는 발전적인 피드백을 제공함.
 - ③ **마일스톤 미팅 연계:** IND 신청 전(Pre-IND)이나 임상 2상 종료 후(EOP2) 미팅 시, TPP의 변경 사항을 바탕으로 임상 3상 프로토콜의 타당성을 평가함.

4-2) Industry (업계)를 위한 실행 전략

- ① **초기 작성 가이드:** 임상 1상 또는 2상 진입 전, **마케팅 부서와 R&D 부서가 협력하여 '이상적인 목표(Target)'와 '최소 수용 가능한 목표(Minimum Acceptable)'를 구분하여 첫 TPP를 작성.**
- ② **지속적인 업데이트:** 새로운 전임상/임상 데이터가 도출될 때마다 TPP를 실시간으로 갱신하여 팀 내 싱크를 맞추어야 함
- ③ **FDA 소통 도구로 활용:** 규제기관 미팅 요청 시, 브리핑 북(Briefing Book)의 첫 페이지에 TPP를 첨부하여 심사관이 제품의 개념을 즉각적으로 이해할 수 있도록 해야함.

5) TPP의 이점

- 잘 설계된 TPP를 활용하면 혁신 기업에게 많은 이점을 제공함. 의약품 개발사가 TPP를 사용하고 규제 절차를 진행함에 따라 이를 수시로 업데이트하는 것은 모범 사례임. TPP는 다음을 보장하는 데 도움이 될 수 있음

- ① 연구개발(R&D) 효율성 향상 - TPP는 연구개발 부문과 상업 부문 간의 격차를 해소함으로써 예기치 못한 위험을 줄이고 협업 과정을 효율화.
- ② 긍정적인 규제 결과 - TPP를 BLA(생물학적 제제 허가 신청) 또는 NDA(신약 허가 신청)에 통합한 신약 개발 프로젝트는 일반적으로 추가 정보 요청이 줄어들어 심사 절차가 간소화됨.
- ③ 상업적 성공 - TPP의 지침에 따라 개발된 의약품은 시장에서 성공할 가능성이 더 높음.

6) TPP 핵심 구성 요소 (표준 템플릿 구조)

- 이상적으로는 신약 개발 프로젝트의 초기 단계부터 TPP를 통합하여, 신약의 발견 단계부터 임상 시험에 이르기까지의 로드맵 역할을 수행해야 함. 주요 구성 요소로는 표적 적응증, 효능/안전성 목표, 최소 및 흡충 매개변수가 포함됨. 또한, 새로운 데이터가 등장함에 따라 TPP를 수정하여 최신 통찰력을 반영할 수 있음. TPP의 간단한 예시는 다음과 같음. 무엇보다도 중요한 것은 다음의 2가지를 수행 가능하여야 함.

- ① TPP는 전임상 개발(설계, 수행 및 분석)이 의도된 임상시험 설계와 치료적 용도를 뒷받침할 수 있도록 보장하는 프레임워크를 제공할 수 있어야 함.
- ② 체계적으로 구성된 TPP는 FDA와의 상호작용을 원활하게 하고 효율화할 수 있어야 함.

<표> TPP의 일반적인 예시

항목	내용
1. 적응증 및 용법 (Indications and Usage)	<ul style="list-style-type: none"> • 목표 질환: 치료하고자 하는 구체적인 질병 또는 상태 • 환자군: 특정 연령대, 질병의 중증도(경증, 중등증, 중증), 1차/2차 치료제 여부
2. 용법 및 용량 (Dosage and Administration)	<ul style="list-style-type: none"> • 투여 경로: 경구, 정맥 주사(IV), 피하 주사(SC) 등 • 제형 및 투여 주기: 정제, 캡슐, 액상 / 1일 1회, 주 1회 등 • 특수 환자군: 간/신장 기능 저하 환자, 소아 및 노인 요량 조절 계획
3. 제형 및 함량 (Dosage Forms and Strengths)	<ul style="list-style-type: none"> • 제품 형태: 제품의 물리적 형태 (예: 100mg 필름코팅정, 5mL 바이알)
4. 금기사항 (Contraindications)	<ul style="list-style-type: none"> • 투여 금지 대상: 특정 성분 과민증, 병용 금지 약물, 특정 기저질환자
5. 경고 및 주의사항 (Warnings and Precautions)	<ul style="list-style-type: none"> • 예상되는 중대한 위험: 심각한 부작용 위험(예: 간독성, QTc 연장) 및 이에 대한 모니터링 방법
6. 이상반응 (Adverse Reactions)	<ul style="list-style-type: none"> • 안전성 프로파일 목표: 임상시험에서 허용 가능한 임상적 부작용의 빈도 및 종류 예측
7. 약물 상호작용 (Drug Interactions)	<ul style="list-style-type: none"> • 병용 약물 영향: CYP 450 효소 대사 관련 상호작용 등 함께 복용 시 주의해야 할 약물군
8. 특수 인구집단에서의 사용 (Use in Specific Populations)	<ul style="list-style-type: none"> • 임부 및 수유부: 태아 영향 가능성 및 수유 제한 필요성 • 소아 및 고령자: 연령별 안전성 및 유효성 고려사항
9. 약물 오남용 및 의존성 (Drug Abuse and Dependence)	<ul style="list-style-type: none"> • 중독 위험: 제어 물질(Controlled Substance) 지정 필요성 검토
10. 과량투여 (Overdosage)	<ul style="list-style-type: none"> • 과량 복용 시 처치: 독성 증상 및 해독제(Antidote) 존재 여부

11. 임상 약리학 (Clinical Pharmacology)	<ul style="list-style-type: none"> • 작용 기전(MoA): 약물이 체내에서 효과를 내는 생물학적 메커니즘 • 약동학/약력학(PK/PD): 흡수, 분포, 대사, 배설(ADME) 특성 목표치
12. 비임상 독성학 (Nonclinical Toxicology)	<ul style="list-style-type: none"> • 동물 실험 데이터: 발암성, 변이원성, 생식 독성 결과 요약
13. 임상 연구/유효성 (Clinical Studies)	<ul style="list-style-type: none"> • 일차 평가변수(Primary Endpoint): 통계적 유의성을 증명할 핵심 지표 (예: PFS, HbA1c 감소량) • 대조군 설정: 위약(Placebo) 대조 또는 기존 표준 치료제(Active Control) 대비 우월성/비열등성
14. 공급, 보관 및 취급 (How Supplied/Storage and Handling)	<ul style="list-style-type: none"> • 보관 조건: 실온 보관, 냉장(2-8°C), 동결 보관 등 유통 편의성 목표

3. Toxicological TPP의 배경과 약물 모달리티별 이해

1) Toxicological TPP의 개념

- 독성학적 목표 제품 프로파일(TPP)은 신약 또는 화학 제품의 초기 발굴 단계부터 상용화에 이르기까지, 해당 제품에 대해 기대되는 안전성, 내약성 및 비임상 독성 허용 기준을 정의하는 전략적 계획을 담은 Framework. 이는 후보 물질이 규제 및 임상 안전성 요건을 충족하도록 보장하기 위해 **최소 허용** 및 **이상적/선호** 안전성 특성(**minimally acceptable** and **ideal/preferred** safety)을 모두 명시함(NIH SEED, 2026; Mohamed 등, 2021; Jain 등, 2026).

2) TPP 내 독성학적 프로파일링의 주요 구성 요소

- ① **비임상 안전성 평가:** 세포, 조직 및 주요 장기 시스템에 대한 안전성을 규명하기 위해 필요한 in vitro 및 in vivo 동물 연구를 요약함.
- ② **용량-반응 임계치:** 동물 실험에서 최대 내약 용량(MTD)에 대한 목표를 설정하고, 인간 임상 시험을 위한 안전한 시작 용량을 예측함.
- ③ **부작용 프로파일:** 예상되는 계열별 또는 기전 기반 독성(예: 간독성, 심장독성 또는 피부 과민성)을 파악하고, 허용 가능한 부작용 범위의 한계를 설정함.
- ④ **장기 노출 및 동태학:** 전신 클리어런스, 흡수, 대사 및 만성 노출의 영향을 개괄함.

3) 약물 모달리티별 toxicological TPP을 위한 접근 방법

- 독성학적 표적 제품 프로파일(TPP)은 신약 후보가 임상적으로 성공하기 위해 필요한 허용 가능한 안전 마진(safety margin), 모니터링 매개변수 및 책임 기준을 정의함. 이러한 안전 TPP를 정의하고 실행하는 접근 방식은 각 **약물 모달리티**의 고유한 물리화학적 및 약리학적 특성에 따라 상당히 달라짐(Beattie 등, 2024; Dorato 등, 1998; Wyatt 등, 2011).

3-1) 저분자

- ① **기전 기반 위험성:** 표적 독성, 2차 약리학(표적 외 핵 수용체 또는 hERG와 같은 이온 채널), 그리고 공유결합 단백질 결합으로 이어지는 생체활성화 경로에 중점을 둠(Guengerich, 2011; Zhou 등, 2005; Bassan 등, 2024).
- ② **ADME 기반 target product profile:** 반응성 대사산물, CYP450 억제/유도, 조직 특이적 축적에 대해 명확한 임계값이 설정됨.
- ③ **평가 도구:** 고처리량 체외 분석법 및 정량적 시스템 독성학(PMC의 QST) 모델링을 통해 약동학적 노출을 간독성 또는 신장 내 결정 형성과 직접적으로 연관시킴(Beattie 등, 2024).

3-2) 치료용 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드

- ① **본질적인 구조적 위험:** TPP는 면역원성, 보체 활성화, 비특이적 막 파괴(용혈)의 완화를 최우선으로 함.
- ② **비경구 투여 시 표적 외 작용:** 간 및 근위 신세뇨관에 고도로 축적되므로, 신장 및 간 안전성 임계값을 초기 단계에서 엄격하게 정의해야 함(Bashir 등, 2023).

- ③ **평가 도구:** 특수 세포 플랫폼과 [Nature Communications](#)의 첨단 예측 프로파일링을 통해 구조적 오염 및 표적 외 세포 상호작용을 평가(Zhang 등, 2026).

3-3) 생물학적 제제(단일클론 항체 및 ADC)

- ① **면역학적 및 사이토카인 관련 우려 사항:** TPP는 사이토카인 방출 증후군(CRS, Cytokine Release Syndrome), 주입 반응, 그리고 표적 외 정상 조직에서의 표적 매개 분포를 중심으로 다뤄짐.
- ② **유효부하 독성(ADC):** 항체-약물 접합체(ADC, antibody-drug conjugate)의 경우, 프로파일에서 유효부하의 조기 절단, 방관자 세포 독성, 국소적 골수 또는 말초 신경 병증 위험을 반드시 고려해야 함.
- ③ **평가 도구:** 인간 세포 기반 공동 배양, 중개 약동학/약력학(PK/PD) 모델링, 그리고 특수 비인간 영장류(NHP) 교차 반응성 연구

3-4) 세포치료제

- 개발 독성학적 타겟 제품 프로파일(TPP) 세포 치료는 전통적인 저분자와 구별되는 접근법이 필요하며, 세포 산물은 살아 있고 증식하며 종종 장기간 지속되는 치료법임. 주요 목표는 복잡한 생물학적 위험을 미리 정의된 것으로 변환이 필요함. 예를 들어 **최소 및 선호 안전성 수용 기준**. 다음은 세포 치료를 위한 강력한 독성학 TPP를 구축하기 위해 필요한 주요 접근법과 안전성 기준임

3-4-1) TPP에서 핵심 독성학 매개변수 정의

- 화학 약물과 달리 최대 허용량(MTD)이 표준인 반면, 세포 치료는 **관찰 부작용 수준 (NOAEL)** 그리고 생물학적 행동 모니터링. TPP는 다음 기준을 정해야 함(Yoneda 등, 2022; Li 등, 2025).
 - ① **중양 발생성 및 중양성:** 세포 변형 또는 중양 형성의 허용 가능한 위험을 정의할 필요성. 기준에는 염색체 안정성, 벡터 유도 삽입 돌연변이 유발 부재, 생체 내 통제되지 않은 증식의 부재에 대한 허용 가능한 임계치가 명시되어야 함(Leonov 등, 2025).
 - ② **생물분포와 지속:** 세포가 어디로 가는지, 얼마나 오래 살아남는지, 언제 사라지는지 지도화해. TPP는 폐 내 갇힘 방지나 주요 장기와의 교차 반응 방지에 대한 허용 가능한 비표적 조직 축적에 대한 목표 임계치를 설정함.
 - ③ **면역원성 및 면역독성:** 특히 다음과 같은 허용 가능한 면역 반응 경계를 정의하십시오. **동종** (기성품) 치료법. 여기에는 숙주 대 이식편 반응 또는 이식편 대 숙주 질병(GvHD, Graft-versus-Host Disease) 매개변수의 한계가 포함(Yoneda 등, 2021).
 - ④ **온타겟/오프-종양 독성:** CAR-T와 같은 유전자 조작 세포의 경우, TPP는 표적 항원의 낮은 수준을 발현하는 정상 조직과의 교차 반응성 허용 한계를 명확히 정의해

야 함.

3-4-2) 위험 완화 및 내장된 안전 통제

- 세포는 무기한 존속할 수 있기 때문에, 독성학 TPP는 부작용을 처리하기 위한 능동적 안전 메커니즘을 정의해야 함(Knowledge Library, 2024).

- ① **자살 또는 제거 유전자:** TPP는 심각한 독성이 발생했을 때 즉시 세포를 제거하기 위해 제어 가능한 '오프 스위치'(예: 유도성 Caspase-9 또는 엔지니어링 EGFR/CD20 태그)에 대한 요구사항을 명시해야 함(Bonifant 등, 2016).
- ② **도징 게이팅(dosing gating):** 도징 게이팅은 특정 물질이나 데이터, 신호의 흐름을 정해진 양(Dose)이나 조건에 맞춰 제어.선별(Gating)하는 공정 및 기술을 의미함. 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 같은 과염증 관리를 위한 분할 투여 전략이나 치료 전 조건화 한계에 대한 명확한 경계 설정(Bonifant 등, 2026).

3-4-3) 번역 및 동물 모델 선택 접근법

- TPP의 중요한 부분 중 하나는 정의입니다 어떻게 안전성은 전임상 단계에서 입증될 것임. 프로파일은 관련 테스트 모델 선정 기준을 명확히 규정해야 함(Leonov 등, 2025)

- ① **종 관련 성:** 선택된 동물 모델은 인간과 동등한 생물학적 표적을 발현하거나 종 특이적 대리 세포를 이용해 대표적인 독성학 데이터를 산출해야 함(Bhoite, 2020).
- ② **면역저하 모델 대 동생 모델:** TPP는 면역 저하 마우스(인간 세포 생존 및 종양 발생 평가)와 면역 기능 있는 공동 모델(전체 면역 체계 독성 평가)을 병행 사용하도록 계획해야 함(Bhoite, 2020).

3-4-4) 오프타겟 공정 불순물 고려

- 세포 치료에서의 독성학은 최종 세포에만 국한되지 않습니다; TPP는 환자와 접촉하는 제조 부품에 대한 안전 기준을 정의해야 함(Yoneda 등, 2022).

- ① **잔류 재료:** 최종 제품 제형에서 잔류 벡터, 뉴클레아제(예: CRISPR/Cas9), 선택적 항생제 또는 냉동 보호제(예: DMSO)의 최대 허용 농도를 정의함(Bhoite 등, 2020).
- ② **어드벤처스 에이전트:** 세포 전개 과정에서 사용되는 마이코플라즈마, 내독소 또는 복제 능력 있는 바이러스에 대해 엄격한 무관용 기준을 정의함(ASGCT 등, 2020)

4. Toxicological TPP의 접근 방법

1) 다양한 치료 양식 전반에 걸친 독성학적 TPP의 중요성

- ① **안전성 범위 정의와 더불어 임상 진입(IND) 및 임상 디자인의 초석:** 기존의 소분자와는 달리, 새로운 치료 양식(항체-약물 접합체[ADC], 세포 및 유전자 치료, 복합 생물학적 제제 등)은 고유한 표적 내/종양 외 독성 또는 면역원성 위험을 수반함. Toxicological TPP는 치료적 이점에 비해 허용 가능한 이상 반응에 대한 명확한 경계를 설정. 이를 바탕으로 이를 바탕으로 인간 대상 첫 시험(FIH)의 최초 투여 용량(MRSD)을 안전하게 설정할 수 있음.
- ② **치료 모달리티별 설계:** 이는 경직된 '일률적' 체크리스트가 아닌 약리학적 교차 반응성을 바탕으로 단일 종 또는 이중 종 시험 모델 중 어느 것이 필요한지를 결함.
- ③ **진행/중단 결정 기준:** 개발자들은 [NIH SEED TPP 가이드](#)와 같은 자료에 제시된 프레임워크를 활용하여, 막대한 임상 단계 손실을 입기 전에 실현 가능성이 없는 후보 물질을 선별해 내기 위해 최소 허용 안전성 프로파일을 정의함.

2) 독성학적 TPP 접근법

- ① **인간 중심 신개념 접근법(Human-Centric New Approach Methodologies):** 첨단 체외 세포 모델, 오가노이드 및 in silico 프로파일링을 활용하여 표준 동물 모델로는 파악할 수 없는 인간 특유의 조직 독성을 예측함(Pognan 등, 2023; Liu, 등, 2026).
- ② **단계적 전임상 시험(Tiered Preclinical Testing):** [FDA 세포 및 유전자 치료 지침 등 포함한 약물 모달리티별 가이드라인](#)에 따라 단일 용량 또는 반복 용량 생체 분포 및 안전성 약리학 시험을 실시하여 후보 물질 선정의 위험을 완화함(FDA, 2026; Yoneda 등, 2022).
- ③ **동적 반복(Dynamic Iteration):** 전임상 분석에서 1/2상 임상시험으로 데이터가 축적됨에 따라 [NIH SEED TPP 프레임워크](#) 내에서 안전성 기준을 지속적으로 업데이트함(NIH SEED, 2026)

5. Toxicological TPP와 비임상시험 마케팅 전략

1) Toxicological TPP와 비임상시험의 마케팅 전략

- ① **규제 준수:** Toxicological TPP를 통해 안전성 매개변수를 초기 단계부터 통합하면 미국 FDA와 같은 규제 기관과의 협의를 간소화하여 신약 임상시험 신청(IND) 절차를 원활하게 진행할 수 있음. 또한 WuXi AppTec 전임상 지침을 통해 표준 워크플로를 검토함(Creative Bioarray, 2026, WuXi AppTec, 2026).
- ② **차별화 및 라벨 표기:** 전임상 모델에서 더 안전한 safety margin이나 낮은 면역원성을 입증하는 것은 최종 제품 라벨에 대한 경쟁적인 마케팅 이점으로 직접 이어짐
- ③ **자원 최적화:** 특정 작용 기전과 관련된 고위험 평가 지표(예: 심장 독성 또는 면역 독성)에 엄격히 초점을 맞춰 동물 및 체외 시험을 수행함. (Nguyen 등, 2026; Pognan 등, 2023; Nandre 등, 2025; Avila 등, 2025).

2) AI 기반 및 인간 중심의 새로운 접근법(NAM) 시대에서 비임상 마케팅 전략

- 전임상 독성 시험에서 AI 기반 및 인간 중심의 새로운 접근법(NAM)을 효과적으로 마케팅하려면, 이러한 디지털 및 체외 플랫폼을 동물 모델을 즉시 대체하는 수단이 아니라, 규제 요건에 부합하고 위험을 줄이며 임상 적용을 가속화하는 보완 수단으로 포지셔닝해야 함(Mirlohi 등, 2025)

2-1) 핵심 가치 제안

- ① **인간 관련성 높은 정확도:** AI 모델과 3D 오가노이드가 중간 차이를 극복함으로써, 기존 동물 모델이 인간의 이상 반응을 제대로 예측하지 못하는 현실을 해결한다는 점을 강조함(Axion BioSystems. 2026; Barberan, 2025).
- ② **빠른 실패를 통한 비용 절감 & 조기 퇴출(Early Kill):** 초기 가상 스크리닝 및 선도 물질 최적화 단계에서 독성 후보 물질을 선별해냄으로써 자원과 시간을 절약할 수 있음을 강조함(Lee 등, 2025; Barberan. 2025).
- ③ **윤리 및 3R 원칙 준수:** 글로벌 지침에 따라 동물 실험을 줄이고 개선함으로써 기관의 지속 가능성과 윤리적 의무를 충족시킨다는 점을 어필함(Mehta 등, 2025; Ro emd, 2025).

2-2) 시장 진출 및 메시징 전략

- **교육 중심 콘텐츠 마케팅:** AI 예측과 '오가노이드-온-어-칩(organ-on-a-chip)' 검증을 결합한 하이브리드 워크플로가 [FDA NAMs 활동](#) 프레임워크를 어떻게 충족하는지 보여주는 백서 및 사례 연구를 발간함(FDA, 2026; 4Dcell, 2025).
- **규제 투명성 및 검증 근거:** 규제 기관의 승인 기준에 대한 최신 [EMJ 리뷰](#)와 부합하는 설명 가능한 AI(XAI) 출력 결과, 신뢰 구간, 다중 사이트 검증 지표를 마케팅하여 신뢰를 구축함(Research and Marget, 2026).
- **생태계 파트너십:** Certara NAM Strategies와 같은 확고한 입지를 갖춘 계약 연구 기관(CRO) 또는 소프트웨어 플랫폼과 공동 마케팅을 통해 통합된 종단간 비임상 개발 청사진을 제공함(Paul 등, 2020).

- **임상 적용 성공에 집중:** 영업 전략을 “저비용/고속 처리”에서 “인간 관련성 증대”로 전환하고, 초기 단계에서 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 유해성을 탐지함으로써 후기 임상 단계의 높은 실패율을 어떻게 줄일 수 있는지 강조(Seyhan, 등, 2026; Masarone 등, 2024; Mehta 등, 2025).
- **투명한 서비스 패키지 제공:** [Next MSC](#)의 분석에 따르면, 성공적인 계약 연구 기관(CRO)들은 선별된 예측 데이터 관리 서비스를 구독형 모델로 패키징하여 신약 임상시험 신청(IND) 소요 기간을 단축하고 있음(NMSC 등, 2025).

2-3) 교육 및 사고 리더십 콘텐츠

- **한계를 공개적으로 인정:** 기계 학습이 예측할 수 있는 것과 예측할 수 없는 것에 대한 콘텐츠를 게시하고, 희귀하거나 특이적인 독성 경로와 관련된 한계를 인정함으로써 신뢰성을 구축(Russell, 2026).
- **사례 연구를 활용:** **Tox21 데이터 챌린지**(tripod.nih.gov/tox21/challenge)와 같은 이니셔티브의 과거 벤치마크 데이터를 활용하여, 바이오테크 고객들이 다중 동물 실험 설계에서 벗어나도록 교육(Paul 등, 2020; Marin biologics laboratories, 2025).

6. 결론: Toxicological Target Product Profile과 비임상 연구 및 마케팅 전략

- 새로운 약물 모달리티(Modality, 치료 접근법)의 등장은 비임상 독성시험의 패러다임을 바꾸고 있습니다. 과거의 1세대 합성의약품(Small Molecule) 중심에서 2세대 항체의약품(Biologics), 그리고 최신의 3세대 유전자 및 세포 치료제(CGT) 및 표적 단백질 분해제(TPD) 등으로 다변화되면서 전임상 독성시험의 전략적 가치는 더욱 높아졌음.
- 전임상 독성시험에서 독성 목표 제품 프로파일(tTPP, **Toxicological Target Product Profile**)의 수립과 **마케팅 전략적 관점**의 융합이 왜 중요한지 핵심 요소를 정리하였음.

6-1. 독성 목표 제품 프로파일 (Toxicological Target Product Profile, tTPP)의 중요성

- tTPP는 신약 개발 초기 단계에서 허가 및 상용화 단계까지 예상되는 **안전성 프로파일의 가이드라인**입니다. 다양한 모달리티의 등장으로 tTPP의 수립은 신약 개발의 시행착오를 줄이는 핵심 나침반 역할을 함.

1) 모달리티별 맞춤형 독성 예측:

- **합성약품**: 간독성, 심장독성(hERG), CYP 효소 억제 등 전형적인 대사성 독성에 집중함
- **바이오향약품**: 표적 외 독성(Off-target)보다는 과도한 면역 반응(사이토카인 폭풍) 및 면역원성(ADA, antibody-drug antigen 발생) 예측이 핵심임.
- **세포/유전자 치료제**: 체내 지속성, 종양원성(Tumorigenicity), 의도치 않은 유전자 삽입 변이(Insertional Mutagenesis) 등을 tTPP에 반드시 반영해 함.

2) 임상 진입(IND) 및 임상 디자인의 초석: tTPP를 통해 무독성량(NOEL)을 정확히 산출하고, 이를 바탕으로 인간 대상 첫 시험(FIH)의 최초 투여 용량(MRSD)을 안전하게 설정할 수 있음.

3) 조기 퇴출(Early Kill)을 통한 비용 절감: 전임상 단계에서 tTPP가 정한 안전성 기준(마진)을 충족하지 못하는 후보물질을 빠르게 걸러내어, 막대한 임상 비용이 낭비되는 것을 방지함.

6-2. 비임상 독성시험의 마케팅 및 사업화 전략적 의의

- 비임상 독성시험은 단순히 '규제 기관의 승인을 받기 위한 통과 의뢰'가 아님. 기술 수출(L/O)이나 투자 유치, 시장 경쟁력 확보를 위한 **강력한 마케팅 툴**로 활용됨.

- ① **기술 수출(License-out)의 핵심 세일즈 포인트:** 글로벌 빅파마들이 파이프라인을 도입할 때 가장 엄격하게 검증하는 것 중 하나가 '안전성 데이터'임. 탄탄한 GLP 독

성 데이터와 명확한 tTPP는 물질의 신뢰도를 높여 권리 가치(Valuation)를 극대화시키는 마케팅 무기가 됨.

- ② **계열 내 최고(Best-in-Class) 전략 입증:** 경쟁 약물(First-in-Class 등)이 가진 고유의 독성 이슈(예: 특정 간독성 또는 혈전 부작용)를 우리 물질은 극복했음을 비임상 독성 비교 데이터를 통해 시각적으로 증명할 수 있음.
- ③ **시장 진입 속도(Time-to-Market) 단축:** 최근 규제기관(FDA 등)은 혁신 모달리티에 대해 유연하지만 과학적인 독성 데이터를 요구함. 바이오마커를 활용한 비임상 독성 시험 설계는 임상 승인 기간을 단축시켜 시장에 먼저 진입하는 선점 효과를 누리게 함.
- ④ **환자 및 의료진 대상의 예비 신뢰 구축:** 전임상 단계에서 확보된 안전성 경향성은 향후 출시될 제품의 장기 안전성 프로파일에 대한 예비 지표가 되며, 이는 전문의들이 처방을 고려할 때 중요한 마케팅적 신뢰 자산이 됨.

<참고문헌>

Mehta, Krina & Maass, Christian & Cucurull-Sanchez, Lourdes & Pichardo-Almarza, Cesar & Subramanian, Kalyanasundaram & Androulakis, Ioannis & Gobburu, Jogarao & Schaller, Stephan & Sherwin, Catherine. (2025). Modernizing Preclinical Drug Development: The Role of New Approach Methodologies. ACS Pharmacology & Translational Science. 8. 10.1021/acsptsci.5c00162.

Lee H, Kim J, Kim J-W and Lee Y (2025) Recent advances in AI-based toxicity prediction for drug discovery. Front. Chem. 13:1632046.

Krina Mehta, Christian Maass, Lourdes Cucurull-Sanchez, Cesar Pichardo-Almarza, Kalyanasundaram Subramanian, Ioannis P. Androulakis, Jogarao Gobburu, Stephan Schaller, Catherine M Sherwin; Modernizing Preclinical Drug Development: The Role of New Approach Methodologies. ACS Pharmacol. Transl. Sci. 13 June 2025; 8 (6): 1513–1525.

Jenny Ro. Approach Methodologies (NAMs) in Drug Development. Thermo Fisher Scientific. 2025.

Sara Masarone, Katie V. Beckwith, Matthew R. Wilkinson, Shreshth Tuli, Amy Lane, Sam Windsor, Jordan Lane, Layla Hosseini-Gerami, Advancing predictive toxicology: overcoming hurdles and shaping the future, Digital Discovery, Volume 4, Issue 2, 2024, Pages 303-315, ISSN 2635-098X.

Marin Biologic Laboratories. Transforming Preclinical Safety Testing: The FDA's Roadmap to Replacing Animal Studies with New Approach Methodologies (NAMs). 2025.

NMSC. Preclinical CRO Market. Source: <https://www.nextmsc.com/preclinical-cro-market-hc3834/request-pdf>. 2025.

Paul D, Sanap G, Shenoy S, Kalyane D, Kalia K, Tekade RK. Artificial intelligence in drug discovery and development. Drug Discov Today. 2021 Jan;26(1):80-93.

Attila A. Seyhan, Claudio Carini, Artificial Intelligence in drug discovery and development: current landscape, challenges, and future perspectives, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 226, 2026, 105461, ISSN 1040-8428.

Paul D, Sanap G, Shenoy S, Kalyane D, Kalia K, Tekade RK. Artificial intelligence in drug discovery and development. Drug Discov Today. 2021 Jan;26(1):80-93.

Erika Russell, AI toxicity prediction: What machine learning models can (and can't) tell you about drug safety, 2026.

Research and Marget. Artificial Intelligence (AI) in Predictive Toxicology Market Report 2025.

FDA. New Approach Methodologies (NAMs). The agency released a follow-up report, Reducing Animal Testing in Nonclinical Studies: Year One Progress and the Path Forward. 2026.

4Dcell. e Economic Case for Human-Based Preclinical Drug Testing: FDA's NAMs Roadmap Explained. 2025.

Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. Target Product Profile Analysis of COVID-19 Vaccines in Phase III Clinical Trials and Beyond: An Early 2021 Perspective. Viruses. 2021 Mar 5;13(3):418.

Axion BioSystems. 2026 New Approach Methodologies (NAMs): Advances in preclinical safety studies

Olivier Barberan. From Animal Models to NAMs: AI/ML-Driven Predictive Toxicology. Director of Translational Medicine Solutions, Elsevier Life Science Solution. 2025.

FDA Cellular & Gene Therapy Guidances by Year (2026)

- [Leveraging Prior Knowledge in the Development of Human Gene Therapy Products Incorporating Genome Editing; Draft Guidance for Industry 6/2026](#)

- [Chemistry, Manufacturing, and Controls Flexibilities for Developing Human Cellular and Gene Therapy Products for a Biologics License Application; Guidance for Industry](#)
5/2026
- [Safety Assessment of Genome Editing in Human Gene Therapy Products Using Next-Generation Sequencing; Draft Guidance for Industry](#)
4/2026
- [Considerations for the use of the Plausible Mechanism Framework to Develop Individualized Therapies that Target Specific Genetic Conditions with Known Biological Cause; Draft Guidance for Industry](#)
2/2026

Mirlohi, M.S.; Yousefi, T.; Aref, A.R.; Seyfoori, A. Integrating New Approach Methodologies (NAMs) into Preclinical Regulatory Evaluation of Oncology Drugs. *Biomimetics* 2025, 10, 796.

WuXi AppTec. Is Your Drug Ready for Preclinical Toxicological Testing? 2026

Tam Nguyen, Elena Koustova, Target product profile: An essential tool to deliver differentiated, patient-centered, and reimbursable medical products to treat substance use disorders, *Drug Discovery Today*, Volume 31, Issue 1, 2026, 104573, ISSN 1359-6446.

Pognan F, Beilmann M, Boonen HCM, Czich A, Dear G, Hewitt P, Mow T, Oinonen T, Roth A, Steger-Hartmann T, Valentin JP, Van Goethem F, Weaver RJ, Newham P. The evolving role of investigative toxicology in the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov.* 2023 Apr;22(4):317-335.

Nandre RM, Terse PS. An overview of immunotoxicity in drug discovery and development. *Toxicol Lett.* 2025 Jan;403:66-75.

Amy M. Avila, Ilona Bebenek, Jessica A. Bonzo, Todd Bourcier, Karen L. Davis Bruno, David B. Carlson, John Dubinion, Ikram Elayan, Wafa Harrouk, Shwu-Luan Lee, Donna L. Mendrick, Jill C. Merrill, Jackye Peretz, Emily Place, Muriel Saulnier, Ronald L. Wange, Jia Yao, Dong Zhao, Paul C. Brown, An FDA/CDER perspective on nonclinical testing strategies: Classical toxicology approaches and new approach methodologies (NAMs), *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 114, 2020, 104662, ISSN 0273-2300.

Pognan F, Beilmann M, Boonen HCM, Czich A, Dear G, Hewitt P, Mow T, Oinonen T, Roth A, Steger-Hartmann T, Valentin JP, Van Goethem F, Weaver RJ, Newham P. The evolving role of investigative toxicology in the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov.* 2023 Apr;22(4):317-335.

Creative Bioarray. Preclinical Workflow for Drug Toxicity Testing. 2026

Wenqiang Liu, Paul D. Pang, Catherine A. Wu, Danilo Tagle, Joseph C. Wu, New approach methodologies for drug discovery, *Cell*, Volume 189, Issue 7, 2026, Pages 1877-1903, ISSN 0092-8674.

ASGCT. Recommendations for risk assessment requirements (safety and toxicology) for animal models and nonclinical data. ASGCT. Liaison Meeting Working Group 16 Nov 2020

Li J., Ma J., Wang L., et al. (2025). Application of non-invasive imaging on cell tracking of adoptive cell therapy: A systemic review. *The Innovation Medicine* 3:100137.

Leonov, G.E.; Grinchevskaya, L.R.; Makhnach, O.V.; Samburova, M.V.; Goldshtein, D.V.; Salikhova, D.I. Safety Assessment of Stem Cell-Based Therapies: Current Standards and Advancing Frameworks. *Cells* 2025, 14, 1660.

Knowledge Library. Cell and gene therapy answers: The importance of designing trials and strategies with the end goals in mind. 2024. www.labcorp.com/education-events/articles/cell-and-gene-therapy-answers-importance-designing-trials-and-strategies-end-goals-mind

Prabhakar Bhoite. Toxicological Assessment of Cell Therapy NCAC 2020 Spring Virtual Symposium on Next Generation Tools, Technologies and Surrogate Endpoints in Toxicological Assessments 25 June 2020

Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016 Apr 20;3:16011.

Zhang, Y., Tang, S., Chen, T. et al. PeptiVerse: A unified platform for therapeutic peptide property prediction. *Nat Commun* 17, 6819 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41467-026-74167-w>

Tomohiro Yoneda, Toshimitsu Tanaka, Kiyoko Bando, Byung Hyune Choi, Ryan Chang, Yukari Fujiwara, Pawan Kumar Gupta, Dong-sik Ham, Hiroshi Karasawa, Shinobu Kuwae, Shing-mou Lee, Yuu Moriya, Koji Takakura, Yoshie Tsurumaki, Takeshi Watanabe, Keiji Yoshimura, Masayuki Nomura, Nonclinical and quality assessment of cell therapy products: Report on the 4th Asia Partnership Conference of Regenerative Medicine, April 15, 2021, *Cytotherapy*, Volume 24, Issue 9, 2022, Pages 892-904, ISSN 1465-3249.

Shazia Bashir, Rawan Fitaihi, Hend E. Abdelhakim, Advances in formulation and manufacturing strategies for the delivery of therapeutic proteins and peptides in orally disintegrating dosage forms, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 182, 2023, 106374, ISSN 0928-0987.

Beattie KA, Verma M, Brennan RJ, Clausznitzer D, Damian V, Leishman D, Spilker ME, Boras B, Li Z, Oziolor E, Rieger TR, Sher A. Quantitative systems toxicology modeling in pharmaceutical research and development: An industry-wide survey and selected case study examples. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2024 Dec;13(12):2036-2051.

Wyatt PG, Gilbert IH, Read KD, Fairlamb AH. Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(10):1275-83.

Dorato, M.A. and Buckley, L.A. (1998), Toxicology in the Drug Discovery and Development Process. *Current Protocols in Pharmacology*, 2: 10.3.1-10.3.30

Guengerich FP. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011;26(1):3-14.

Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M., & Chen, Y. Z. (2005). Drug Bioactivation Covalent Binding to Target Proteins and Toxicity Relevance. *Drug Metabolism Reviews*, 37(1), 41-213.

Bassan A, Steigerwalt R, Keller D, Beilke L, Bradley PM, Bringezu F, Brock WJ, Burns-Naas LA, Chambers J, Cross K, Dorato M, Elespuru R, Fuhrer D, Hall F, Hartke J, Jahnke GD, Kluxen FM, McDuffie E, Schmidt F, Valentin JP, Woolley D, Zane D, Myatt GJ. Developing a pragmatic consensus procedure supporting the ICH S1B(R1) weight of evidence carcinogenicity assessment. *Front Toxicol*. 2024 Apr 5;6:1370045.

Beattie KA, Verma M, Brennan RJ, Clausznitzer D, Damian V, Leishman D, Spilker ME, Boras B, Li Z, Oziolor E, Rieger TR, Sher A. Quantitative systems toxicology modeling in pharmaceutical research and development: An industry-wide survey and selected case study examples. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2024 Dec;13(12):2036-2051.

NIH SEED(Small business Education and Entrepreneurial Development). Creating a Target Product Profile for New Drug Products. <https://seed.nih.gov/sites/default>. 2026.

Mohamed Diwan M. AbdulHameed, Ruifeng Liu, Patric Schyman, Daniel Sachs, Zhen Xu, Valmik Desai, Anders Wallqvist, ToxProfiler: Toxicity-target profiler based on chemical similarity, *Computational Toxicology*, Volume 18, 2021, 100162, ISSN 2468-1113.

Jain, V., Bharti, S. Toxicological target profiling and mechanistic exploration of 4-methylbenzylidene camphor toxicity using integrated in silico approaches. *Toxicol. Environ. Health Sci*. (2026).

Creative Bioarray. Preclinical Workflow for Drug Toxicity Testing. 2026

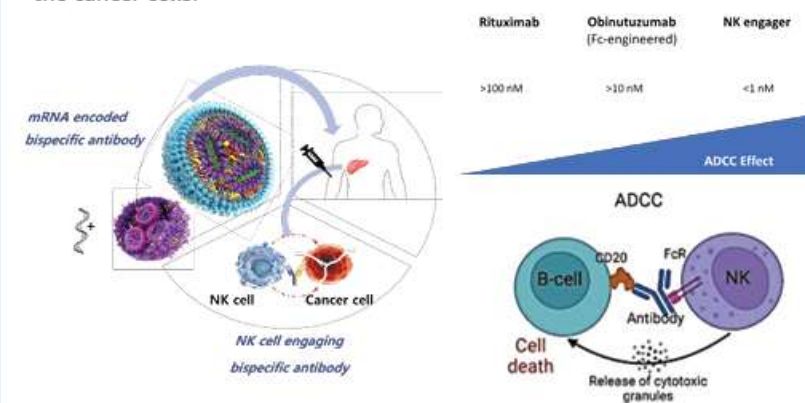
126. RNA-based NK cell engager for autoimmune or cancer에 대한 tTPP(Toxicological target product profile)

<p>[윤나리<지아이이노베이션 임상부문장>의 임상 바로 읽기] 신약 개발 여정의 시작과 끝 : Target Product Profile(TPP)과 Clinical Development Plan 입력2022.01.26 10:23수정2022.04.29 13:40</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 20세기 가장 영향력 있는 경영학자 중 한 명인 스티븐 커비는 저서 <성공하는 사람들의 7가지 습관>에서 자신의 삶을 효과적으로 이끌기 위한 습관 중 하나로 'Begin with the end in mind(끝을 염두에 두고 시작하라)'고 제시했다. 원하는 것을 얻기 위해서는 먼저 끝을 염두에 둔 목표를 확립하는 과정이 필수라는 의미다. ● 정리하자면, TPP란 개발 의약품의 안전성 및 유효성 입증 전략, 허가 시점에서의 경쟁제품 대비 차별화 요소, 상업적 가치 등을 총체적으로 제시하는 전략적 도구라 할 수 있다. ● 앞서 소개한 'Begin with the end in mind'라는 말처럼 TPP는 본격적으로 데이터를 도출하기 훨씬 전, 개발 초기 개발 의약품의 개념 증명(proof-of-concept) 결과만으로도 충분히 수립할 수 있고, 제조 품질 관리, 비임상, 중개연구, 독성, 약리학, 임상개발, 허가, 마케팅 등 신약 개발에 참여하는 모든 팀이 관여해 작성한다. ● 목표를 세워놓고 신약 개발의 각 단계에서 TPP를 충족할 수 있는 비임상 연구, 중개연구 및 임상시험을 디자인하고 결과를 도출하면 효율성이 크게 증가할 뿐만 아니라 실패 확률도 줄어든다. ● 과학기술은 빠르게 진보하고, 규제환경과 경쟁상황이 늘 급변하는 만큼 TPP는 개발 중간중간 지속적으로 점검하고 업데이트되는 '살아 있는 문서(living document)'다.

1. mRNA 기반 내추럴 킬러(NK) 세포 결합체의 개념

- mRNA 기반 내추럴 킬러(NK) 세포 결합체는 <표-1>에서처럼 체지질 나노입자(LNP)를 이용해 생체 내에서 합성 메신저 RNA를 전달하며, 숙주 세포(주로 간세포)가 다중 특이적 인게이지 단백질을 번역하고 분비하도록 유도하여 환자의 NK 세포를 병원성 표적에 결합시킴(De novo Biotherapeutics, 2024).

<표-1> mRNA-encoded, NK cell engaging bispecific antibody

Product Type	mRNA-encoded, NK cell engaging bispecific antibody
Indication	B cell lymphoma
Target	CD20/NK cell activating receptor
MoA(Mechanism of Action)	<p>1. LNP-encapsulated mRNA encoding NK cell engager is administered intravenously.</p> <p>2. They are delivered to the liver, and NK cell engagers are produced in the hepatocytes.</p> <p>3. NK cell engagers redirect NK cells toward cancer cells, mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity, ultimately resulting in the destruction of the cancer cells.</p> 
Competitiveness	<p>1. Extended dosing interval, reduced dosing frequency</p> <p>2. better safety profiles with lower incidence and severity of CRS and neurotoxicity compared to T cells</p>
Development Stage	Hit
Route of Administration	Parental - Intravenous

2. Mode of action

- ① mRNA 인코딩: mRNA는 세포가 한쪽 끝에는 특정 종양 항원을, 다른 쪽 끝에는 NC 세포의 CD16 활성화 수용체를 표적으로 하는 이중특이적 단백질을 만들도록 지시(Yang 등, 2025; Bai 등, 2024). [1, 2, 3, 4]
- ② LNP 제공: 지질 나노입자(LNP)는 연약한 mRNA를 안전하게 캡슐화하여 주입하여 체내 안으로 운반(De novo Biotherapeutics, 2026; Douka 등, 2024)
- ③ 표적 용해: 생성된 인게이지 단백질은 암세포에 결합하여 활성 NK 세포를 끌어들여 항체 의존성 세포독성을 통해 종양을 파괴함(Bai 등, 2024)

3. 핵심 tTPP(독성학적 표적 신약 프로파일) 측면에서 안전성 이점

- ① **감소 사이토카인 방출 증후군(CRS):** T세포 참여자(예: BiTEs)나 대규모 증식 연쇄 반응과 전신 IL-6/TNF- α 급증을 강하게 활성화하는 CAR-T 치료제와 달리, NK 세포 참여는 일반적으로 CRS 및 신경독성의 발생률과 중증도를 낮추며 더 유리한 안전성 프로파일을 보임(Rafei 등 2021; De novo Biotherapeutics, 2023; Dos Reis 등, 2025).
- ② **일시적이고 조절 가능한 발현:** 활성 치료제가 영구적인 바이러스 벡터나 지속적인 세포 전달이 아닌 일시적인 mRNA에 의해 암호화되기 때문에 단백질 발현은 자연스럽게 감소함. 이 자기 제한 약물동역학/약동역학(PK/PD) 창은 잠재적 온타겟/오프 종양 독성의 지속 기간을 크게 제한함(Dong 등, 2026).
- ③ **선천적 내성과 GvHD 부족:** NK 플랫폼은 이식편대숙주 질환(GvHD, graft-versus-host disease)을 유발하지 않아 심각한 전신 동종면역 독성을 피함(Bai 등, 2024; De novo Biotherapeutics, 2023)

4. 주요 독성학적 위험 및 모니터링 지표

- ① **LNP 관련 간독성 및 전신 염증:** 주요 독성은 종종 인게이지 단백질 자체보다는 LNP 전달체에 의해 주도되며, 일시적인 간 트랜스아미나제(AST/ALT) 상승과 급성 주입 관련 선천 면역 자극으로 나타남.
- ② **목표 중 외부 조직 독성:** 종양학에서는 선택한 종양 관련 항원(TAA)이나 자가면역에서는 자가반응 표면 표지자에 의해 엄격히 결정됩니다. 표적 항원을 발현하는 건강한 조직과의 교차 반응성은 엄격한 조직 교차반응성(TCR) 선별이 필요함(Beijing CorreGene Biotechnology Co, 2025).

③ **선천 면역의 통제되지 않은 활성화** : 높은 국소 농도는 주요 정상 조직에서 저수준 기저 발현을 보인 경우 국소에서 전신 급성 반응이나 표적세포 외 용해를 유발할 수 있음

④ **약동학 및 생체 분배**: 일시적 표현:mRNA 발현은 1-2일 이내에 정점에 달하고 5-7일 내에 사라져, 재조합 단백질에 비해 만성 노출 위험을 제한함(Shimasaki 등, 2020).

- 조직 분포: 생물분포 연구는 주로 간, 비장, 폐에서 LNP 축적을 추적하며, 국소 조직 공포 형성 또는 면역 세포 침윤 평가가 필요함.
- 반감기 조절: 암호화된 단백질 반감기는 분비된 인게이지 분자의 전신 제거와 단백질 분해에 의존함.

⑤ 목표 중 조직 외 독성

- 목표 교차 반응성: 정상 세포의 우발적 용해를 방지하기 위해 표적 종양이나 자가면역 항원을 발현하는 건강한 조직 평가(Pfeifer 등, 2024) .
- CD16a 활성화 조절: NK 관련 도메인이 과도하게 비표적화된 말초혈 NK 세포 탈과립을 유발하지 않도록 하는 것임(Zhang 등, 2023).

⑥ 면역원성 및 유전독성

- 항약물 항체(ADA): 암호화된 인게이지 도메인에 대한 중화 항체 평가와 반복 투여에 영향을 미치는 항PEG/LNP 항체의 평가(Zhang 등, 2023; .
- 선천적 면역 감지: 단일 가닥 또는 이중 가닥 mRNA 모티프에 의해 촉발되는 톨 유사 수용체(TLR7/8 및 RIG-I) 활성화(Cording 등, 2025).
- 유전자 독성: 일시적인 세포질 mRNA의 비통합 특성 때문에 위험이 낮으나, 잔류 플라스미드 또는 조각 분석이 표준(Tan emd, 2026; Forster em,d 2026; Žak emd, 2021)

<참고문헌>

Žak MM, Zangi L. Lipid Nanoparticles for Organ-Specific mRNA Therapeutic Delivery. *Pharmaceutics*. 2021 Oct 13;13(10):1675.

J. Forster III, A. Fish, M. Malhotra, A. Pinjari, M. Debnath, and A. Kulkarni, "Engineered Immunoagonist Non-Coding RNA (incRNA) Activates Dual TLR Pathways for Cancer Immunotherapy." *Adv. Healthcare Mater.* 15, no.2(2026):

Chloe Tan, Lauren Levy, Yuting Huang, and Ana Jaklenec. RNA Delivery Technologies: Industrial Applications And Emerging Innovations. February 10, 2026. *avancing RNA*. Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology

Cording, S., Pahl, J., Ellwanger, K., Breunig, C., Koch, J. (2025). "Innate Immune Cell Engagers: Matchmakers for Next-Generation Immunotherapy". In: Zimmer, J., Ullrich, E. (eds) *Natural Killer Cells*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Noriko Shimasaki, Amit Jain and Dario Campana. NK cells for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 19, Issue 3)

Pfeifer Serrahima J, Schoenfeld K, Kühnel I, Harwardt J, Macarrón Palacios A, Prüfer M, Kolaric M, Oberoi P, Kolmar H, Wels WS. Bispecific killer cell engagers employing species cross-reactive NKG2D binders redirect human and murine lymphocytes to ErbB2/HER2-positive malignancies. *Front Immunol*. 2024 Aug 29;15:1457887.

Zhang M, Lam KP, Xu S. Natural Killer Cell Engagers (NKCEs): a new frontier in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2023 Aug 9;14:1207276.

Zhang Y, Zhou W, Yang J, Yang J, Wang W. Chimeric antigen receptor engineered natural killer cells for cancer therapy. *Exp Hematol Oncol*. 2023 Aug 10;12(1):70.

Dong A, Soleimani Samarkhazan H, Tavakoli F. Beyond CRISPR: next-gen precision engineering of CAR-NK cells for enhanced persistence, trafficking, and tumor eradication. *Cancer Cell Int*. 2026 Feb 5;26(1):120.

Beijing CorreGene Biotechnology Co. T-cell engager targeting intracellular antigens. 2025. T-cell engager targeting intracellular antigens | Biopharma Dealmakers

Douka S, Papamoschou V, Raimo M, Mastrobattista E, Caiazzo M. Harnessing the Power of NK Cell Receptor Engineering as a New Prospect in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics*. 2024 Aug 29;16(9):1143.

De novo Biotherapeutics. Immune Cell-engaging Antibody. mRNA/Lipid Nanoparticle. 2026

Chen Yang, Ping Wang, Mingjun Yang, Huaqing Lu, Qizhong Lu, Zongliang Zhang, Zeng Wang, Zhixiong Zhu, Hexian Li, Wanqin Zeng, Zhengyu Yu, Meng Li, Lizhou Zhao, Bo Ling, Wei Wang, Hai Yi, Yisong Xiong, Ting Niu, Aiping Tong, A nanobody-based tri-specific NK cell engager targeting CD5 triggers antitumor immunity, *Cell Reports Medicine*, Volume 6, Issue 10, 2025, 102409, ISSN 2666-3791.

Ailin Bai, Maija Garnaas, Zhen Zhang, Rebecca L Riding, Ankita Mishra, Kristen Cowens, Haley BrinJones, Khushbu Bhatt, John Zielinski, Matthew Sullivan, Anu Yammanuru, Graham MacLean, Sam Farlow, Russell Karp, John Eldredge, Maiko Obana, Darren Potz, Neeraj Kaushal, Christopher Rowbottom, Kenneth Drombosky, Linh Van, Graham Farrington, Brendan M. Weiss, Joshua P Frederick, Sushma Gurumurthy, Preclinical Proof-of-Concept of a Novel mRNA-Based Therapeutic Combination of an FcRH5 Targeted NK Cell Engager and an IL-15 Superagonist for the Treatment of Multiple Myeloma, *Blood*, Volume 144, Supplement 1, 2024, Page 2780, ISSN 0006-4971.

Rafei H, Daher M, Rezvani K. Chimeric antigen receptor (CAR) natural killer (NK)-cell therapy: leveraging the power of innate immunity. Br J Haematol. 2021 Apr;193(2):216-230.

De novo Biotherapeutics, Development of mRNA-encoded NK cell engager for the treatment of relapsed/refractory B cell lymphoma. RS-2023-00258675.

Dos Reis FD, Saidani Y, Martín-Rubio P, Sanz-Pamplona R, Stojanovic A, Correia MP. CAR-NK cells: harnessing the power of natural killers for advanced cancer therapy. Front Immunol. 2025 May 30;16:1603757.

127. 399종의 합성제제 및 바이오토크스 - 신약 승인 후 부작용에 대한 분석

1. 목적

- 공개된 자료를 활용하여, 2002년 10월 1일부터 2014년 12월 31일 사이에 승인된 **저분자 신약(NME, new molecular entities)** 및 **신치료생물제(NTB, new therapeutic biologics)**에 대해 전체 승인 및 라벨 섹션(박스 경고, 경고 및 주의사항, 부작용 섹션)에 추가되는 가장 흔한 안전성 문제의 빈도를 파악(Pinnow 등, 2026).

2. 방법

- 2002년 10월 1일부터 2014년 12월 31일까지 FDA가 승인한 모든 NMEs와 NTB를 확인했음. 이 코호트에서 신약들은 339개 제품으로 NME 278개 그리고 NTB 61개 포함되었으며, 추적 관찰 기간의 중앙값은 13.1년이었음. 그리고 승인 시점부터 **2018년 6월 30일까지 규제 및 검토 특성, 안전성 관련 표기 변경을 소급하여 확인.**
- 비NME 약물, 생물체의제평가연구센터(CBER)가 규제하는 생물학적 제제, 바이오시밀러, 제네릭 의약품, 일반 의약품은 제외

3. 결과

- <표-1>은 가장 자주 추가되는 20가지 부작용을 나타낸 것이며 승인 후 추적 관찰 기간은 3.1년에서 20.2년 사이였음.
- 코호트에는 339개의 생성물이 있었으며(NME 278개, NTB 61개), 추적 관찰 기간은 13.1년이었음. **총 5,161건의 새로운 안전 문제가 발생했음.** 제품 라벨에 부작용의 문제로 가장 자주 추가된 것은 아나필락시스 반응(anaphylactic reaction), 혈관부종(angioedema), 스티븐스-존슨 증후군(SJS, Stevens-Johnson syndrome), 과민반응(Hypersensitivity), 독성 표피 괴사(TEN, toxic epidermal necrolysis)로, 339개 제품 중 최소 12%가 안전성 라벨에 추가되었음.
- 혈관부종과 아나필락시스 반응이 25% 이상의 제품에 추가되었고, SJS와 과민반응이 각각 15% 이상의 제품 라벨에 추가되었음. 심장부전은 NTB의 15% 이상에 표시되었고, 대부분의 다른 안전 문제는 제품 라벨의 10% 미만에 추가되었음.
- 대부분의 다른 AR(adverse response)은 10% 이하의 제품에 추가되었음. 주로 외래 환자에서 사용되는 약물 중에서, 안전성 문제가 라벨에 추가될 당시 누적 처방 평균 수가 100만 건을 초과했음. 가장 자주 추가되는 AR 중 다수는 약물 과민성임.

<표-1> 승인 후 안전성 라벨에 추가된 상위 20가지 가장 흔한 안전 문제: 전체 기준으로, 신분자 물질(NME) 및 신규 치료용 생물제제(NTB)에 대해 박스 경고, 경고 및 예방 조치, 부작용 섹션에 포함

전체 (N = 339)				저분자 신약 (NME) (N = 278)				생물학제 신약(NTBs) (N = 61)			
순위 ^b	MedDRA 선호 용어	건수	% ^a	순위	MedDRA 선호 용어	건수	% ^a	순위	MedDRA 선호 용어	건수	% ^a
1	아나필락시스 반응	93	27.4	1	혈관부종	78	28.1	1	아나필락시스 반응	25	41.0
2	혈관부종	91	26.8	2	아나필락시스 반응	68	24.5	2	과민반응	16	26.2
3	스티븐스-존슨 증후군	57	16.8	3	스티븐스-존슨 증후군	48	17.3	3	혈관부종	13	21.3
4	과민반응	52	15.3	4	독성 표피 괴사관	38	13.7	4-5	심장부전	9	14.8
5	독성 표피 괴사관	44	13.0	5	과민반응	36	12.9		스티븐스-존슨 증후군	9	14.8
6	발진	37	10.9	6	발진	33	11.9	6-7	설사	8	13.1
7	두드러기	31	9.1	7-8	프루리투스	27	9.7		테라토생성성	8	13.1
8	프루리투스	29	8.6		두드러기	27	9.7	8-12	호흡곤란	7	11.5
9 - 10	호산구와 전신 증상에 대한 약물 반응	28	8.3	9	호산구와 전신 증상에 대한 약물 반응	24	8.6		간독성	7	11.5
	혈소판 감소증	28	8.3	10	간부전	23	8.3		메스꺼움	7	11.5
11	간부전	27	8.0	11	혈소판감소증	21	7.6		패혈증	7	11.5
12	심장부전	26	7.7	12 - 13	간질성 폐질환	20	7.2		혈소판 감소증	7	11.5
13	간질성 폐질환	25	7.4		체장염	20	7.2	13 - 24	허리 통증	6	9.8
14	체장염	24	7.1	14 - 19	심장부전	17	6.1		기침	6	9.8
15 - 16	급성 신장 손상	21	6.2		약물 과민증	17	6.1		약물 특이 항체 존재	6	9.8
	호흡곤란	21	6.2		에리테마 멀티 포르메	17	6.1		길랭-바레 증후군	6	9.8
17 - 20	뇌혈관 사고	20	5.9		저혈압	17	6.1		감염	6	9.8
	간독성	20	5.9		홍문근용해증	17	6.1		부종 말초	6	9.8
	발작	20	5.9		발작	17	6.1		폐렴	6	9.8
	구토	20	5.9	20	급성 신장 손상	16	5.8		진행성 다발성 백질뇌병	6	9.8

								증		
					뇌혈관 사고	16	5.8	발열증	6	9.8
					호중구 감소증	16	5.8	호흡부전	6	9.8
					중양 용해 증후군	16	5.8	독성 표피 괴사관	6	9.8
								구토	6	9.8

- ^a 백분율은 영향을 받는 제품 비율을 반영.
- ^b 동점이 20개 이상의 용어를 가진 순위 목록을 만들 경우, 최종 순위는 "20+"로 표시.

4. 논의 - 핵심 추론

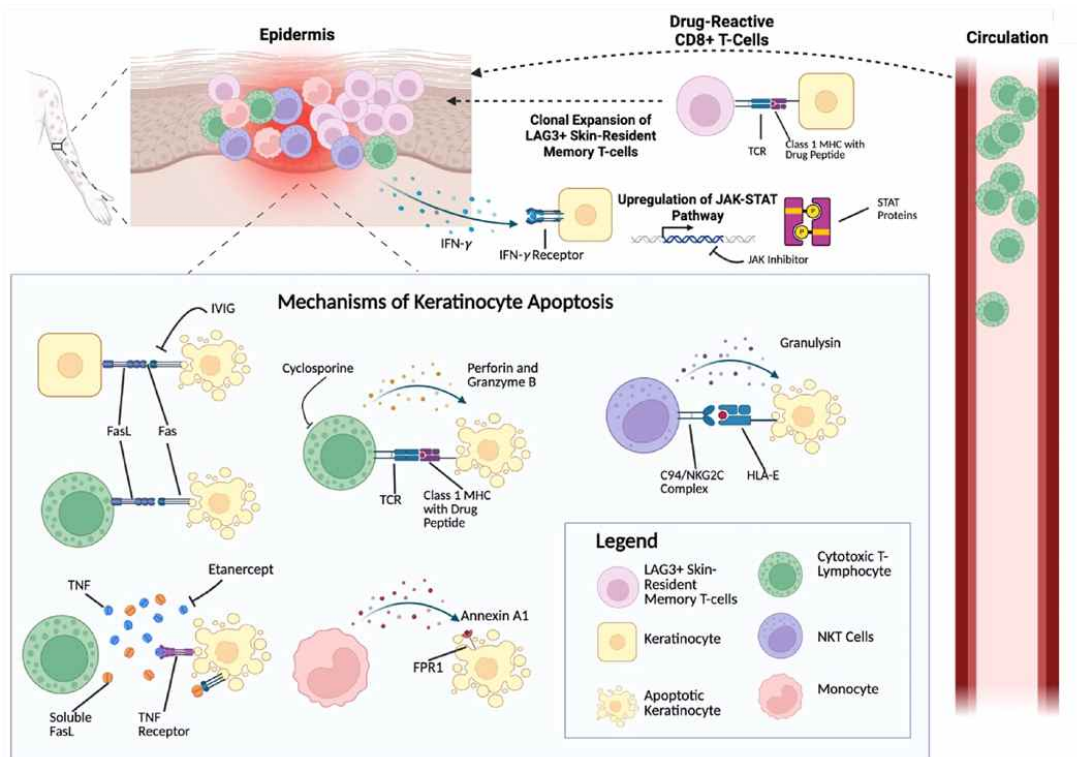
- 가장 자주 추가되는 부작용 중 다수는 이른바 **B형 약물 이상반응(Type B adverse drug reaction)**으로 다음과 같이 3가지 특징을 가짐(Edwards 등, 2000).
 - ① **용량-비례성 없음**: 약물 복용량을 줄이거나 늘려도 부작용의 발생 여부나 강도가 달라지지 않음.
 - ② **예측 불가능성**: 일반적인 약리 작용이 아닌 환자의 특이 체질이나 면역 반응에 기인하므로 사전에 예상하기 어려움.
 - ③ **높은 중증도**: 발생 빈도는 낮지만, 일단 나타나면 심각한 전신 반응으로 이어질 수 있음.
- B형 약물 이상반응은 일반적으로 드물고, 약물의 약리학적 작용과 관련이 없으며, 용량과 관련이 없고, 예측 불가능하며, 잠재적으로 치명적일 수 있는 부작용으로 **주요 유형은 다음과 같음**(서울대학교병원, 2026).
 - ① **약물 알레르기(Drug allergy)**: 면역계의 과민반응으로 발진, 두드러기, 호흡곤란 등이 발생함.
 - ② **특이반응(Idiosyncrasy)**: 유전적 요인 등으로 인해 남들에게는 없는 비정상적인 반응이 나타남
 - ③ **약물 불내성(Drug intolerance)**: 아주 적은 용량으로도 일반적인 부작용을 극심하게 겪는 상태임.
- 주요 유형의 반응 중 다수는 **겔과 콤스의 과민반응 체계(Gell and Coombs hypersensitivity framework)**에 따라 면역 매개 반응이지만, 모두가 진정한 IgE 매개 약물 알레르기를 대표하는 것은 아님. SJS, TEN과 같은 **중증 피부 부반응(SCAR, Severe Cutaneous Adverse Reactions)**은 잘 규명된 면역학적 기전을 가지고 있음<참고자료-1>.

<참고자료-1> 중증 피부 부반응(SCAR, Severe Cutaneous Adverse Reactions)에 대한 이

해

- 중증 피부 부반응(SCAR, Severe Cutaneous Adverse Reactions)은 다음과 같음. 주로 피부와 점막에 영향을 미치는 드문 생명을 위협하는 약물 유발 과민반응.
- 여기에는 스티븐스-존슨 증후군(SJS), 독성 표피 괴사관(TEN), DRESS 증후군, AGEP와 같은 질환이 포함되며, 다기관 손상과 높은 사망률의 상당한 위험을 지니고 있음. 자세한 정의와 임상적 통찰은 [미국 알레르기, 천식 및 면역학 학회](#)에서 제공하며 다음과 같은 **SCAR의 종류가 있음**(Hung 등, 2024; Li 등, 2023; Grover, 2011).

- ① **SJS와 TEN**(Stevens-Johnson Syndrome & Toxic Epidermal Necrolysis): 심한 물질, 피부 박리, 입, 눈, 점막에 통증이 생김. 기전은 <도표>와 같이 SJS/TEN에서 각질성 세포 세포자멸사와 괴사의 구성 요소에 진행됨.
- ② **드레스 증후군**(DRESS Syndrome): 호산구증과 약물 반응, 고열, 림프절 부기, 얼굴 부기, 그리고 내부 장기(예: 간)의 염증.
- ③ **AGEP**(Acute generalized exanthematous pustulosis): 급성 전신 배출성 농포증으로 갑작스럽게 나타나는 작은 비난포성 불임 고름 돌기와 함께 고열과 백혈구 증가가 동반됨.



<도표> Components of keratinocyte apoptosis and necroptosis in Stevens-Johnson Syndrome & Toxic Epidermal Necrolysis: LAG3+ 피부 상주 기억 T 세포의 클론 확장은 TCR/클래스 I MHC와 각질성 세포와의 상호작용을 따름. 43개의 CD8+ T 세포가 표피로 모집되어 인터페론-γ가 방출되어 JAK-STAT 경로가 활성화. 케라티노사이트의 세포자멸사는 Fas/FasL 상호작용, TCR/클래스 I MHC 상호작용,

TNF- α 방출을 통해 CD8⁺ T 세포에 의해 촉발됨. 자연 살해 세포는 HLA-E와 CD94/NKG2C 상호작용 후 세포자살을 유도하며, 단핵구는 FPR1에 결합하는 Annexin A1을 방출하여 기여함. 표적 치료제로는 사이클로스포린(CD8⁺ T 세포), IVIG(Fas/FasL), 에타너셉트(TNF- α), JAK 억제제(JAK-STAT 경로)가 포함됨. (<스티븐스-존슨 증후군/독성 표피 괴사; (SJS/TEN), T세포 수용체(TCR); 주요 조직적합성 복합체(MHC); 야누스 키나아제 신호 변환기 및 전사 활성화자(JACK/STAT); 중앙 괴사 인자(TNF); 인간 백혈구 항원(HLA); 포밀 펩타이드 수용체 1(FPR); 정맥 주사 면역글로빈(IVIG)>(Justice 등, 2025).

- 반면, 아나필락시스(anaphylaxis)의 병인은 고전적인 IgE 매개 경로를 넘어 <Fig 1>에서처럼 IgE 매개 반응을 임상적으로 모방할 수 있는 비IgE 매개 기전의 증거를 가지고 있음(Cianferoni, 2021).

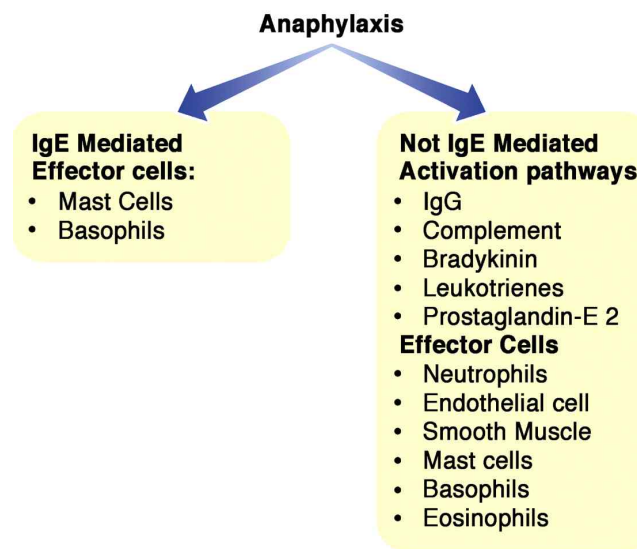


Fig 1. Mechanism involved in anaphylaxis.

- 심부전은 NTBs에 추가되는 다섯 가지 빈도의 부작용(Adverse reaction) 중 하나였음. 대부분의 다른 AR(adverse response)은 10% 이하의 제품에 추가되었음. 주로 외래 환자에서 사용되는 약물 중에서, 안전성 문제가 라벨에 추가될 당시 누적 처방 평균 수가 100만 건을 초과했음. 가장 자주 추가되는 AR 중 다수는 약물 과민성임.
- 분석된 339개의 신약 중 61개(18%)가 치료용 NTB로 승인되었음. 이 약물들은 주로 단클론 항체 또는 용해성 융합 수용체로, 살아있는 세포, 조직 또는 유기체에서 유래함. 승인된 단클론 항체의 수는 꾸준히 증가해왔음. **완전 인간 또는 인간화된 단클론 항체를 공학적으로 만드는 발전에도 불구하고, 면역원성은 여전히 우려 사항임.**
- 다른 치료제와 마찬가지로, 생물학적 제제도 부작용과 예상치 못한 과민반응을 일으킬 수 있음. 그러나 저분자 합성약물과 달리 생물학적 제제는 합성 화학물질이 아니라 숙주 단백질과 닮았고, 대사 처리 대신 단백질 분해를 겪으며, 종종 장시간 주입을 통해 경시로 투여됨. 특히 생물학적 제제는 면역 매개 효과를 발휘하도록 설계되어 있어 의도치 않은 부작용을 일으킬 수 있음.
- 결론적으로

- 코호트에는 339개의 생성물이 있었으며(NME 278개, NTB 61개), 추적 관찰 기간은 13.1년이었음. **총 5,161건의 새로운 안전 문제가 발생했음.**
- **제품 라벨에 가장 자주 추가된 것은 NMEs와 NTB는 비슷했지만** 심부전은 NTBs에 추가되는 다섯 가지 빈도의 부작용(AR) 중 하나였고, TEN은 덜 자주 추가되었음.
- 아나필락시스 반응, 혈관부종, 스티븐스-존슨 증후군(SJS), 과민반응, 독성 표피 괴사(TEN)로, 339개 제품 중 최소 12%가 라벨에 추가되었음.
- 혈관관부종과 아나필락시스 반응이 25% 이상의 제품에 추가되었고, SJS와 과민반응이 각각 15% 이상의 제품 라벨에 추가되었음. 심장부전은 NTB의 15% 이상에 표시되었고, 대부분의 다른 안전 문제는 제품 라벨의 10% 미만에 추가되었음.
- 278개의 저분자 개체 약물 분석 결과, 70.1%의 약물이 제품 수명 주기 전반에 걸쳐 안전성 관련 라벨링 업데이트가 최소 한 번 이상 이루어졌음을 확인했음.
- 부작용에는 여러 요인이 있을 수 있지만 B형 반응과 같이 드문 부작용은 많은 사람이 약물을 사용해야만 나타나거나 확인될 수 있음.
- 이러한 발견은 제품의 마케팅 사용 과정에서 발생하는 안전 문제에 대한 귀중한 통찰을 제공함. 심각한 과민반응이 가장 흔히 발견되는 시상 후 문제 중 하나이며, 승인 수년이 지나서야 발견될 수 있다는 점.

<참고문헌>

Cianferoni A. Non-IgE-mediated anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2021. 147, 1123-1131.

Justice J, Mukherjee E, Martin-Pozo M, Phillips E. Updates in the pathogenesis of SJS/TEN. *Allergol Int.* 2025 Jul;74(3):361-371)

Sanjiv Grover, Severe cutaneous adverse reactions. *IJDVL*. Volume 77 | Issue 1 | January-February 2011.

Hung SI, Mockenhaupt M, Blumenthal KG, Abe R, Ueta M, Ingen-Housz-Oro S, Phillips EJ, Chung WH. Severe cutaneous adverse reactions. *Nat Rev Dis Primers*. 2024 Apr 25;10(1):30.

Li D, Gou J, Zhu J, Zhang T, Liu F, Zhang D, Dai L, Li W, Liu Q, Qin C, Du Q and Liu S (2023) Severe cutaneous adverse reactions to drugs: A real-world pharmacovigilance study using the FDA Adverse Event Reporting System database. *Front. Pharmacol.* 14:1117391. doi: 10.3389/fphar.2023.1117391

서울대학교병원 약물안전센터 약물이상반응 소개. 2026.

Pinnow, E., Day, B., Zhou, E.H., Woods, C., Dwumfour, N., Lee, J.Y., Bulatao, I., Cherkaoui, S., Kalaria, M., Brajovic, S., Sadiq, N., Sistani, F., Lee, M., Chai, G. and Dal Pan, G. (2026), Adverse Reactions Identified after Approval of Novel Medicines: Analysis of 339 New Molecular Entities and Therapeutic Biologics. *Clin Pharmacol Ther.*

Pinnow, E. et al. Postmarket safety outcomes for new molecular entity (NME) drugs approved by the Food and Drug Administration between 2002 and 2014. *Clin. Pharmacol. Ther.* **104**, 390–400 (2018).

Edwards, I.R. & Aronson, J.K. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* 356, 1255–1259 (2000).

128. FDA-승인 ADC 15종의 비임상독성시험 및 임상시험에서의 독성 및 부작용 비교 분석

1. FDA-approved ADC와 ADC 특성

1) ADC 구성 및 FDA-approved ADC

- 항체-약물 접합체(ADC, Antibody-Drug Conjugate)는 항체(Antibody), payload(Payload, 세포독성 약물), 그리고 이 둘을 연결하는 링커(Linker)의 세 가지 핵심 요소로 구성. ADC에서 항체는 표적 암세포 추적, Payload는 암세포를 실질적으로 사멸시키는 강력한 '세포독성 약물(화학항암제)'을 의미. Payload는 세포를 죽이는 방식(작용 기전)에 따라 크게 세 가지 클래스로 다음과 같이 분류(Biopharma PEG, 2026; Liu, 2025; Mullard, 2026; Wang 등, 2023)
- ① **미세소관 저해제 (Tubulin Inhibitors):** 세포 분열에 필수적인 미세소관 형성을 억제하여 암세포 분열을 막고 사멸을 유도함. <대표 payload>: MMAE(Monomethyl Auristatin E), MMAF(Monomethyl auristatin F), DM1, DM4 등
- ② **DNA 손상 유발제 (DNA Damaging Agents):** 암세포의 DNA 구조에 직접 결합하여 DNA 복제와 세포 분열을 차단함. <대표 payload>: Calicheamicin, PBD(Pyrrolobenzodiazepine) 등.
- ③ **토포이소머라아제 I 저해제 (Topoisomerase I Inhibitors):** Topoisomerase I(위상이성질화 효소 I)은 DNA 복제와 전사 과정에서 DNA 이중가닥의 꼬임과 비틀림 스트레스를 완화하는 핵심 효소임. 저해제는 DNA 복제 및 전사 과정에 관여하는 효소를 차단하여 DNA 단일 가닥을 절단하고 사멸을 유도. <대표 payload> 엔허투(Enhertu) 등의 성공으로 가장 주목받는 계열
- 미국 FDA는 2025년까지 다양한 암 치료를 위한 15개의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체-약물 복합체)가 승인됨. <표-1>은 지금까지 승인된 15종 ADC의 설계, 승인된 적응증, 표적 등을 요약한 것임.

<표-1> FDA 승인된 15종 ADC의 특성 요약

약물	브랜드명	회사명	Target	Linker	Payload	승인 연도	적응증
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Pfizer	CD33	절단 가능	Calicheamicin	2000; 2017	급성 골수성 백혈병(AML)
Brentuximab vedotin	Adcetris®	Seagen/Takeda	CD30	절단 가능	MMAE	2011	호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종
Trastuzumab emtansine	Kadcyla®	Roche	HER2	절단 불가능	DM1	2013	HER2+ BC
Inotuzumab ozogamicin	Besponsa®	Pfizer	CD22	절단 가능	Calicheamicin	2017	재발성 또는 불응성 전구 B세포 급성 림프모구성 백혈병(ALL)
Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti®	AstraZeneca	CD22	절단 가능	PE38	2018년, 미국 시장에서 단종됨	HCL
Polatuzumab vedotin-piqa	Polivy®	Roche	CD79	절단 가능	MMAE	2019	미만성 거대 B세포 림프종
Enfortumab vedotin	Padcev®	Astellas/Seagen	Nectin-4	절단 가능	MMAE	2019	요로상피암 (방광암)
Trastuzumab	Enhertu®	AstraZeneca	HER2	절단 가능	Dxd	2019	HER2+ 피임암,

deruxtecan		a/Daiichi Sankyo					HER2-저/초저형 MBC, HER2+ GC, NSCLC
Sacituzumab govitecan	Trodelvy®	Gilead	TROP-2	절단 가능	SN-38	2020	HR+/HER2 - MBC, TNBC
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep®	GSK	BCMA	절단 불가능	MMAF	2025년에 재승인 됨	재발성 또는 불응성 다발성 골수종
Loncastuximab tesirine-lpyl	Zynlonta®	ADC Therapeutics	CD19	절단 가능	SG3199(PBD dimer)	2021	DLBCL
Tisotumab vedotin-tftv	Tivdak®	Seagen	Tissue factor	절단 가능	MMAE	2021	자궁경부암
Mirvetuximab soravtansine	ELAHERE™	ImmunoGen	FRα	절단 가능	DM4	2022	난소암
Datopotamab Deruxtecan	Datroway	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	TROP-2	절단 가능	Dxd	2025	HR+/HER2- Breast cancer, NSCLC
Telisotuzumab vedotin	EMRELIS™	AbbVie	c-Met	절단 가능	MMAE	2025	비소세포암

2) Payload의 항암 용량과 단회 시험의 특성

- IC₅₀(반수 최대 억제 농도, Half-Maximal Inhibitory Concentration)은 특정 생물학적 또는 생화학적 기능을 50% 억제하는 데 필요한 억제제(약물, 독소 등)의 농도를 뜻
- Figure-2는 ADC별 IC₅₀를 나타낸 것으로 자장 세포독성이 강한 payload는 pg/p mol 농도 이하에서 세포 살해 효과를 발휘함. 투여된 ADC 용량의 < %가 종양 부위에 축적되고 대부분의 용량이 몸 전체를 순환하기 때문에, 순환 중 방출되는 소량의 payload도 상당한 독성을 일으킴(Nguyen 등, 2023; Donaghy 등, 2016). Doxorubicin 및 기타 payload는 IC₅₀ 값이 높아 ADC 효율이 낮음. PBDs(Pyrrolobenzodiazepine dimers), auristatin, maytansine 등의 IC₅₀ 값이 낮은 payload 약물을 가진 ADC는 여러 조직/장기에서 명백한 off-target toxicity를 보임. Topoisomerase I Inhibitors의 IC₅₀ 값은 위 두 약물군 사이에 위치하지만, ADC Trastuzumab deruxtecan의 DAR(drug-antibody ratio)은 8에 이를 수 있어 효능과 독성 간의 균형을 이룰 수 있음.

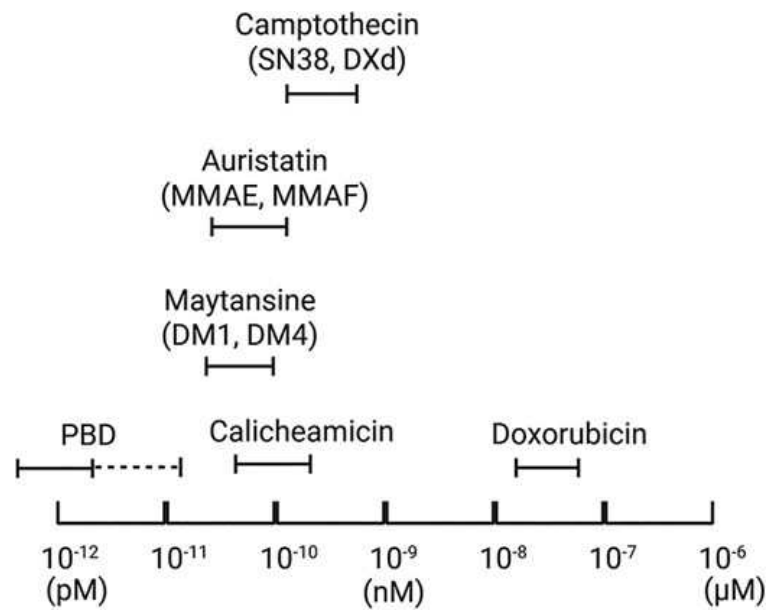


Figure 2: IC_{50} 범위의 일반적으로 사용되는 payload. 독소루비신은 IC_{50} 이 비교적 높아 ADC 효과가 떨어짐. 초기 ADC 개발에도 사용되었음. IC_{50} 이 낮은 미세소관 억제제(MMAE, MMAF, DM1, DM4)는 ADC에서 성공적으로 사용되었음. DNA 손상 물질인 PBD는 세포독성이 매우 높으며(IC_{50} 이 가장 낮음), PBD를 payload로 사용하는 ADC는 매우 명백한 독성을 보임. 현재 토포이소머라제 1 억제제(SN38, DXd)는 ADC에서 인기 있는 payload이며, 이들의 IC_{50} 값은 미세소관 억제제보다 약간 높음(Nakada 등, 2013).

2. FDA-approved ADC의 비임상 독성시험 및 임상시험의 분석 자료

- 비교분석을 위해 사용된 논문은 Cheng 등(2025)이 작성한 것으로 <비임상 표-2> FDA-승인 ADC의 비임상 독성에 대한 분석과 <임상 표-3> FDA-승인 ADC의 임상시험에서의 adverse effects 등의 자료가 이용됨.

<비임상 표-2> FDA-승인 ADC의 비임상 독성에 대한 분석

ADC 명칭	종	용량 요법	독성
혈액계			
Mirvetuximab soravtansine	시노물거스 원숭이	2, 4, 8 mg/kg, 3주분, 4회 투여	8 mg/kg: 절대 호중구, 백혈구, 망상혈구에서 $\geq 30\%$ 감소
	시노물거스 원숭이	1, 3, 5, 10 mg/kg, 단일 복용량	골수(최소 또는 중등도의 골수 감소), 비장(경미한 림프구 감소), 림프절(경미한 림프구 감소)
	시노물거스 원숭이	0.1 mg/kg, 단일 용량 (DM4)	골수 (중등도에서 중증 적혈구 및 골수질 감소)
Tisotumab vedotin	시노물거스 원숭이	1, 3, 5 mg/kg, 13주간 3주에 한 번에 4 mg/kg 단일 용량으로 복용 (중간 연구)	≥ 4 mg/kg: HGB, RBC, HCT, WBC, NEUT, LYMP, EOS, BASO 감소; 4 mg/kg: 흉선(위축) ≥ 1 mg/kg: 백혈구 감소(남성) ≥ 3 mg/kg: LYMP, NEUT 감소; 3 및 5 mg/kg: 골수(육아 생성 감소), 흉골(세포 형성, 골수 감소), 비장(생아 중심 크기 감소)
		0.058 mg/kg MMAE, 4회 투여 시 3주분씩	RBC, RET, WBC, MONO, NEUT, LYMP, EOS 감소 조직병리학 소견에는 흉선과 비장의 세포 수치, 출혈, 울혈, 괴사가 포함된다
Disitamab vedotin ^a	시노물거스 원숭이	3, 6, 12 mg/kg, 12주씩 12주 간격으로 복용	백혈구, NEUT, 림프, 단핵구, 적혈혈당, 혈관혈당, 호크로스, MCV, MCH 감소
Belantamab mafodotin ^b	시노물거스 원숭이	1, 3, 10 mg/kg, 13주 동안 정량 복용	RBC, RET, PLT 감소, 비장, 림프절, 흉선 림프구 세포 감소
Enfortumab vedotin	원숭이	1, 3, 6 mg/kg, QW, 4회 투여	적혈구 지표와 호중구, 림프구 조직 병변 3 mg/kg 이상에서는 HCT와 HGB가 가역적으로 감소하며, 6 mg/kg 용량에서는 가역적 림프구와 단핵구 감소가 나타납니다
Polatuzumab vedotin	랫드	2, 6, 10 mg/kg, 4주 동안 정량 복용	골수 저세포 상태와 관련된 혈액학적 변화 및 흉선 세포 감소
	원숭이	1, 3, 5 mg/kg, 3주분, 4회 투여	≥ 3 mg/kg: 가역적 용량 의존적 골수 저세포 현상
Trastuzumab emtansine	시노물거스 원숭이	1, 3, 10 mg/mg, 3주분, 8회 투여	모든 용량군: RET 증가 및 일시적 감소 적혈구, HCT, HGB 감소 10 mg/kg: PLT 감소 및 단핵구, 호산구 및 LUC의 일시적 증가 1, 3, 또는 10 mg/kg: 골수세포 저수, 비장(고갈, 림프), 흉선(고갈, 림프)
Brentuximab vedotin	시노물거스 원숭이	1, 3, 6 mg/kg (ADC) 및 0.058 mg/kg (MMAE), Q3W, 4회 투여	골수독성은 심각한 호중구 감소증으로 인한 6 mg/kg의 예정 없는 사망 상태였으며 ≥ 1 mg/kg: EOS, 적혈구, 백혈구 감소 ≥ 3 mg/kg: 림프, 단핵구, NEUT, 퇴진 MMAE 감소: EOS, RBC, WBC, LYMP, MONO, NEUT, RET 감소 골수 저세포 및 흉선 및 비장의 림프구 감소

	쥐	0.5, 5, 10 mg/kg, QW, 4회 투여	감소: RET, RBC, WBC
Loncastuximab tesirine	시노몰거스 원숭이	0.075, 0.15, 0.3 mg/kg, Q3W, 5회 투여	HCT, RET, RBC, EOS, HGB 감소, 단핵구군 증가, 골수 저세포, 비장 세포 증가, 비장 내 세포 증가 및 적혈질
Inotuzumab Ozogamicin)	시노몰거스 원숭이	0.5, 1.5, 5.0 µg/kg	≥ 1.5 µg/kg: RBC, HGB, HCT, PLT 감소 및 단핵구 증 증가, 비장 및 흉선 세포성 감소 5 µg/kg: 백혈구, LYMP 감소 및 RDW 증가
Gemtuzumab ozogamicin	원숭이	2.4, 7.2, 22 mg/m ² , 6주 QW	≥ 7.2 mg/m ² : 적혈구 질량 감소(11%에서 42%), 백혈구 감소(5%에서 68%), 다형태핵세포(33%에서 78%), 림프구 감소(41%에서 63%)
	시노몰거스 원숭이	15 mcg/kg 구 세포주 또는 5, 15 또는 45 mcg/kg 신 세포주(칼리체아미신 상당제), 6주 동안 정량 복용	45 mcg/kg(신생 세포주)에서 적혈구 질량 감소는 경미한 비재생성 빈혈로 간주됨. 모든 용량 수준: 백혈구 및 LYMP 감소, NEUT 및 골수 저세포 증가; ≥ 15 mcg/kg의 구/새 세포주: 비장(림프 고갈, 생식기 위축), 흉선(림프구 고갈) 45 mcg/kg 신세포주: 적혈구 량 감소
Sacituzumab govitecan	시노몰거스 원숭이	12.5, 25, 50 mg/kg을 주 1회 2주간 3주 주기 중 2주 (1, 8, 22, 29, 43, 50, 64, 71일차) 4회 치료 주기	≥ 12.5 mg/kg: PLT 및 LYMP 감소 50 mg/kg: 적혈구 감소, 흉선 및 장간막 림프절의 세포 감소
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	랫드	20, 60, 197 mg/kg, 3주분, 3회 투여	≥ 20 mg/kg: 망상혈구 비율 감소 ≥ 60 mg/kg: 백혈구, 림프구, 호염기구, 호중구 수 감소, 호산구 감소, 혈소판 수 증가, 대형 비염색 세포 감소, 골수 내 적혈구(적혈구 감소) 197 mg/kg: 단핵구 수 감소, 골수 내 골수 감소
	시노몰거스 원숭이	10, 30, 78.8 mg/kg; Q3주, 3회 투여	78.8 mg/kg: 적혈구 지표(적혈구, HGB, HCT, 망상혈구 비율) 감소, 흉골 골수 내 적혈구 및 골수구 감소
	시노몰거스 원숭이	10mg, 30 mg/kg, 3주에 한 번, 3회 투여	30 mg/kg: 적혈구 지표(적혈구, HGB, HCT) 감소, 흉골 골수 내 적혈구아 감소
	시노몰거스 원숭이	3, 10, 30 mg/kg, 3주에 한 번, 5회 투여	30 mg/kg: 망상혈구 비율 감소, 적혈구세포 및 골수구 감소
위장관			
Mirvetuximab soravtansine	시노몰거스 원숭이	0.1 mg/kg, 단편 (DM4)	위와 식도에서 단핵 세포 침윤이 최소에서 경미한 수준
Belantamab mafodotin	시노몰거스 원숭이	1, 3 또는 10 mg/kg, 13주 동안 QW 복용	10 mg/kg: 식욕, 식도 및 장관 감소(섬유소 괴사, 출혈 및/또는 한쪽 또는 여러 혈관에 혈전증이 있음)
Enfortumab vedotin	원숭이	1, 3, 6 mg/kg, QW, 4회 투여	장간막 대식세포는 ≥3 mg/kg으로 침윤합니다.
Trastuzumab emtansine	시노몰거스 원숭이	1, 3, 10 mg/mL, 3주에 한 번, 8회 투여	≥ 1 mg/kg: 구토; ≥ 3 mg/kg: 음식 섭취 금지
Loncastuximab tesirine	시노몰거스 원숭이	0.075, 0.15, 0.3 mg/kg, Q3W, 5회 투여	0.3 mg/kg (남성 한정): 맹장에서 짙은 붉은 색 변색, 대장에 회색 변색, 출혈, 회미 막막의 GALT 과형성 및 아급성 염증, 위 점막 울혈
Sacituzumab govitecan	시노몰거스 원숭이	60, 120 mg/kg; 2회 접종 (1일차와 4일차)	출혈, 점막 퇴행, 침식과 궤양, 장내 단핵 및 다형태핵 침윤
Fam-Trastuzumab	랫드	20, 60, 197 mg/kg, 3주분,	≥ 20 mg/kg: 소장과 대장의 지하 상피세포 단세포

Deruxtecan-nxki		3회 투여	괴사 ≥ 60 mg/kg: 십이지장 용모의 국소 위축 197 mg/kg: 음식 섭취 감소, 고유층 염증 세포 침윤 및 십이지장 점막 침식
	시노몰거스 원숭이	10, 30, 78.8 mg/kg; Q3주, 3회 투여	≥ 10 mg/kg: 소장 및 대장 납하 상피세포의 단세포 괴사 78.8 mg/kg: 설사, 식욕 감소
	시노몰거스 원숭이	10, 30, mg/kg, 3주분, 3회 투여	≥ 10 mg/kg: 소장 및 대장 내 기하부 상피세포의 단세포 괴사
	시노몰거스 원숭이	3, 10, 30 mg/kg; Q3W, 5회 투여	≥ 3 mg/kg: 크립트 상피 세포 소장 및 대장 단세포 괴사
피부			
Mirvetuximab soravtansine	시노몰거스 원숭이	2, 4, 8, mg/kg, Q3W, 4회 투여	상처 입은 피부, 건조한 피부, 변색된 피부, 비늘 피부, 상처, 딱지, 흉터가 주로 원숭이에게 관찰되며, 4 mg/kg 투여 시 주로 관찰됩니다. 8 mg/kg: 피부/피하 (남성의 주사 부위를 제외한 부위에서 경미한 상피 궤양/침식, 칸토시스, 과각화증, 부종이 나타났습니다)
		1, 3, 5, 10 mg/kg, 단일 복용량	≥ 1 mg/kg: 적혈 부위 및 부위 탈리, 중등도 혈관염 및 궤양의 조직병리학적 소견
Tisotumab vedotin	시노몰거스 원숭이	1, 3, 5 mg/kg, 13주간 3주에 한 번에 4 mg/kg 단일 용량으로 복용 (중간 연구)	피부 독성(건조하고 붉은, 각질 및 피부 벗겨짐) ≥ 3 mg/kg ≥ 3 mg/kg: 발적 4 mg/kg: 궤양성 피부염, 혼합 표피하 염증 세포 침윤, 상피 수막 퇴행/과형성, 피하 출혈 5 mg/kg: 건조하고 각질이 있는 피부, 긁힌 자국, 피부 벗김, 피부 및 피하 과각화증, 피부 국소 단핵 세포 침윤
Enfortumab vedotin	랫드	0.5, 2, 5 mg/kg, QW, 13회 투여	5 mg/kg: 피부 찰과상, 혈청세포 딱지, 침식/궤양, 염증, 그리고 피부에서 관찰된 MMAE 존재와 관련된 유사분열 수치 또는 단세포 괴사, 주사 부위
	원숭이	1, 3, 6 mg/kg, QW, 4회 투여	찰과상, 건조 및/또는 붉어진 피부 6 mg/kg: 피부 염증(피하 및 진피), 과형성, 과각화증
Loncastuximab tesirine	시노몰거스 원숭이	0.075, 0.15, 0.3 mg/kg, Q3W, 5회 투여	피부(검은색 변색, 표피 과다 색소침착 및 과형성) ≥ 0.075 mg/kg: 검은 반점 및/또는 피부 변색 피부/피하염(부종, 출혈, 표피 과다 색소침착, 급성 염증)
Sacituzumab govitecan	시노몰거스 원숭이	12.5, 25, 50 mg/kg을 주 1회 1시간 주입으로 3주 주기(1, 8, 22, 29, 43, 50, 64, 71일차) 4주 치료 주기 중 2주간 투여	≥ 12.5 mg/kg: 피부 색 이상 및 멍
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	랫드	20, 60, 197 mg/kg, 3주분, 3회 투여	≥ 20 mg/kg: 피부의 외상 및/또는 딱지 ≥ 60 mg/kg: 모낭의 단세포 괴사, 궤양/딱지/표피 두꺼워짐/섬유화/염증성 세포 침윤 197 mg/kg: 털이 드문드문하거나 털이 빠짐
	원숭이	10, 30, 78.8 mg/kg, 3주분, 3회 투여	≥ 30 mg/kg: 피부 및 주사 부위의 모낭 단세포 괴사 78.8 mg/kg: 비정상적인 피부색(검은 갈색), 표피

			두꺼움 및 피부 색소침착
	원숭이	10, 30, mg/kg, 3주분, 3회 투여	30 mg/kg: 피부 및 주사 부위의 모낭 단세포 괴사
	원숭이	3, 10, 30, mg/kg, 3주분, 5회 투여	30 mg/kg: 비정상적인 피부색(검은 갈색), 피부(단세포 괴사, 모낭, 색소침착, 표피)
신경계			
Mirvetuximab soravtansine	시노물거스 원숭이	2, 4, 8, mg/kg, Q3W, 4회 투여	좌골신경의 축삭 퇴행성 최소화 (회복 기간)
Tisotumab vedotin	시노물거스 원숭이	3, 10, 30 mg/kg, 3주 주기, 4회 투여	좌골신경의 축삭 변성 척수 등쪽 근모의 축삭 변성
눈			
Mirvetuximab soravtansine	시노물거스 원숭이	2, 4, 8 mg/kg; 10주간 3주 분기 복용	각막병증(특히 상부 쪽으로 미세한 변상부 각막 색소 이동)이 양쪽 눈에서 3/6 남성과 3/6 여성의 경우 8 mg/kg ≥ 각막 4 mg/kg 복용 시 발생: 각막(각막 상피의 경미하거나 뚜렷한 퇴행/괴사, 색소 침착 및 감쇠), 눈꺼풀 피부(상피 퇴행/괴사 및 염증 경미 또는 경미)
Tisotumab vedotin	시노물거스 원숭이	1, 3, 5 mg/kg, 13주간 3주에 한 번에 4 mg/kg 단일 용량으로 복용 (중간 연구)	5 mg/kg에서 안구 독성, 안저 유리 같은 모습, 결막 발적 및 부종
Belantamab mafodotin	랫드	3, 10, 30 mg/kg, 13주 동안 3주분씩 복용	모든 용량에서 유사분열 증가와 ≥10 mg/kg에서 단세포 괴사가 눈/각막에서 발생했습니다
Enfortumab vedotin	랫드	0.5, 2, 5 mg/kg, QW, 13회 투여	눈(각막)에서 관찰된 MMAE 존재와 관련된 유사분열 수치 또는 단세포 괴사가 있을 가능성이 있습니다
간			
Belantamab mafodotin	시노물거스 원숭이	1, 3 또는 10 mg/kg, QW, 13주	≥ 3 mg/kg: AST, ALT, ALP 증가 및 간세포 괴사 경미
Enfortumab vedotin	랫드	0.5, 2, 5 mg/kg, QW, 13회 투여	AST와 ALT 증가
Brentuximab vedotin	시노물거스 원숭이	1, 3, 10 mg/kg, 3주분, 8회 투여	ALT와 AST 증가 및 간 조직병리학적 소견
Polatuzumab vedotin	랫드	2, 6, 10 mg/kg, QW, 4주	≥ 6 mg/kg: 간세포, 사인세포, 담관 상피의 세포멸사/유사분열 증가, 혈청 간 트랜스아미나제 및 총 빌리루빈 증가로 인한 다발성 간 괴사
Brentuximab vedotin	랫드	0.5, 5, 10 mg/kg ADC; 0.0097, 0.097, 0.194 mg/kg MMAE, QW, 4회 투여	10 mg/kg: 트랜스아미나제와 TBIL 증가, 최소 응고성 괴사 (ADC가 생쥐 CD30 발현 세포에 결합하지 않음, MMAE가 세포독성을 유발함) 10 mg/kg 및 0.194 mg/kg: TBIL, AST, ALT, GGT 증가
Loncastuximab tesirine	시노물거스 원숭이	0.3, 0.6 mg/kg, 3주분, 2회 투여	0.6 mg/kg: AST와 GLDH 증가
Inotuzumab Ozogamicin	시노물거스 원숭이	0.5, 1.5, 5.0 µg/kg	≥ 0.5 µg/kg: 간 내 사인파 확장 ≥ 1.5 µg/kg: AST 증가, 간 비대 5 µg/kg: ALT 증가
Gemtuzumab ozogamicin	원숭이	2.4, 7.2, 22 mg/m ² , 6주 QW	≥ 2.4 mg/m ² : AST 증가
	시노물거스 원숭이	15 mcg/kg 구 세포주 또는 5, 15 또는 45 mcg/kg 신	모든 용량 수준: ALT, AST, TP, GLOB 증가, A/G 5 및 45 mcg/kg 감소 신생 세포주: 간 사인파 확

		세포주(칼리체아미신 상당제), 6주 동안 정량 복용	장, 단세포 과사 및 담낭염
Sacituzumab govitecan	시노물거스 원숭이	60mg과 120 mg/kg, 2회 복용 (1일차와 4일차)	≥ 12.5 mg/kg: ALT, AST 증가
폐			
Mirvetuximab soravtansine	시노물거스 원숭이	1, 3, 5, 10 mg/kg, 단독	폐의 경미한 흉막 섬유증
	시노물거스 원숭이	0.1 mg/kg, 단편 (DM4)	경미한 폐포출혈, 적혈구형성증, 색소 침착
Loncastuximab tesirine	시노물거스 원숭이	0.075, 0.15, 0.3 mg/kg, Q3W, 5회 투여	폐 섬유증, 염증에 의한 것으로 추정됨 0.3 mg/kg: 비정상적인 일질, 비정상적인 형태, 횡격막 유착, 엽 유착, 흉막 유착(≥ 0.15 mg/kg), 변색, 적색; 다발성 혈관주섬유증, 흉막/흉막하섬유증(≥ 0.15 mg/kg), 폐포 출혈, 단핵세포 침윤, 급성 염증, 과사
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	원숭이	10, 30, 78.8 mg/kg, 3주분, 3회 투여	≥ 30 mg/kg: 폐 내 폐포 대식세포의 국소 간질성 염증, 거품성 폐포 대식세포 응집, 콜레스테롤 구열, 78.8 mg/kg: 폐의 백색 초점, 폐 내 폐포의 부종
	원숭이	3, 10, 30, mg/kg, 3주분, 5회 투여	30 mg/kg: 폐에 백색 초점, 거품성 폐포 대식세포 응집, 국소 폐포 염증, 국소 간질염

<임상 표-3> FDA-승인 ADC의 임상시험에서의 adverse effects

ADC 명칭	용량 요법	AE(발생률)
혈액학		
Mirvetuximab soravtansine	6 mg/kg, Q3W	모든 등급: 림프 감소증(35%), 백혈구 감소증(26%), 호중구 감소증(26%), 혈중혈구 감소(25%), 혈소판감소증(18%)
Tisotumab vedotin	2 mg/kg (최대 200 mg), 3주 분기	출혈(62%): 모든 등급의 출혈: 삼혈(44%), 혈뇨(10%), 질 출혈(10%), 3등급 출혈: 5%, HGB 감소(52%), 림프감소증(42%), 백혈구 감소(30%), 호중구 감소증(21%)
Disitamab vedotin	2.5 mg/kg, 2주 분에	3등급 이상 심각한 부작용: 호중구 감소증 및 백혈구 감소증
Belantamab mafodotin	2.5 mg/kg, 3주 분당	모든 등급: 혈소판감소증(62%), 림프감소증(49%), HGB 감소(32%), 호중구 감소증(28%)
Enfortumab vedotin	1.25 mg/kg (최대 125 mg), 28일 주기 중 1일, 8일, 15일에 복용	2-4등급: HGB 감소(34%), 림프감소증(32%), 호중구 감소증(14%), 백혈구감소증(14%)
Polatuzumab vedotin	1.8 mg/kg, 3주 분량	모든 등급: 림프감소증(80%), 빈혈(68%), 호중구감소증(60%), 혈소판감소증(32%), 열성 호중구감소증(15%)
Trastuzumab emtansine	3.6 mg/kg, 3주 분당	모든 등급: 호중구감소증(6.7%), 빈혈(14.3%), 혈소판감소증(31.2%)
Brentuximab vedotin	1.8 mg/kg (최대 180 mg), 3주 분에	모든 등급: 전형적 호지킨 림프종: 호중구 감소증(54%), 빈혈(33%), 혈소판 감소(28%) 모든 등급: 전신 형성성 대세포 림프종: 호중성 감소증(55%), 빈혈(52%), 혈소판 감소증(16%)
Loncastuximab tesirine	0.15 mg/kg, 2주기 동안 Q3W, 이후 주기 동안 Q3W 0.075 mg/kg	모든 등급: 혈소판감소증(58%), 호중구 감소증(52%), HGB 감소(51%)
Inotuzumab ozogamicin	주기 1: 1일차에 1.8 mg/m ² 2회 2회 복용 1일차(0.8 mg/m ²), 8일차(0.5 mg/m ²), 15일차(0.5 mg/m ²). 이후 주기: 4주 주기당 1.5 mg/m ² 1일차(0.5 mg/m ²), 8일차(0.5 mg/m ²), 15일차(0.5 mg/m ²)	모든 등급: 혈소판감소증(51%), 호중구감소증(49%), 빈혈(36%), 백혈구 감소증(35%), 열성 호중구감소증(26%), 림프감소증(18%)
Gemtuzumab ozogamicin	유도 투여: 3 mg/m ² (최대 4.5 mg) 1, 4, 7일차; 고정: 3 mg/m ² (최대 4.5 mg) 1일차	혈소판 감소증과 혈소판 수치 <50 Gi/L (19%)
Sacituzumab govitecan	10 mg/kg, 21일 주기 1일차와 8일차에 QW	호중구 감소증 (64%), 3등급에서 4등급 호중구 감소증(49%). 열성 호중구 감소증(6%). 호중구감소성 대장염(1.4%).
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	5.4 mg/kg, 3주 분기	모든 등급: 빈혈(31%), 호중구 감소증(29%), 백혈구 감소증(22%), 혈소판 감소증(20%)
위장관		
Mirvetuximab soravtansine	6 mg/kg, Q3W	모든 등급: 메스꺼움(40%), 복통(36%), 설사(31%), 변비(30%), 구토(19%), 복부 팽창(11%)
Tisotumab vedotin	2 mg/kg (최대 200 mg), 3주 분기	메스꺼움(41%), 설사(25%), 변비(23%), 복통(23%), 구토(17%)
Enfortumab vedotin	1.25 mg/kg (최대 125 mg), 28일 주기 중 1일, 8일, 15일에 복용	모든 등급: 메스꺼움(45%), 설사(42%), 구토(18%)
Polatuzumab vedotin	1.8 mg/kg, 3주 분량	모든 등급: 메스꺼움(42%), 설사(31%), 변비(29%), 점막염(22%), 복통(16%), 구토(15%)
Trastuzumab emtansine	3.6 mg/kg, 3주 분당	모든 등급: 소화불량(9.2%), 구내염(14.1%), 구강건조(16.7%), 복통(18.6%), 구토(19.2%), 설사(24.1%), 변비(26.5%), 메스꺼움(39.8%)
Brentuximab vedotin	1.8 mg/kg (최대 180 mg), 3주 분에	모든 등급: 전형적 호지킨 림프종: 메스꺼움(42%), 설사(36%), 복통(25%), 구토(22%), 변비(16%) 모든 등급: 전신 기분화 대세포림프종: 메스꺼움(38%), 설사(29%), 복통(9%), 구토(17%), 변비(19%)
Loncastuximab tesirine	0.15 mg/kg, 2주기 동안 Q3W, 이후 주기 동안 Q3W 0.075 mg/kg	모든 등급: 메스꺼움(23%), 설사(17%), 복통(14%), 구토(13%), 변비(12%)
Inotuzumab ozogamicin	주기 1: 1일차에 1.8 mg/m ² 2회 2회 복용 1일차(0.8 mg/m ²), 8일차(0.5 mg/m ²), 15일차(0.5 mg/m ²). 이후 주기: 4주 주기당 1.5 mg/m ² 1일차(0.5 mg/m ²), 8일차(0.5 mg/m ²), 15일차(0.5 mg/m ²)	모든 등급: 메스꺼움(31%), 복통(23%), 설사(17%), 변비(16%), 구토(15%), 구내염(13%)
Gemtuzumab ozogamicin	유도 투여: 3 mg/m ² (최대 4.5 mg) 1, 4, 7일차; 고정: 3 mg/m ² (최대 4.5 mg) 1일차	설사 (2%)

Sacituzumab govitecan	10 mg/kg, 21일 주기 1일차와 8일차에 QW	모든 학점: 설사(59%), 메스꺼움(57%), 구토(33%), 변비(37%), 복통(30%), 구내염(17%)
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	5.4 mg/kg, 3주 분기	모든 등급: 메스꺼움(79%), 구토(47%), 변비(35%), 설사(29%), 복통(19%), 구내염(14%), 소화불량(12%)
피부		
Tisotumab vedotin	2 mg/kg (최대 200 mg), 3주 분기	탈모증(39%), 발진(25%)
Enfortumab vedotin	1.25 mg/kg (최대 125 mg), 28일 주기 중 1일, 8일, 15일에 복용	피부 반응(54%): 황반지백성 발진(26%), 가려움(30%). 3-4등급 피부 반응(10%): 대칭 간간부활 및 굴곡성 피부염(SDRIFE), 불성 피부염, 각질 피부염, 손바닥-족저 적혈각 이상증
Polatuzumab vedotin	1.8 mg/kg, 3주 분량	탈모증(24%), 발진(13%)
Brentuximab vedotin	1.8 mg/kg (최대 180 mg), 3주 분에	모든 등급: 전형적 호지킨 림프종: 발진(27%), 가려움(17%), 탈모(13%), 야간 발한(12%), 건조한 피부(4%), 전신 무분화 대세포 림프종: 발진(31%), 가려움(19%), 탈모(14%), 야간 발한(9%), 건조한 피부(10%)
Loncastuximab tesirine	0.15 mg/kg, 2주기 동안 Q3W, 이후 주기 동안 Q3W 0.075 mg/kg	발진 (30%), 간염 (12%), 광과민반응 (10%)
신경계		
Mirvetuximab soravtansine	6 mg/kg, Q3W	말초 신경병증 (> 20%)
Tisotumab vedotin	2 mg/kg (최대 200 mg), 3주 분기	3등급 말초 신경병증(8%). 말초 신경병증: 말초 신경병증(20%), 말초 감각 신경병증(11%), 말초 감각운동 신경병증(5%), 운동신경병증(3%), 근력 약화(3%), 탈신초성 말초 다발신경병증(1%).
Disitamab vedotin	2.5 mg/kg, 2주 분에	말초 감각 신경병증 (68.2%)
Enfortumab vedotin	1.25 mg/kg (최대 125 mg), 28일 주기 중 1일, 8일, 15일에 복용	말초 신경병증, 주로 감각성 (49%); 3학년 (2%).
Polatuzumab vedotin	1.8 mg/kg, 3주 분량	말초 신경병증(53%), 미각 변화(14%), 두통(13%)
Trastuzumab emtansine	3.6 mg/kg, 3주 분당	모든 등급: 기미 이상(8%), 어지러움(10.2%), 말초 신경병증(21.2%), 두통(28.2%)
Brentuximab vedotin	1.8 mg/kg (최대 180 mg), 3주 분에	모든 등급: 전형적 호지킨 림프종: 말초 감각 신경병증(52%), 말초 운동 신경병증(16%), 두통(19%), 어지러움(11%) 모든 등급: 전신 무분화 대세포 림프종: 말초 감각 신경병증(53%), 말초 운동 신경병증(7%), 두통(16%), 어지러움(16%)
Inotuzumab ozogamicin	주기 1: 1일차에 1.8 mg/m ² 2회 2회 복용 1일차(0.8 mg/m ²), 8일차(0.5 mg/m ²), 15일차(0.5 mg/m ²). 이후 주기: 4주 주기당 1.5 mg/m ² 1일차(0.5 mg/m ²), 8일차(0.5 mg/m ²), 15일차(0.5 mg/m ²)	모든 등급: 두통 (28%)
Sacituzumab govitecan	10 mg/kg, 21일 주기 1일차와 8일차에 QW	모든 등급: 두통 (18%), 어지럼증 (10%)
눈		
Mirvetuximab soravtansine	6 mg/kg, Q3W	모든 등급: 시각 장애(50%), 각막증(37%), 안구건조증(27%), 백내장(18%), 광공포증(17%), 눈통(10%)
Tisotumab vedotin	2 mg/kg (최대 200 mg), 3주 분기	결막성 부작용(40%), 안구 건조증(29%), 각막 부작용(21%), 검체염(8%). 3등급 안구 부작용(3.8%), 충증 궤양성 각막염(3.2%)을 포함합니다.
Belantamab mafodotin	2.5 mg/kg, 3주 분당	모든 등급: 각막증(71%), 시력 저하(53%), 시야 흐림(22%), 안구 건조증(14%)
Enfortumab vedotin	1.25 mg/kg (최대 125 mg), 28일 주기 중 1일, 8일, 15일에 복용	안구 질환(46%): 각막염, 시야 흐림(14%), 변연 줄기세포 결핍 및 안구 건조증(36%).
Polatuzumab vedotin	1.8 mg/kg, 3주 분량	시야 흐림, 1.2%
Trastuzumab emtansine	3.6 mg/kg, 3주 분당	모든 등급: 눈물 증가(3.3%), 안구 건조(3.9%), 시야 흐림(4.5%), 결막염(3.9%)
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	5.4 mg/kg, 3주 분기	안구 건조증, 11%

Depatuxizumab mafodotin (anti-GFR-oncleava ble maleimide-caproyl-MMAF)	/	시야 흐림(63%), 광공포증(39%), 안구 건조증(29%), 이물 질 감각(26%), 각막염(26%)
DMUC4064A (anti-MUC16--MM AE)	/	시야 흐림(35-65%), 안구 건조증(39-52%), 미세낭성 각 막병증(57-84%)
DMUC4064A (anti-MUC16--MM AE)	/	안구 AE: 40%, 시야 흐림, 안구 건조, 각막염, 백내장, 각 막 상피 미세낭종, 눈 통증, 광 공포증 포함
Unmarketed product		
간		
Mirvetuximab soravtansine	6 mg/kg, Q3W	모든 등급: AST 증가(50%), ALT 증가(39%), ALP 상승 (30%)
Tisotumab vedotin	2 mg/kg (최대 200 mg), 3주 분기	모든 등급: ALT 증가(24%), AST 증가(18%)
Disitamab vedotin	2.5 mg/kg, 2주 분에	AST 증가(30.6%), ALT 증가(27.8%)
Polatuzumab vedotin	1.8 mg/kg, 3주 분량	트랜스아미나제 및/또는 빌리루빈 상승을 포함한 간세포 손상과 일치하는 심각한 간 독성 사례. 3등급과 4등급 트랜스아미나제 상승이 각각 1.9%로 발생했습니다.
Trastuzumab Emtansine	3.6 mg/kg, 3주 분당	모든 등급: AST 증가(98%), ALT 증가(82%)
Brentuximab vedotin	1.8 mg/kg (최대 180 mg), 3주 분에	모든 등급: AST 증가(57%), ALP 증가(26%)
Loncastuximab tesirine	0.15 mg/kg, 2주기 동안 Q3W, 이후 주기 동안 Q3W 0.075 mg/kg	모든 등급: ALT 증가(34%), AST 증가(41%)
Brentuximab vedotin	주기당 1.8 mg/를 투여하며, 1일차(0.8 mg/m ²), 8일차(0.5 mg/m ²), 15일차(0.5 mg/m ²)에 3회 나누어 투여했습니다. 1주 기는 3주 동안 진행됩니다	VOD(14%), 3/4등급 AST, ALT, 총 빌리루빈 이상 간 검 사는 4%, 4%, 5%에서 이루어졌습니다.
Gemtuzumab ozogamicin	유도 투여: 3 mg/m ² (최대 4.5 mg) 1, 4, 7일차; 고정: 3 mg/m ² (최대 4.5 mg) 1일 차	3명의 환자가 VOD로 사망했습니다
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	5.4 mg/kg, 3주 분기	모든 등급: AST 증가(41%), ALT 증가(38%) 급성 간부전 (0.4%)
ILD		
Fam-Trastuzumab Deruxtecan-nxki	5.4 mg/kg, 3주 분기	중증 부작용(20%), ILD와 폐렴 포함. 사망자 (4.3%), ILD 포함 (2.6%)

3. FDA-approved ADC의 비임상 독성시험 및 임상시험의 독성에 대한 ADC별 분석된 독성 및 부작용

- FDA-approved ADC의 비임상 독성시험 및 임상시험의 독성에 대한 ADC별 분석된 독성 및 부작용은 다음과 같은 항목임.

- 1) 혈액 및 골수 독성(Hematotoxicity and Bone marrow toxicity)
- 2) 위장 독성(Gastrointestinal toxicity)
- 3) 피부 독성(Skin toxicity)
- 4) 말초 신경병증(Peripheral neuropathy)
- 5) 안구독성(Ocular toxicity)
- 6) 간독성(Hepatic toxicity)
- 7) 폐독성(Pulmonary toxicity)
- 8) 기타 독성

1) 혈액 및 골수 독성(Hematotoxicity and Bone marrow toxicity)

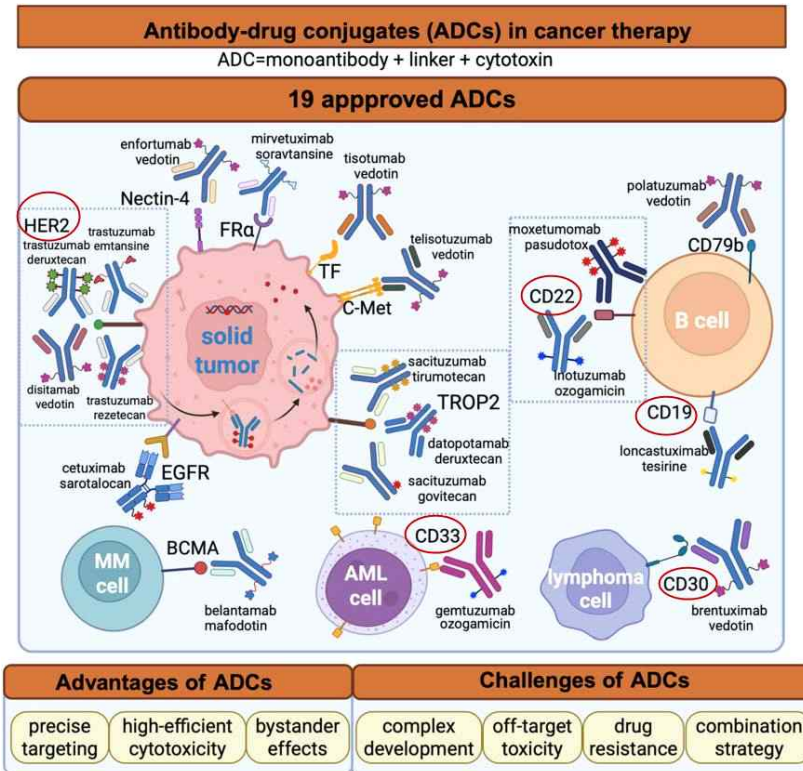
1-1) 비임상 및 임상에서의 독성 양상

- 종양에 대한 화학요법의 가장 흔한 부작용은 골수억제이며, 이에 따라 FDA-승인 및 시판 중인 모든 ADC는 다양한 정도의 혈액 및 골수 독성(비임상 표-2 및 임상 표-3)을 나타내며, 호중구감소증, 림프구감소증, 혈소판감소증과 같은 말초혈액 세포 감소 증상을 유발하여 감염, 출혈 및 빈혈로 이어짐. 구체적인 증상은 ADC의 유형에 따라 다름.
- DNA 손상제를 payload로 하는 ADC의 경우, 비임상 연구에서 더 낮은 용량에서도 혈액 독성이 나타났는데, 예를 들어 Inotuzumab ozogamicin의 경우 1.5 µg/kg 이상의 용량에서 적혈구(RBC), 헤모글로빈(HGB), 헤마토크리트(HCT), 및 PLT의 감소가 관찰된 반면, 5 µg/kg 용량에서는 WBC 및 LYMP의 감소가 관찰되었음(비임상 표-2). 분해 불가능한 링커를 사용하는 Belantamab mafodotin과 T-DM1에 대한 비임상 연구에서는 고용량에서도 호중구(NEUT, **Neutrophils**) 수의 현저한 감소가 나타나지 않았으며, 다른 혈액학적 지표의 변화도 비교적 경미했으나, 관련 임상 연구에서는 인간 대상에서 혈소판(PLT, platelet) 수치가 감소한 것으로 확인됨. Val-Cit-MMAE를 사용하는 5가지 ADC는 비임상 및 임상 시험 모두에서 14%~60% 정도로 확연히 NEUT 감소가 확인됨(임상 표-3).
- Zhao 등은 골수 미세환경에서 분화 중인 NEUT에 의해 국소적으로 분비되는 세린 프로테아제(호중구 엘라스타제)가 Val-Cit 링커의 세포외 절단에 기여하여, 막 투과성 MMAE를 방출함으로써 골수 내 분화 중인 NEUT에 세포 독성을 발휘할 수 있음을 입증했음(Zhao 등, 2017). 또한, MMAE는 호중구가 빠르게 증식하는(~10¹¹ 세포/day) 생식 능력이 있는 골수에 강력한 영향을 미침. 특히 FcγRIIa는 골수구(MK), 혈소판(PLT), 그리고 조혈 줄기/전구세포를 포함한 분화 중인 골수 유래 미성숙 세포에서 발현되는 것으로 밝혀졌음(Mahalingaiah 등, 2019). Uppal 등(2015)은 MK에서 FcγRIIa 매개 T-DM1의 내재화와 이에 따른 방출된 유효 성분에 의한 세포골격 파괴가 PLT 생산 감소를 초래함을 규명하였음(Nishiguchi 등, 2019). T-DM1과 FcγRIIa 수용체 간의 상호작용을 차단하면 T-DM1의

내재화가 현저히 감소했음(Uppal 등, 2015). HER2, CD19, CD22 및 CD30 표적 항원들은 골수에서 일정 수준으로 발현되며, 이러한 항원을 표적으로 하는 절단 가능한 링커를 가진 ADC 역시 비임상 및 임상 환경에서 모두 주목할 만한 혈액독성을 나타냈음(비임상 표-2 및 임상 표-3).

1-2) 결론

- 요약하면 HER2, CD19, CD22, CD30과 같은 표적 항원들은 종양 세포 표면에 많이 발현되지만, 골수(Bone Marrow)의 미성숙 세포나 정상 조혈모세포/전구세포 등에서도 일정 수준(선택적/기저 수준)으로 발현됨(Wu 등, 2026). 이 때문에 해당 항원들을 표적하는 ADC를 투여했을 때 다음과 같은 메커니즘으로 심각한 골수독성 및 혈액독성이 발생하게 됨(Cheng 등, 2025; Wu 등, 2025)
- ① **절단성 링커(Cleavable Linker)와 주변 세포 사멸 효과 (Bystander Effect):** Cleavable Linker는 세포 내부나 종양 미세환경의 특정 효소, 산성 환경 등에서 잘 끊어지도록 설계. Val-Cit-MMAE 등과 같은 링커를 가진 ADC가 골수 세포 주변에서 잘려 독성 Payload를 조기에 방출(Premature release)하거나, 표적 세포를 죽인 후 방출된 약물이 막을 통과해 주변의 정상 조혈 세포들까지 무차별적으로 공격(Bystander effect)하게 됨.
- ② **비특이적 세포 흡수 (Nonspecific Endocytosis):** 항원 결합력 외에도, 골수 내 거핵구(혈소판을 만드는 세포)나 대식세포 등이 FcγRIIa 수용체를 통해 ADC를 비특이적으로 잡아먹으면서 골수 억제가 가중되기도 함
- ③ **표적 의존성 오프-타겟 독성 (On-target, Off-tumor Toxicity):** ADC가 암세포뿐만 아니라 정상 골수 세포에 발현된 표적 항원(HER2, CD19, CD22 및 CD30등)과도 결합하여 세포 내로 흡수(Internalization)됨. 이로 인해 정상 세포까지 파괴되면서 호중구 감소증, 혈소판 감소증, 빈혈 등의 조혈계 부작용이 유발됨.



<그림> **On-target, Off-tumor Toxicity의 기전:** 암세포의 항원 표적인 HER2, CD19, CD22 및 CD30(붉은 원내) 등이 골수세포에서도 발현으로 off-tumor toxicity 유도(Wu 등, 2025)

2) 위장 독성(Gastrointestinal toxicity)

2-1) 비임상 및 임상에서의 독성 양상

- FDA-승인 및 시판된 13개 ADC 중 11개는 메스꺼움(23%–79%), 구토(13%–47%), 설사(2%–59%), 복통(9%–36%), 변비(12%–37%), 소화불량(9.2%–12%), 구강건조(16.7%), 구내염(13%–14.1%) 등 위장 부작용 유도함(임상 표-3). 13개의 ADC 중 7개는 구토나 대장의 색 변화, 소장(십이지장, 공주, 회장)과 대장(맹장, 대장, 직장)의 지하 상피세포 단세포 괴사, 그리고 비임상 연구에서 염증과 같은 위장 반응을 유발하는 것으로 관찰되었음(비임상 표-2).
- ADC의 대부분 표적 항원은 소화계에서 광범위하게 발현되며, 예를 들어 HER2는 침샘, 식도, 소장, 직장, 간에서 발현됨(Ntellas 등, 2025). 식도, 후두, 구강 점막, 침샘, 췌장, 간에서 Trop-2(Trophoblast Cell Surface Antigen 2); 구강 점막, 침샘, 췌장, 식도, 위에서 넥틴-4; 그리고 침샘과 대장의 FR α . 거의 모든 다른 표적 항원도 위장관에서 발현됨.
- Lewis A는 정상 결장에서 발현되며 Lewis Y를 표적으로 하는 BR96-doxorubicin은 1상 임상시험에서 심각한 위장 독성을 입증했음(Saleh 등, 2000; Blaszczyk 등, 1085).
- 종합적으로 보면, ADC의 광범위한 위장 독성은 표적 항원의 발현과 관련이 있을 수 있습니다. 장 점막 세포의 급속한 증식으로 인해 초음파 독성 payload 도 손상에 중요한 기여를 함. 예를 들어, 0.1 mg/kg DM4의 단일 용량을 투여한 시노몰구스 원숭이에서 위 및 식도 단핵세포 침윤이 관찰되었음(soravtansine, 2026). 이 두 요인이 결합되어 비임상 및 임상 환경에서 ADC 투여 후 관찰되는 많은 위장 부작용은 당연함. 위장관 독성과 그 메커니즘에 대한 더 깊은 이해가 앞으로 더 안전한 ADC 분자 설계에 도움이 될 수 있도록 ADC 독성의 가능한 메커니즘을 탐구해야 함.

2-2) 결론

① 개요

- 항체-약물 접합체(ADC) 치료 시 위장관 독성(Gastrointestinal Toxicity)은 가장 흔하게 발생하는 주요 부작용 중 하나임. ADC는 암세포를 정밀 타격하도록 설계되었지만, 혈류 내에서 세포독성 payload (항암제)가 일부 조기 방출되거나 정상 장관막 세포가 손상되면서 소화기계 부작용을 유발하게 됨.
- Table 1에서처럼 ADC뿐만 아니라 대부분의 표적 항암제인 TKI, CAR-T 및 이중 항체(bispecific antibody)는 주로 혈관 손상을 통해 작용함. 특히, ADC는 직접 상피 손상을 통해, CAR-T 세포는 사이토카인 매개 염증을 통해 작용함. mTOR과 PARP 억제제 등 다른 계열은 세포자멸 및 DNA 수리 연관 손상 패턴을 기여함(Hashim 등, 2026)..

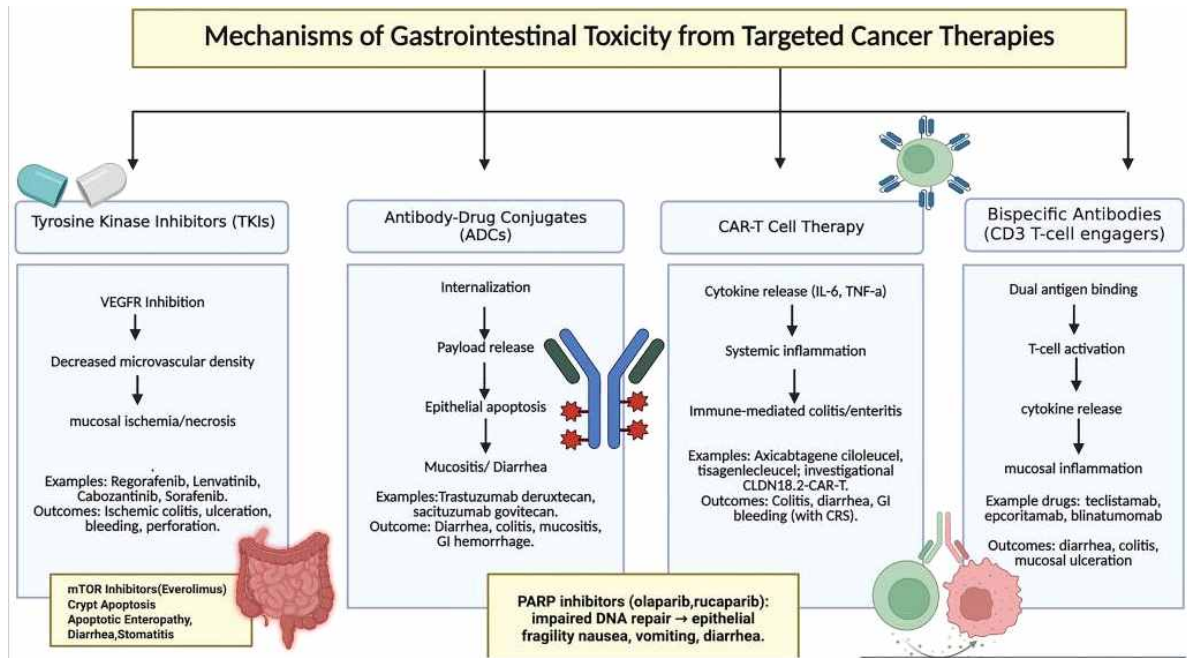


Figure 1. Mechanisms of Gastrointestinal Toxicity from Targeted Cancer Therapies. 약어:

ADC: 항체-약물 결합; CAR-T: Chimeric Antigen Receptor T-cell(키메라 항원 수용체 T세포); CLDN18.2: Claudin 18.2; CRS: Cytokine Release Syndrome(사이토카인 방출 증후군); GI: gastrointestinal(위장관) mTOR: Mammalian Target of Rapamycin(라파마이신의 포유류 표적); PARP: Poly (ADP-ribose) Polymerase; TKI: Tyrosine Kinase; VEGF/VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor/(Receptor)(혈관 내피 성장 인자/(수용체)).(Hashim 등, 2026).

② 비교 연구자료

- Figure 2에서처럼 또 다른 임상연구에 대한 분석을 통해 가장 흔한 치료 관련 위장관 adverse effect는 Trastuzumab Deruxtecan(T-DXd) 치료 환자의 75%, Sacituzumab Govitecan(SG) 투여 환자의 65.6%에서 메스꺼움을 보고했음(Pedersini 등, 2024). Trastuzumab Emtansine(T-DM1)을 투여받은 환자에서는 메스꺼움 빈도가 낮았으며 (38.1%). T-DXd 치료 환자의 6.2%, SG 치료 환자의 4.3%, T-DM1 치료 환자의 0.7%에서 3-4 암등급 메스꺼움이 보고되었음. SG 및 T-DXd 투여 환자들은 T-DM1 치료를 받은 환자보다 구토 빈도가 더 높다고 보고되었음: 43.7과 46.3, 17.1. SG 3-4 암등급 구토는 다른 ADC보다 더 높았음(4.4%)(T-DXd 3.3%, TMD-1 1.2%).

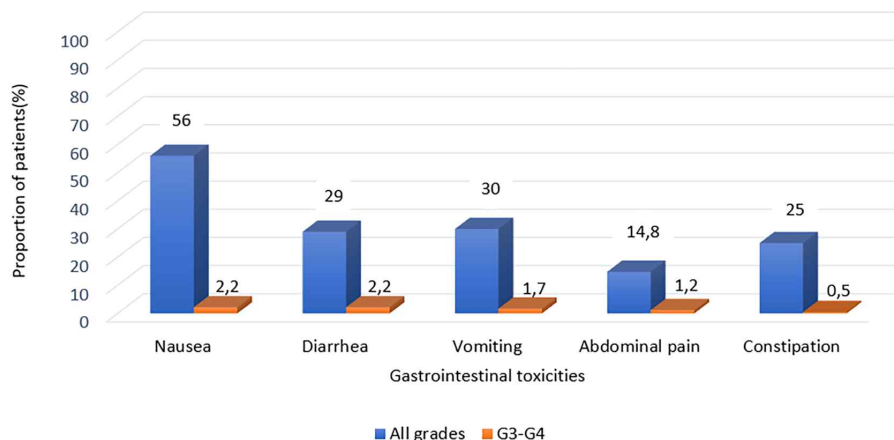


Figure 2. Pooled incidence rates of gastrointestinal toxicities.(Pedersini 등, 2024).

③ 주요 ADC 억제별 위장관 독성 비교: <비임상 표-2>을 요약한 것으로 ADC에 부착된 payload(화학항암제 종류)에 따라 독성의 빈도와 양상이 다르게 나타남.

ADC 억제명	주요 target 암종	위장관 독성 특징
Sacituzumab Govitecan (SG)	유방암 등	설사 발생률이 매우 높음 (약 60% 환자에서 발생, 프로토콜에 따른 철저한 지사제 관리가 필수적임).
Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd)	유방암, 위암 등	오심 및 구토 발생률이 매우 높음 (약 75% 환자가 오심 경험). 구토 조절을 위한 사전 예방적 항구토제 처방이 중요함.
Trastuzumab Emtansine, (T-DM1)	유방암 등	SG나 T-DXd에 비해 오심, 구토, 설사 등 전반적인 위장관 독성 빈도가 상대적으로 낮은 편임.

④ ADC에 의한 위장 독성을 유발하는 주요 요인: ADC에 의한 위장 독성의 주요 원인은 빠르게 분열하는 점막 세포에 강력한 세포독성 payload가 직접 손상을 입혔으며 주요 기전은 다음과 같음(D'Arienzo 등, 2023; Suzuki 등, 2023; Pedersini 등, 2024),

1. 점막에 미치는 세포독성 영향: 항체에 부착된 활성 화학요법 약물은 암세포를 공격하듯 장내 빠르게 성장하는 정상 세포도 공격함
2. 조기 payload 방출: 링커 불안정성은 독성 약물이 중양에 도달하기 전에 혈류로 분리되어 건강한 조직 노출을 증가시킬 수 있음
3. 국소 염증: 장내 손상은 메스꺼움, 구토, 설사, 복통과 같은 일반적인 증상을 유발함

3) 피부 독성(Skin toxicity)

3-1) 비임상 및 임상에서의 독성 양상

- 피부 독성은 ADC의 전형적인 adverse effect로, 비임상 연구에서 쉽게 관찰되며, 피부 색소침착, 어두운 반점, 건조, 벗겨짐, 탈래, 피부염, 궤양 등으로 나타남(비임상 표-2). 임상적으로 발진(13%–31%), 가려움(12%–30%), 피부염(10%), 건조함(4%–10%), 탈모(13%–39%)는 드물거나 가끔 관찰됨(표- 3).
- 피부 독성은 주로 **Val-Cit-MMAE 부착 형태의 ADC에서 관찰**되었으며, 5명 중 4명이 비임상 또는 임상 환경에서 다양한 정도의 피부 독성을 보였음(비임상 표-2와 임상 표-3). 예를 들어, 3mg/kg 이상에서 3mg/kg 이상에서 13주 동안 정맥 주입으로 Tisotumab vedotin을 투여했을 때 피부 독성(건조, 붉은색, 각질 피부, 피부 벗겨짐)이 관찰되었음.
- SN-38, Dxd, DM4, PE38, SG3199 등의 payload를 사용한 ADC에서도 비임상 피부 독성이 관찰되었으며, 그중 loncastuximab tesirine(SG3199)은 인간에서 더 다빈도의 피부 부작용을 보고됨(임상 표-3). 반면, **MMAF(Monomethyl auristatin F)와 calicheamicin payload를 가진 ADC와 절단 불가능한 링크 그룹은 비임상 및 임상 시나리오에서 피부 독성을 보이지 않았음**. 이는 링커 및/또는 payload가 주로 표적 외 독성(off-target toxicity)인 피부 독성과 연관될 가능성을 시사함(Lucas 등, 2018; Shi 등, 2022).
- 반면, HER2와 Nectin-4는 모두 정상 피부에서 발현되며, 랫드와 시노물구스 원숭이에서 fam-trastuzumab deruxtecan-nxki와 enfortumab vedotin의 비임상 독성 연구에서 피부 독성이 관찰되었음. 피부 독성과 관련된 enfortumab vedotin 용량은 tisotumab vedotin과 관련된 용량보다 낮았으며(Tissue factor는 정상 피부에서 발현되지 않음), 이는 피부 독성이 항원 발현과 관련이 있음을 나타냄.

3-2) 일반적인 임상 증상과 예시

- ① **모빌리폼 및 반두엽 발진(Morbilliform and maculopapular rashes):** Enfortumab vedotin 같은 약물과 함께 자주 보고됨(Gazzoni 등, 2025)
- ② **탈모증(Alopecia):** 이는 항미토토 또는 DNA 상호작용 payload에 노출된 모낭과 점막 세포의 높은 교체율로 인해 발생함(Sun 등, 2026).
- ③ **중증 피부 부반응(SCAR, Severe Cutaneous Adverse Reactions), :** 스티븐스-존슨 증후군(SJS, Stevens-Johnson syndrome)과 독성 표피 괴사관해리(TEN, toxic epidermal necrolysis)와 같은 희귀하지만 생명을 위협하는 질환(Myers 등, 2025). **아래의 '참고자료'에서처럼** 화상처럼 피부가 광범위하게 벗겨지고 점막을 침범하는 증상이 나타남.

<참고자료> 요로피암(urothelial cancer) 환자에 ADC 'Enfortumab vedotin(EV)' 처방 후 확인된 중증 피부 부반응(SCAR, Severe Cutaneous Adverse Reactions)과 기전 (Myers 등, 2025)

- <Fig. 1>: Enfortumab vedotin을 처방 받은 8명의 환자 모두 홍역과 유사한 발진을 나타낸 것임. 경미한 발진은 발진성 약물 반응(P1-5)과 일치한 반면, 더 심각한 반응은 TEC, SJS 또는 TEN의 임상적 스펙트럼에 속했다(P6-8). P6-8은 특히 심각한 증상(4등급)을 보였으며, 여기에는 장액성/출혈성 수포(n=3), 니콜스키 징후 양성(n=3), 그리고 광범위한 홍피증(n=1)과 같은 피부 소견이 포함되었음.



Fig 1. Spectrum of clinical images.

- <Fig. 3>: Enfortumab vedotin(EV)는 세포독성 미세소관 억제제인 MMAE(Monomethyl auristatin E), 그리고 nectin-4를 표적으로 하는 단클론 항체로 구성된 ADC(Fig.3). Nectin-4는 요로상피암을 포함한 다양한 상피 악성 종양뿐만 아니라 정상 피부 조직, 특히 기저 각질세포, 땀샘, 모낭에서 발현되는 세포 부착 분자로, 환자에게 피부 반응에 취약하게 만들(Lacouture 등, 2022). 능동적으로 분열하는 표피 각질세포는 MMAE의 항유사분열 효과에 특히 취약할 수 있는데, 이는 nectin-4에 의한 각질세포 파괴와 MMAE 유발 독성의 복합 효과를 시사함. 임상시험 2상 및 3상에서 요로피암(urothelial cancer)에 대한 EV 단독요법 환자의 55%가 치료 관련 피부 반응을 보였고, 13%는 3등급 이상의 반응을 보였음(Lacouture 등, 2022). 피부와 반응은 황반지막 발출부터 TEC 및 SJS/TEN과 같은 심각한 부작용까지 다양하며, 3상 EV-301 임상시험(NCT03474107)에서 보고된 대로 발병 중위 기간은 0.427개월(0.03-12.68)임(Powles 등, 2024).

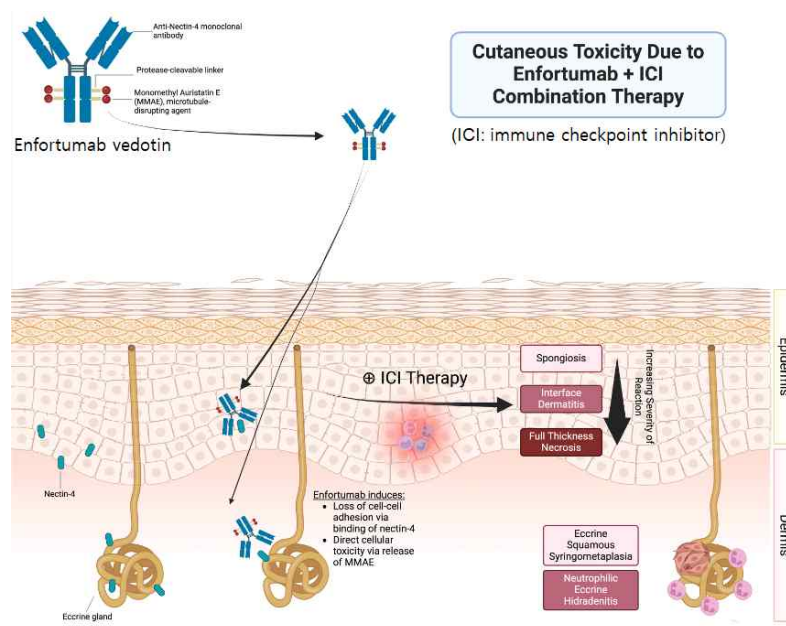


Fig 3. Cutaneous toxicity due to **enfortumab vedotin**+ ICI(immune checkpoin inhibitor) combination therapy.

3-4) ADC에 의한 피부 독성 핵심 기전

- ADC에 의한 피부 독성은 다음과 같은 혼합 작용으로 발생함. 표적/종양 외 결합 (on-target/off-tumor binding), 조기 전신 payload 방출, 그리고 빠르게 분열하는 표피 세포에 미치는 local bystander effects 영향(Majem 등, 2026; Ding 등, 2026; Sun 등, 2026; Liu 등, 2026; Gronbeck 등, 2024).
- ① **비표적 지점 외 결합(On-Target, Off-Tumor Binding):** 정상적인 기저 각질세포와 부부 구조(땀샘, 모낭 등)는 자연스럽게 Nectin-4 or Trop-2와 같은 특정 표적 항원을 발현함. ADC는 이 건강한 피부 세포에 결합하여 독성 물질을 비종양 조직에 직접 전달함(Majem 등, 2026; Ding 등, 2026)
- ② **조기 분리(Premature Deconjugation):** 불안정하거나 절단 가능한 화학적 연결자는 종양에 도달하기 전에 전신 순환에서 분해될 수 있음. 이로 인해 자유롭고 투과성이 높은 세포독성 물질이 혈류로 방출되어, 각화세포와 같은 빠르게 증식하는 세포를 손상시킴(Liu 등, 2026; Gronbeck 등, 2024).
- ③ **방관자 효과(Bystander Effects):** 죽어가는 세포에서 방출되는 막 투과성 payload는 주변 건강한 피부 조직에 수동적으로 확산되어 주변 세포가 표적 항원을 발현하든 상관없이 부수적 손상을 일으킬 수 있음(Nguyen 등, 2023).
- ④ **비특이적 흡수(Non-Specific Uptake):** 건강한 세포는 비특이적 유상상 피노사이토시스 (non-specific fluid-phase pinocytosis) 또는 Fc/mannos receptor 결합을 통해 온전한 ADC를 내화할 수 있으며, 이는 종양 미세환경 외부에서 세포 내 payload 활성화를 이끌어냄(Donaghy 등, 2016).

4) 말초 신경병증(Peripheral neuropathy)

4-1) 비임상 및 임상에서의 독성 양상

- 말초 신경병증은 ADC의 전형적인 adverse response로, 임상적으로 말초 감각 신경병증 (11%–68.2%)으로 나타나며, 근육 약화, 미각 장애, 두통, 현기증, 탈수초성 말초 신경병증, 말초 운동 신경병증이 특징.
- MMAE, DM1, DM4 및 기타 미세소관 억제제를 사용한 ADC 치료 환자에서 말초 신경병증이 자주 관찰되었음(임상 표-3). **SN38과 calicheamicin을 payload로 사용한 ADC 치료는 두통이나 현기증만 보고되었음. 나머지 ADC로 치료받은 환자들은 말초 신경병증 발생이 줄거나 전혀 발생하지 않았다고 보고되었음.**
- 주목할 점은, 말초 감각 신경 질환과 관련된 증상은 비임상 연구에서 동물에서 관찰하기 어려워 보고되는 빈도가 낮았다는 점임.
- 반면, 떨림과 조직병리학적 소견(좌골신경 축삭 변형, 척수 축삭 변성 등)은 단 세 가지 ADC 제품(DM1, DM4, PE38 payload 포함)에서만 나타났음(비임상 표-2).
- 미세소관 억제제를 탑재한 시판용 ADC 중에서, 비절단 링크-MMAF를 가진 ADC만이 임상 또는 비임상 시나리오에서 관찰된 유사한 adverse effect가 없음.
- 또한, 4주간 enfortumab vedotin 독성 연구에서 MMAE(용량 0.1093 mg/kg에서 0.0545 mg/kg으로 감축)를 투여받은 동물에서 좌골신경 축삭 변성이 관찰되었으며, 이는 ADC의 신경독성과 payload 간의 관계 가능성을 시사함(Enfortumab vedotin-Drugs@FDA, 2019)
- ADC 관련 말초 신경독성 기전에 대한 연구가 매우 적어 관련 기전은 명확하지 않으며 추가 연구가 필요함.

4-2) 말초 신경병증을 유도하는 ADC 및 payload 특징

① 화학요법 유발 말초 신경병증과 ADC-유도 말초 신경병증의 차이점

- ADC 관련 말초 신경독성(PN, peripheral Neurotoxicity)은 주로 말초 신경 내 세포 내 세포독성 유적체 축적으로 축삭의 변성과 구조적 손상을 초래함. 독성은 <표-1>에서처럼 고전적인 화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN, chemotherapy-induced peripheral neuropathy)과 유사하지만, ADC 특이적 전달, 구조적 안정성, 세포 흡수 반응학에 의해 독특하게 형성됨(Zhang 등, 2024).

<표-1> 화학요법 유발 말초 신경병증과 ADC-유도 말초신경병증의 차이

특징	화학요법 유발 말초 신경병증(CIPN)	ADC 관련 말초 신경독성
전달 경로	자유 전신 순환; 직접 세포 확산.	비특이적 '비표적' 신경 흡수를 가진 표적 항체 전달(Targeted antibody delivery with nonspecific "off-target" nerve uptake)
주요 약물	Taxanes, Platinums, Vinca Alkaloids, Proteasome inhibitors 등	Strictly tubulin-binding payloads (e.g., MMAE, DM1) 등
신경 충격 프로파일	대부분 감각적인 문제(무감각, 따끔거림, 타는 듯한 통증).	감각에 강한 충격을 주지만, 특히 운동 약화 위험이 눈에 띄게 높음
일반적인 발병시간	치료 초기에서 중간: 초기 주기에서 급성 증상을 유발할 수 있음.	지연 발병: 일반적으로 누적 노출이 필요. 3-4개월.

② 말초 신경병증을 유도하는 ADC 및 payload의 특징

- 미세소관인 튜블린에 결합하는 payload(예: MMAE, DM1, DM4)가 말초 신경병증의 합병증에 대한 주요 원인이며 Fig 4에서처럼 중증도에서는 차이가 있음(Chen 등, 2024; Buongervino 등, 2021). 반면, DNA 손상 유도 payload(예: Calicheamicin, Pyrrolobenzodiazepine) 또는 Topoisomerase I inhibitor의 payload(예: Enhertu)는 신경독성 위험이 최소화(Yabukarski, 2025; Chen 등, 2024; Rossin 등, 2018). Fig 4는 ADC 관련 말초신경병증으로 인한 사망, 생명을 위협하는 사건 및 입원 비율을 나타낸 것임(Chen 등, 2024). 다음은 미세소관인 튜블린에 결합하는 ADC와 payload를 나타낸 것임: Brentuximab vedotin; MMAE, trastuzumab emtansine; DM1, Enfortumab vedotin; MMAE, Polatuzumab vedotin; MMAE, Tisotumab vedotin: MMAE.

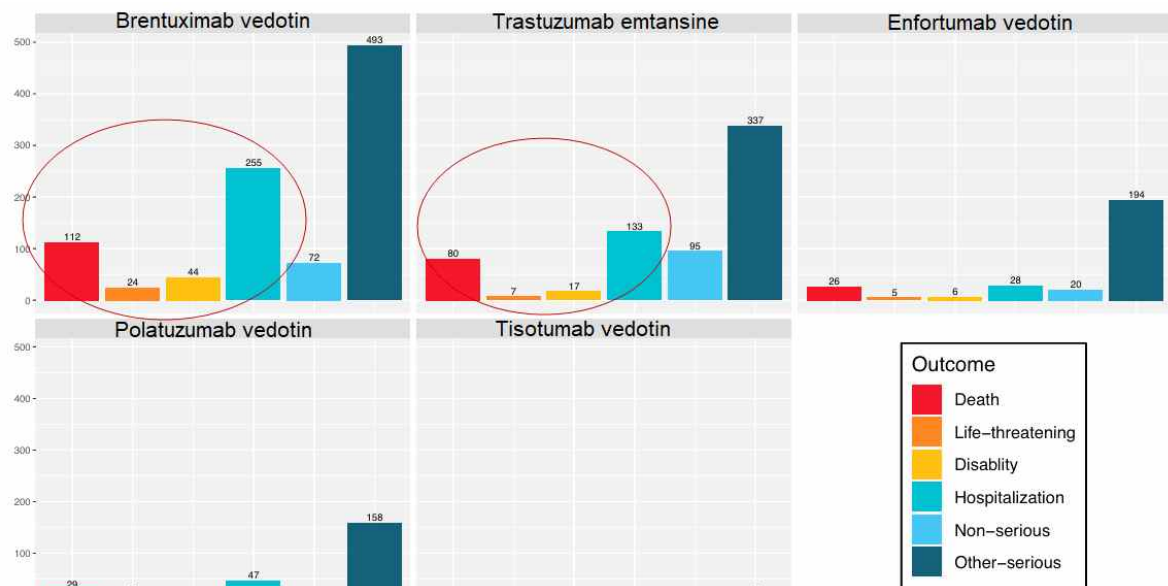
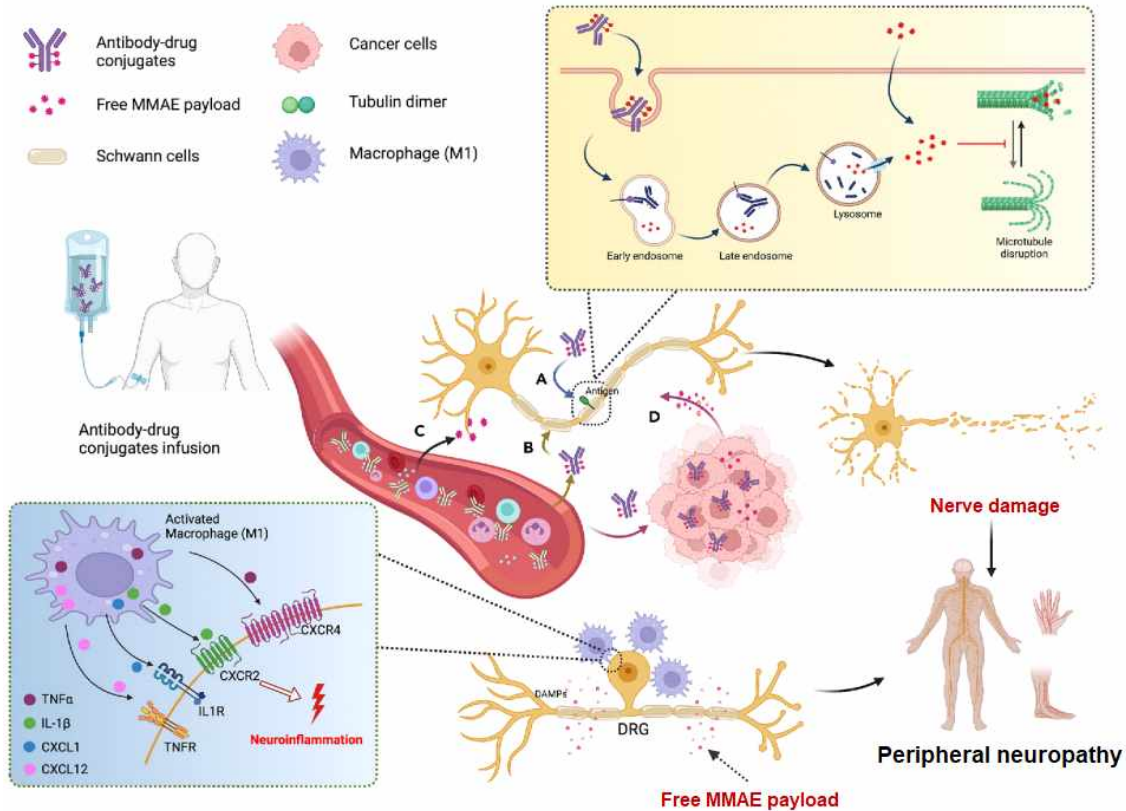


Fig. 4. The proportion of deaths, life-threatening events, and hospitalizations for ADC-associated peripheral neuropathy. (Chen 등, 2024)

4-3) MMAE-ADC 투여에 의한 말초 신경병증(peripheral neuropathy) 발생기전

- 미세소관(튜블린) 표적 약물에 의해 신경 손상이 유발되는 경우, 슈반 세포가 활성화되어 손상 관련 분자 패턴(DAMPs, damage-associated molecular patterns)을 생성함. 이는 차례로 염증성 대식세포인 M1형 대식세포와 같은 순환 백혈구를 손상 부위로 유인함(Bedoui 등, 2022). 정상적인 상황에서는 상주하는 대식세포는 항염증성 대식세포인 M2형 아형 대식세포이며, 이들은 조직의 항상성을 유지하고 말초 신경계를 손상으로부터 보호하는 역할을 함(Chowdhury 등, 2023). 그러나 대식세포 집단의 염증성 M1형 대식세포로의 전환은 IL-1 β , TNF α , CXCL1, CXCL12 등을 포함한 다양한 전염증성 사이토카인의

분비를 촉진함. 이러한 사이토카인은 <그림-4>에서처럼 신경염증을 유발하고 통각 정보를 DRG(dorsal root ganglion, 등근 신경절) 뉴런으로 전달하여 통증 지각을 유발함(Fu 등, 2023).



<그림-4>. MMAE 기반 항체-약물 접합체(ADC)와 관련된 말초 신경병증의 가능한 기전: (A) 표적 의존적 ADC 흡수. (B) 건강한 세포에 의한 ADC의 비특이적 흡수. (C) 순환 중 MMAE의 조기 방출. (D) MMAE 기반 ADC의 방관자 효과. MMAE가 직접적 경로(자유 MMAE) 또는 간접적 경로(MMAE 기반 ADC의 흡수 및 MMAE 방출)를 통해 말초 신경 세포에 흡수되면, MMAE는 미세소관 전체에 걸쳐 풍부한 결합 부위에 결합하여 미세소관 네트워크를 파괴함으로써 말초 신경병증을 유발함. 또한, 미세소관을 표적으로 하는 약물로 인해 신경 손상이 발생하는 경우, 슈반 세포가 활성화되어 손상 관련 분자 패턴(DAMPs, damage-associated molecular patterns)을 생성하고, 이는 차례로 M1형 대식세포와 같은 순환 백혈구를 손상 부위로 유인함. 이는 IL-1b, TNFα, CXCL1, CXCL12 등을 포함한 다양한 전염증성 사이토카인의 방출을 촉진함. 이러한 사이토카인은 신경염증을 유발하고 통각 정보를 DRG(dorsal root ganglion, 등근 신경절) 뉴런으로 전달하여 통증을 느끼게 함. 그림은 BioRender.com을 사용하여 제작되었음. (Fu 등, 2023)

4-4) 요약 및 결론

① 튜블린 결합 payload (MMAE, DM1, DM4)에 의한 말초 신경병증

- 미세소관(튜블린) 억제제 payload인 MMAE, DM1, DM4는 말초 신경독성 위험이 가장 높은 범주를 차지하는 ADC payload 범주(예: MMAE, DM1, DM4)이며 다음과 같은 기전으로 발생.

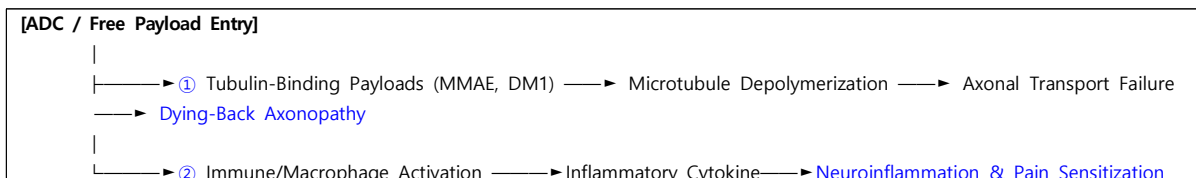
1. 축삭 수송의 붕괴(Disruption of axonal transport): MMAE와 유도체 mertansine(DM1)과 같은 payload는 튜블린에 결합하여 축삭의 구조적 '궤도'를 유지하는 데 필요한 중합을 방해함. 이로 인해 세포체에서 신경 끝으로 중요한 단백질

질, 미토콘드리아, 영양소가 이동하는 것을 멈춤(Tang 등, 2024).

2. **"죽음 회수" 축삭병증(Dying-back" axonopathy):** 필수적인 대사 지원이 부족한 가
장 길고 먼 신경 말단이 먼저 퇴화함. 이로 인해 고전적인 대칭 '장갑과 스타킹' 감
각 장애가 발생함(Castro-Bono 등, 2026).
3. **슈반 세포에서의 유사분열 정지(Mitotic arrest in schwann cells):** 신경세포는 유사
분열 후 상태이지만, 지지하는 슈반 세포는 때때로 분열하거나 재형성되어야 보호
하는 미엘린 외피(myelin sheath)를 유지할 수 있음. 미세소관 파괴는 이러한 세포
를 정지시켜 미엘린 무결성을 저해함(Yuan 등, 2025).
4. **면역 매개 신경염증(Immune-mediated neuroinflammation):** ADC의 payload는 뉴
런에 대한 직접적인 구조적 손상을 넘어, 면역 매개 독성 반응을 유발할 수 있음
(Wang 등, 2025; Liu 등, 2026). 다음과 같이 2 기전에 의해 payload에 의한 신경
염증이 발생함.

- **대식세포 침윤:** 순환 ADC는 말초 신경다발과 등뿌 신경절 내 대식세포에 의
해 자연스럽게 흡수됨.
- **사이토카인 연쇄 반응:** 독성 payload의 내부 방출은 대식세포 용해를 일으켜
TNF- α , IL-6 같은 염증성 사이토카인의 파동을 촉발함. 이 국소 염증은 통각
수용체를 감작하여 신경병성 통증과 화끈거림 감각을 증폭시킴.

- **세포 내 신경독성 경로의 요약:** Payload가 신경세포 내부 환경에 접근하면, 연쇄적인 퇴
행성 사건이 발생함. 정확한 병리학은 payload 종류에 크게 의존함(Liu 등, 2025; Kepp
등, 2025).



② Free payload의 건강한 신경으로의 세포 침입 메커니즘

- Payload가 신경 섬유를 파괴하기 전에 ADC 또는 자유 payload가 말초 신경계를 관통해
야 하며 4 가지 명확한 경로를 통해 이루어지며 Figure 1을 참고(Fu 등, 2023; Nguyen
등, 2023; Chen 등, 2024).

- ① **비특이적 엔도사이토시스(Nonspecific endocytosis):** 말초 뉴런과 슈반 세포는 종양
표적 항원과 무관하게 거대 피노사이토시스(macro-pinocytosis) 또는 수용체 매개
과정(예: FcRn 또는 Fc γ R 수용체)을 통해 순환하는 온전한 ADC를 흡수함(Stagg
등, 2016).
- ② **전신 payload 분리(Systemic payload deconjugation):** 불안정한 화학 연결을 가진
ADC가 전신 순환 중에 있을 때 조기 절단됨. 이로 인해 free payload가 혈류로 방

- 출되고, 이 payload는 세포막을 넘어 말초 신경으로 수동적으로 확산됨
- ③ **비표적 결합(On-Target, off-Tumor binding):** 표적 종양 항원이 건강한 미엘린, 슈반 세포, 또는 배근신경절(DRG) 뉴런에도 소량으로 발현된다면, ADC는 건강한 조직에 직접 결합하여 내부화됨
 - ④ **방관자 확산(Bystander diffusion):** 종양 미세환경 내에서 방출된 활성 payload는 인근 혈액 모세혈관으로 누출되어 전신적으로 분포하고 국소 신경 말단을 관통할 수 있음.

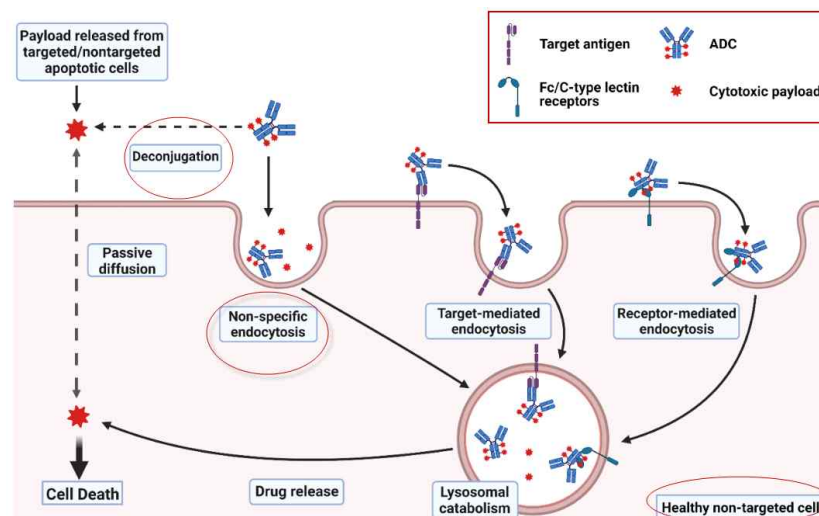


Figure 1. Mechanisms of ADC toxicity: 온전한 ADC가 정상 세포로 흡수되는 것은 비특이적 내포 작용을 통해서, 또는 표적 항원이나 Fc/C형 렉틴 수용체에 결합하여 세포 내로 유입됨으로써 발생할 수 있음. 세포외액에서 ADC의 탈결합 또는 기타 표적/비표적 세포 사멸을 통해 방출된 유효부하 물질은, 막 투과성 유효부하 물질의 경우 수동 확산을 통해, 막 불투과성 링커-유효부하 복합체(membrane-impermeable linker-payload adducts)의 경우 비특이적 내포작용(non-specific endocytosis)을 통해 정상 세포로 유입될 수도 있음(Nguyen 등, 2023).

③ DNA-Damaging & Topoisomerase I의 Payloads (Calicheamicin, DXd, SN-38) - 낮은 직접적인 신경독성(Low direct neurotoxicity)

- DNA-Damaging 및 Topoisomerase I 저해제인 deruxtecan (DXd) 또는 SN-38 등의 Payload 성숙한 말초 신경세포는 능동적 분열이나 DNA 복제를 겪지 않기 때문에, DNA 손상 기전에 본질적으로 저항성이 있어 신경병증 발생률이 현저히 낮아짐(Donaghy 등, 2016; Bos science, 2026; Synapse 등, 2025).

④ 말초 신경병증의 고위험 ADC 구성 요인

- 말초 신경독성의 위험과 중증도는 <표>에서처럼 ADC의 구성 방식과 직접적으로 연관되어 있음(Sisca 등, 2026; Zhang 등, 2024).

<표> 말초 신경병증의 고위험 ADC 구성 요인

ADC 구성 요소	고위험 구조적 속성	임상 사례
Payload	세포 내 수송 구조를 심각하게 교란하는 튜불린 표적 작용제.	MMAE, DM1
Linker Chemistry	절단 가능한 링크(예: 발린-시트룰린)는 혈청 프로테아제에 지나치게 민감하여 자유 순환 payload의 기준 수준이 높아짐.	Brentuximab vedotin, Enfortumab vedotin
약물 대 항체 비율(DAR, Drug-to-Antibody Ratio)	높은 DAR 값(예: 항체당 4에서 8개의 payload)은 비특이적 세포 진입 사건당 더 많은 독소 양을 전달함.	Polatuzumab vedotin
Linker Chemistry	증상이 나타나기까지 걸리는 시간의 중앙값은 약 127일이지만, 개인에 따라 큰 차이를 보일 수 있음	

5) 안구독성(Ocular toxicity)

5-1) 비임상 및 임상에서의 독성 양상

- 안구 독성(1.2%~84%)은 ADC 치료의 전형적인 adverse effect(AE)로, 시력 저하, 안구건조증, 각막병증, 각막염, 미세낭성 상피 변화, 각막 침착 등으로 나타남. 지금까지 비임상 독성학 연구에서 안구 독성을 보고한 ADC는 단 3명에 불과하며, 인간/임상시험에서 10명의 ADC는 다양한 중증도를 가진 안구 독성을 보고했음(표 2 및 표 3).
- 안구 독성과 항원 발현의 연관성이 제시되었음. 예를 들어, Figure 1에서처럼 MUC16은 **난소암, 자궁내막암, 췌장암** 등 특정 고형암 세포 표면에 과발현되는 특성이 있음. 또한 안구 상피에서 발현되는 MUC16이 발현되며((Saad 등, 2022), ADC DMUC4064A의 임상시험에서는 환자의 40%가 안구 독성을 경험했다고 보고했음(Liu 등, 2021; Clark 등, 2024). DMUC4064A는 백금 저항성 난소암 치료를 위해 연구된 항체-약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC) 신약 후보 물질임(Liu 등, 2021). 즉, MUC16은 눈의 각막, 결막 및 체내 상피 표면을 보호하고 윤활하는 장벽 역할을 담당 당단백질이면서 동시에 난소암 등의 종양 표지자인 **CA125**를 부호화하는 유전자임. 이와 같은 정상세포와 암세포에서의 발현되는 MUC16이 ADC를 유도함으로 항암치료와 동시에 부작용을 유발하게 됨.

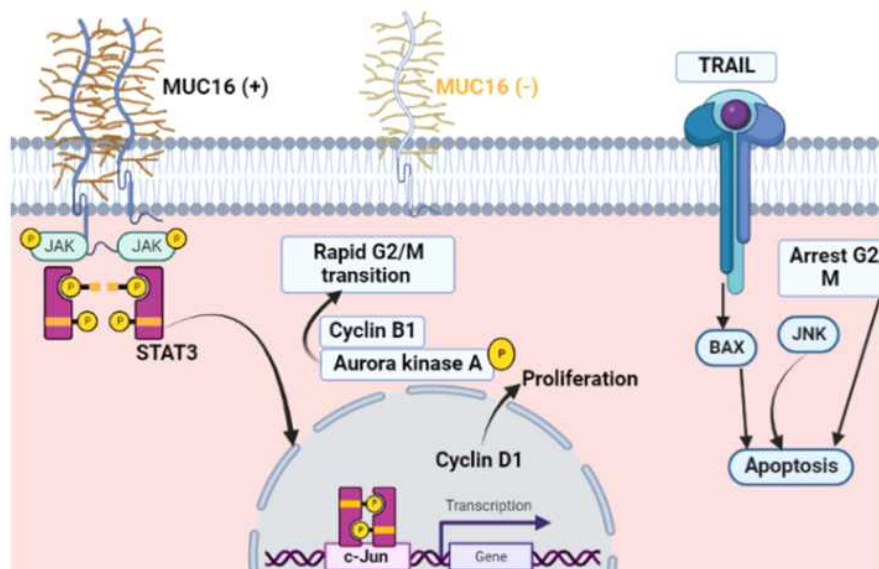


Figure 1. MUC16 expression in cancer: MUC16 발현(+)은 비수용체 티로신 키나제 JAK2에 결합하여 종양 세포 분열을 자극하며, 이는 전사인자 STAT3의 인산화를 자극하여 사이클린 D1의 c-Jun 발현을 활성화함. MUC16은 cyclin B1과 Aurora kinase A의 인산화를 통해 G2/M 전이 과정에 영향을 줌. MUC16(-)의 발현 감소는 세포 주기의 G2/M 단계에서 악성 세포가 축적되고, 이후 JNK 신호를 통한 유방암 세포의 세포자멸사를 초래함(Saad 등, 2022).

- ADC Tisotumab vedotin은 조직 교차반응성 연구에서 인간과 원숭이의 각막 및 결막 상피 조직과 양성 교차반응성(positive cross-reactivity)을 보였으며(Tisotumab vedotin: Drugs@FDA, 2021), 비임상 연구에서는 안구 독성이 관찰되었음. **임상에서 3.2%의 환자에서 심각한 궤양성 각막염을 포함한 높은 빈도의 안구 부작용이 보고되었음**(Tisotumab vedotin: Drugs@FDA, 2021).
- EGFR epitope는 각막 기저 상피에서 정상적으로 발현됨(Borkar 등, 2013). EGFR 표적에 결합하는 ADC depatuxizumab mafodotin은 임상시험에서 눈에 띄게 높은 부작용 빈도를 보였고 MMAF 또는 DM4를 payload로 사용하는 ADC는 인간에서 높은 빈도의 안구 부작용을 일으킴(Liu 등, 2021; Dominguez-Llamas 등, 2023). 그러나 <임상 표-3>에서처럼 MMAE payload로 사용하는 일부 ADC는 높은 빈도의 안구 부작용을 보이지만, MMAE를 사용하는 일부 ADC는 부작용이 전혀 발생하지 않거나 **payload가 반드시 안구 독성과 관련이 없음**을 시사함.
- 안구 독성은 맥락막과 섬모체에서 신생아 FcRn(Neonatal Fc Receptor) 발현과 각막(Cornea) 내 C형 렉틴 수용체(CLRs, C-type Lectin Receptors) 발현과도 관련이 있을 수 있음(Allavena 등, 2004; Powner 등, 2014). 눈의 투과성과 면역 장벽을 구성하는 각막 내에서 FcRn와 CLR는 안구 표면의 항상성 유지와 외래 병원체 방어에 핵심적인 역할을 수행함.
- 세포가 세포외액과 그 안에 포함된 대형 분자들을 비특이적으로 흡수하는 **세포내이입(Endocytosis)**의 한 형태를 대음세포작용(Macropinocytosis)이라고 함. 대음세포작용은 변연(limbal) 및 각막 상피세포(corneal epithelial cells)에서 발생할 수 있으며, 각막 기질은 대음세포작용을 통해 영양분을 섭취함. 따라서 비특이적 엔도사이토시스(nonspecific endocytosis)가 ADC 관련 안구 독성의 잠재적 메커니즘 중 하나일 수 있음. Figure 1에서 ADC의 off-target toxicity 기전으로 ADC 또는 payload의 전하 또는 소수성 성질 때문에 정상 세포(예: 각막 상피세포나 골수 세포)로 대음세포작용을 통해 비특이적으로 흡수될 수 있음(Rongshan 등, 2025; Peng 등, 2017; Yan 등, 2025). 또한, 안구 조직에 높은 노출을 가진 ADC가 세포외 또는 심지어 세포 공간으로 침투하면 약물 축적이 일어나 안구 독성이 발생함(Bussing 등, 2021). 눈의 혈관과 빠른 세포 분열도 안구 반응 위험을 높이는 데 기여할 수 있음.

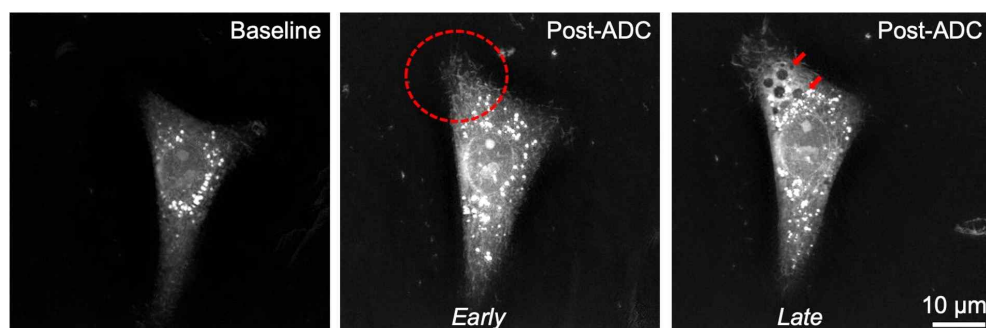


Figure 1. HCEC(human corneal epithelial cells, 인간 각막 상피 세포)에서 관찰된 ADC의 macropinocytosis의 생세포 영상: Baseline에서 HCEC는 극히 미미한 수준의 macropinocytosis을 나타냄. ADC로 HCEC에 처리한 결과, 세포막 주름 현상(빨간 원)에 이어 수많은 macropinocytosis(빨간 화살표)이 관찰됨. 세포가 세포외액과 그 안에 포함된 대형 분자들을 비특이적으로 흡수하는 **세포내이입(Endocytosis)**의 한 형태를 대음세포작용(Macropinocytosis)이라고 함(Yan 등, 2025).

5-2) 안구독성을 유도하는 ADC

- 임상 및 비임상시험에서 ADC에 의한 안구 독성은 <표>에서처럼 주로 눈 앞부분에 영향을 주어 표면 자극, 각막병증(각막 질환), 시야 흐림을 유발함(Liu 등, 2021; Dominguez-Llamas 등, 2023; Rongshan 등, 2025; Peng 등, 2017, Yan 등, 2025; Mao 등, 2024).

<표> 안구독성을 유도하는 ADC

ADC(payload)	안구 독성
Belantamab mafodotin(MMAF)	심한 각막병증과 미세낭종 유사 상피 변화
Tisotumab vedotin(MMAE)	결막염, 각막염, 안구건조증과 강하게 연관
Mirvetuximab soravtansine(DM4)	시야 흐림과 각막 각막병증 발생률이 높음
Trastuzumab emtansine(DM1) and Trastuzumab duocarmazine(Dxd)	시력 저하와 각막 손상과 연관

5-3) 안구독성을 유도하는 ADC의 기전 요약

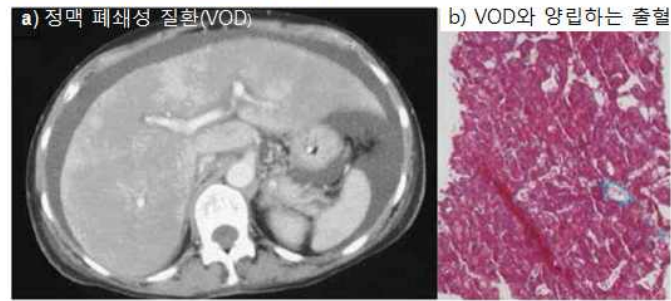
- 미세소관 억제제 payload(Microtubule inhibitor payloads):** Maytansinoids(DM1, DM4)와 auristatins(MMAE, MMAF)와 같은 payload는 안구 표면 독성을 유발할 위험이 매우 높음.
- 대음세포작용(Macropinocytosis):** 비특이적 세포 흡수는 각막 상피세포가 표적 결합과 독립적으로 순환 중인 ADC 분자를 흡수할 수 있게 함.
- 표적 중 독성, 종양 외 독성(On-Target, Off-Tumor Toxicity):** 건강한 안구 조직에서 MUC16와 같은 특정 표적 항원이 발현되면 직접적인 손상이 발생함.

6) 간독성(Hepatic toxicity)

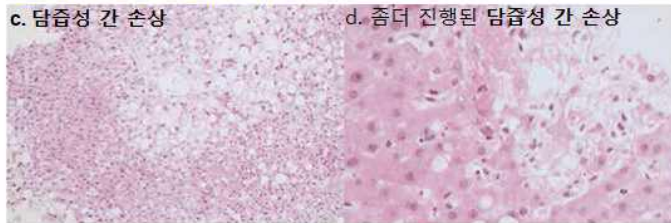
6-1) 비임상 및 임상에서의 독성 양상

- 간 독성은 ADC의 흔한 adverse effect를 나타냄(표 2 및 표 3). ADC 13개 중 9개는 비임상 연구에서 간 독성을 보고했으며, 주요 증상은 간 아미노트랜스퍼라제(aminotransferases, AT) 상승과 간 조직병리학적 변화였음. 임상적으로 13개의 ADC 중 10개 ADC에서 간 AT(24%–98%) 상승이 관찰되었음.
- MMAE payload를 가진 ADC는 비임상 연구에서 항상 간 독성을 보였음. MMAE 단독으로는 낮은 용량에서 간 손상을 일으킬 수 있으므로(Brentuximab vedotin: Drugs@FDA), 관련 ADC 간 독성이 MMAE 순환 중 노출과 관련이 있는 것으로 여겨짐. 분포 연구 결과, T(Thioether 링커)-DM1은 간, 폐, 신장 등 여러 고도로 관류된 장기에 비특이적으로 분포되어 있음이 밝혀졌음. 랫드를 대상으로 DM1 투여한 연구에서는 간, 폐, 신장 및 기타 조직과 같이 고도로 관류된 조직에 광범위하게 분포하는 것이 나타났음(Taplin 등, 2018). 이 분포 연구들은 독성이 표적 암세포 항원 존재와는 관련이 없이 독립적으로 분포된다는 것을 보여주는 것임(Taplin 등, 2018).
- 반면, HER2, EGFR, TF, CD30의 암세포 표적 항원은 모두 간에서 발현되며, 관련 ADC는 비임상 연구에서 간독성이 있는 것으로 관찰되었음. C형 렉틴 수용체(CLR, C-type Lectin Receptors)도 간에서 발현됨(Skilleter 등, 1989). 리신(lysine)을 활성 payload로 사용하는 ADC 약물이 간 손상을 일으키는 주요 기전은 간이 CLR 계열의 일원인 mannose receptor (MR)을 통해 리신을 흡수하는 것임(Skilleter 등, 1989). 또한, ADC 약물의 비특이적 흡수는 간, 특히 Kupffer 세포에서 빠르게 일어나는데, 이는 면역접합체 처리에 중요한 역할을 하기 때문임(Gorovits 등, 2013; Taplin 등, 2018; Kraynov 등, 2-16). 요약하자면, ADC의 간 독성은 payload, 정상 간세포에서 표적 항원 발현, Fc 수용체 및 비특이적 엔도사이토시스(nonspecific endocytosis)와 관련이 있음.
- 또한, 드문 합병증인 간정맥폐쇄성 질환(VOD, hepatic veno-occlusive disease) 또는 간정맥 폐쇄 증후군(SOS, sinusoidal obstruction syndrome)은 간비대, 오른쪽 상복부 통증, 황달, 복수를 특징으로 하는 더 심각한 간 독성 형태임. gemtuzumab ozogamicin과 함께 임상적으로 VOD가 보고되었으며, inotuzumab ozogamicin 2상 임상시험에서 치료 관련 VOD/SOS가 발생한 환자 4명도 발견되었음(DeAngelo 등, 2017). 두 ADC 모두 calicheamicin을 유효물질로 사용하며, gemtuzumab ozogamicin의 표적 항원인 CD33은 간에서 발현되지만, VOD/SOS의 발병 기전에 대해서는 보고된 바가 없음(Hamann 등, 2002; Maniecki 등, 2011).
- FIGURE 3은 gemtuzumab ozogamicin, brentuximabvedotin 그리고 trastuzumabemtansine 등의 ADC 투여 후 확인된 간독성의 대표적인 영상 및 간 생검 소견을 나타낸 것임(Dong 등, 2025)

1. Gemtuzumab ozogamicin 투여 후



2. Brentuximab vedotin 투여 후



3. Trastuzumab emtansine 투여 후

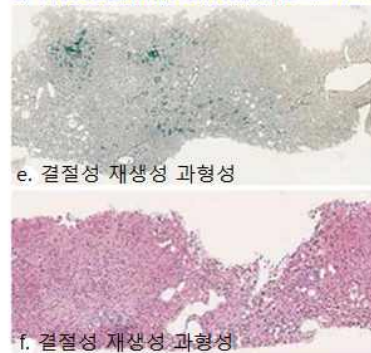


FIGURE 3. ADC 관련 간독성의 대표적인 영상 및 간 생검 소견. (a) Gemtuzumab ozogamicin 치료 후 복부 CT 스캔에서 대규모 복수 및 이질성 간 강화가 확인되었으며, 이는 정맥 폐쇄성 질환 (VOD)과 일치함. (b) 간 생검에서 초기 VOD와 양립하는 간소동맥 울혈(sinusoidal congestion) 및 정맥 주변 출혈(perivenular hemorrhage)이 입증됨. (c,d) Brentuximab vedotin으로 치료받은 환자의 간 생검 샘플에서 담즙성 간 손상과 두 시점에서 진행성 간 세포 변화가 나타났음. (e, f) 트라스투주맙 엠탄신으로 치료받은 환자의 간 생검, 결절성 재생성 과형성의 특징을 보였음(Dong 등, 2025).

6-2) ADC 관련 간독성의 가능한 기전

① 자유 또는 탈접합된 세포 독성 payload를 내화 등 일반적인 독성 기전 개요.

- ADC는 전통적인 항암 치료보다 의도된 종양 부위를 더 정밀하게 표적으로 할 수 있지만, 연구에 따르면 투여된 ADC의 10% 미만이 의도된 종양 부위에 축적되며, 대부분은 순환 내에 남아 정상 세포에 의해 흡수되어 독성을 유발할 수 있음(Huang 등, 2025; Liu 등, 2025). 간의 높은 관류와 FcγRIIb를 포함한 엔도사이토시스 수용체의 풍부한 발현으로 인해, 간 소동맥 내피세포(LSEC, liver sinusoidal endothelial cells)는 ADC에 의한 손상에 특히 취약함(Casi 등, 2015; Poisson 등, 2017). FcγRIIb는 면역계의 음성 조절 역할을

하는 IgG 항체 Fc 영역에 대한 저친화성 수용체임.

- 간세포와 쿠퍼 세포 모두 간 내 ADC 침착에 기여함. 간세포는 수동적 확산 또는 수송체 매개 흡수를 통해 자유 또는 탈접합된 세포 독성 payload를 내화할 수 있으며, 쿠퍼 세포와 간 소동맥 내피세포는 Fcγ 수용체와 C형 렉틴 수용체(CLR, C-type Lectin Receptors)(예: mannose 수용체)를 통해 순환 중인 ADC와 면역 복합체를 제거하는데, 이는 전임상 및 임상 연구에서 간 사이토카인 반응 변화와 간 손상에 관여하는 과정들임 (Nguyen 등., 2023년; Aoyama 등, 2022). 이러한 세포 영향은 혈청 ALT/AST 상승, 담즙정혈(cholestasis), 간정맥 폐쇄 증후군(SOS, sinusoidal obstruction syndrome), 심한 경우 간부전과 같은 임상 증상의 기전적 기초를 제공함. 그러나 ADC 관련 간독성의 정확한 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았음.
- 최근 연구들은 간 거주 대식세포와 단핵구 유래 대식세포가 면역치료 후 염증을 증폭시키는 역할을 강조하며, 이들이 잠재적인 치료 표적으로 활용될 수 있음을 시사함(Siwicki 등., 2021). 여기서는 최근 연구 결과를 종합하여 ADC 유발 간독성에 대한 분류 체계를 제안하였으며, 이를 on-target toxicity와 off-target toxicity 독성으로 분류됨. Figure 2는 간세포, Kupffer 세포, 소동맥 내피세포(LSEC, liver sinusoidal endothelial cells) 사이 비특이적이거나 수용체 매개 기전을 통해 ADC 또는 자유 payload를 내화하는 과정을 통해 off-target 간 독성을 보여줌(Dong 등, 2025).

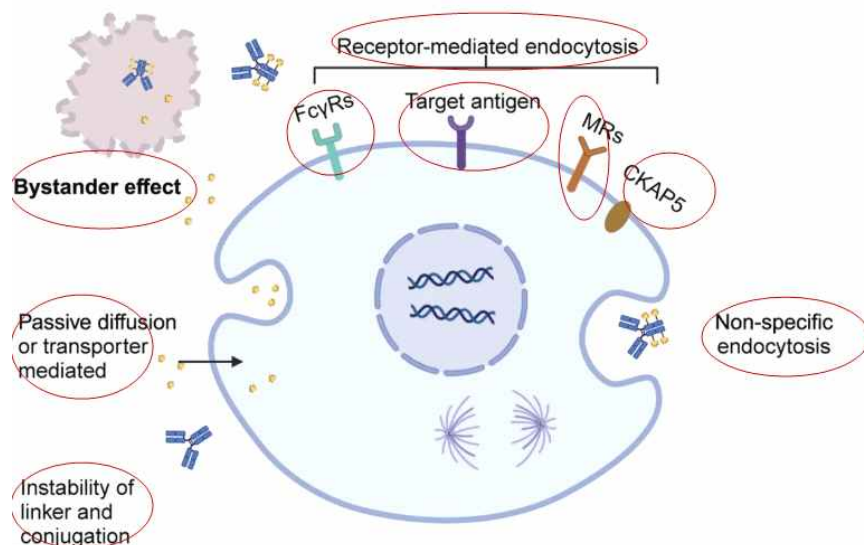


Figure 2. 정상 간세포에서 ADC 또는 유리 payload의 흡수 메커니즘에 대한 가설. ADC: 항체-약물 접합체; DNA: 데옥시리보핵산; TME: tumor microenvironment, 종양 미세환경; FcγRs: Fc 감마 수용체; MRs: mannose receptor; CKAP5: cytoskeleton-associated protein 5(세포골격 관련 단백질 5)(Dong 등, 2025).

② On-target toxicity(표적 독성)

- 표적 독성은 ADC가 종양 세포와 정상 간세포 모두에 존재하는 표적 항원에 결합하여 간 독성을 유발할 때 발생함. Maniecki 등은 Gemtuzumab ozogamicin가 CD33 수용체를 통해 정상 세포에 결합하여 간 소엽 독성을 유발함을 입증(Maniecki 등, 2011). 그러나 이는 정상 간세포에는 존재하지 않는 CD22를 표적으로 하는 Inotuzumab ozogamicin의 간 독성을 설명하지 못함(McDonald 등, 2019). HER2 표적 ADC인 Trastuzumab emtansine(T-DM1)은 상당한 간독성과 연관되어 있는 반면, 다른 HER2 표적 ADC들은 경미한 독성만을 보임. 이러한 차이는 표적 작용 기전의 복잡성을 잘 보여줌. 결론적으로, 표적 항원은 일반적으로 정상 조직보다 종양 세포에서 더 높게 발현되므로, 표적 관련 독성은 ADC 관련 간독성의 극히 일부만을 차지함.

③ 비표적 독성(Off-target toxicity)

- 표적 외 독성은 표적 항원과 무관한 부작용을 의미하며, ADC 독성의 주요 기전임(Wei 등, 2024; Dumontet 등, 2023). 이러한 비표적 효과에는 다음과 같은 여러 메커니즘이 기여함.

가) 링커와 접합의 불안정성(Instability of linker and conjugation)

- 비표적 조직에서 링커의 불안정성과 조기 payload 방출은 ADC의 효능과 안전성에 큰 영향을 미침. 메타분석 결과 ADC의 독성 유형은 종종 payload 유형과 상관관계가 있음을 보여줌. Calicheamicin-기반 ADC(예: Gemtuzumab ozogamicin, Inotuzumab ozogamicin)는 간정맥 폐쇄 증후군(SOS, sinusoidal obstruction syndrome)과 간독성과 가장 강한 연관성을 보였음(Zhu 등, 2023).
- ADC의 링크는 세포독성 약물 방출 메커니즘에 따라 절단 가능 또는 비절단 가능 것으로 분류됨(McKertish 등, 2021). 대부분의 시판용 ADC는 세포 내 환경과 혈장 간 차이를 이용하는 절단 가능한 링커를 사용하며, 단백질 분해가 필요한 비절단 링크는 간독성 감소와 연관되어 있으나 특히 저발현 표적에서는 효능을 저하시킬 수 있음(Jin 등, 2022; Drago 등, 2021; Polson 등, 2009). 또한, 링커 설계는 약물-항체 비율(DAR, Drug-antibody ratio)에 영향을 주며, 이는 효능, 약동학, 간독성에 영향을 미침(López 등, 2023). 높은 DAR은 ADC의 소수성과 전신 노출을 증가시켜 간과 같은 비표적 조직에서 ADC의 축적을 증가시켜 간독성 위험을 높일 수 있음(Lyon 등, 2015; Tan 등, 2025). 링커 기술과 접합(conjugation) 기법의 발전은 효율성과 안전성이 향상된 더 안정적이고 균일한 ADC 개발을 가능하게 할 것임.

나) 수용체 매개 내화(receptor mediate internalization)

- ADC의 표적 외 독성(off-target toxicity)은 정상 세포가 IgG 항체의 Fc 영역에 결합하는 특정 수용체(예: Fc 감마 수용체, FcγRs)와 mannose receptor(MRs)를 통해 흡수될 때 발생할 수 있음(Mahalingaiah 등, 2019). FcγR은 항체 매개 기능을 통해 ADC 효능을 향상시키지만, 특히 간 소동맥 내피세포(LSEC, liver sinusoidal endothelial cells)에서 억제형 수용체인 FcγRIIb를 통해 간 정맥굴 (sinusoid)에서 간정맥 폐쇄 증후군(SOS, sinusoidal obstruction syndrome)을 포함한 독성에도 기여함(Stewart 등, 2014; Taylor 등, 2024). 간으로 들어온 혈액은 '정맥굴(sinusoid)'이라는 미세한 혈관을 통과하며 간세포와 물질 교환이 이루어짐. 특히 간에서 비표적 세포에 의한 ADC의 MR(mannose receptor) 매개 흡수도 간독성에 기여할 수 있으며, 이는 Gemtuzumab ozogamicin에서 관찰되었음(Gorovits 등, 2013). MR은 Kupffer 세포와 LSEC를 포함한 다양한 세포 유형에서 발현되며, ADC의 Fc 영역과 상호작용하여 ADC의 흡수를 촉진하고 간 독성을 악화시킬 수 있음(Sancho 등, 2012; Linehan 등, 1999). 간세포는 세포골격 관련 단백질 5(CKAP5: cytoskeleton-associated protein 5)를 통해 T-DM1을 내화할 수 있어 미토콘드리아 기능 장애와 세포자멸사를 일으킴(Endo 등, 2018).

다) 비특이적 엔도사이토시스(Non-specific endocytosis)

- 영양소와 물질의 세포 내 내화를 위한 핵심 과정인 엔도사이토시스에는 식세포작용과 피노사이토시스(phagocytosis and pinocytosis)가 포함됨. 엔도사이토시스의 속도와 기전은 조직과 세포 유형에 따라 다르며, 특히 Kupffer와 같은 면역 세포와 내피세포가 높은 비율을 보임(Mahalingaiah 등, 2019; Adler 등, 2018). Inotuzumab ozogamicin을 포함한 임상시험의 후향적 분석에서 Inotuzumab ozogamicin과 관련된 간 손상이 LSEC에 의한 비특이적 엔도사이토시스와 연관될 수 있다고 제안했으나, 확실한 실험적 증거는 아직 부족함(McDonald 등, 2019).

라) 방관자 효과(Bystander effect)

- 방관자 효과는 ADC의 오프타겟 독성에 중요한 메커니즘임. 이 현상은 표적 세포 내에서 ADC가 분해된 후, 막 투과성, 매우 친지성 또는 표적 세포 사멸의 결과로 인해 자유 payload가 종양 미세환경으로 방출될 때 발생함. 방출된 payload는 이후 인접한 비표적 세포로 확산되어 의도치 않은 세포독성을 유발할 수 있음(Theocharopoulos 등, 2024). 방관자 효과는 항암 효능을 높이는 한편, 간독성 위험을 증가시켜 임상 적용에 큰 도전 을 제기함.

라) 면역원성 관련 간 독성(Immunogenicity related hepatotoxicity)

- 면역원성은 약물 구조, 환자 특성, 용량, 투여 빈도, 공동 치료제 등 다양한 요인에 의해 영향을 받으며, 일반적으로 항약물 항체(ADA, antidrug antibody)를 통해 평가됨 (Carrasco-Triguero et al., 2019). ADC 면역원성과 간독성과의 잠재적 연관성에 대한 추가 조사가 필요하며, 개발 과정과 승인 후 평가가 안전성과 효능 확보에 매우 중요함.

7) 폐독성(Pulmonary toxicity)

- ILD(interstitial lung disease, 간질성 폐질환)는 폐렴을 포함한 폐 손상을 특징으로 하는 질환군으로, 주로 다양한 정도의 염증 및/또는 간질성 섬유증을 특징으로 하는 이질적인 확산성 폐 실질 질환을 의미함(Graney 등, 2019). 약물 관련 폐 독성의 가장 전형적인 형태인 ILD는 대부분의 경우 항암제에 의해 유발되며, 이러한 약물은 종종 세포독성 및 면역 작용 기전을 통해 ILD를 유발할 수 있음(Rugo 등, 2023).
- 모든 등급의 ILD 환자 245명과 3등급 이상의 ILD 환자 47명을 대상으로 한 연구에서, 항-HER2 ADC가 각각 4.4%와 0.5%를 차지했음(Ma 등, 2022). T-DM1을 payload를 사용하는 trastuzumab deruxtecan, and trastuzumab duocarmazine은 모든 등급 및 3등급 이상의 ILD 발생 위험을 유의하게 증가시켰음(Tarantino 등, 2021). 폐 및 기관지 조직에서 HER2 발현이 관찰되는 점을 고려할 때, ILD는 표적 항원 관련 흡수 현상과 관련이 있을 가능성이 높음(Tarantino 등, 2021). 임상 전 단계에 있는 몇몇 ADC는 폐 내 폐포 대식세포 침윤 및 흉막 섬유화와 연관성이 있는 것으로 나타났음(비임상 비임상 표-2). Nguyen 등(2023)은 FcγR을 다량 발현하는 폐포 대식세포에 의한 비특이적 흡수가 폐의 조직병리학적 변화에 기여할 수 있다고 제시했음.

8) 기타 독성

- 위에서 설명한 독성 외에도, 인간에서 ADC의 다른 adverse effect가 보고된 바 있음. 예를 들어, 여러 ADC에서 생식 독성이 관찰되었음; 신장 장애는 polatuzumab vedotin, sacituzumab govitecan, 그리고 moxetumomab pasudotox에서 관찰되었음. 심혈관 부작용(cardiovascular adverse events)은 T-DM1, gemtuzumab ozogamicin(Long 등, 2024), 그리고 loncastuximab tesirine에서 관찰되었음. 모세혈관 누출 증후군(capillary leakage syndrome)과 용혈성 요독증후군(hemolytic uremic syndrome)이 moxetumomab pasudotox에서 관찰되었으며; 그리고 개별 ADC에서 임상시험에서 원형질막 독성이 관찰되었음(비임상 표-2 및 임상 표-3).

4. FDA-approved ADC별 비임상 독성시험 및 임상시험의 독성 분석 결론

- 첫 ADC가 승인된 이후 >20년 동안, 물리화학적으로 더 적합한 소분자 탐색, 기존 payload 변경, 절단에 더 강한 특이성과 더 적합한 안정성을 가진 링커 탐구, 접합 및 마스킹 최신 기술을 통한 항체 구조 최적화 등 다양한 방식으로 ADC 구성 요소를 최적화하기 위한 지속적인 노력이 이루어졌음.
- 이 모든 노력은 off-target toxicity를 효과적으로 줄이고 환자 내성을 개선할 것으로 기대되나, 점점 늘어나는 임상 증거는 ADC의 내성 용량이 관련 payload와 크게 다르지 않다는 주장을 하기도 함.
- ADC 치료 분야는 최근 몇 년간 급속한 발전을 거듭해 왔지만 상당한 진전이 있었음에도 불구하고, 간독성은 여전히 ADC의 광범위한 사용을 제한하는 주요 장애물로 남아 있음을 비임상 및 임상시험에 확인됨. 그러나 간독성 외에도 혈액 및 골수 독성(Hematotoxicity and Bone marrow toxicity), 위장 독성(Gastrointestinal toxicity), 피부 독성(Skin toxicity), 말초 신경병증(Peripheral neuropathy), 안구독성(Ocular toxicity), 간독성(Hepatic toxicity), 폐독성(Pulmonary toxicity) 등의 off-target toxicity를 극복하는데 대한 제시가 필요한 상황임.
- 따라서 ADC 개발의 발전을 위해서는 필수적으로 off-target toxicity를 극복하는 것이 핵심이라고 할 수 있음. 전문가들은 향후 연구는 유전적 소인, 동반 질환, 유효물질 및 링커와 같은 약물 특성을 포함하여 ADC 유발 간독성에 대한 환자별 및 약물별 위험 요인을 규명하는 데 초점을 맞춰야 한다고 주장함. 그리고 이를 달성하기 위해, 다중 오믹스 프로파일링, 전장 유전체 CRISPR 스크리닝, 단일 세포 RNA 시퀀싱을 결합한 통합적 접근법을 진단 정밀도 향상 등을 방법으로 제시함.
- 그러나 off-target toxicity를 극복하기 위해서 초기단계에서 payload의 Electrophilicity(친전자성) 특성 파악하는 것이 가장 중요한 방법으로 제시하고 이에 대한 고찰이 필요함. 이는 ADC의 payload 항암 기전이 payload의 친전자성과 암세포의 핵심 표적인 ①미세소관 저해제 (Tubulin Inhibitors), ②미세소관 저해제 (Tubulin Inhibitors), ③DNA 손상 유발제 (DNA Damaging Agents)에서 단백질 및 염기의 친핵성 부분과 공유결합을 통해 이루어지기 때문임. 따라서 ADC의 모든 payload는 어떠한 방식으로든 친전자성을 가져야 함. 특히 모든 합성저분자 항암제는 친전자성으로 전환이 필수적이라는 점을 잘 이해하고 payload가 어떤 기전으로 친전자성으로 전환되는지에 대한 이해가 우선적임. 이는 off-target toxicity를 극복할 수 있는 최선의 방안 중 하나라고 할 수 있음.
- 또한 ADC(Antibody-Drug Conjugate, 항체-약물 접합체) 개발에 있어서 향후 발전 단계는 다음과 같은 2가지 기술로 요약됨. 물론 2가지 기술의 목적이 중첩될 수도 있지만 근본적인 목적은 이중 항체에 의한 높은 표적 특이성과 2종류의 payload에 의한 암세포 독성에 대한 효율성임. 그러나 2가지 payload 사용은 off-target toxicity에 대한 우려가 더욱 커지므로 친전자성의 발생 기전과 상호작용에 대한 이해가 개발 성공의 초반 필수

적인 요소라는 것이 더욱 필요성이 제시된다고 할 수 있음.

- ① 이중특이적 ADC (Bispecific ADC): 두 가지 서로 다른 암세포 항원을 동시 target
 - ② 듀얼 payload ADC (Dual-payload ADC): 서로 다른 두 가지 약물을 조합해 치료 효과 극대화
- 따라서 향후 컨설팅보고서는 위와 같은 점을 고려하여 국내 ADC 개발에 기여를 하는 방향으로 payload의 친전자성과 관련된 내용이 조사하려고 합니다.

<참고논문>

Dong Y, Zhi Y, Li X, Ma M, Ye M, Huang S, Tang J, Zhong W, Lei X and Mao Y (2025) Navigating hepatotoxicity of antibody-drug conjugates: from mechanistic insights to clinical and postmarketing evidence. *Front. Pharmacol.* 16:1694436.

Long P, Li S, Pan L. et al. Cardiovascular adverse events associated with antibody-drug conjugates (ADCs): a pharmacovigilance study based on the FAERS database. *Front Pharmacol* 2024;15:1378010. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1378010>.

Yumei Cheng, Jing Lu, Chonghao Zhang, Weiyuan Yan, Panpan Zhu, Qiuping Qin, Likun Gong, Overview of antibody-drug conjugates nonclinical and clinical toxicities and related contributing factors. *Antibody Therapeutics*, Volume 8, Issue 2, April 2025, Pages 124–144,

Tarantino P, Modi S, Tolaney SM. et al. Interstitial lung disease induced by anti-ERBB2 antibody-drug conjugates: a review. *JAMA Oncol* 2021;7:1873–81.

Ma Z, Zhang Y, Zhu M. et al. Interstitial lung disease associated with anti-HER2 antibody drug conjugates: results from clinical trials and the WHO's pharmacovigilance database. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2022;15:1351–1361.

Graney BA, Fischer A. Interstitial pneumonia with autoimmune features. *Ann Am Thorac Soc* 2019;16:525–33.

Rugo HS, Crossno CL, Gesthalter YB. et al. Real-world perspectives and practices for pneumonitis/interstitial lung disease associated with Trastuzumab Deruxtecan use in human epidermal growth factor receptor 2-expressing metastatic breast cancer. *JCO Oncol Pract* 2023;19:539–46.

Carrasco-Triguero, M., Dere, R. C., Milojic-Blair, M., Saad, O. M., Nazzal, D., Hong, K., et al. (2019). Immunogenicity of antibody-drug conjugates: observations across 8 molecules in 11 clinical trials. *Bioanalysis* 11 (17), 1555–1568.

Mahalingaiah, P. K., Ciurlionis, R., Durbin, K. R., Yeager, R. L., Philip, B. K., Bawa, B., et al. (2019). Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. *Pharmacol. Ther.* 200, 110–125.

McDonald, G. B., Freston, J. W., Boyer, J. L., and DeLeve, L. D. (2019). Liver complications following treatment of hematologic malignancy with Anti-CD22 Calicheamicin (inotuzumab ozogamicin). *Hepatology* 69 (2), 831–844.

Theocharopoulos, C., Ziogas, I. A., Douligeris, C. C., Efstathiou, A., Kolorizos, E., Ziogas, D. C., et al. (2024). Antibody-drug conjugates for hepato-pancreato-biliary malignancies: "magic bullets" to the rescue? *Cancer Treat. Rev.* 129, 102806.

Tan, H. N., Morcillo, M. A., Lopez, J., Minchom, A., Sharp, A., Paschalis, A., et al. (2025). Treatment-related adverse events of antibody drug-conjugates in clinical trials. *J. Hematol. Oncol.* 18 (1), 71.

López, D. S. A., Díaz-Tejero, C., Poyatos-Racionero, E., Nieto-Jiménez, C., Paniagua Herranz, L., Sanvicente, A., et al. (2023). Considerations for the design of antibody drug conjugates (ADCs) for clinical development: lessons learned. *J. Hematol. Oncol.* 16 (1), 118.

Tan, H. N., Morcillo, M. A., Lopez, J., Minchom, A., Sharp, A., Paschalis, A., et al. (2025). Treatment-related adverse events of antibody drug-conjugates in clinical trials. *J. Hematol. Oncol.* 18 (1), 71.

McKertish, C. M., and Kayser, V. (2021). Advances and limitations of antibody drug conjugates for

cancer. *Biomedicines* 9 (8), 872.

Jin, Y., Schladetsch, M. A., Huang, X., Balunas, M. J., and Wiemer, A. J. (2022). Stepping forward in antibody-drug conjugate development. *Pharmacol. Ther.* 229, 107917.

Drago, J. Z., Modi, S., and Chandarlapaty, S. (2021). Unlocking the potential of antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 18 (6), 327–344.

Polson, A. G., Calamine-Fenau, J., Chan, P., Chang, W., Christensen, E., Clark, S., et al. (2009). Antibody-drug conjugates for the treatment of non-hodgkin's lymphoma: target and linker-drug selection. *Cancer Res.* 69 (6), 2358–2364.

Mahalingaiah, P. K., Ciurlionis, R., Durbin, K. R., Yeager, R. L., Philip, B. K., Bawa, B., et al. (2019). Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. *Pharmacol. Ther.* 200, 110–125.

Stewart, R., Hammond, S. A., Oberst, M., and Wilkinson, R. W. (2014). The role of Fcγ receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer. *J. Immunother. Cancer* 2 (1), 29.

Taylor, R. P., and Lindorfer, M. A. (2024). Antibody-drug conjugate adverse effects can be understood and addressed based on immune complex clearance mechanisms. *Blood* 144 (2), 137–144.

Sancho, D., and Reis, S. C. (2012). Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 491–529.

Linehan, S. A., Martínez-Pomares, L., Stahl, P. D., and Gordon, S. (1999). Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189 (12), 1961–1972.

Endo, Y., Takeda, K., Mohan, N., Shen, Y., Jiang, J., Rotstein, D., et al. (2018). Payload of T-DM1 binds to cell surface cytoskeleton-associated protein 5 to mediate cytotoxicity of hepatocytes. *Oncotarget* 9 (98), 37200–37215.

Zhu, Y., Liu, K., Wang, K., and Zhu, H. (2023). Treatment-related adverse events of antibody-drug conjugates in clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *Cancer* 129 (2), 283–295.

Dumontet, C., Reichert, J. M., Senter, P. D., Lambert, J. M., and Beck, A. (2023). Antibody-drug conjugates come of age in oncology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 22 (8), 641–661.

Wei, Q., Li, P., Yang, T., Zhu, J., Sun, L., Zhang, Z., et al. (2024). The promise and challenges of combination therapies with antibody-drug conjugates in solid tumors. *J. Hematol. Oncol.* 17 (1), 1.

Huang, W., Li, L., Zhou, Y., Yang, Q., Mixdorf, J. C., Barnhart, T. E., et al. (2025). Preclinical evaluation of zirconium-89 labeled anti-Trop2 antibody-drug conjugate (trodelvy) for imaging in gastric cancer and triple-negative breast cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 52 (7), 2369–2383.

Liu, Y., Wang, X., Zhang, N., He, S., Zhang, J., Xu, X., et al. (2025). Utility of (131)IHLX58-Der for the precision treatment: evaluation of a preclinical radio-antibody drug-conjugate approach in mouse models. *Int. J. Nanomedicine* 20, 723–739.

Casi, G., and Neri, D. (2015). Antibody-drug conjugates and small molecule drug conjugates: opportunities and challenges for the development of selective anticancer cytotoxic agents. *J. Med. Chem.* 58 (22), 8751–8761.

Aoyama, M., Tada, M., Yokoo, H., Demizu, Y., and Ishii-Watabe, A. (2022). Fcγ receptor-dependent internalization and off-target cytotoxicity of antibody-drug conjugate aggregates. *Pharm. Res.* 39 (1), 89–103.

Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., et al. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. *J. Hepatol.* 66 (1), 212–227.

Siwicki, M., Gort-Freitas, N. A., Messemaker, M., Bill, R., Gungabeesoon, J., Engblom, C., et al. (2021). Resident kupffer cells and neutrophils drive liver toxicity in cancer immunotherapy. *Sci. Immunol.* 6 (61), eabi7083.

Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. *MAbs* 2016;8:659–71.

Hamann PR, Hinman LM, Hollander I. et al. Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconjug Chem* 2002;13:47–58.

Maniecki MB, Hasle H, Bendix K. et al. Is hepatotoxicity in patients treated with gemtuzumab ozogamicin due to specific targeting of hepatocytes? *Leuk Res* 2011;35:e84–6.

DeAngelo DJ, Stock W, Stein AS. et al. Inotuzumab ozogamicin in adults with relapsed or refractory CD22-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase 1/2 study. *Blood Adv* 2017;1: 1167–80.

Kraynov E, Kamath AV, Walles M. et al. Current approaches for absorption, distribution, metabolism, and excretion characterization of antibody-drug conjugates: an industry white paper. *Drug Metab Dispos* 2016;44:617–23.

Gorovits B, Krinos-Fiorotti C. Proposed mechanism of off-target toxicity for antibody-drug conjugates driven by mannose receptor uptake. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:217–23

Brentuximab vedotin: Drugs@FDA. U.S. Food and Drug Administration. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125399Orig1s000PharmR.pdf.

Taplin S, Vashisht K, Walles M. et al. Hepatotoxicity with antibody maytansinoid conjugates: a review of preclinical and clinical findings. *J Appl Toxicol* 2018;38:600–15. h

Skiller DN, Price RJ, Parnell GD. et al. The low uptake of an abrin A-chain immunotoxin by rat hepatic cells in vivo and in vitro. *Cancer Lett* 1989;46:161–6.

Mao K, Chen P, Sun H, Zhong S, Zheng H, Xu L. Ocular adverse events associated with antibody-drug conjugates in oncology: a pharmacovigilance study based on FDA adverse event reporting system (FAERS). *Front Pharmacol.* 2024 Aug 20;15:1425617.

Bussing D, Li Z, Li Y. et al. Pharmacokinetics of monoclonal antibody and antibody fragments in the mouse eye following systemic administration. *AAPS J* 2021;23:116

Rongshan Yan et al., Macropinocytosis Inhibition Mitigates Antibody-Drug Conjugate (ADC) Corneal Toxicity In Vitro. June 2025. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. Volume 66, Issue 8. 4602

Peng H, Park JK, Lavker RM. Autophagy and macropinocytosis: keeping an eye on the corneal/limbal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:416–23.

Allavena P, Chieppa M, Monti P. et al. From pattern recognition receptor to regulator of

homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev Immunol* 2004;24: 179–92.

Powner MB, McKenzie JA, Christianson GJ. et al. Expression of neonatal Fc receptor in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:1607–15.

Liu J, Burris H, Wang JS. et al. An open-label phase I dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of DMUC4064A in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2021;163:473–80.

Dominguez-Llamas S, Caro-Magdaleno M, Mataix-Albert B. et al. Adverse events of antibody-drug conjugates on the ocular surface in cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 2023;25:3086–100.

Borkar DS, Lacouture ME, Basti S. Spectrum of ocular toxicities from epidermal growth factor receptor inhibitors and their intermediate-term follow-up: a five-year review. *Support Care Cancer* 2013;21:1167–74.

Tisotumab vedotin: Drugs@FDA. U.S. Food and Drug Administration. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2021/761208Orig1s000MultidisciplineR.pdf.

Clark C, Komo I. Antibody-drug conjugates and ocular toxicity: nursing, patient, and organizational implications for care. *Clin J Oncol Nurs* 2024;28:188–96.

Liu J, Burris H, Wang JS. et al. An open-label phase I dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of DMUC4064A in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2021;163:473–80.

Saad, H.M.; Tourky, G.F.; Al-kuraishy, H.M.; Al-Gareeb, A.I.; Khattab, A.M.; Elmasry, S.A.; Alsayegh, A.A.; Hakami, Z.H.; Alsulimani, A.; Sabatier, J.-M.; et al. The Potential Role of MUC16 (CA125) Biomarker in Lung Cancer: A Magic Biomarker but with Adversity. *Diagnostics* **2022**, *12*, 2985.

Sisca, L.; Polito, M.G.; Travisan, A.; Zannino, F.; Iuliani, M.; Tonini, G.; Pantano, F. Toxicities of Antibody–Drug Conjugates in Breast Cancer: From Mechanistic Insights to Clinical Management. *Pharmaceutics* **2026**, *18*, 792.

Synapse. Datopotamab Deruxtecan: A Novel ADC Targeting Trop-2 for Advanced Breast Cancer. 13 February 2025.

Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. *MAbs*. 2016 May-Jun;8(4):659–71.

Chen H, He G, Huang J, Hu L, Ma J. Ocular adverse events associated with antibody-drug conjugates: a comprehensive pharmacovigilance analysis. *Front Immunol*. 2024 Dec 17;15:1495137.

Stagg, N., Shen, B.-Q., Brunstein, F., Li, C., Kamath, A., Zhong, F., Schutten, M., & Fine, B. (2016). Peripheral neuropathy with microtubule inhibitor containing antibody drug conjugates: Challenges and perspectives in translatability from nonclinical toxicology studies to the clinic. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *82*, 1–13.

Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 24;15(3):713.

Liu X, Yin S, Li X, Nie J. Focusing on toxicity management: Challenges and strategies for HER2-targeted antibody-drug conjugates in breast cancer. *Breast*. 2026 Apr;86:104741.

Wang Y, Lu K, Xu Y, Xu S, Chu H and Fang X (2025) Antibody-drug conjugates as immuno-oncology agents in colorectal cancer: targets, payloads, and therapeutic synergies. *Front. Immunol.* 16:1678907.

Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death and bystander killing: expanding the therapeutic potential of modern antibody-drug conjugates. *Oncoimmunology*. 2025 Dec;14(1):2533488.

Lin Yuan, Navdeep S. Chandel, David Julius, Mitochondrial activity tunes nociceptor resilience to excitotoxicity, *Cell*, Volume 188, Issue 23, 2025, Pages 6436-6452.e18, ISSN 0092-8674.

Velázquez de Castro-Bono, A.; Castro-Luna, G.; Guil-Guerrero, J.L. Beyond the Amyloid Hypothesis: Systemic Drivers, CNS-PNS Crosstalk, and the Future of Alzheimer's Disease Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2026**, 27, 5042.

Tang L, Sun C, Liu W, Wu H, and Ding C. (2024), A pharmacovigilance study on antibody-drug conjugate (ADC)-related neurotoxicity based on the FDA adverse event reporting system (FAERS). *Front. Pharmacol.* 15:1362484.

Buongervino S, Lane MV, Garrigan E, Zhelev DV, Dimitrov DS, Bosse KR. Antibody-Drug Conjugate Efficacy in Neuroblastoma: Role of Payload, Resistance Mechanisms, Target Density, and Antibody Internalization. *Mol Cancer Ther.* 2021 Nov;20(11):2228-2239.

Chowdhury, S., and Trivedi, A.K. (2023). Origin, production and molecular determinants of macrophages for their therapeutic targeting. *Cell Biol. Int.* 47, 15–29.

Bedoui, Y., De Larichaudy, D., Daniel, M., Ah-Pine, F., Selambarom, J., Guiraud, P., and Gasque, P. (2022). Deciphering the Role of Schwann Cells in Inflammatory Peripheral Neuropathies Post Alphavirus Infection. *Cells* 12, 100.80.

Fu Z, Gao C, Wu T et al., Peripheral neuropathy associated with monomethyl auristatin E-based antibody-drug conjugates. *iScience*, 2023; 26

Rossin R, Versteegen RM, Wu J, Khasanov A, Wessels HJ, Steenbergen EJ, Ten Hoeve W, Janssen HM, van Onzen AHAM, Hudson PJ, Robillard MS. Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumour activity in mice. *Nat Commun.* 2018 May 4;9(1):1484.

Filip Yabukarski, Advanced Drug Modalities Part 3: Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Drug Discovery and Biotech.* 2025.

Zhang J, Yang H, Lu Y. Management of neurotoxic reactions induced by antibody-drug conjugates. *Asia Pac J Oncol Nurs.* 2024 Sep 14;11(11):100595.

Chen, Y., Ren, X., Dai, Y. et al. Pharmacovigilance study of the association between peripheral neuropathy and antibody-drug conjugates using the FDA adverse event reporting system. *Sci Rep* **14**, 21386 (2024).

Wang Z, Li H, Gou L, Li W, Wang Y. Antibody-drug conjugates: Recent advances in payloads. *Acta Pharm Sin B.* 2023 Oct;13(10):4025-4059.

Liu J, Li G, Yang J, Sun B, Guo S. Risk Signals of Antibody-Drug Conjugates in Bladder Cancer: A Real-World FAERS Study. *Clin Epidemiol.* 2025 Nov 28;17:995-1009.

Enfortumab vedotin: Drugs@FDA. U.S. Food and Drug Administration. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/761137Orig1s000MultiDisciplineR.pdf.

Frank Liu, Safety assessment of antibody-drug conjugates: Nonclinical toxicology, non-active

ingredients, and environmental risk considerations, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 215, 2025, 104865, ISSN 1040-8428,

Asher Mullard. 2025 FDA approvals. The US FDA approved 46 new drugs in 2025, despite a tumultuous year at the regulatory agency. Nature Reviews Drug Discovery. 25, 81-87 (2026)

Mahalingaiah PK, Ciurlionis R, Durbin KR, et al. Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates. Pharmacol Ther 2019;200:110–25.

Lacouture ME, Patel AB, Rosenberg JE, O'Donnell PH. Management of dermatologic events associated with the nectin-4-directed antibody-drug conjugate enfortumab vedotin. Oncologist. 2022;27(3):e223-e232.

Myers E, Liu J, Shearer S et al., Recognition and management of adverse cutaneous reactions in patients on enfortumab vedotin and pembrolizumab in the inpatient setting JAAD Case Reports, 2025; 58, 85-92

Gabriela Gazzoni, Isabella Michelon, Maysa Vilbert, João Pedro Oliveira, Maria Inez Dacoregio, Pedro C. A. Reis, Marcelo A. P. Braga, Clara Aleixo S imões, Lilia Maria Lima de Oliveira, Matthew Zibelman, Ana Paula Cardoso, Enfortumab vedotin-related skin toxicities in patients with urothelial carcinoma: A systematic review and meta-analysis, Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, Volume 43, Issue 10, 2025, Pages 595.e1-595.e11, ISSN 1078-1439.

Powles T, Valderrama BP, Gupta S, et al, EV-302 Trial Investigators. Enfortumab vedotin and pembrolizumab in untreated advanced urothelial cancer. N Engl J Med. 2024;390(10):875-888.

Donaghy H. Effects of antibody, drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates. MABs. 2016 May-Jun;8(4):659-71.

Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. Cancers (Basel). 2023 Jan 24;15(3):713

Gronbeck, C., Hadfield, M., & Grant-Kels, J. (2024). Dermatologic toxicities of antibody-drug conjugates. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 91(6), 1177–1188.

Liu X, Yin S, Li X, Nie J. Focusing on toxicity management: Challenges and strategies for HER2-targeted antibody-drug conjugates in breast cancer. Breast. 2026 Apr;86:104741.

Sun H, Chen J, Xu Q, Chen C, Yu J and Shu Q (2026) Cutaneous adverse events with antibody-drug conjugates: a FAERS-based pharmacovigilance study. Front. Med. 13:1847032.

Ding P, Luo Q and Cao L (2026) Cutaneous adverse reactions associated with enfortumab vedotin: a pharmacovigilance study based on the FDA adverse event reporting system. Front. Med. 13:1792256.

Majem, M., Molina Mata, K., Mayor Ibarguren, A. et al. Diagnosis and treatment of cutaneous adverse effects of targeted therapy, antibody–drug conjugates, and immunotherapy in cancer patients: a national consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. *Clin Transl Oncol* **28**, 2603–2624 (2026)

Shi F, Liu Y, Zhou X. et al. Disitamab vedotin: a novel antibody-drug conjugates for cancer therapy. Drug Deliv. 2022;29:1335–44.

Lucas AT, Price LSL, Schorzman AN. et al. Factors affecting the pharmacology of antibody-drug conjugates. Antibodies (Basel) 2018;7:10.

Hashim MMA, Ahsan M, Khan MAM, Thakur HH, Khan TK, Zahoor K, Muzaffar S, Fatima F, Zahra ST, Naeem A, Gandhi M, Ashraf MU, Qureshi PM. Gastrointestinal toxicity of targeted cancer therapies in the United States: Clinicopathologic patterns, FDA safety frameworks, and implications for national patient protection. *Oncoscience*. 2026 Feb 6;13:10-28.

Suzuki Y, Zhou S, Ota Y, Harrington M, Miyagi E, Takagi H, Kuno T, Wright JD. Toxicity profiles of antibody-drug conjugates for anticancer treatment: a systematic review and meta-analysis. *JNCI Cancer Spectr*. 2023 Aug 31;7(5):pkad069.

D'Arienzo A, Verrazzo A, Pagliuca M, Napolitano F, Parola S, Viggiani M, Caputo R, Puglisi F, Giuliano M, Del Mastro L, Arpino G, De Laurentiis M, Montemurro F. Toxicity profile of antibody-drug conjugates in breast cancer: practical considerations. *EClinicalMedicine*. 2023 Jul 27;62:102113.

Saleh MN, Sugarman S, Murray J. et al. Phase I trial of the antiLewis Y drug immunoconjugate BR96-doxorubicin in patients with Lewis Y-expressing epithelial tumors. *J Clin Oncol* 2000;18: 2282–92.

P. Ntellas, A. Athauda, K. Sugiyama, M.L. Le, V. Crespi, I. Chau, Expanding the potential of antibody–drug conjugates in gastrointestinal malignancies: beyond HER2 targets, *ESMO Gastrointestinal Oncology*, Volume 8, 2025, 100154, ISSN 2949-8198.

Blaszczuk M, Pak KY, Herlyn M. et al. Characterization of Lewis antigens in normal colon and gastrointestinal adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:3552–6.

Rebecca Pedersini, Martina Buffoni, Fausto Petrelli, Antonio Ghidini, Pierluigi di Mauro, Vito Amoroso, Maria Chiara Parati, Lara Laini, Deborah Cosentini, Greta Schivardi, Giuseppe Ippolito, Alfredo Berruti, Marta Laganà, Gastrointestinal Toxicity of Antibody Drug Conjugates (ADCs) in Metastatic Breast Cancer: A Pooled Analysis, *Clinical Breast Cancer*, Volume 24, Issue 5, 2024, Pages 411-420, ISSN 1526-8209.

Mirvetuximab soravtansine: Drugs@FDA. U.S. Food and Drug Administration. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2022/761310Orig1s000MultidisciplineR.pdf.

Wu D, Yang K, He R, Yin R, Shui L. Antibody-drug conjugates in cancer therapy: current advances and prospects for breakthroughs. *Front Cell Dev Biol*. 2025 Oct 8;13:1669592. doi: 10.3389/fcell.2025.

Nakada T, Sugihara K, Jikoh T. et al. The Latest Research and Development into the Antibody–Drug Conjugate, [fam-] Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), for HER2 Cancer Therapy. *Chem. Pharm. Bull*. 2019;67:173–185.

129. 비만치료제 Mounjaro 복용에 의한 췌장염과 독성학적 이해

1. 마운자로(Mounjaro, 성분: Tirzepatide)과 췌장염에 대한 기사와 식약처의 입장

- 기사에서처럼 비만치료제 Mounjaro 복용후 췌장염-의심 환자의 발생이 보고되었지만 식약처의 입장은 인과관계의 부족함을 제시와 더불어 향후 지속적인 모니터링 후 조치

<기사> 마운자로(Mounjaro, 터제파타이드)로 맞고 췌장염?...식약처 "약물과 인과관계 확인 안 돼"
hyungjun.woo@sbs.co.kr (우형준 기자)

- 비만치료제 '마운자로'를 투여한 뒤 급성 췌장염으로 입원했다는 사례와 관련해 식품의약품안전처가 해당 의약품과 이상사례 사이의 인과관계가 확립된 것은 아니라고 오늘(19일) 밝혔습니다.
- 식약처는 국내에서도 터제파타이드와 세마글루타이드 성분 의약품 투여 이후 췌장염이 의심되는 이상사례가 보고됐지만, 보고된 사례만으로 의약품과 췌장염의 인과관계를 확인할 수는 없다고 설명했습니다.
- 이번 논란은 최근 한 온라인 커뮤니티에 마운자로 투여 이후 급성 췌장염으로 입원했다는 내용의 글이 올라오면서 불거졌습니다.
- 작성자는 마운자로를 첫 단계 용량으로 한 차례 투여한 당일 췌장 관련 수치가 크게 상승했고, 염증 수치와 간 수치도 높아져 입원했다고 주장했습니다.
- 다만 식약처는 개별 사례의 인과관계를 판단하려면 투약과 증상 발생 사이의 시간적 관계뿐 아니라 기존 질환과 병용약물, 다른 발병 원인, 투약 중단 이후 경과 등을 종합적으로 살펴봐야 한다고 설명했습니다.
- 온라인에 공개된 개인 경험만으로는 정확한 진료기록이나 검사 결과, 기저질환, 병용약물, 음주 여부, 담석이나 고중성지방혈증 등 다른 위험요인을 확인하기 어렵다는 것입니다.
- 식약처에 따르면 터제파타이드 성분 제제에서는 지난해 8월부터 올해 3월까지 췌장염 이상사례 3건이 보고됐습니다.
- 세마글루타이드 성분 제제에서도 시판 후부터 올해 3월까지 급성 췌장염 4건이 보고됐으며, 이 가운데 3건은 중대 이상사례로 분류됐습니다.
- 다만 식약처는 두 성분에서 보고된 이상사례 모두 의약품과의 인과관계가 확립된 것은 아니라고 밝혔습니다.

- 식약처는 "앞으로도 티르제파타이드와 세마글루타이드를 비롯한 GLP-1 계열 치료제의 국내외 안전성 정보를 지속적으로 확인하고, 추가 정보가 확인될 경우 허가사항 변경 등 필요한 조치를 검토하겠다"고 밝혔습니다.

2. 비만 치료제로 마운자로(Mounjaro) 복용에 의한 case report 및 meta analysis

- <참고논문-1>에서 <참고논문-5>는 비만치료제 마운자로 복용후 췌장염에 대한 환자 보고 및 여러 논문을 통합하여 분석한 meta analysis을 통한 연구 결과임.
- 마운자로의 복용 후 심각한 부작용은 없는 것으로 확인되지만, 1% 이하라는 발생률이 낮아 췌장염 등과 같은 부작용과 연관이 없다는 통계적 결론.
- 그러나 참고논문을 통해 제2형당뇨와는 관련이 없이 마운자로에 의한 췌장염 발생을 무시할 정도는 아닌 것으로 판단됨. 단지, 수 천명의 복용자 대상으로 6명 정도의 낮은 췌장염 발생률이 통계적 유의성을 없을 뿐이라고 판단됨.

<참고논문-1> Mando N, Thomson E, Fowler M, Short L, Gillen N. **Acute Pancreatitis Caused by Tirzepatide(티르제파타이드로 인한 급성 췌장염).** Cureus. 2024 Dec 19;16(12):e76007.

1. Case 소개

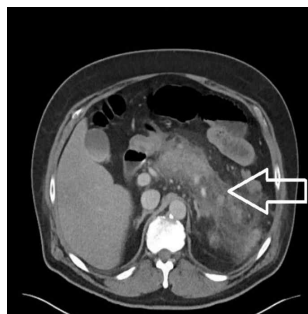
- 59세 백인 남성이 제2형당뇨병, 고지혈증, 고혈압을 앓고 응급실에 상복통으로 내원. 환자는 도착 이틀 전에 복부에 전반적인 팽만감을 느꼈으며, 처음에는 단순히 복부 팽만감이나 변비라고 생각했음.
- 다음 날, 그의 증상은 메스꺼움과 여러 차례 비혈성 구토 에피소드로 진행되었음. 같은 날 늦게, 그는 상복부에서 배주부까지 심한 상복통이 발생했음.
- 환자는 췌장염 병력이 전혀 없다고 부인했으며, 비슷한 증상을 경험한 적도 없다고 했음. 알코올이나 불법 약물 사용은 전혀 없다고 부인했음.
- 하지만 그는 오젠평(Ozempic)(원성문: 세마글루타이드 Semaglutide) 1mg 주사를 **주 1회 맞았고 지난 6개월 동안 약 20파운드**를 감량했다고 보고했음
- 환자는 도착 일주일 전에 의료진이 Ozempic에서 Mounjaro(주성분은 티르제파타이드, Tirzepatide)로 바꿨다고 보고했음. 그는 주 1mg 오젠평 주사에서 7.5mg 마운자로 주사로 바뀌었음
- 그는 증상이 시작된 날 막 새 Mounjaro를 복용하기 시작했음. 도착 시, 환자는 백혈구증(백혈구 수치(WBC) 13)과 빈맥(심박수(HR)>90 bpm)과 함께 전신 염증 반응(SIRs) 기준을 충족하였음. 헤모글로빈(Hgb) 14.0, Hct 39.6, 혈중 요소 질소(BUN) 14, 칼슘(Ca) 9.2, 알부민 3.7, 리파아제 847에서 유의미한 연구가 있음. 트로포닌 수치는 정상 범위 내에 있음. 소변 검사에서는 포도뇨만 나왔음. 빌리루빈과 간 효소 수치는 정상 범위 내에 있었음.
- 인플루엔자 A와 B, 코로나19, 호흡기 융합 바이러스(RSV)는 음성이었음. 도착 시 복부/골반 CT를 실시하였으며, 광범위한 췌장 주변 고래와 주변 액체가 비장 폐문과 비장 하부, 그리고 왼쪽 신장 주변 공간 전체로 확장된 광범위하고 확산된 것을 발견했음 <그림 1>. 오른쪽 상부 사분면 초음파 검사에서는 담석증 또는 담낭염 음성이었음. 지질 패널을 검사했으나 고중성지방혈증의 증거는 발견되지 않았음. 입원 당시 그의

당화 Hgb(HbA1c)는 6.1%였음.



<그림 1> 내원 시 응급실에서 시행한 복부/골반 CT 검사 결과: 주변에 삼출액이 동반된 광범위하고 확산된 췌장 주위 경직이 관찰되었으며, 이는 비장 문부로 확장되고 비장 하부 표면을 따라, 또한 좌측 신장 주위 공간 전체로 퍼져 있는 것으로 나타났음. 화살표는 급성 췌장염을 가리킴.

- 환자는 급성 췌장염 평가 및 치료를 위해 병원에 입원했음. 환자는 병원에서 모니터링을 받았으며 통증 조절을 포함한 지지 치료를 받았고, 증상은 서서히 호전되었음. 소화기내과와 상담하여 환자 치료를 지원했음. 환자와의 광범위한 약물 검토와 포괄적인 병력 조사 후, 그의 GLP-1 작용제가 췌장염의 원인으로 의심되었음. 안타깝게도 환자는 입원 기간 동안 38-39°C 사이의 지속적인 열을 겪었음. 이로 인해 입원 5일째에 다시 CT를 실시했는데, 좌측 대장벽 침범이 있는 악화되는 췌장염, 장장염, 좌측 흉막삼출과 함께 양기저폐 불명증이 발견되었음 **<그림 2>**.



<그림 2> 재촬영 결과 췌장염이 악화된 것으로 나타남: 화살표는 악화된 급성 췌장염을 가리킴

2. 결론

- 급성 췌장염과 GLP-1 작용제 전환의 부작용에 대한 문서화는 잘 알려져 있지 않으며, 이러한 잠재적 합병증에 대한 인식을 높이는 것이 중요함. 이러한 문헌 공백과 인식 부족은 이 약물 관리에 관한 논의와 공동 의사결정의 중요한 기회를 부각시킴.
- 더 나아가, 의료 제공자와 환자 간의 논의를 장려하여 부작용을 적시에 식별하고 GLP-1 작용제에 대한 적극적이고 정보에 기반한 접근을 촉진하는 데 필수적임. 전 세계적으로 제2형당뇨병과 비만의 유병률이 계속 증가함에 따라, 췌장염 위험을 포함한 이 약물들의 장기 안전성 프로필에 대한 지속적인 연구가 매우 중요함. 지속적인 조사를 통해서만 환자들이 가장 안전하고 효과적인 치료를 받을 수 있으면서 심각한

부작용 위험을 최소화할 수 있음.

<참고논문-2> Sallam, A. A., Alenezi, B. A., & Albugami, M. M. (2025). Tirzepatide (Mounjaro)-induced acute pancreatitis and ketoacidosis in an adult nondiabetic patient(성인 비당뇨 환자에서 티르제파타이드(Mounjaro) 유발 급성 췌장염 및 케토산증). Saudi Journal for Health Sciences, 14(1), 104–106.

1. Case 소개

- 29세 여성으로, 특별한 과거 의료 또는 수술 병력이 없었으나, 응급실에 내원했으며, 응급실 방문 2일 전부터 하루에 3-4번의 구토와 함께 복위통을 동반했음. 통증은 심각하고, 끊임없으며, 날카로웠음. 음식을 먹고 회복 요인이 없으면 통증이 더 심해짐. 환자는 통증의 방사선 치료나 외부에서 먹는 것을 부인했음. 발열, 호흡기, 요로, 신경학적 증상은 없었음. 그녀는 케토제닉 다이어트를 하지 않았음.
- 그녀는 이 증상 1주 전에 체중 감량을 위해 Mounjaro(티르제파타이드)를 처방약국에서 복용했음. 첫 번째 용량은 5mg이었음. 그 후 한 번 구토를 했고, 일주일 내내 경구 섭취를 줄였음. 그 후 두 번째 복용을 했는데, 같은 날 늦게 상복부 통증과 구토가 시작되었음. 경구로 아무것도 먹을 수 없을 정도로 지속적이었음. 물조차 마실 수 없었음. 알코올이나 약물 복용 이력이 없으면 췌장염은 Mounjaro(티르제파타이드)를 제외하고는 발생할 수 없음. 췌장염이나 당뇨병 병력은 없었음.
- 내과 병동에 입원할 때 환자는 중환자실 입원이 필요 없었으며, 환자가 매우 안정적이고 정신 차리며 방향 감각이 있었고 고통받지 않았음. 그녀는 건조한 구강 점막이 있었고 황달은 없었음. 경미한 상복부 압통이 있었음. 체질량지수는 24.6 kg/m²였음. 입원 시 실험실 검사 결과는 <표-1>에 나와 있습니다.

<표-1> 실험실 검사 결과

Item	On admission	On discharge	Reference range
pH (VBG)	7.26	7.36	7.30–7.40
CO ₂ (VBG) (k Pascal)	2.90	5.40	5.3–6.6
HCO ₃ (VBG) (mmol/L)	9.9	23.2	22–29
Lactate (mmol/L)	1.1		0.05–2
Urinalysis	+4 ketones		
Blood glucose (mmol/L)	3	4.5	3.9–6
HbA1c	5.4		≤6.5
Lipase	118 IU/L, within 48 h it increased to 1109 U/L	39 U/L	13–60 U/L
Creatinine (μmol/L)	60.4	47	46–96
Urea (mmol/L)	2.69	1.3	2.76–8.07
Sodium (mmol/L)	134	138	135–147
Potassium (mmol/L)	3.7	4	3.5–5.7
Chloride (mmol/L)	98	106	98–111
HCO ₃ (serum)	8	22	22–31
CBC, hepatic profile, bone profile, lipid profile	Unremarkable		

CBC: Complete blood count, VBG: Venous blood gas, HbA1c: Glycated hemoglobin

- 그녀는 고음이온 갭 대사성 산증(계산된 것)을 가지고 있었음. 저혈당은 경구 섭취 부족과 Mounjaro와 관련이 있을 가능성이 높으며, 다른 원인은 없음. 그녀는 구토와 Mounjaro(티르제파타이드)로 인한 칼로리 섭취 부족으로 인한 기아 케토산증을 앓고

있었음. 우리 환자는 다른 항혈당제를 복용하지 않고 비당뇨병 환자로, 케토산증의 차이를 자가처방 Mounjaro(티르제파타이드)에 따른 기아 케토산증으로 좁혀졌음. 환자의 복통과 구토는 5일간 지속되었음. 복부 초음파 검사는 특별한 이상이 없었음. 정맥 주사와 오메프라졸, 항구토제 치료를 시작했음. 점차 복통과 구토가 가라앉았고, 경구로 복용하는 것도 견딜 수 있게 되었음. 환자는 Mounjaro로 인한 케토산증과 함께 급성 췌장염을 앓고 있었음. 병원 과정은 복잡하지 않았고, 증상도 전반적으로 호전되었음. 그녀는 안정적인 상태로 퇴원했음. 환자는 Mounjaro의 부작용에 대해 상담을 받았음.

2. 결론

- 의사들은 비당뇨 환자들이 체중 감량을 위해 Mounjaro를 일반의약품으로 복용하는 경우가 많아지므로, Mounjaro로 인한 심각한 부작용을 인지해야 함. Mounjaro는 의료 감독 하에 처방되어야 함.

<참고문헌-3> Mishra R, Raj R, Elshimy G, Zapata I, Kannan L, Majety P, Edem D, Correa R. Adverse Events Related to Tirzepatide(티르제파타이드와 관련된 부작용). J Endocr Soc. 2023 Jan 26;7(4):bvad016.

1. 배경: Mounjaro(티르제파타이드)는 2022년 5월 미국 식품의약국(FDA)에서 제2형 당뇨병(T2DM) 환자를 위해 승인한 이중 포도당 의존성 인슐리노트로픽 펩타이드(GIP)와 글루카곤 유사 펩타이드-1 수용체 작용제(GLP-1 RA)임

2. 목적: 3가지 연구된 Mounjaro 투여와 관련된 개별 부작용(adverse effect, AE)의 발생률을 규명하는 것을 목표

3. 방법: Mounjaro(티르제파타이드) 관련 AE를 보고한 모든 임상시험에 대해 5개의 데이터베이스(PubMed, Embase, CINAHL, Scopus, Web of Science)를 포함한 메타분석을 포함한 체계적 문헌고찰을 수행했음. 개별 연구의 안전성 데이터를 추출하여 메타회귀분석을 통해 개별 AE의 비율을 평가하였음. 연구 품질 평가는 국립 심장, 폐, 혈액 연구소의 관찰 코호트 및 횡단면 연구 품질 평가 도구를 사용하여 수행되었음.

4. 결과:

- 10개의 시험(6836명 참가자)이 포함되었음. 위장관(GI) AE는 가장 흔히 보고된 AE였으며, 용량 의존적이었으며, 5mg, 10mg, 15mg 용량에서 각각 39%(95% CI, 35%-43%), 46%(95% CI, 42%-49%), 49%(95% CI, 38%-60%)에 의존하였음.
- 모든 위장기 AE 중에서 Mounjaro 복용 시 메스꺼움과 설사가 가장 빈번했음. AE로 인한 약물 중단 비율이 가장 높았던 것은 15mg Mounjaro 용량(10%)임. 경미한 저혈당(혈당 < 70 mg/dL) 발생률은 Mounjaro 10mg 용량에서 22.6%(9.2%-39.8%)로 가장 높았음.
- 치명적인 AE, 중증 저혈당, 급성 췌장염, 담석증, 담낭염의 발생률은 모든 Mounjaro 용량에서 매우 낮았으며($\leq 1\%$).

5. 결론: Mounjaro는 용량 의존적으로 위장관 AEs 및 AEs의 발생률 증가와 연관되어 약물 중단에 이르는 결과를 낳았음. 이 약물로 인해 심한 저혈당, 치명적인 AE, 급성 췌장염, 담석증, 담낭염은 드물(**급성 췌장염이라는 부작용이 보고되었다는 의미임**)

<참고논문-4> Zeng Q, Xu J, Mu X, Shi Y, Fan H, Li S. Safety issues of tirzepatide (pancreatitis and gallbladder or biliary disease) in type 2 diabetes and obesity: A systematic review and meta-analysis(**제2형 당뇨병 및 비만에서 티르제파타이드(췌장염 및 담낭 또는 담도 질환)의 안전성 문제: 체계적 문헌고찰 및 메타분석**). Front Endocrinol (Lausanne) 2023;14:1214334.

1. 목적: 임상 시험에서 얻은 데이터를 종합하고 제2형 당뇨병(T2D) 및 비만에서 티르제파타이드(췌장염 및 담낭 또는 담도 질환)의 안전성 문제를 평가하기 위해 체계적 문헌고찰과 메타분석이 수행됨.

2. 방법: 2023년 3월 1일까지 Embase, PubMed, Cochrane Library라는 세 개의 전자 데이터베이스에서 체계적인 검색이 수행되어, T2D 및 비만 환자를 대상으로 티르제파타이드와 위약 또는 활성 저혈당제를 비교한 무작위 대조 시험(RCT)을 확인하였음. 이질성은 I² 값과 코크란 Q 검정을 사용하여 평가했으며, 고정 효과 모델을 사용해 티르제파타이드의 안전성 프로필을 추정하였음. 췌장염(담낭 또는 담도 질환의 복합체), 담낭염, 담석증 및 담도 질환의 복합적 질환을 포함한 관심 있는 안전성 결과를 평가하였음. (담낭 또는 담도 질환의 복합 범주에는 담석증, 담낭염, 기타 담낭 질환, 담도 질환이 포함되었습니다.)

3. 결과: 총 9,871명의 참가자(티르제파타이드 그룹 6,828명, 대조군 3,043명)로 구성된 9건의 시험이 포함되었으며, 이들은 사전 정해진 기준을 충족하였음. 기저 인슐린(글라진 또는 데글루텍), 선택적 GLP1-RA(둘라글루타이드 또는 세마글루타이드 주 1회), 위약으로 구성된 모든 대조군과 비교했을 때, 췌장염 위험 증가는 티르제파타이드와 유의미하게 연관되어 있지 않았음(RR 1.46, [95% 신뢰구간] 0.59에서 3.61; I² = 0.0%, p = 0.436). 담낭 또는 담도 질환의 경우, 담낭 또는 담도 질환의 복합 성분이 위약 또는 기저 인슐린과 비교해 티르제파타이드와 유의하게 연관되어 있었음(RR 1.97, [95% 신뢰구간] 1.14에서 3.42; I² = 0.0%, p = 0.558), 담석증, 담낭염 또는 담도 질환의 위험은 없었음.

3. 결론: 현재 이용 가능한 데이터에 따르면, 티르제파타이드는 췌장염 위험에 있어 안전한 것으로 보임. 그러나 RCT에서 관찰된 담낭 또는 담도 질환의 복합적 결과 위험 증가는 임상 진료 의사들의 추가 주목이 필요함.

4. 다른 전문가 평가: 메타분석에서는 티르제파타이드의 안전성을 조사했으며, 급성 췌장염과 담낭 질환이라는 두 가지 주요 부작용이 있었음. 본 연구는 9개의 무작위 대조 시험을 검토했으며, **그중 6개는 췌장염을 부작용으로 보고했음**. 그러나 기저 인슐린, GLP-1 작용제와 다른 항당뇨제와 위약과 비교했을 때, 췌장염 발생률이 통계적으로 유의하게 나타나지 않았음. **이 환자의 급성 췌장염 위험 요인은 티르제파타이드 복용뿐이며, 다른 위험 요인은 배제됨.**

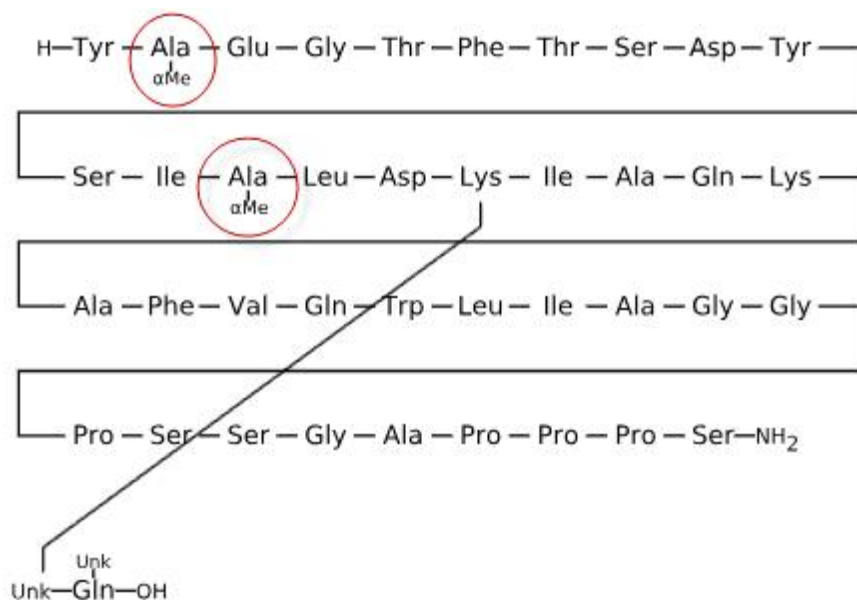
<참고자료-5> Iqbal PM, Maadarani OS, Bitar ZI. Tirzepatide-induced ketoacidosis in non-diabetic patients(비당뇨병 환자에서 티르제파타이드 유발 케토산증). Eur J Case Rep Intern Med 2024;11:004357.

1. 배경: Mounjaro는 새로운 글루카곤 유사 펩타이드 1/포도당 의존성 인슐리노트로픽 펩타이드(GLP-1/GIP) 수용체 작용제임. 최근 비당뇨병 환자의 당뇨병 조절 및 체중 감량에 승인되었음.
2. 사례 설명: 비만 비당뇨 환자에서 Mounjaro 사용 후 케토산증이 발생한 첫 사례를 보고하며, 이는 기아 케토산증과 인슐린 저항성 가능성에 따른 2차적 사례임.
3. 결론: GLP-1과 GIP 수용체 작용제인 Mounjaro는 비만 비당뇨 환자에서 케토산증을 유도할 수 있음

3. 비만 치료제로 마운자로(Mounjaro, Tirzepatide) 복용에 의한 췌장염 기전 추정

1) Tirzepatide 구성

- Tirzepatide는 39개의 아미노산 펩타이드 골격을 구성 되어있으며 비정규(비암호화) 아미노산인 α -aminoisobutyric acid(Aib)을 <그림>에처럼 2번과 13번에 2개 잔기를 포함하고 있음



<그림> Tirzepatide의 구성과 2개의 α -aminoisobutyric acid

2) Amino acid의 2 종류: canonical vs noncanonical amino acid

- 표준 아미노산(Canonical Amino Acids)과 비표준 아미노산(Non-canonical Amino Acids)의 가장 핵심적인 차이는 생명체의 표준 유전 암호(Genetic Code)를 통해 단백질 합성에

직접 참여하는지 여부임(Lepthien 등, 2006).

- 표준 아미노산은 우리가 흔히 알고 있는 20가지 기본 아미노산을 말하며, DNA의 코돈을 통해 단백질로 직접 번역됨. 반면, 비표준 아미노산은 유전 암호에 직접 포함되지 않거나 단백질 합성 이후에 변형되어 생성되는 모든 아미노산을 포함함. 다음의 <표>는 두 그룹의 주요 특징과 차이점을 나타냄.

<표> 표준 아미노산(Canonical Amino Acids)과 비표준 아미노산(Non-canonical Amino Acids)

구분	표준 아미노산 (Canonical)	비표준 아미노산 (Non-canonical)
개수	• 정확히 20종 (특수 경우 22종)	• 수백 가지 이상
유전 암호 (코돈)	• 지정된 코돈이 존재함	• 일반적인 코돈이 없음
단백질 합성	• 리보솜에서 직접 합성됨	• 합성 후 변형되거나 독립적으로 작용
주요 역할	• 단백질을 구성하는 기본 블록	• 대사 중간체, 신호 전달, 특수 단백질 기능 강화
대표 예시	• 글리신, 알라닌, 라이신, 글루탐산 등	• 오르니틴, 시트룰린, 하이드록시프롤린 등

3) Canonical Amino Acids과 Non-canonical Amino Acids의 독성 차이

- 표준 아미노산은 보편 유전 코드에 의해 암호화된 20개의 표준 구성 요소임. 비표준 아미노산(ncAAs)은 표준 DNA에 의해 직접 암호화되지 않은 천연 또는 합성 변이체임. 독성 차이는 세포가 처리하고 접으며 인식하는 방식에서 비롯됨(Rodgers 등, 2026; Castro 등, 2023; Rich 등, 2020; Landor 등, 2023)

① 표준 아미노산

- 안전함: 정상적인 세포 대사와 단백질 합성에 완전히 통합
- 무독성: 세포는 정밀한 교정 메커니즘과 이를 처리하는 경로를 가지고 있음
- 통제: 분해와 재활용 경로가 잘 확립되어 있음.

② 비표준 아미노산(NCAA)

- 단백질 오염: 일부 ncAA는 정준 대응 물질을 모방하여 단백질에 통합되어 구조적 불안정을 일으킴.
- 면역 반응: ncAAs가 포함된 잘못 접힌 단백질은 면역원성 neoepitope를 생성하여 세포 독성을 유발할 수 있음.
- 대사 교란: 메티오닌 유사체인 AHA나 HPG와 같은 특정 유사체는 고용량에서 세포 분열을 억제하고 성장 속도를 늦춤.
- 식물 방어: 천연 ncAAs는 단백질 합성을 방해하여 포식자에 대한 독소 역할을 함

4) 합성물질의 독성기전

- ① 생체 거대분자인 DNA, 단백질, 당, 그리고 지질 등과 공유결합이 가능한 친전자성(electrophilicity)으로 전환
- ② 세포 및 체내 축적을 통한 항상성 저하 및 독성학적 영향

5) Noncanonical amino acid인 α -aminoisobutyric acid(Aib)의 체장염 기전

① α -aminoisobutyric acid(Aib)의 체장에서 가장 높은 용량의 축적

- α -아미노이소부티르산(Aib)은 합성 비대사성 아미노산 유사체로 나트륨 의존성 시스템 A 아미노산 수송체를 통해 체장에 적극적으로 축적됨. <참고논문-6>에서처럼 정상인을 이용한 방사성 표지된 Aib를 이용한 생체분포 및 PET 영상 연구는 정상 체장을 포함한 분비선 조직에서 가장 높은 생리적 흡수와 축적이 확인됨. 본 논문은 α -아미노이소부티르산(Aib)이 체내 축적된다는 최초의 논문임.

<참고논문-6>

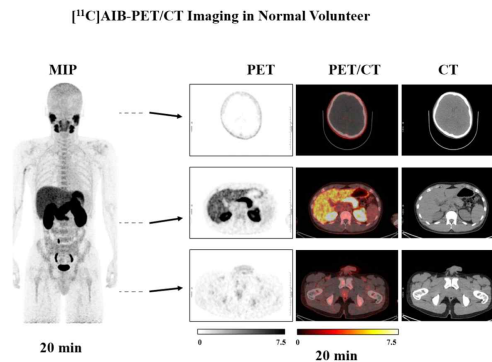
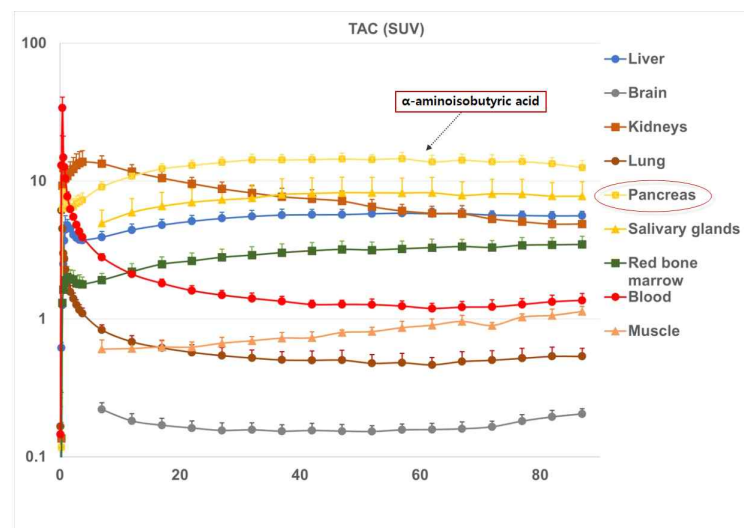
Kentaro Tamura, Ryuichi Nishii, Kotaro Tani, Hiroki Hashimoto, Kazunori Kawamura, Etsuko Imabayashi, Kana Yamazaki, Tatsuya Higashi. A First-in-Human Study of [3-11C] AIB PET/CT, a novel PET amino acid tracer([3-11C] AIB PET/CT, 새로운 PET 아미노산 추적자에 대한 최초의 인간 연구). Journal of Nuclear Medicine Jun 2023, 64 (supplement 1) P1305;

1. 소개: 탄소-11 표지된 아미노이소부티르산([¹¹C] AIB)는 종양 탐색 PET 추적자로, 대사되지 않는 비자연 아미노산이며 주로 시스템 A 아미노산 수송체를 통해 세포로 운반됨. [¹¹C]알파-AIB ([¹¹C]AIB)는 1980년대에 개발되었으며, 악성 흑색종 진단에 유용성이 보고되었음. 하지만 방사선 합성과 최종 제품에 시안화물 잔류물이 포함된 복잡한 절차에 관한 여러 문제가 아직 해결되지 않았음. 우리는 2-아미노-[3-¹¹C]이소부티르산 ([3-¹¹C]AIB) 및 [3-¹¹C]AIB PET를 전임상 영상 연구로 활용함. 본 연구는 [3-¹¹C]건강한 성인 남성에서 C]AIB.

2. 방법: [3-¹¹C]AIB는 우리 실험실에서 이전에 보고된 방법으로 방사합성되었음. PET 영상 검사에서 6명의 건강한 성인 남성(24-34세, 중위 연령 28세)이 식염수 용액 [3-¹¹C]AIB(평균 용량 367 MBq) 정맥 주사. PET/CT 스캔은 GE Discovery MI 5 링 디지털 PET 스캐너를 사용해 수행되었음. [3-¹¹C]AIB, 심장 및 상복부의 동적 PET 영상이 4분간 시행되었음. 5분에서 90분 사이, 5분마다 4분 길이의 전신 스캔 17회가 이루어졌습니다. 뇌, 침샘, 심장벽, 심장 내용물, 폐, 갑상선, 간, 췌장, 비장, 부신, 신장, 전립선, 적골수 등을 각 PET/CT 데이터 세트를 사용해 관심 부피(Volumes of Interest)로 수동으로 표시하였음. PMOD 4.2를 사용하여 방사성 추적자의 생체 분포를 결정하기 위해 개별 장기의 시간-활동 곡선을 먼저 작성했음. 그 후 IDAC-용량 2.1을 사용하여 전신 유효 용량을 평가했음. 방사성 추적제 주사 전후로 활력 징후와 실험실 검사를 모니터링하여 안전성 평가를 평가하였음.

3. 결과: 검사 중이나 검사 후 모두 명백한 증상이나 활력 징후의 이상이 없었음. 또한 혈액 검사에서는 신장 또는 간 기능 이상이 관찰되지 않았음. 심장 내용물(혈액)의 방사성 추적자 축적은 주사 후 30초 후 SUV평균 33.9±6.7에 도달했으나, 20분에 SUV평균 1.6±0.14로 급격히 감소했음. 신장 내 방사선 추적자가 상당히 축적되어 4분에 SUV평균 14.8±2.8까지 상승했고, 이후 방사선 추적자가 낭골신장 요관에서 방광으로 이동했음. 20분 시점에 신장 내 축적은 SUV평균 9.6±1.1이었음. 따라서 신장이 이 방사선 추적자의 주요 제거 기관으로 간주되었음. 췌장과 침샘 내 축적은 20분 시점에 각각 SUV평균 13.0±1.2와 SUV평균 7.0±1.8이었음. 췌장과 침샘에 상당한 축적은 [¹¹C]메티오닌과 같은 아미노산 PET 추적자와 유사함. 20분 영상에서 간 내 축적은 SUV평균 5.1±0.5였음. 담관으로의 방사선 추적자가 이동하는 일은 거의 없었음. 뇌와 폐의 흡수는 약했으며, SUV평균 20분에 각각 0.16±0.02와 0.57±0.08이었음. MIRD 방법을 기반으로 한 평균 전신 유효 용량은 5.08±0.32 μ Sv/MBq로, 370MBq 투여 시 약 1.88±0.12 mSv로 추정됨. [3-¹¹C]AIB.

4. 결론: [3-¹¹C]AIB PET는 적절한 방사선 흡수 선량과 투여 시 부작용 없이 만족스러운 화질을 제공했음. 따라서 종양학 영상 촬영에 유용할 잠재력을 가지고 있음.



<그림> 기관별 α -아미노이소부티르산(Aib)

② α -aminoisobutyric acid의 췌장 축적에 의한 독성

- α -aminoisobutyric acid의 췌장 축적에 의한 췌장염 발생 기전에 대한 연구는 없음. 그러나 비대사성 amino acid의 췌장 축적 급성 췌장염을 유발하는 것으로 확인됨.
- 췌장에 비표준 아미노산 또는 염기성 아미노산이 축적되면 급격한 소포체 교란, 칼슘 독립성 미토콘드리아 손상, 대규모 액차세포 사멸로 인해 심각한 세포 스트레스를 유발하고 급성 췌장염을 유발함(Zhang 등, 2019; Kui 등, 2014).
- 펩타이드 구조: 별도의 생화학적 맥락에서, Aib 잔기는 췌장 섬 기능 장애와 관련된 아밀

라아제/아밀로이드 집합체를 표적으로 하거나 교란하도록 설계된 유전자 조작 펩타이드에서 나선 유도 특성으로 연구됨(Gilead, 등, 2004).

- 다음과 같이 아미노산의 축적에 의한 췌장 독성의 기전이 제시됨(Zhang 등, 2019; Kui 등, 2014)
 1. **고단백 합성:** 췌장 소엽세포는 매우 빠른 속도로 소화 효소를 합성하고 아미노산을 강하게 축적하여 독성 아미노산 급증에 독특하게 취약함(Zhang 등, 2019)
 2. **세포기관 손상:** 과도한 염기성 아미노산은 소포체의 초기 초기적 초기구조적 결함과 심각한 칼슘 독립적 미토콘드리아 손상을 일으킴(Zhang 등, 2019);
 3. **효소 활성화:** 세포 내 스트레스는 아시나르 세포 내에서 트립시노겐의 부적절한 활성화를 유발하여 자기소화와 세포 공포화를 유발함(Olga 등, 2022)
 4. **체계적 대응:** 높은 국소 독성은 빠른 조직 부종, 염증성 세포 침윤, 지방 괴사, 심각한 전신 대사 합병증을 초래(Kui 등, 2014)

4. 비만치료제 Mounjaro에 의한 췌장염을 포함한 부작용의 극복 방안

- **Tirzepatide**의 생체이용률은 약 80%로 대단히 높고 혈청 최고 수치에 도달하는데 걸리는 시간은 8시간에서 72시간 사이임. 반감기는 5일로 상당히 긴 편임(Farzam 등, 2024).
- PK 정보를 이용하여 α -aminoisobutyric acid를 비롯하여 염기성 아미노산의 축적을 예방하는 연속적인 처방 시간 조절의 필요성 있음.

<참고문헌>

Olga A. Mareninova, Dustin L. Dillon, Carli J.M. Wightman, Iskandar Yakubov, Toshimasa Takahashi, Herbert Y. Gaisano, Keith Munson, Masaki Ohmuraya, David Dawson, Ilya Gukovsky, Anna S. Gukovskaya, Rab9 Mediates Pancreatic Autophagy Switch From Canonical to Noncanonical, Aggravating Experimental Pancreatitis, Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, Volume 13, Issue 2, 2022, Pages 599-622, ISSN 2352-345X

Kui, B., Balla, Z., Végh, E. et al. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. Lab Invest 94, 138–149 (2014).

Zhang X, Jin T, Shi N, Yao L, Yang X, Han C, Wen L, Du D, Szatmary P, Mukherjee R, Liu T, Xia Q, Criddle DN, Huang W, Chvanov M, Sutton R. Mechanisms of Pancreatic Injury Induced by Basic Amino Acids Differ Between L-Arginine, L-Ornithine, and L-Histidine. Front Physiol. 2019 Jan 15;9:1922.

Landor LAI, Bratbak G, Larsen A, Tjendra J, Våge S. Differential toxicity of bioorthogonal non-canonical amino acids (BONCAT) in Escherichia coli. J Microbiol Methods. 2023 Mar;206:106679.

Castro, T.G.; Melle-Franco,M.; Sousa, C.E.A.; Cavaco-Paulo, A.;Marcos, J.C. Non-Canonical AminoAcids as Building Blocks forPeptidomimetics: Structure, Function,andApplications. Biomolecules 2023,13, 981.

M. H. Rich, K. E. O'Connor, and T. Narancic, in Amino Acids, Peptides and Proteins: Volume 44, ed. M. Ryadnov and F. Hudecz, The Royal Society of Chemistry, 2020, vol. 44, pp. 44-63.

Rodgers KJ. Evidence that non-cognate proteinogenic amino acids generate immunogenic neoepitopes. J Biol Chem. 2026 Apr;302(4):111349.

Lepthien, S., Wiltschi, B., Bolic, B. et al. In vivo engineering of proteins with nitrogen-containing tryptophan analogs. Appl Microbiol Biotechnol 73, 740–754 (2006).

Gilead, S. and Gazit, E. (2004), Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Peptide Analogues Modified with α -Aminoisobutyric Acid. Angewandte Chemie, 116: 4133-4136.

Iwamoto Y, Williams JA. Inhibition of pancreatic alpha-aminoisobutyric acid uptake by cholecystokinin and other secretagogues. Am J Physiol. 1980 May;238(5):G440-4.

Kentaro Tamura, Ryuichi Nishii, Kotaro Tani, Hiroki Hashimoto, Kazunori Kawamura, Etsuko Imabayashi, Kana Yamazaki, Tatsuya Higashi. A First-in-Human Study of [3-11C] AIB PET/CT, a novel PET amino acid tracer. Journal of Nuclear Medicine Jun 2023, 64 (supplement 1) P1305;

Khashayar Farzam; Preeti Patel. Tirzepatide. National Library of Medicine. 2024

130. 유한양행의 Lazertinib vs HLB의 Rivoceranib의 병용요법에서 저분자 합성물질의 선택에 있어서 우선 고려할 사항

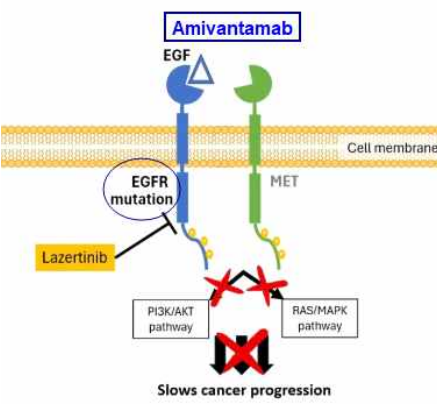
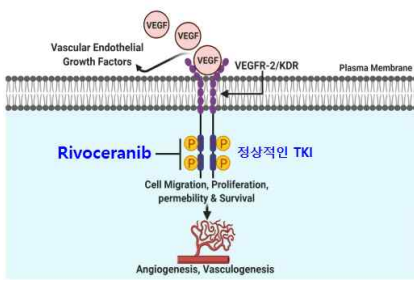
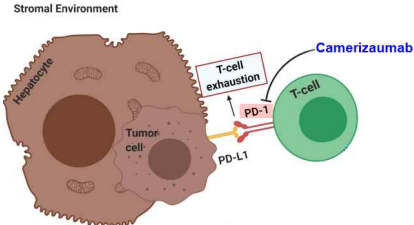
- 본 고찰은 항암 치료를 위한 병용요법 개발에서 치료 기법 및 암의 상황 등을 고려하여 어떤 특성을 가진 저분자 합성물질을 선택할 것인가에 대한 정보를 제공할 수 있습니다. 또한 ADC(antibody-drug conjugate)에도 이와 같은 선택성을 어느 정도 적용이 가능할 것으로 사료됩니다.

1. Lazertinib과 Rivoceranib의 차이점

- Lazertinib과 Rivoceranib의 공통점은<표>의 Drug class에서처럼 **EGFR**(Epidermal Growth Factor Receptor, 상피세포 성장인자 수용체)와 VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, 혈관내피성장인자 수용체 2)의 세포막 내쪽에 위치한 receptor tyrosine kinase(RTK)의 활성 억제제 역할을 통한 항암 효능을 가진다는 점.
- 가장 큰 차이는 Lazertinib은 CYP3A4에 의해 대사되어 친전자성대사체로 전환되어 돌연변이된 EGFR의 recptor tyrosine kinase(RTK)와 **비가역적-공유결합**, 반면에 Rivoceranib은 그 자체 또는 극성대사체로 전환되어 정상적인 VEGFR-2의 recptor tyrosine kinase(RTK)와 **수소결합이나 소수성 상호작용의 가역적-비공유 결합**

<표> Lazertinib과 Rivoceranib의 차이점

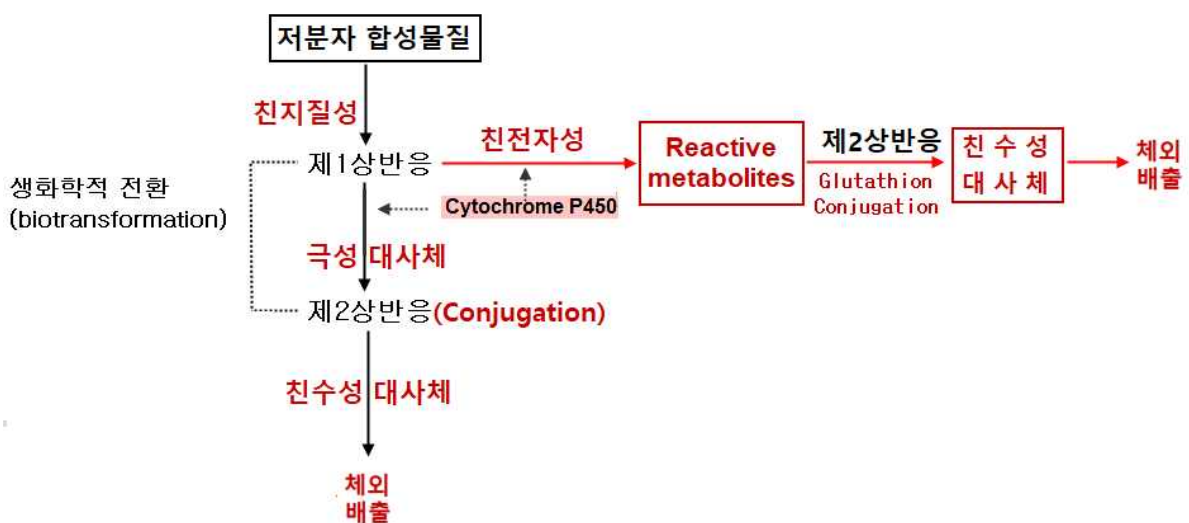
비교 항목	유한양행의 Lazertinib	HLB의 Rivoceranib
적응증	<ul style="list-style-type: none"> 상피세포 성장인자 수용체(EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) 변이 비소세포폐암 1차 치료제 	<ul style="list-style-type: none"> 간암 1차 치료제
Drug Class	<ul style="list-style-type: none"> Third-generation irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) 	<ul style="list-style-type: none"> Selective VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, (혈관 내피 성장 인자 수용체 2) tyrosine kinase inhibitor (TKI)
Target Receptor	<ul style="list-style-type: none"> EGFR (specifically mutant forms including T790M, L858R, and exon 19 deletions) 	<ul style="list-style-type: none"> VEGFR-2
병용요법 항체 및 분류	<ul style="list-style-type: none"> Amivantamab EGFR/MET 표적 이중항체 	<ul style="list-style-type: none"> Camrelizumab PD-1 면역관문억제제 (면역항암제)
Mechanism of action	<ul style="list-style-type: none"> 세포막 외 영역의 EGF에 Amivantamab의 결합 및 세포막 내에 존재하는 돌연변이를 가진 TKI에 결합하여 돌연변이형 EGFR-TKI에 대한 높은 선택성으로 암세포 성장의 신호전달체계를 차단하여 암세포 성장 억제 	<ul style="list-style-type: none"> 혈관 신생을 담당하는 핵심 수용체인 VEGFR-2 TK를 매우 선택적이고 강력하게 억제하여 혈관생성 억제

		 <ul style="list-style-type: none"> 간암세포의 표면에 'PD-L1'이 T-cell의 PD-1과 결합하여 T-cell 불활성화. Camrelizumab은 PD-1에 결합하여 T-cell에 의한 암세포 공격하여 항암 효능 
TKI에 결합 방법	<ul style="list-style-type: none"> 비가역적 공유결합 	<ul style="list-style-type: none"> 가역적 비공유결합(ex: 수소결합이나 소수성 상호작용)
대사 효소	<ul style="list-style-type: none"> CYP3A4 	<ul style="list-style-type: none"> CYP3A4/5
대사 후 metabolic activation	<ul style="list-style-type: none"> 친전자성 reactive metabolite 	<ul style="list-style-type: none"> 극성 → 친수성 대사체

2. Lazertinib의 비가역적-공유결합과 Rivoceranib의 가역적-비공유 결합과 의미

2-1) 저분자의 체외 배출까지의 Biotransformation(생화학적 전환)

- 저분자 합성물질이 체내에 들어오면 <그림-1>과 같이 효소에 의한 생화학적 전환 (Biotransformation) 즉, 제1상반응으로 친지질성에서 극성대사체 그리고 제1상반응으로 친수성대사체로 전환되어 체외로 전환되어 배출됨.
- 대부분의 독성이 없는 저분자 합성물질은 친지질성→극성→친수성으로 전환되어 체외배출됨. 이때 독성이 없다는 것은 제1상반응의 cytochrome P450에 의한 극성대사체 생성 후 내인성 물질인 당유도체, 황산, 아세트기, 메틸기, 아미노산 등이 결합하여 친수성으로 전환하는 포합반응으로 추정 가능함.
- 반면에 체내에서 독성을 유발하는 저분자 합성물질은 cytochrome P450에 의해 친전자성 (electrophilic)을 띠는 활성중간대사체(reactive metabolite 또는 reactive intermediate)로 전환하여 전자가 풍부한 단백질, 아미노산 또는 DNA 염기와 결합함. 이와 같은 친전자성의 활성중간대사체(친전자성대사체)를 제거하는 유일한 물질은 glutathione(GSH)에 의한 포합반응(conjugation)이며 단지 간에서만 생성되어 간이 해독이 중심기관이 되는 이유임. 따라서 생체에서 독성을 유발하는 과정은 친지질성→친전자성→단백질 및 DNA 염기와 분리되지 않은 비가역적 공유결합(irreversible covalent bond)을 유발함. 결과적으로 생체 및 생체 내 세포 독성을 유발할 수 있는 물질의 유무를 확인하는 방법은 glutathione과의 포합반응 유무로 확인하는 것임.

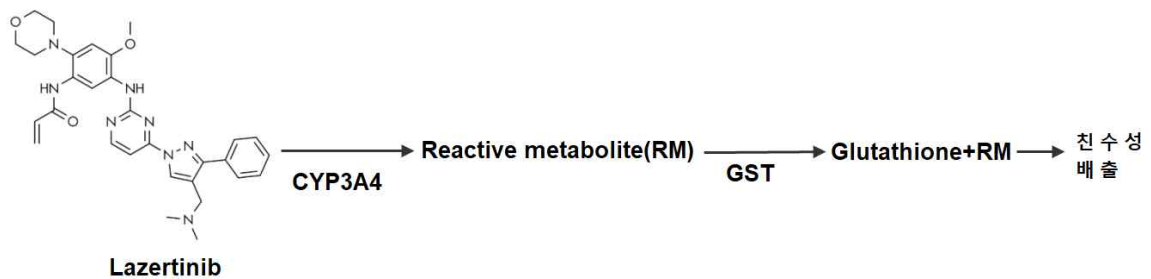


<그림-1> 저분자 합성물질의 체외배출 2 기전

2-2) Lazertinib의 Receptor tyrosine kinase와 비가역적-공유 결합 근거

<근거-1> Lazertinib의 reactive metabolite(활성중간대사체, reactive intermediat)로의 전환

- 효소에 의한 대사에 의한 reactive metabolite로의 전환: 제1상반응의 효소는 CYP3A4이며 제2상반응의 효소는 Glutathione-S-Transferase(GST), 특히 아종인 GST-M1에 의한 glutathione과 포함되어 최종적으로 아래의 <그림-1>과 친수성 대사체로 전환되어 체외 배출되는 것으로 추정됨(Mehta 등, 2025; USFDA, 2024; Dhillon, 2021).



<그림-1> Lazertinib의 enzymatic metabolism을 통한 체외 배출 추정 경로

<근거-2> Lazertinib의 돌연변이형 EGFR-TK에 대한 비가역성 및 공유결합

- Lazertinib의 돌연변이형 EGFR-TK에 대한 결합은 **친전자성으로 비가역성(irreversible)**이루어지고 돌연변이형 EGFR-TK에 대한 선택성은 Figure 3의 노란 부분처럼 T790M/V948R 돌연변이형 EGFR-TK와 **hydrogen bonds**와 **van der Waals** 등을 통해 특이적 결합으로 이루어짐(Heppner 등, 2022; Patel 등, 2025).

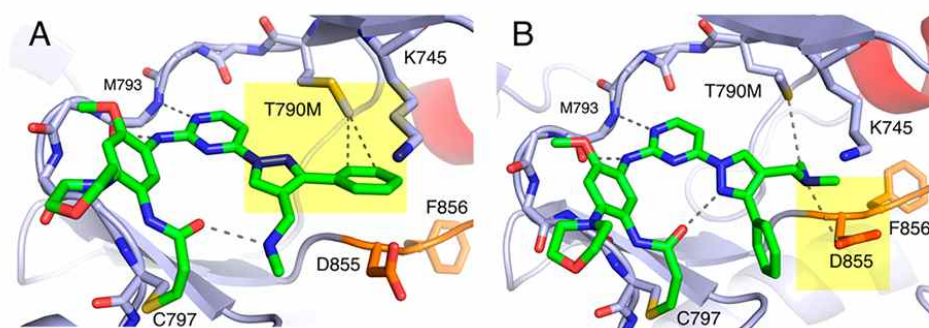


Figure 3. Lazertinib bound to inactive EGFR(T790M/V948R) with distinct conformations. (A) Lazertinib bound with phenyl ring anchored within van der Waals distance to the T790M methionine (~3.8 Å) and methane amine involved in intramolecular H-bonding. (B) A "flipped" conformation with outward phenyl and methyleneamine donating an H-bond to D855. Other interactions seen in this structure include an intramolecular dipole-dipole pyrazole to carbonyl (3.2 Å) as well as a van der Waals methyleneamine methyl to thioether (3.8 Å). P-loop cartoon removed for clarity. (PDB ID 7UKW).

<2-2 결론>

- Lazertinib은 CYP3A4에 의해 친전자성의 reactive metabolite로 전환되어 RTK와 공유결합을 통해 분리되지 않은 비가역성의 특성을 가짐.
- 이는 결과적으로 세포막 외부의 수용체인 상피세포 성장인자 수용체(EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor)에 Amivantamab이 결합하여 암세포의 세포주기를 억제함.
- 그러나 EGFR과 세포막 내부와 연결되어 있는 receptor tyrosine kinase(RTK)가 돌연변이 이라면 Amivantamab의 약리작용이 무력화됨. 따라서 돌연변이된 RTK에 대한 저해제가 필요함. 이때 저해제가 가역적이라면 다시 분리되어 암세포의 증식을 억제하지 못함. 따라서 돌연변이 RTK에 비가역적인 공유결합이 이루어져야 함. 특히 이와 같은 돌연변이 RTK에 대한 비가역적 공유결합은 암세포 특이적이기 때문에 정상세포에 대한 결합력이 없거나 약하여 항암제에 의한 부작용이 감소.
- 이와 같은 돌연변이 RTK의 비가역적 공유결합을 위해 RTK의 저해제는 reactive metabolite로 전환되는 저분자 합성물질로 선택하여야 함.
- 아래의 Figure 1은 EGFR의 RTK 저해제의 화학적 특성 변화를 기반으로 제1세대-제2세대-제3세대로 구분한 것임.
- 여기서 AstraZeneca가 개발한 Osimertinib와 유한양행의 Lazertinib은 RTK의 TK-domain에서 돌연변이가 발생한 T790M 및 T790M에 각각 선택적이면서 공유결합을 통한 비가역성이라는 점(Sattler 등, 2023). 이는 3세대 EGFR inhibitor의 중요한 특성임.

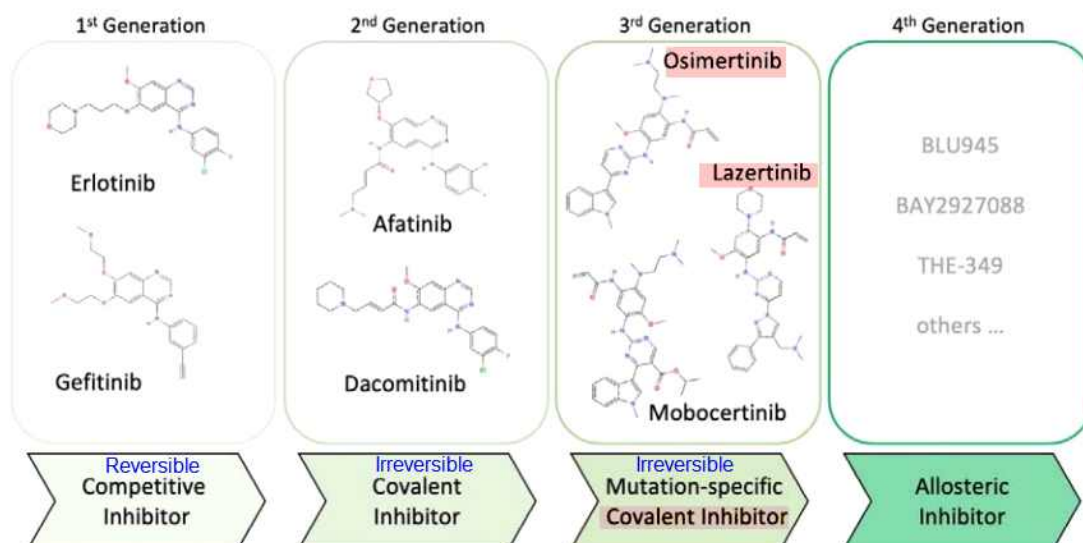
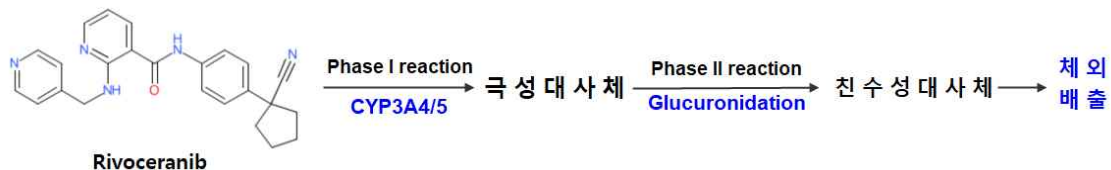


Figure 1. Evolution of EGFR tyrosine kinase inhibitors.

2-3) Rivoceranib의 Receptor tyrosine kinase와 가역적-비공유 결합 근거

<근거-1> Rivoceranib의 극성 및 친수성대사체 전환

- **Rivoceranib**은 cytochrome P450 (CYP)3A4/5에 의해 간에서 대사되며, CYP2D6, CYP2C9 및 CYP2E1에 의해서도 소량으로 대사됨(Weyer, 2023).
- Cytochrome P450에 의해 **Rivoceranib**의 9가지 주요 대사산물인 E-cyclopentyl-3-hydroxylation, Z-cyclopentyl-3-hydroxylation, N-dealkylation, pyridyl-25-N-oxidation, 16-hydroxylation, dioxygenation, O-glucuronidation after 3-hydroxylation 등이 제1상반응(phase I reaction)에 의해 일산화소가 이루어짐(Ding 등, 2013). 또한 이들 대사산물은 Phase II reaction의 **UGT1A4**와 **UGT2B7** 효소에 의해 glucuronidation(글루쿠론화)를 통해 친수성대사체로 전환 후 배출됨(Ding 등, 2013).
- 건강한 지원자를 대상으로 Rivoceranib에 대한 drug-drug interaction을 비롯하여 PK 정보에 대한 임상시험 수행됨. 앞서 언급하였듯이 주로 cytochrome P450 (CYP) 3A4/5에 의해 간에서 대사되며, CYP2D6, CYP2C9 및 CYP2E1도 소량 대사되는 것으로 확인됨(Weyer, 2023).



<그림> Rivoceranib의 제1상반응과 제2상반응을 통한 체외 배출 과정

- 따라서 **Rivoceranib**은 제1상반응의 cytochrome P450에 의하여 극성대사체 전환 후 내인성 물질인 **당유도체**와 포합반응을 통해 체외로 배출됨. 따라서 **Rivoceranib**은 VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)의 세포막 내부에 존재하는 정상적인 tyrosine kinase에 비공유결합을 통해 가역적인 반응을 확인할 수 있음.

<근거-2> Rivoceranib와 다른 VEGFR-2 tyrosine kinase 억제제와 비교

- Rivoceranib와 같이 pazopanib, sorafenib, 그리고 sunitinib 등도 VEGFR-2 tyrosine kinase 억제제로 비공유-비친전자성 다표적 저해제(reversible, non-covalent multi-targeted tyrosine kinase inhibitors)로 확인됨(Que 등, 2018, Irfan 등, 2025). <참고자료-1>에서처럼 이들 저해제는 tyrosine kinase의 ATP-binding site에 수소결합(hydrogen bonds)의 비공유결합을 통한 가역적 반응을 확인됨(Gotink 등, 2010).

<참고자료-1> Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis*. 2010 Mar;13(1):1-14.

Modes of tyrosine kinase inhibitor binding: Most small-molecule kinase inhibitors discovered to date compete with ATP. The chemical structure of ATP is shown in Fig. 4a. ATP consists of adenosine, composed of an adenine ring and a ribose sugar, and three phosphate groups. Binding of ATP to a kinase is characterized by the formation of hydrogen bonds from the adenine ring to the ATP-binding cleft of the kinase. Kinase inhibitors can target (nearby) the ATP-binding site of a kinase. The ATP-binding site is common to all protein kinases, and selectivity of kinase inhibitors is engineered by the chemical structure which is not similar to the ATP structure. The chemical structures of the anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitor listed in Table 1 are shown in Fig. 4b. Elements of some compounds can be compared to elements of ATP. For example, the adenine ring of ATP, which **forms hydrogen bonds to the kinase, is in more or lesser similarity seen in pazopanib, vatalanib, and axitinib.**

<결론 2-3>

- VEGF-A(Vascular Endothelial Growth Factor A)는 세포막 외부 영역의 VEGFR-2(혈관 내피 성장 인자 수용체 2) 활성화를 통한 신생혈관 생성을 유도함(Abhinand 등, 2016). 그러나 Rivoceranib은 VEGFR-2의 세포질 도메인인 정상적인 tyrosine kinase 활성을 저해하여 신생혈관 생성을 억제함. 이와 같은 억제는 암조직에서 혈관 형성을 억제하여 영양분의 차단으로 종양성장을 억제함.
- Rivoceranib은 VEGFR-2의 tyrosine kinase에 대한 비공유결합의 수소결합을 통해 결합 후 분리되는 가역성 결합이 이루어짐. 암조직과 연결되는 혈관생성과 관련된 VEGFR-2의 세포질 내의 특정 돌연변이 R1051Q와 D1052N tyrosine kinase가 존재하여 환자의 생존율을 감소시킬 수 있음. 그러나 이와 같은 사례는 매우 희귀함(Chuah 등, 2009; Grillo 등, 2021).
- 결론적으로 VEGFR-2의 정상적인 Tyrosine kinase에 비가역적 공유결합을 유도하는 reactive metabolite(친전자성대사체, 또는 활성중간 대사체)로 전환되는 저분자 합성물질일 경우에 암세포보다 정상세포에 더 큰 영향을 주게 됨. 따라서 일시적으로 VEGFR-2의 Tyrosine kinase에 결합하여 분리되는 비가역성 비공유결합의 저분자 합성물질의 저해제가 필요함.

3. 병용요법에서 저분자 합성물질의 선택성에서 고려할 요인에 대한 결론

3-1) Lazertinib의 reactive metabolite에 대한 선택성

- 암세포의 증식을 유도하는 EGFR 활성이 항체에 의해 저해되더라도 EGFR의 세포질 receptor tyrosine kinase(RTK)에 돌연변이가 있다면 암세포 증식이 이루어짐.
- 따라서 암세포의 돌연변이 RTK에 특이적으로 결합이 가능하고 공유결합을 통한 비가역적인 저분자 합성물질의 약물이 요구됨. 공유결합을 통한 비가역적인 저분자 합성물질은 cytochrome P450의 생화학적 전환으로 생성되는 reactive metabolite의 전구물질이어야 함. Reactive metabolite의 친전자성은 단백질 및 DNA의 염기 부위와 공유결합하여 분리가 되지 않아 암세포의 증식을 억제함.
- 특히 돌연변이 RTK에 특이성이 없다면 정상세포의 RTK에 결합하여 환자의 부작용은 더욱 심화될 수 있음. 반면에 돌연변이 RTK에 비공유결합을 하면 분리되어 가역성으로 암세포 증식을 억제하기가 어려움.

- 따라서 Lazertinib은 비가역성 공유결합이 가능한 저분자 합성물질

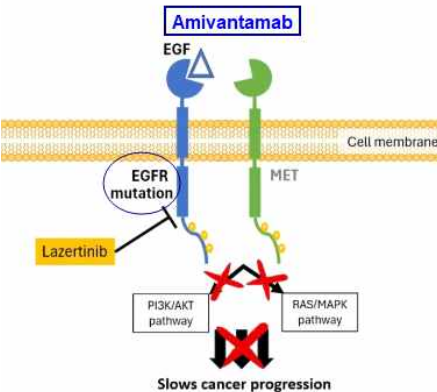
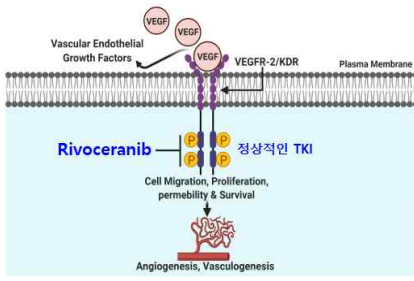
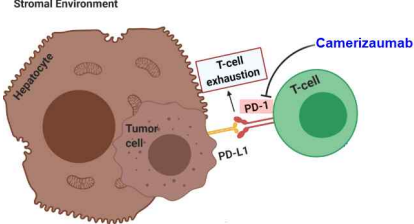
3-2) Rivoceranib의 가역적-비공유 결합에 대한 선택성

- HLB의 Rivoceranib은 암세포에 직접적으로 작용하여 증식을 억제하는 약물이 아니며 암세포 및 암조직으로 형성되는 신생혈관 생성의 차단 및 영양공급을 저해함으로 암세포 증식을 억제하는 기전.
- 따라서 비가역적 공유결합으로 암조직으로 연결되는 VEGFR-2의 세포질 tyrosine kinase에 결합하면 암세포 사멸을 유도할 수 있음. 그러나 정상세포에도 큰 영향을 주어 암세포의 치료에 대한 이익보다 환자 생명에 더 치명적일 수 있음. 특히 EGFR의 세포질 receptor tyrosine kinase의 돌연변이처럼 암세포와 연관된 VEGFR-2의 세포질 tyrosine kinase에서는 돌연변이가 희귀함.
- 따라서 정상세포에 대한 영향을 최소화하고 항암적 효능을 위해서는 VEGFR-2의 세포질 tyrosine kinase에 대한 비공유결합에 의한 가역성의 특성을 가진 저분자 합성물질이 요구됨.

3-3) 다음의 <표>는 Lazertinib과 Rivoceranib의 차이점에 대한 요약한 것임

<표> Lazertinib과 Rivoceranib의 차이점

비교 항목	유한양행의 Lazertinib	HLB의 Rivoceranib
적응증	<ul style="list-style-type: none"> • 상피세포 성장인자 수용체(EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) 변이 비소세포폐암 1차 치료제 	<ul style="list-style-type: none"> • 간암 1차 치료제
Drug Class	<ul style="list-style-type: none"> • Third-generation irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) 	<ul style="list-style-type: none"> • Selective VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, (혈관 내피 성장 인자 수용체 2) tyrosine kinase

		inhibitor (TKI)
Target Receptor	<ul style="list-style-type: none"> EGFR (specifically mutant forms including T790M, L858R, and exon 19 deletions) 	<ul style="list-style-type: none"> VEGFR-2
병용요법 항체 및 분류	<ul style="list-style-type: none"> Amivantamab EGFR/MET 표적 이중항체 	<ul style="list-style-type: none"> Camrelizumab PD-1 면역관문억제제 (면역항암제)
Mechanism of action	<ul style="list-style-type: none"> 세포막 외 영역의 EGF에 Amivantamab의 결합 및 세포막 내에 존재하는 돌연변이를 가진 TKI에 결합하여 돌연변이형 EGFR-TKI에 대한 높은 선택성으로 암세포 성장의 신호전달체계를 차단하여 암세포 성장 억제 	<ul style="list-style-type: none"> 혈관 신생을 담당하는 핵심 수용체인 VEGFR-2 TK를 매우 선택적이고 강력하게 억제하여 혈관생성 억제  <ul style="list-style-type: none"> 간암세포의 표면에 'PD-L1'이 T-cell의 PD-1과 결합하여 T-cell 불활성화. Camrelizumab은 PD-1에 결합하여 T-cell에 의한 암세포 공격하여 항암 효능 
TKI에 결합 방법	<ul style="list-style-type: none"> 비가역적 공유결합 	<ul style="list-style-type: none"> 가역적 비공유결합(ex: 수소결합이나 소수성 상호작용)
대사 효소	<ul style="list-style-type: none"> CYP3A4 	<ul style="list-style-type: none"> CYP3A4/5
대사 후 metabolic activation	<ul style="list-style-type: none"> 친전자성 reactive metabolite 	<ul style="list-style-type: none"> 극성 → 친수성 대사체

<참고문헌>

Chuah, B. Y. S., Yeo, W. L., Guo, J. Y., Lim, S. G., Yap, H. L., Goh, B. C., & Lee, S. C. (2009). Lack of somatic mutations in VEGFR-2 tyrosine kinase domain in hepatocellular carcinoma. *Acta Oncologica*, 48(4), 628–630.

Elisabetta Grillo, Michela Corsini, Cosetta Ravelli, Luca Zammataro, Marina Bacci, Andrea Morandi, Eugenio Monti, Marco Presta, Stefania Mitola, Expression of activated VEGFR2 by R1051Q mutation alters the energy metabolism of Sk-Mel-31 melanoma cells by increasing glutamine dependence, *Cancer Letters*, Volume 507, 2021, Pages 80-88, ISSN 0304-3835.

Abhinand CS, Raju R, Soumya SJ, Arya PS, Sudhakaran PR. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal*. 2016 Dec;10(4):347-354.

Irfan, A., Al-Hussain, S.A., Khalid, T. *et al.* Recent advances in clinically approved nitrogenous heterocycle-based drugs and EGFR Tyrosine kinase inhibitors for precision oncology (2020–2024): a review. *J. Saudi Chem. Soc.* 29, 39 (2025).

Que Y, Liang Y, Zhao J, Ding Y, Peng R, Guan Y, Zhang X. Treatment-related adverse effects with pazopanib, sorafenib and sunitinib in patients with advanced soft tissue sarcoma: a pooled analysis. *Cancer Manag Res*. 2018 Jul 19;10:2141-2150.

Trenker R, Jura N. Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Curr Opin Cell Biol*. 2020 Apr;63:174-185.

Sattler, Martin & Mambetsariev, Isa & Fricke, Jeremy & Tan, Tingting & Liu, Sariah & Vaidehi, Nagarajan & Pisick, Evan & Mirzapozova, Tamara & Rock, Adam & Merla, Amartej & Sharma, Sunil & Salgia, Ravi. (2023). A Closer Look at EGFR Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer through the Lens of Precision Medicine. *Journal of Clinical Medicine*. 12. 1936.

Dhillon, S. Lazertinib: First Approval. *Drugs* 81, 1107–1113 (2021).

Patel KB, Heppner DE. Lazertinib: breaking the mold of third-generation EGFR inhibitors. *RSC Med Chem*. 2025 Jan 7;16(3):1049-1066.

USFDA HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. LAZCLUZE™ (lazertinib) tablets, for oral use Initial U.S. Approval: 2024

Mehta J, Thompson C, Scheers E, Leclercq L, Jang SB, Kim DK, Haddish-Berhane N, Hellemans P, Jiao JJ, Clemens PL. Clinical Pharmacokinetic Assessment of Lazertinib in Healthy Adult Participants: Effects of GSTM1 Genotype. *Clin Drug Investig*. 2025 Dec;45(12):935-944.

Marie-Noëlle Paludetto, Jean-Luc Stigliani, Anne Robert, Vania Bernardes-Génisson, Etienne Chatelut, Florent Puisset, Cécile Arellano; Involvement of Pazopanib and Sunitinib Aldehyde Reactive Metabolites in Toxicity and Drug–Drug Interactions *in Vitro* and in Patient Samples. *Chem. Res. Toxicol*. 21 January 2020; 33 (1): 181–190.

McGill MR, Kaufman YJ, LoBianco FV, Schleiff MA, Aykin-Burns N, Miller GP. The role of cytochrome P450 3A4-mediated metabolism in sorafenib and lapatinib hepatotoxicity. *Livers*. 2023 Jun;3(2):310-321.

Maillard M, Arellano C, Vachoux C, Chevreau C, Cabaton NJ, Pont F, Saint-Laurent N, Lafont T, Chatelut E, Thomas F. Biological Role of Pazopanib and Sunitinib Aldehyde Derivatives in Drug-Induced Liver Injury. *Metabolites*. 2022 Sep 11;12(9):852.

Iacopetta, D.; Ceramella, J.; Catalano, A.; Scali, E.; Scumaci, D.; Pellegrino, M.; Aquaro, S.; Saturnino, C.; Sinicropi, M.S. Impact of Cytochrome P450 Enzymes on the Phase I Metabolism of Drugs. *Appl. Sci*. 2023, 13, 6045.

Ding J, Chen X, Gao Z, Dai X, Li L, Xie C, Jiang H, Zhang L, Zhong D. Metabolism and pharmacokinetics of novel selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor apatinib in humans. *Drug Metab Dispos*. 2013 Jun;41(6):1195-210.

Cella D, Beaumont JL. Pazopanib in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol*. 2016 Feb;8(1):61-9.

Heudel P, Cassier P, Derbel O, Dufresne A, Meeus P, Thiesse P, Ranchère-Vince D, Blay JY, Ray-Coquard I. Pazopanib for the treatment of soft-tissue sarcoma. *Clin Pharmacol*. 2012;4:65-70

Zosia Chustecka. Fatal Adverse Events with Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib. *Medscape Medical News & Oncology News*. February 09, 2012

131. 오가노이드 평가 결과와 실제 임상 결과의 사이 일치율

1. 의미

- 현재까지 대표적인 인체-기반 시험법(New approach methoda, NAM)의 일종인 organoid에 대한 임상 결과와의 일치율에 대한 연구 논문이 없음. 따라서 본 논문은 NAM의 미래에 대한 긍정성을 어느 정도 확인이 가능하다고 할 수 있음. 특히 본 논문은 환자의 결과 그리고 환자-유래 오가노이드(Patient-derived organoid ,POD) 결과와 더불어 환자-유래 이종이식(patient-derived xenograft, PDX) 결과와의 비교가 이루어져 PDO vs PDX의 결과 임상 결과의 비교도 미래의 NAM과 동물실험의 방향성도 어느 정도 예측이 가능함.
- 소개되는 논문은 다음과 같으며 고형 종양 전반에 걸쳐 후향적이고 일치된 환자-PDX 및 환자-PDO 치료 반응 데이터를 체계적으로 검토하고 메타분석을 수행하여 이 모델들의 예측 성능을 비교하였음.
- Romero JM, Magrill J, Kalashnikov N, Luo YZ, Chen OJ, Busque S, Ma R, Atallah A, Lazaratos AM, Mendelson D, Wilson L, Deshmukh S, Taifour T, Sorin M, Arthur I, Kuasne H, Levett JY, Wang Y, Seufferlein T, Kleger A, Gout J, Michels AK, Brugarolas J, Poshusta ZS, Hogenson TL, Fernandez-Zapico ME, Hamada A, Yagishita S, Kryeziu K, Lothe RA, Nichols A, Barrett JW, Papaccio F, Castillo J, Inoue M, Massfelder T, Lang H, Lindner V, Nilsson J, Dantes Z, Seppanen H, Wells GA, Kim SH, Ittmann MM, Villanueva H, Lerner SP, Sikora AG, Theillet C, Huang DQ, Khuong-Quang DA, Yeung JC, Park M, Siegel PM, Watson IR, Zogopoulos G, Rose AAN, Dankner M. Comparative analysis of patient-derived organoids and patient-derived xenografts as avatar models for predicting response to anti-cancer therapy. Cancer Treat Rev. 2026 Sep;149:103190.

2. PDO vs PDX의 이해

- **환자 유래 이종이식(PDX, Patient-Derived Xenograft)**과 **환자 유래 오가노이드(PDO, Patient-Derived Organoid)**는 암 환자의 종양 조직을 활용하여 **개인 맞춤형 정밀 의료와 신약 개발**을 이끄는 핵심 전임상 모델임
- **PDX**는 면역결핍 마우스에 환자의 암 조직을 직접 이식하므로, 암세포가 자라나는 실제 체내 환경(혈관 형성, 종양 미세환경)을 가장 잘 모방한 모델이며(Shogen 등, 2026; Gayibov 등, 2025), **PDO**는 환자의 종양 조직에서 추출한 세포를 3D in vitro 배양법으로 키워내어, 환자 종양 고유의 유전체 구조와 구조적 특징을 그대로 유지한 모델(Choi 등, 2025). PDX와 PDO의 장단점은 다음의 <표>와 같음.

<표> PDX vs PDO의 간략 비교

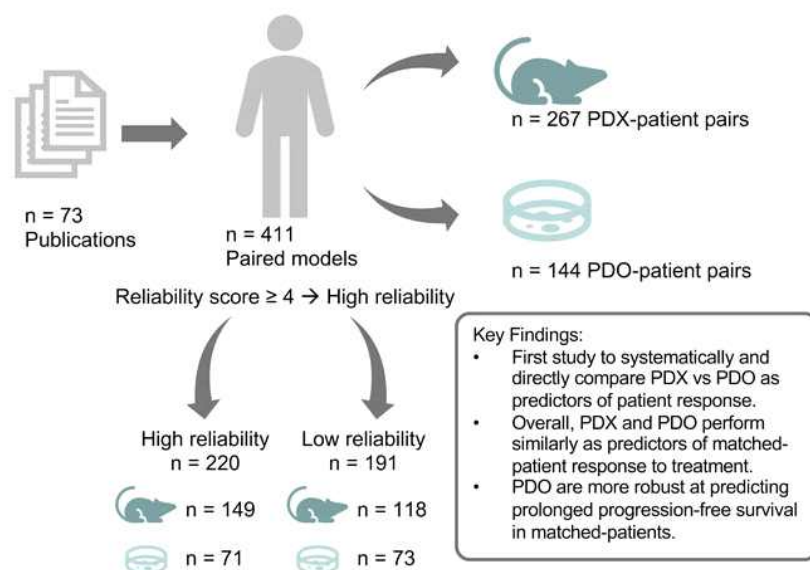
구분	환자 유래 이종이식 (PDX, Patient-Derived Xenograft)	환자 유래 오가노이드 (PDO, Patient-Derived Organoid)
개념	환자의 암 조직을 면역 결핍 마우스 에 이식하여 in vivo에서 키우는 모델	환자의 암세포를 3차원(3D)으로 배양하여 in vitro에서 인공 장기처럼 키우는 모델
환경	In vivo 환경 (실제 복잡한 미세환경 반영)	In vitro 환경 (3D 매트릭스 및 배양액 활용)

종양 미세환경	혈관, 기질 세포 등 실제 생체 내 환경 반영도가 높음	면역 세포나 혈관 등의 미세환경 재현이 제한적임
실험 처리 속도	느림 (종양이 쥐 몸에서 자라는 데 수개월 소요)	빠름 (수주 이내에 배양 및 결과 확인 가능)
대량 스크리닝	불가능 (수많은 약물을 한 번에 테스트하기 어려움)	가능 (초고속 약물 스크리닝(HTS)에 매우 유리)
비용 및 인력	매우 높음 (동물 실험 시설과 지속적인 관리 필요)	상대적으로 낮음 (일반적인 세포 배양 시설 활용)
성공률 및 확장	마우스에 생착되지 않으면 실패, 무한 확장 불가	동결 보존 및 무한 증식 배양(바이오뱅크) 가능

3. 일치율 확인 방법

3-1) 메타분석 방법

- 21,565개의 초록에서 스크리닝 및 데이터 추출을 거친 후, 총 73편의 출판물과 411개의 환자-모델 쌍이 최종 분석에 포함되었음(그림-1). 암 연구 및 정밀 의학 분야에서 '환자-모델 쌍(Patient-Model Pair)'이란, 환자의 종양 조직에서 직접 배양된 활성 실험실 in vitro 및 in vivo 모델과 일치하는 살아있는 인간 환자를 의미함.
- <그림>에서처럼 여기서 동일한 항암제로 치료된 고형종양에서 PDX 또는 PDO를 사용한 연구를 체계적으로 검토하고 메타분석을 수행했으며, 411개의 환자-모델 쌍(267건은 PDX, 144건은 PDO)을 확인했음.



<그림-1> PDO와 PDX의 치료 환자에 대한 반응 일치율

3-2) 상관관계 지표와 편향 평가 지표

- 의료 검사의 성능을 평가하는 데 사용되는 네 가지 핵심 통계 지표가 민감도(sensitivity) 나 특이도(specificity), 양성 예측값(PPV, positive predictive value), 음성 예측값(NPV, egative predictive value)
- 연관성은 편향 평가 지표(Bias Evaluation Metrics: 데이터나 인공지능(AI) 모델이 특정 집단에 대해 불공정하거나 치우친 결과를 내는지 측정하는 정량적 도구)를 적용한 분석

4. 결과

4-1) 코호트 인구 통계

- 환자 유래 이중이식(PDX)과 오가노이드(PDO)는 암 모델링과 일치 환자 치료 반응 예측에 널리 사용됨. 그러나 이들의 **예측 정확도**는 체계적으로 연구되거나 비교되지 않았음.
- 411쌍의 환자-모델 쌍 중 **267쌍(65%)은 PDX**, **144쌍(35%)은 PDO(표-1)**이었음. 모든 환자-모델 쌍에서 **PDX의 대부분은 북미 출신(160/267, 60%)**이었고, **PDO의 대부분은 아시아에서 모델링**되었음(114/144, 79%, 표-1).
- 대부분의 PDX와 PDO는 **전이성 질환 환자**에서 나왔으며, 모델 간 차이는 없었음(136/182 PDX, 75%; 96/113 PDO, 85%, 유의미하지 않음, 무의미).
- **가장 많이 모델링된 암 유형은 대장암**이었고, 그 다음으로 난소암, NSCLC(비세포성세포), 유방암이 뒤를 이었음(그림 2A).
- **대장암은 주로 PDO를 사용해 모델링**되었고(82/102, 80%, $P < 0.001$, 표-1, 그림 2A), **유방암과 난소암은 주로 PDX를 사용해 모델링**되었음(유방암: 28/31, 90%, $P < 0.01$; 난소: 75/77, 97%, $P < 0.001$ 표-1, 그림 2A).
- NSCLC(non-small cell lung cancer, 비소세포폐암)는 PDX와 PDO 모두에서 유사하게 나타났음(PDX 28/49, 57% 대 PDO는 21/49, 43%, 유의미하지 않음(표-1, 그림 2A).
- 대부분의 PDX와 PDO는 **세포독성 화학요법만으로 치료**되었으며, PDX에 비해 **화학요법 단독으로 치료된 PDO가 더 많았음**(PDX 147/267, 55% vs. PDO의 97/144, 67%, $P < 0.05$, 표 1). **이후 표적 치료가 이어졌으나, 모델 간 차이는 없었음**(PDX 87/267, 33%; PDO 35/144, 24%, 노스, 표-1). 45쌍의 환자-모델 쌍이 화학요법과 표적 치료의 병행으로 치료받았다(33/267 PDX, 12%; 12/144 PDO, 8%, 신분증, 표-1).

<표-1> PDX와 PDO 환자 모델 쌍의 코호트 인구통계.

	총	PDX	PDO	P-adj 값
Total	411	267 (65%)	144 (35%)	-
대륙				
북미	172	160 (93%)	12 (7%)	< 0.001
아시아	197	83 (42%)	114 (58%)	< 0.001
유럽	40	24 (60%)	16 (40%)	NS
호주	2	0 (0%)	2 (100%)	NS

성				
남성	159	88 (55%)	71 (45%)	NS
여성	130	87 (67%)	43 (33%)	-
나이, 평균 (최소-최대값)				
	54.34 (1-83)	52.56 (1-79)	57.35 (18-83)	< 0.05
암 진행성 정도				
전이성	232	136 (59%)	96 (41%)	NS
비전이성	63	46 (73%)	17 (27%)	-
암종				
대장항문	102	20 (20%)	82 (80%)	< 0.001
육종	26	26 (100%)	0 (0%)	< 0.001
비소세포암	49	28 (57%)	21 (43%)	NS
난소	77	75 (97%)	2 (3%)	< 0.001
가슴	31	28 (90%)	3 (10%)	< 0.01
췌장	25	20 (80%)	5 (20%)	NS
기타	101	70 (69%)	31 (31%)	NS
치료방법				
화학요법	244	147 (60%)	97 (40%)	< 0.05
표적 치료	122	87 (71%)	35 (29%)	NS
복합 요법	45	33 (73%)	12 (27%)	NS

<암 유형에 대해서는 총 N 기준으로 상위 6개의 암 유형을 보여줌. 괄호 안에 카테고리별 총액 비율이 표시되어 있음. P값은 피셔의 정확 검정(Fisher's exact test)을 사용하여 계산되었으며, 벤자미니-호흐버그 절차(Benjamini-Hochberg procedure)로 계산된 조정 P 값으로 보정되었음. 약어: PDX; 환자 유래 이종이식, PDO; 환자 유래 오가노이드인 NSCLC(non-small cell lung cancer); 비소세포폐암, NS; non significant>

4-2) PDX와 PDO의 치료 맥락에서 예측 성과 지표

4-2-1) PDO 및 PDX의 치료 반응성 일치율

- 다음으로 PDX와 PDO 모델이 특정 치료 맥락에서 환자 결과를 예측할 수 있는 능력을 평가함. 전체 코호트에서 PDX와 PDO는 일치 환자와 비교했을 때 치료 반응성의 일치율을 보였음(PDX (190/267), 71% vs PDO (99/144), 69%, 표-2, 그림 2B).
- 개별 암 유형(최소 3쌍의 환자-PDX 및 -PDO 쌍이 있는 암 조직학 분석), 치료 유형, 성별 또는 병기 내에서 PDX와 PDO 간 일치도에 유의한 차이가 관찰되지 않았음(표-2). 유럽 출신 PDX 환자 쌍은 PDO 환자보다 더 일치하는 것으로 나타났음(표-2).

<표-2> 임상 변수별로 구분된 일치. 전체 코호트, PDX, PDO에 대한 임상 변수 간 일치 비교.

	총				PDX				PDO				PDX vs PDO ratio
	임상시험에서 환자 반응과 일치성				임상시험에서 환자 반응과 일치성				임상시험에서 환자 반응과 일치성				
	총	일치성	비일치성	P-adj 값	총	임상과 일치성	비일치성	P-adj 값	총	임상과 일치성	비일치성	P-adj 값	P-adj 값

모두	411	289 (70%)	122 (30%)	-	267	190 (71%)	77 (29%)	-	144	99 (69%)	45 (31%)	-	NS
대륙													
북미	172	121 (70%)	51 (30%)	NS	160	114 (71%)	46 (29%)	NS	12	7 (58%)	5 (42%)	NS	NS
아시아	197	141 (72%)	56 (28%)	NS	83	55 (66%)	28 (34%)	NS	114	86 (75%)	28 (25%)	< 0.05	NS
유럽	40	26 (65%)	14 (35%)	NS	24	21 (88%)	3 (12%)	NS	16	5 (31%)	11 (69%)	< 0.05	<0.01
호주	2	1 (50%)	1 (50%)	NS	-	-	-	-	2	1 (50%)	1 (50%)	NS	-
성													
남성	159	119 (75%)	40 (25%)	NS	88	68 (77%)	20 (23%)	NS	71	51 (72%)	20 (28%)	NS	NS
여성	130	88 (68%)	42 (32%)	-	87	58 (67%)	29 (33%)	-	43	30 (70%)	13 (30%)	-	-
진행 정도													
전이성	232	162 (70%)	70 (30%)	NS	136	96 (71%)	40 (29%)	NS	96	66 (69%)	30 (31%)	NS	NS
비 전이성	63	49 (78%)	14 (22%)	-	46	39 (85%)	7 (15%)	-	17	10 (59%)	7 (41%)	-	-
암													
대장 항문	102	65 (64%)	37 (36%)	NS	20	11 (55%)	9 (45%)	NS	82	54 (66%)	28 (34%)	NS	NS
육종 (희귀 악 성종양)	26	20 (77%)	6 (23%)	NS	26	20 (77%)	6 (23%)	NS	-	-	-	-	-
비소세 포암	49	40(82%)	9 (18%)	NS	28	24 (86%)	4(14)	NS	21	16 (76%)	5 (24%)	NS	NS
난소	77	49 (64%)	28 (36%)	NS	75	49 (65%)	26 (35%)	NS	2	0 (0%)	2 (100%)	NS	NS
가슴	31	24 (77%)	7 (23%)	NS	28	21 (75%)	7 (25%)	NS	3	3 (100%)	0 (0%)	NS	NS
췌장	25	16 (64%)	9 (36%)	NS	20	14 (70%)	6 (30%)	NS	5	2 (40%)	3 (60%)	NS	NS
기타	101	75 (74%)	26 (26%)	NS	70	51 (73%)	19 (27%)	NS	31	24 (77%)	7 (23%)	NS	NS
치료													
화학 요법	244	172 (70%)	72 (30%)	NS	147	106 (72%)	41 (28%)	NS	97	66 (68%)	31 (32%)	NS	NS

표적 치료제	122	79 (65%)	43 (35%)	NS	87	57 (66%)	30 (34%)	NS	35	22 (63%)	13 (37%)	NS	NS
복합 요법	45	38 (84%)	7 (16%)	NS	33	27 (82%)	6 (18%)	NS	12	11 (92%)	1 (8%)	NS	NS

<암 유형에 대해서는 총 N 기준으로 상위 6개의 암 유형을 보여줌. P값은 피셔의 정확 검정(Fisher's exact test)을 사용하여 계산되었으며, 벤자미니-호흐버그 절차(Benjamini-Hochberg procedure)로 계산된 조정 P 값으로 보정되었음. 약어: PDX; 환자 유래 이종이식, PDO; 환자 유래 오가노이드인 NSCLC(non-smallcell lungcancer); 비소세포폐암, NS; non significant>

4-3) 본 연구에서 응용된 환자-모델 쌍의 암 유형 분포에 대한 이해

① 증개 종양학 및 생물학적 쌍(Translational Oncology & Biological Pairs)

- 환자-모델 쌍(patient-model pairs): 암 연구 및 정밀 의학 분야에서 '환자-모델 쌍이란, 환자의 종양 조직에서 직접 배양된 활성 실험실 모델과 일치하는 살아있는 인간 환자를 의미함.
- PDX/PDO 매칭 쌍: **환자의 종양**을 환자 유래 이종 이식편(PDX - 마우스에서 배양) 또는 환자 유래 오가노이드(PDO - 3차원 실험실 배양에서 배양)와 연결하는 것임. 이를 통해 과학자들은 in vitro 및 in vivo에서 수백 가지의 약물 조합을 동시에 선별하여, 실제 환자를 치료하기 전에 해당 환자의 **유전체 프로파일**에 가장 효과적인 치료법을 검증할 수 있음.
- Pair(쌍)의 중요한 이유: 대규모 국제 이니셔티브—예를 들어 **인간 암 모델 이니셔티브**—믿을 수 있어 **일치된 종양-모델 쌍**. 연구에 따르면 **전체 일치율** 환자와 그들의 매칭된 모델 간의 치료 반응을 통해 의사들이 약물의 작용을 관찰할 수 있게 함. In vitro 및 in vivo 실제 환자에게 투여 전에 이들 모델을 통해 예측의 중요성(Harouni 등, 2026).

② 환자-모델 쌍의 암 유형별 분포와 암종별 일치율 분석

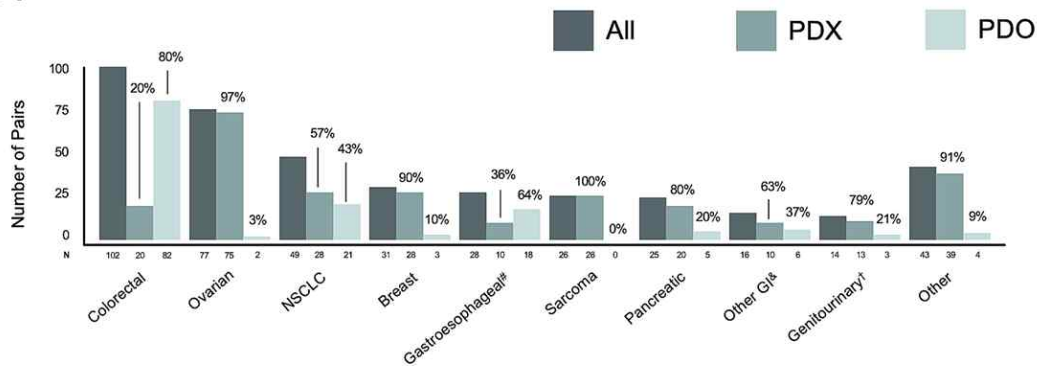
- <그림-2>는 본 연구의 (A)PDX 및 PDO 환자-모델 쌍(patient-model pairs)의 암 유형 분포와 (B) 일치 반응을 가진 환자-모델 쌍(patient-model pairs)의 비율을 나타낸 것임.
- **A) PDX 및 PDO 환자-모델 쌍(patient-model pairs)의 암 유형 분포:** 가장 많이 모델링된 암 유형은 대장암이었으며, 그 다음으로 난소암, 비소세포폐암(NSCLC), 유방암 순이었음 (그림 2A). 대장암은 주로 PDO를 사용하여 모델링되었으며(102건 중 82건, 80%, $P < 0.001$, 표-1, 그림 2A), 반면 유방암과 난소암은 주로 PDX를 사용하여 모델링되었음. (유방암: 28/31, 90%, $P < 0.01$; 난소암: 75/77, 97%, $P < 0.001$, 표-1 그림 2A)를 사용하여 모델링되었다. 비소세포폐암(NSCLC)은 PDX와 PDO 모두에서 비슷한 비율을 보였음 (28/49 PDX, 57% 대 21/49 PDO, 43%, 통계적으로 유의하지 않음 [ns], 표 1, 그림 2A). PDX와 PDO의 대다수는 세포독성 화학요법 단독으로 치료받았으며, PDO에서 화학요법 단독 치료를 받은 비율이 PDX에 비해 더 높았다(PDX 267건 중 147건, 55% 대 PDO 144건 중 97건, 67%, $P < 0.05$, 표 1). 그 다음으로 표적 치료가 뒤를 이었으며, 두 모델 간에는 차이가 없었음. (PDX 267건 중 87건, 33%; PDO 144건 중 35건, 24%, 통계적으로 유의하지 않음 [ns], 표 1). 45쌍의 환자-모델 쌍은 화학요법과 표적 치료의 병용 요법을 받았음(PDX 267건 중 33건, 12%; PDO 144건 중 12건, 8%, 통계적으로 유의하지 않음 [ns], 표 1).
- **B) 일치 반응을 가진 환자-모델 쌍(patient-model pairs)의 비율:** PDX와 PDO는 유사한 예측 성능 지표를 나타냄. 다음으로, 특정 치료 상황에서 PDX 및 PDO 모델이 환자 예후

를 예측하는 능력을 평가했음. 전체 코호트에서, PDX와 PDO는 매칭된 환자군과 비교했을 때 치료 반응도에 대한 일치율이 유사했음(PDX 190/267, 71% 대 PDO 99/144, 69%, 통계적으로 유의하지 않음, 표 2, 그림 2B). 개별 암 유형(환자-PDX 및 환자-PDO 쌍이 각각 최소 3쌍 이상인 암 조직학 유형으로 분석 범위를 제한함), 치료 유형, 성별, 또는 질병 병기별로 PDX와 PDO 간의 일치도에 차이는 관찰되지 않았음(표 2, 그림 2B, 보충 그림 1E 및 F). 유럽에서 수집된 PDX-환자 쌍은 PDO 쌍에 비해 일치도가 더 높은 것으로 나타났음(표 2).

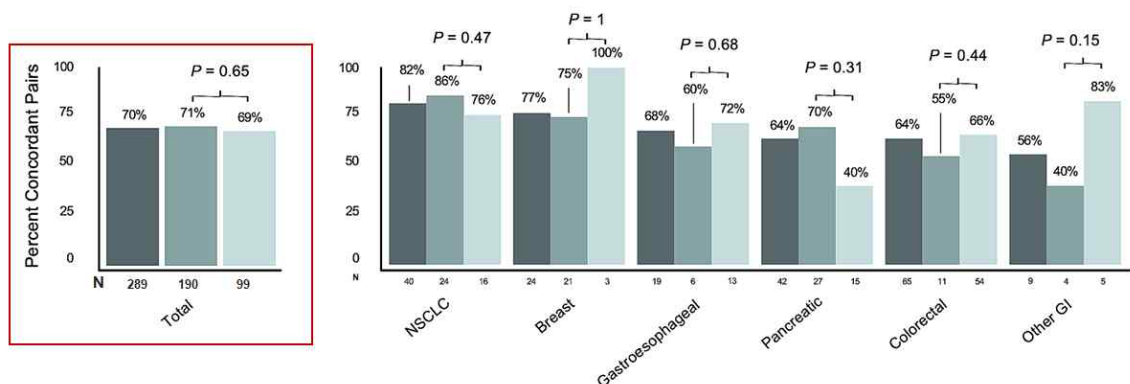
<요약>

- 가장 많이 모델링된 암 유형은 대장암이었으며, 그 다음으로 난소암, 비소세포폐암(NSCLC), 유방암 순이었음. 대장암은 주로 PDO를 사용하여 모델링되었으며, 반면 유방암과 난소암은 주로 PDX를 사용하여 모델링되었음.
- 전체 코호트에서, PDX와 PDO는 매칭된 환자군과 비교했을 때 치료 반응도에 대한 일치율이 유사했음(PDX 190/267, 71% 대 PDO 99/144, 69%, 통계적으로 유의하지 않음).

A



B



<그림-2> 코호트 및 일치율 인구통계 개요. 약어: PDX(patient-derived xenograft); 환자 유래 이종이식, PDO(patient-derived organoid); 환자 유래 오가노이드. NSCLC(non-small cell lung cancer); 비소세포폐암, GI; gastrointestinal.

4-4) 품질 평가 기준의 적용에 의한 PDX와 PDO의 예측 능력 차이 확인 - 고신뢰도(HR, high reliability) 또는 낮은 신뢰도(LR, low reliability)

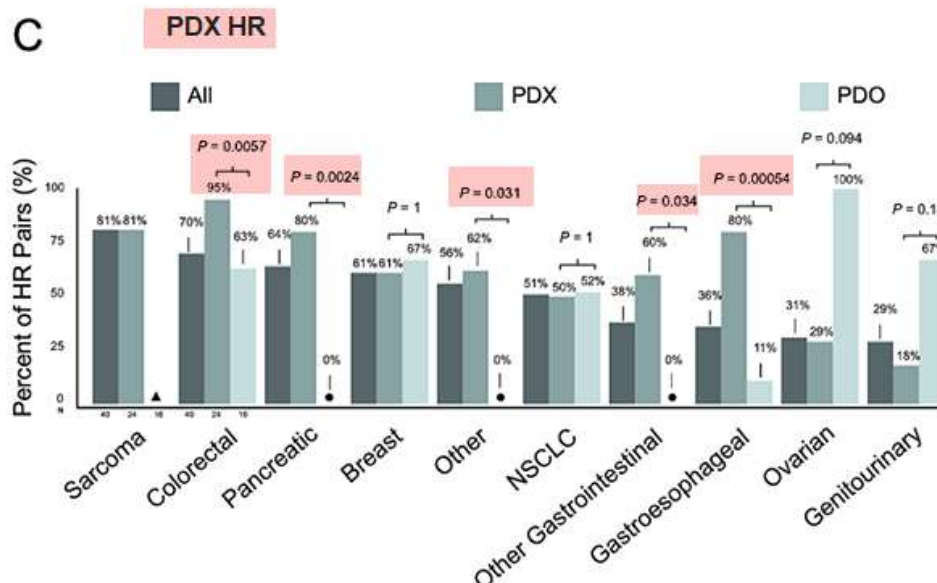
① 품질 평가 기준의 적용의 필요성

- PDX와 PDO 간에 적용, 실험 설계, 비용, 처리량 차이가 존재하므로, 연구가 이러한 요인에 의해 영향을 받을 수 있다고 가정
- 이러한 변수들이 보고된 결과에 미치는 영향을 사후적으로 검토함으로써, 치료 반응 예측에 있어 모델 유용성을 평가하는 향후 전향적 연구를 참고할 수 있는 맥락 특이적 패턴을 식별이 가능함.

② 신뢰성과 편향 위험(Reliability and risk of bias)에 대한 평가 기준: 고신뢰도(HR, high reliability) 또는 낮은 신뢰도(LR, low reliability)

- 이와 같은 목표를 위해 뉴캐슬-오타와 척도의 6기준 점수 체계(6-criterion scoring system from the Newcastle-Ottawa scale)를 적용하여 411개의 개별 환자-모델 쌍(patient-model pairs) 간 신뢰성과 편향 위험(Reliability and risk of bias)을 평가하였음. 이 점수 체계를 사용하여 환자-모델 쌍을 ≥ 4 가지 기준 충족 기준(a cutoff of ≥ 4 criteria)에 따라 고신뢰도(HR, high reliability) 또는 낮은 신뢰도(LR, low reliability)로 분류하여, 220개의 HR과 191개의 LR 환자-모델 쌍을 얻었음(그림 3A, B).

<그림-C> 암 당시 고신뢰도 환자-모델 쌍의 비율: HR(high reliability)과 LR(Low reliability) 쌍 간의 기저 특성 비교 결과, 대장암, 췌장암, 위식도암, 기타 위장관 암 및 기타 암 PDX가 전체 코호트에 비해 HR일 가능성이 더 높았음($P < 0.05$; 그림 3C).



<그림-3C> 암 당시 고신뢰도 환자-모델 쌍의 비율: HR; 고신뢰성, PDX; 환자 유래 이중이식, PDO; 환자 유래 오가노이드인 NSCLC; non-small cell lung cancer 비소세포폐암.

4-5) 품질 평가 기준의 적용에 의한 PDX와 PDO의 예측 능력 차이 확인 - 민감도, 특이도, PPV, NPV

- <그림 4>는 PDX와 PDO를 비교한 예측 통계를 나타낸 것으로 PDX와 PDO의 성과 특성을 이 품질 평가 기준을 사용하여 비교했음.
- 의료 검사의 성능을 평가하는 데 사용되는 네 가지 핵심 통계 지표가 민감도(sensitivity)나 특이도(specificity), 양성 예측값(PPV, positive predictive value), 음성 예측값(NPV, negative predictive value)은 공식은 다음과 같음.

- 민감도(sensitivity)나 특이도(specificity), 양성 예측값(PPV, positive predictive value), 음성 예측값(NPV, negative predictive value)

	실제 질병 있음 (Positive)	실제 질병 없음 (Negative)
검사 결과 양성 (+)	진양성 (True Positive, TP) 환자를 환자로 잘 진단함	위양성 (False Positive, FP) 정상인을 환자로 오진함
검사 결과 음성 (-)	위음성 (False Negative, FN) 환자를 정상인으로 오진함	진음성 (True Negative, TN) 정상인을 정상인으로 잘 진단함

1. 민감도 (Sensitivity)

- 정의: 실제 질병이 있는 사람 중 검사 결과가 양성으로 나온 비율.
- 의미: 질병이 있는 환자를 얼마나 잘 찾아내는지(민감하게 반응하는지)를 나타냄. 민감도가 90%라면 환자 100명 중 90명을 찾아내고 10명은 놓쳤다(위음성)는 뜻임.
- 공식: $(TP)/(TP+FN)$

2. 특이도 (Specificity)

- 정의: 실제 질병이 없는 사람 중 검사 결과가 음성으로 나온 비율
- 의미: 건강한 사람을 얼마나 잘 걸러내는지(특이적으로 구별하는지)를 나타냄. 특이도가 95%라면 정상인 100명 중 95명은 정상으로 판정하고 5명은 환자로 오진(위양성)했다는 뜻
- 공식: $(TN)/(TN+FP)$

3. 양성 예측도 (PPV, Positive Predictive Value)

- 정의: 검사 결과가 양성으로 나온 사람 중 실제 질병이 있을 확률.
- 의미: 환자가 병원에서 "양성"이라는 결과를 받았을 때, 실제로 진짜 환자일 확률을 뜻하므로 임상에서 매우 중요함. **집단의 질병 유병률(Prevalence)이 높을수록 PPV도 올라감.**
- 공식: $(TP)/(TP+FP)$

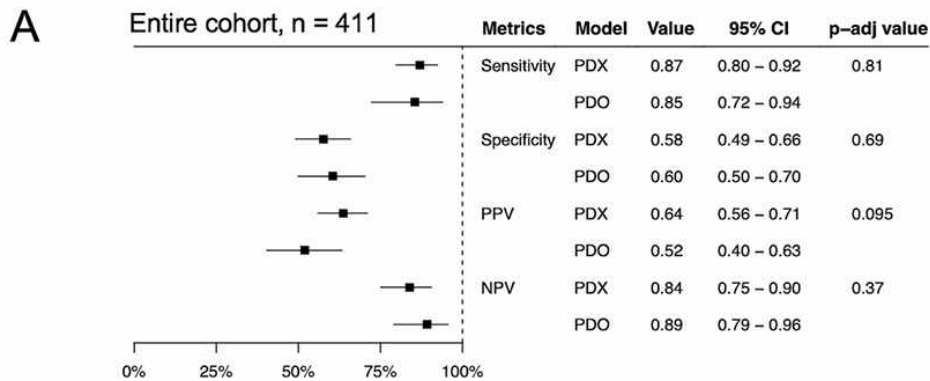
4. 음성 예측도 (NPV, Negative Predictive Value)

- 정의: 검사 결과가 음성으로 나온 사람 중 실제 질병이 없을 확률
- 의미: 검사 결과 "정상(음성)"라는 결과를 받았을 때, 실제로 안심해도 될 확률을 뜻함. **집단의 질병 유병률이 낮을수록 NPV는 올라감.**
- 공식: $(TN)/(TN+FN)$

5. 요약 비교

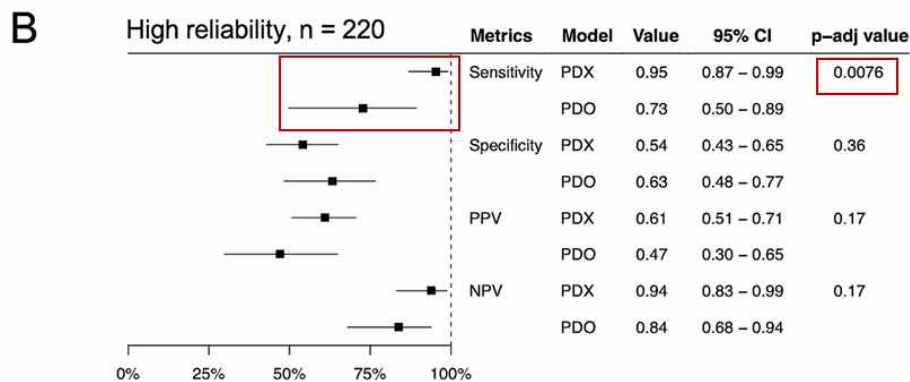
- **민감도와 특이도:** 검사 도구 자체의 고유한 성능. **대상 집단의 유병률이 바뀌어도 이 값들은 변하지 않음.**
- **PPV와 NPV:** 검사를 받는 **집단의 유병률에 따라 값이 변함.** 똑같은 검사기기라도 환자가 많은 병원에서 검사할 때(PPV 높음)와 일반 대중을 대상으로 선별 검사를 할 때(PPV 낮음)의 예측도가 달라짐.

① <그림-4A> PDX와 PDO 간의 민감도, 특이도, PPV 및 NPV: 모든 질의 연구에서 PDX와 PDO는 민감도(sensitivity)나 특이도(specificity)(87% 대 85%, ns; 58% vs 60%, ns)에서 유의미한 차이가 없었으며, PPV(positive predictive value)나 NPV(negative predictive value)에서도 유의한 차이가 없었음(64% vs. 52%, ns; 84% vs. 89%, ns)



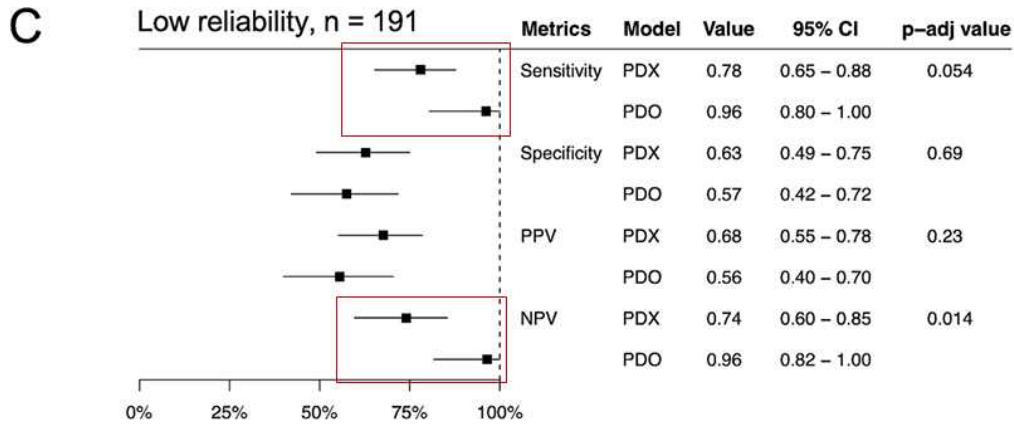
<그림-4A> PDX와 PDO 간의 민감도, 특이도, PPV 및 NPV 포인트 추정치, 95% 신뢰구간, 조정 P값이 표시: 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) PPV(positive predictive value)나 NPV(negative predictive value)

② <그림-4B> PDX와 PDO 간 예측 통계 – 고신뢰도(HR): HR 환자-모델 쌍 전체에서 PDX와 PDO를 비교하였음. 전체 코호트와 마찬가지로, HR 쌍으로 제한된 분석에서는 PDX와 PDO 간 일치 차이가 없었다(107/149 (72%), PDX 대 47/71 (66%), PDO).



<그림-4B> PDX와 PDO 간 예측 통계 – 고신뢰도(HR); 95% 신뢰구간, 조정 P값이 표시: 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) PPV(positive predictive value)나 NPV(negative predictive value)

③ <그림-4C> PDX와 PDO 간 예측 통계 - LR: LR 분석에서는 PDX는 PDO에 비해 더 민감했음(95% 대 73%, $P = 0.008$, 그림-4C).



④ <그림-4D & 4E> D) PDX에서 HR과 LR 쌍 간의 일치율을 강조하는 컨틴전시 테이블 (Contingency Table) 및 E) PDO 모델-환자 쌍 간의 일치율을 강조하는 컨틴전시 테이블 (Contingency Table, 두 변수의 범주가 만나는 칸에 해당하는 빈도수나 비율을 표로 정리한 것) - 모두 유의한 차이가 관찰되지 않았음

D PDX; Concordant Matched Patient Response

	HR	LR
Yes	107	83
No	42	35

$P = 0.89$

E PDO; Concordant Matched Patient Response

	HR	LR
Yes	47	52
No	24	21

$P = 0.59$

4-6) 품질 평가 기준의 적용에 의한 PFS 예측 능력 차이 확인 - PFS

① 개념

- PDO 모델의 치료에 대한 반응은 매칭된 환자에서 장기간 PFS(progression-free survival, 무진행 생존)과 연관되어 있음.
- 모델 성능 차이는 환자-모델 쌍을 고신뢰도(HR)와 저신뢰도(LR) 코호트로 층화하기 위해 미리 정의된 품질 평가 임계치를 적용한 후 나타났음. 즉, 분석을 HR 쌍 또는 RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) 기준으로 평가된 환자-모델 쌍으로 제한

<참고자료> PFS(progression-free survival, 무진행 생존) & RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, 고형 종양 반응 평가 기준)

1) PFS(progression-free survival, 무진행 생존): 환자가 암과 같은 질병과 함께 치료 중과 치료 후 악화되지 않고 살아가는 기간

- ① 시작 시간: 치료가 시작되거나 환자가 임상시험에 참여할 때 시작됨.
- ② 종말: 종양이 자라거나 퍼지거나 환자가 어떤 원인으로든 사망할 때 끝남.
- ③ 목표: 치료가 질병을 얼마나 잘 조절하고 종양 성장을 지연시키는지 보여줌.

2) RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, 고형 종양 반응 평가 기준): 암 치료 과정에서 고형 암의 크기 변화를 측정하여 치료 효과를 객관적으로 평가하는 표준화된 지침. CT나 MRI 등의 영상을 활용해 종양의 장경(가장 긴 지름)을 측정함. 평가 항목 및 기준 (RECIST 1.1 기준)으로 치료 반응은 크게 4가지 범주로 나눔.

- ① 완전 반응 (CR, Complete Response): 모든 표적 및 비표적 병변이 완전히 사라지고, 림프절 단경이 10mm 미만으로 줄어들며 새로운 병변이 없는 상태.
- ② 부분 반응 (PR, Partial Response): 기저선 대비 표적 병변의 직경 합이 30% 이상 감소하고, 새로운 병변이 없는 상태.
- ③ 진행성 병변 (PD, Progressive Disease): 치료 시작 후 기록된 최소 합계 대비 직경 합이 20% 이상 증가하고 절대적 크기가 5mm 이상 늘어나거나, 새로운 병변이 나타난 상태.
- ④ 안정 병변 (SD, Stable Disease): 부분 반응이나 진행성 병변 기준에 모두 미치지 않는 상태.

② 모델에서 반응성의 매칭된 환자에서 장기적인 무진행 생존과 연관성.

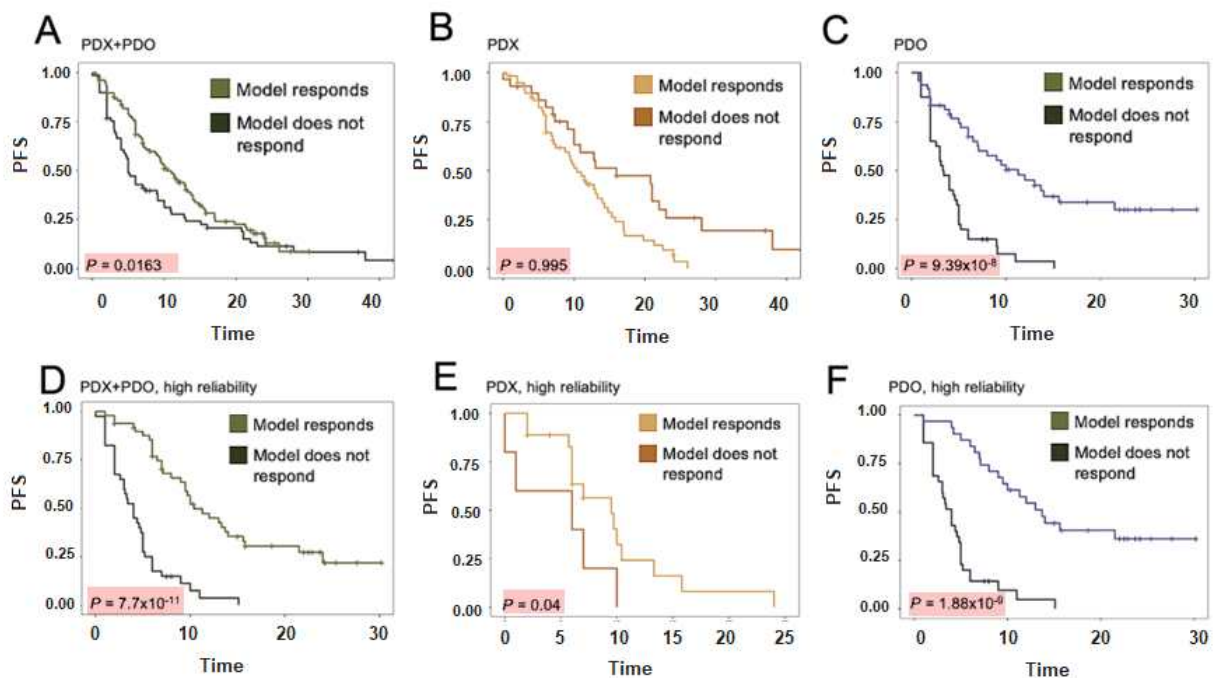
- <그림-5A>의 전체 코호트에 대한 무진행 생존: 실제로 환자 PFS 데이터를 가진 176개의 환자-모델 쌍 중 치료 반응은 장기간 PFS와 연관되어 있었음(중양값 PFS; mPFS [95% 신뢰구간], 반응자: 10.4개월 [8.8–13.7] 개월 vs 비응답자: 5.0개월 [4.4–9.1], $P = 0.02$). 이 결과는 암과 치료 유형을 통제된 다변량 분석에서도 유지되었음(위험비 [95% 신뢰구간]: 0.39 [0.26–0.58], $P < 0.001$).
- <그림-5B & 5C>의 PDX & PDO와 동일하게 치료에 반응했거나 반응하지 않은 환자들 의 PFS 비교
- 분석 대상이 모델 유형에 따라 제한되었을 때, PDO 환자-모델 쌍(반응자: mPFS 11.3개월 [7.0–21.5] 개월 vs. 비반응자 mPFS 3.4개월 [2.6–5.0개월, $P < 0.001$)은 PDX 환자-모델

쌍(응답자: mPFS 10.4개월 [7.4–14.0] 개월 vs. 비반응자: mPFS 16.0 [10.0–28.0] 개월, 불
년)은 단변량(Log rank) 및 다변량 분석 모두에서 환자 PFS의 장기적 연관과 연관이 있
었음(PDX: 0.74 [0.36–1.53], ns; PDO: 0.18 [0.10–0.34], $P < 0.001$, 그림-5B, 5C).

<참고> 단변량 분석(Univariate Analysis) vs 다변량 분석(Multivariate Analysis)

- 단변량 분석(Univariate Analysis): 한 번에 하나의 변수만 대상으로 데이터의 분포, 빈도, 그리고 특성을 살펴보는 가장 단순한 통계적 데이터 분석 방법
- 다변량 분석(Multivariate Analysis): 3개 이상의 여러 변수 간의 복잡한 상호작용과 인과 관계를 동시에 분석하는 통계 기법

- <그림-5D & 5E>: D) 전체 코호트, E) PDX, F) PDO에서 치료 반응 여부를 확인한 고신뢰도 환자-모델 쌍에서 PFS를 비교: 신뢰도 점수에 따라 분석이 제한되었을 때, 단변량 분석(응답자: 10.4개월 [9.5–15.8] 대 비응답자 4.0개월 [3.0–5.0] 개월 중 $P < 0.001$)과 다변량 분석(0.14 [0.08–0.26], $P < 0.001$) 모두에서 신호가 강화되는 것을 관찰했음<그림-5D>. PDX 환자-모델 쌍의 경우, HR 쌍으로만 분석을 제한하면, 치료에 반응한 환자에서 PFS가 장기화되었음(반응자: mPFS 9.5개월 [6.0-NA] vs. 비반응자: mPFS 6.0개월 [1.0-NA] 개월, $P = 0.04$, 그림-5E). 그러나 다변량 분석에서는 이 통계적 유의성이 지속되지 않았다(1.14 [0.18–7.27], ns, Fig. 5E). HR PDO 환자-모델 쌍만 분석했을 때, 반응자들은 단변량형(반응자: mPFS 13.7 [9.5-NA] 개월 vs. 비반응자: mPFS 4.0 [3.0–5.0] 개월, $P < 0.001$) 및 다변량 분석(0.13 [0.06–0.25], $P < 0.001$, 그림-5F) 모두에서 장기간 PFS를 보였음.



<그림-5> 모델에서의 반응성은 매칭된 환자에서 장기적인 무진행 생존과 연관성. A) 전체 코호트, B) PDX, C) PDO에 걸쳐 치료에 반응했거나 반응하지 않은 환자들의 PFS 비교. D) 전체 코호트, E) PDX, F) PDO에서 치료 반응 여부를 확인한 고신뢰도 환자-모델 쌍에서 PFS를 비교. 해당 모델이 치료에 반응했거나 반응하지 않았음. Log-rank test(방법)을 사용하여 계산한 일측 P-값. 각 Kaplan-Meier 곡선 아래에는 표본 크기가 부족한 범주를 제거한 후 변수와 환자 PFS 간의 연관성을 평가하는 다변량 Cox 비례 위험 모델(방법). 약어: PDX; 환자 유래 이중이식, PDO; 환자 유래 오가노이드인 NSCLC; 비소세포폐암, PFS; 무진행 생존.

5. 결론과 의미

5-1) 연구에 대한 결과와 평가

- 항암 치료에 대한 환자 반응을 예측하는 전임상 모델은 임상시험 설계와 치료 개발에 중요한 도구. 이 중 PDX와 PDO는 매칭된 환자 치료 효과를 평가하는 데 가장 널리 사용되는 **환자 아바타 모델(patient avatar models)**(Hidalgo 등, 2014).
- 여러 소규모 연구들이 다양한 암 유형에서 두 모델의 예측 가치를 입증했지만, 지금까지 이들의 성능을 체계적으로 평가하거나 직접 비교한 연구는 없음(Romero 등, 2026).
- 따라서 본 연구의 목적은 PDX 및 PDO 모델에서 환자 결과가 일치하는 치료 반응을 보고한 연구들에 대한 체계적 문헌고찰 및 메타분석을 수행하고, 임상 반응의 정확하고 재현 가능한 모델링을 보장하기 위해 필요한 핵심 방법론 및 보고 기준을 규명하는 것이었음. 결과는 다음과 요약됨.
 - ① PDX와 PDO는 예측 성과 통계가 유사했으며, 두 경우 모두 약 70%의 일치율을 보였고 민감도, 특이도, PPV 또는 NPV에서는 차이가 없었음 – 이는 결국 PDO와 PDX 모두 암환자의 결과 예측에서 차이가 없기 때문에 굳이 동물모델의 PDX를 이용할 필요성이 없을 것으로 판단됨.
 - ② 중요하게도, PDO에서의 치료 반응은 전체 코호트 내 일치 환자에서 장기적인 PFS(progression-free survival)를 예측할 수 있었으나, PDX는 그렇지 않았음.
 - ③ 모델 성능 차이는 환자-모델 쌍을 고신뢰도(HR)와 저신뢰도(LR) 코호트로 층화하기 위해 미리 정의된 품질 평가 임계치를 적용한 후 나타났음. 분석을 HR 쌍 또는 RECIST 기준으로 평가된 환자-모델 쌍으로 제한할 때, PDX가 PDO 모델보다 더 높은 민감도를 보였음. 또한 PDX와 PDO 모델 모두에서 치료 반응은 단변량 분석 중 일치 환자에서 더 긴 PFS와 연관되어 있었음.
- 환자 아바타 분야가 계속 성숙함에 따라, 표준화되고 국제적으로 인정받는 보고 기준의 도입은 재현성을 높이고, 연구 간 비교를 가능하게 하며, 아바타 기반 정밀 종양학의 임상 번역을 가속화하는 데 매우 중요할 것임. 최근 PDX와 PDO 모델 모두에 보고 지침이 제안되었으나, 아직 널리 시행되지는 않았음(eric-Bernstam 등, 2024; Xiang 등, 2024). 이러한 맥락에서, 본 연구에서 사용된 6가지 보고 프레임워크를 제안하는데, 이는 특히 PDX 모델이 포함된 연구를 출판할 때 연구자들이 실용적이고 유익한 체크리스트로서 활용할 수 있도록 함.
- 이 권고는 HR PDX 모델에서의 치료 반응이 환자 PFS의 장기화와 연관되어 있었으나 LR 모델이나 전체 코호트에서는 그렇지 않았다는 사실에 의해 뒷받침됨. 이 차이가 PDX 연구에서 추적 시간 보고(기준 #4)가 부실했기 때문이라고 가설을 세우며, PDO 연구에서는 53%에 비해 29%만이 이 품질 기준을 충족한다고 가정($P < 0.0001$) ($P < 0.0001$; 그림 3A, B). 부적절한 추적 관찰은 PDX 전체 코호트에서 진정한 통계적 신호를 가릴 수 있으며, 이는 추적 관찰 시간이 충분한 HR 하위군에서만 PFS 지속 기간을 신뢰성 있게 평가할 수 있음.

5-2) 한계와 방향

- **인간, 시험관 내 오가노이드 시스템 간의 약동학 및 약역학 차이는 모델과 환자 반응 비교에 큰 도전 과제를 제공함.**
- 연구의 또 다른 한계는 PDX 및 PDO 모델 생성에 표준화가 부족하다는 점임. 표준화된 품질 평가 프레임워크를 적용함으로써 PDX와 PDO 모두의 예측 성능이 향상되어 아바타 기반 연구에서 방법론적 엄밀함의 중요성 인식.
- PDX, PDO, 그리고 **장기 온 칩 기술과 정형외과 이식 PDX 모델** 등 신흥 플랫폼의 사용이 환자 반응 예측과 신약 개발에서 계속 증가함에 따라, 향후 연구에서는 더 큰 표본 크기, 표준화된 품질 지표, 견고한 보고 관행을 포함해야 할 것임. 이러한 노력은 정밀 종양학에서 모델들의 역할을 재평가하고 다듬는 데 필수적임.

<참고문헌>(원본보다 본 보고서에서 내용이 감소되어 인용되지 않은 노문이 많이 존재함)

Alavi, K. A Mini Review on Tumor Organoid-on-a-Chip Technologies in Personalized Oncology. arXiv 2025, arXiv:2507.21149.

Büning, A.; Reckzeh, E. Opportunities of Patient-Derived Organoids in Drug Development. Br. J. Pharmacol. 2025, 183, 939–944.

Zhao, X.; Xu, Z.; Xiao, L.; Shi, T.; Xiao, H.; Wang, Y.; Li, Y.; Xue, F.; Zeng, W. Review on the Vascularization of Organoids and Organoids-on-a-Chip. Front. Bioeng. Biotechnol. 2021, 9, 637048.

Yang, J.; Huang, S.; Cheng, S.; Jin, Y.; Zhang, N.; Wang, Y. Application of Ovarian Cancer Organoids in Precision Medicine: Key Challenges and Current Opportunities. Front. Cell Dev. Biol. 2021, 9, 701429.

Ahammed, B.; Kalangi, S.K. A Decade of Organoid Research: Progress and Challenges in the Field of Organoid Technology. ACS Omega 2024, 9, 30087–30096.

Tsamandouras, N.; Rostami-Hodjegan, A.; Aarons, L. Combining the “Bottom Up” and “Top Down” Approaches in Pharmacokinetic Modelling: Fitting PBPK Models to Observed Clinical Data. Br. J. Clin. Pharmacol. 2015, 79, 48–55.

Psilopatis, I.; Sykaras, A.G.; Mandrakis, G.; Vrettou, K.; Theocharis, S. Patient-Derived Organoids: The Beginning of a New Era in Ovarian Cancer Disease Modeling and Drug Sensitivity Testing. Biomedicines 2023, 11, 1. [CrossRef] [PubMed]

de Witte CJ, Espejo Valle-Inclan J, Hami N, Löhmussaer K, Kopper O, Vreuls CPH, Jonges GN, van Diest P, Nguyen L, Clevers H, Kloosterman WP, Cuppen E, Snippert HJG, Zweemer RP, Witteveen PO, Stelloo E. Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids Mimic Clinical Response and Exhibit Heterogeneous Inter- and Intrapatient Drug Responses. Cell Rep. 2020 Jun 16;31(11):107762.

Darwich, A.S.; Ogungbenro, K.; Hatley, O.J.; Rostami-Hodjegan, A. Role of Pharmacokinetic Modeling and Simulation in Precision Dosing of Anticancer Drugs. Transl. Cancer Res. 2017, 6, S1512–S1529.

Jones, H.; Rowland-Yeo, K. Basic Concepts in Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Drug Discovery and Development. CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol. 2013, 2, e63.

Nayak, P.; Bentivoglio, V.; Varani, M.; Signore, A. Three-Dimensional In Vitro Tumor Spheroid Models for Evaluation of Anticancer Therapy: Recent Updates. Cancers 2023, 15, 4846.

Liu, X.; Flinders, C.; Mumenthaler, S.M.; Hummon, A.B. MALDI Mass Spectrometry Imaging for Evaluation of Therapeutics in Colorectal Tumor Organoids. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2018, 29, 516–526.

Kathawala, R.J.; Gupta, P.; Ashby, C.R., Jr.; Chen, Z.-S. The Modulation of ABC Transporter-Mediated Multidrug Resistance in Cancer: A Review of the Past Decade. Drug Resist. Updat. 2015, 18, 1–17.

Thorel, L., Perréard, M., Florent, R. *et al.* Patient-derived tumor organoids: a new avenue for preclinical research and precision medicine in oncology. *Exp Mol Med* 56, 1531–1551 (2024).

Skowronska, M.; Yildiz, E.; Grosch, J.; Coto-Llerena, M. Patient-Derived Organoids in Clinical Medicine: Proven Impact and Future Directions. *Organoids* 2026, 5, 15

Garraalda, E.; Dienstmann, R.; Tabernero, J. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling for Drug Development in Oncology. Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. 2017, 37, 210–215.

Bender, B.C.; Schindler, E.; Friberg, L.E. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling in Oncology: A Tool for Predicting Clinical Response. Br. J. Clin. Pharmacol.

2015, 79, 56–71.

Zeng, G.; Yu, Y.; Wang, M.; Liu, J.; He, G.; Yu, S.; Yan, H.; Yang, L.; Li, H.; Peng, X. Advancing Cancer Research through Organoid Technology. *J. Transl. Med.* 2024, 22, 1007.

Khalil, F.; Läer, S. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Methodology, Applications, and Limitations with a Focus on Its Role in Pediatric Drug Development. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 2011, 907461.

Saeheng, T.; Na-Bangchang, K.; Karbwang, J. Utility of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling in Oncology Drug Development and Its Accuracy: A Systematic Review. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2018, 74, 1365–1376.

Garraalda, E.; Dienstmann, R.; Tabernero, J. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling for Drug Development in Oncology. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 2017, 37, 210–215.

Bender, B.C.; Schindler, E.; Friberg, L.E. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling in Oncology: A Tool for Predicting Clinical Response. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2015, 79, 56–71.

Park, K. A Review of Modeling Approaches to Predict Drug Response in Clinical Oncology. *Yonsei Med. J.* 2017, 58, 1–8.

Lima AEC, Nunes M, Xavier CPR, Ricardo S. Re-Thinking Pharmacokinetics in Ovarian Cancer: What Do Organoids Add? *Int J Mol Sci.* 2026 Apr 10;27(8):3423.

Helland, Ø.; Popa, M.; Vintermyr, O.K.; Molven, A.; Gjertsen, B.T.; Bjørge, L.; McCormack, E. First In-Mouse Development and Application of a Surgically Relevant Xenograft Model of Ovarian Carcinoma. *PLoS ONE* 2014, 9, e89527.

Lima AEC, Nunes M, Xavier CPR, Ricardo S. Re-Thinking Pharmacokinetics in Ovarian Cancer: What Do Organoids Add? *Int J Mol Sci.* 2026 Apr 10;27(8):3423.

Liu, X.; Flinders, C.; Mumenthaler, S.M.; Hummon, A.B. MALDI Mass Spectrometry Imaging for Evaluation of Therapeutics in Colorectal Tumor Organoids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2018, 29, 516–526.

Vlachogiannis, G.; Hedayat, S.; Vatsiou, A.; Jamin, Y.; Fernández-Mateos, J.; Khan, K.; Lampis, A.; Eason, K.; Huntingford, I.; Burke, R.; et al. Patient-Derived Organoids Model Treatment Response of Metastatic Gastrointestinal Cancers. *Science* 2018, 359, 920–926. [CrossRef]

Yang, J.; Huang, S.; Cheng, S.; Jin, Y.; Zhang, N.; Wang, Y. Application of Ovarian Cancer Organoids in Precision Medicine: Key Challenges and Current Opportunities. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 701429.

Zhu, J.; Ji, L.; Chen, Y.; Li, H.; Huang, M.; Dai, Z.; Wang, J.; Xiang, D.; Fu, G.; Lei, Z.; et al. Organoids and Organs-on-Chips: Insights into Predicting the Efficacy of Systemic Treatment in Colorectal Cancer. *Cell Death Discov.* 2023, 9, 72.

Xiao, W.; Luo, J.; Jain, T.; Riggs, J.W.; Tseng, H.P.; Henderson, P.T.; Cherry, S.R.; Rowland, D.; Lam, K.S. Biodistribution and Pharmacokinetics of a Telodendrimer Micellar Paclitaxel Nanoformulation in a Mouse Xenograft Model of Ovarian Cancer. *Int. J. Nanomed.* 2012, 7, 1587–1597.

Zeng, G.; Yu, Y.; Wang, M.; Liu, J.; He, G.; Yu, S.; Yan, H.; Yang, L.; Li, H.; Peng, X. Advancing Cancer Research through Organoid Technology. *J. Transl. Med.* 2024, 22, 1007.

Saeheng, T.; Na-Bangchang, K.; Karbwang, J. Utility of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling in Oncology Drug Development and Its Accuracy: A Systematic Review. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2018, 74, 1365–1376.

Garraalda, E.; Dienstmann, R.; Tabernero, J. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling for Drug Development in Oncology. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 2017, 37, 210–215.

Bender, B.C.; Schindler, E.; Friberg, L.E. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling in Oncology: A Tool for Predicting Clinical Response. *Br. J. Clin. Pharmacol.*

2015, 79, 56–71.

Quintard, C.; Tubbs, E.; Jonsson, G.; Jiao, J.; Wang, J.; Werschler, N.; Laporte, C.; Pitaval, A.; Bah, T.-S.; Pomeranz, G.; et al. A Microfluidic Platform Integrating Functional Vascularized Organoids-on-Chip. *Nat. Commun.* 2024, 15, 1452.

Ewart, L.; Dehne, E.-M.; Fabre, K.; Gibbs, S.; Hickman, J.; Hornberg, E.; Ingelman-Sundberg, M.; Jang, K.-J.; Jones, D.R.; Lauschke, V.M.; et al. Application of Microphysiological Systems to Enhance Safety Assessment in Drug Discovery. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2018,

Lim, J.H., Mun, S.J., Kang, H.M. *et al.* Personalized pharmacokinetic–pharmacodynamic guided therapy via an induced pluripotent stem cell–derived multi-organoid platform in NF1-mutant breast cancer. *Sig Transduct Target Ther* 11, 79 (2026).

Lima AEC, Nunes M, Xavier CPR, Ricardo S. Re-Thinking Pharmacokinetics in Ovarian Cancer: What Do Organoids Add? *Int J Mol Sci.* 2026 Apr 10;27(8):3423

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 2014;4(9): 998–1013.

Porter RJ, Murray GI, McLean MH. Current concepts in tumour-derived organoids. *733 Br J Cancer.* 2020;123(8):1209-1218.

Zanella ER, Grassi E, Trusolino L. Towards precision oncology with patient-731 derived xenografts. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(11):719-732.

Mateo J, Steuten L, Aftimos P, et al. Delivering precision oncology to patients with 729 cancer. *Nat Med.* 2022;28(4):658-665.

Bose S, Barroso M, Chheda MG, et al. A path to translation: How 3D patient tumor 752 avatars enable next generation precision oncology. *Cancer Cell.* 753 2022;40(12):1448-1453.

Thorel L, Perréard M, Florent R, et al. Patient-derived tumor organoids: a new 755 avenue for preclinical research and precision medicine in oncology. *Exp Mol Med.* 756 2024;56(7):1531-1551.

Byrne AT, Alférez DG, Amant F, et al. Interrogating open issues in cancer precision 740 medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(4):254-268. 741 7.

Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft 742 mouse models. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(5):311-316.

Ben-David U, Ha G, Tseng YY, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-747 specific tumor evolution. *Nat Genet.* 2017;49(11):1567-1575.

Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft 742 mouse models. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(5):311-316.

Ehlen L, Schmuck-Henneresse M. The rise of patient avatars in precision 735 oncology. *Nat Biotechnol.* 2024;42(8):1173-1174.

Romero JM, Magrill J, Kalashnikov N, Luo YZ, Chen OJ, Busque S, Ma R, Atallah A, Lazaratos AM, Mendelson D, Wilson L, Deshmukh S, Taifour T, Sorin M, Arthur I, Kuasne H, Levett JY, Wang Y, Seufferlein T, Kleger A, Gout J, Beutel AK, Brugarolas J, Poshusta ZS, Hogenson TL, Fernandez-Zapico ME, Hamada A, Yagishita S, Nichols A, Barrett JW, Papaccio F, Castillo J, Inoue M, Massfelder T, Lang H, Lindner V, Nilsson J, Dantes Z, Wells GA, Kim SH, Ittmann MM, Villanueva H, Lerner SP, Sikora AG, Theillet C, Huang DQ, Khuong-Quang DA, Yeung JC, Siegel PM, Watson IR, Zogopoulos G, Rose AAN, Dankner M. Comparative analysis of patient-derived organoids and patient-derived xenografts as avatar models for predicting response to anti-cancer therapy. *medRxiv [Preprint].* 2025 Aug 12:2025.08.10.25333051. May 23, 2024

MEDIDATA. 확장성을 우선순위로 EHR과 EDC 통합 문제 해결. 2024-02-14. www.medidata.com/kr/life-science-resources/medidata-blog/ehr-to-edc-integration/

Goulart B, Mushti S, Chatterjee S et al. Correlations of response rate and progression-free survival with overall survival in immunotherapy trials for metastatic non-small-cell lung cancer: an FDA pooled analysis. *The Lancet Oncology*, 2024; 25, 455-462

USFDA. Patient-Friendly Language for Cancer Clinical Trials. 02/16/2021

Sheth M, Ko J. Exploring the relationship between Overall Survival (OS), Progression Free Survival (PFS) and Objective Response Rate (ORR) in patients with advanced melanoma. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;26:100272.

Goulart B, Mushti S, Chatterjee S et al. Correlations of response rate and progression-free survival with overall survival in immunotherapy trials for metastatic non-small-cell lung cancer: an FDA pooled analysis. *The Lancet Oncology*, 2024; 25, 455-462

Long Bai, Jiacan Su, Artificial Intelligence Virtual Organoids (AIVOs), *Bioactive Materials*, Volume 59, 2026, Pages 45-68, ISSN 2452-199X,

Olsen IC, Haavardsholm EA, Moholt E, Kvien TK, Lie E. NOR-DMARD data management: implementation of data capture from electronic health records. *Clin Exp Rheumatol*. 2014 Sep-Oct;32(5 Suppl 85):S-158-62.

DSA. Types of Neural Networks. Last Updated :4 Jul, 2026. www.geeksforgeeks.org/deep-learning/types-of-neural-networks/

Sakshaug, B.C., Folkesson, E., Haukaas, T.H. et al. Systematic review: predictive value of organoids in colorectal cancer. *Sci Rep* 13, 18124 (2023).

Caruso A, Delvecchio A, Memeo R, Lanzino M, Martinotti S. Patient-derived organoids in functional precision oncology: from experimental models to clinical decision-making. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2026 Jul 22;17:1872361.

Kwiecien R, Kopp-Schneider A, Blettner M. Concordance analysis: part 16 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Jul;108(30):515-21.

Sen C, Koloff CR, Kundu S, Wilkinson DC, Yang JM, Shia DW, Meneses LK, Rickabaugh TM, Gomperts BN. Development of a small cell lung cancer organoid model to study cellular interactions and survival after chemotherapy. *Front Pharmacol*. 2023 Aug 7;14:1211026.

Jie Wang. Using Organoids for Disease Modeling. November 11, 2019 in *The Cell Culture Dish*. www.corning.com/kr/ko/products/life-sciences/resources/stories/the-cutting-edge/using-organoids-for-disease-modeling.html

Heinzelmann, E.; Piraino, F. AI-Enhanced Patient-Derived Cancer Organoids: Integrating Machine Learning for Precision Oncology. *Organoids* 2025, 4, 30.

Molecular device. Patient-derived organoids (Tumoroids). 2026. www.moleculardevices.com/applications/3d-cell-models/organoids/patient-derived-organoids?

Pham NA, Radulovich N, Ibrahimov E, Martins-Filho SN, Li Q, Pintilie M, Weiss J, Raghavan V, Cabanero M, Denroche RE, Wilson JM, Metran-Nascente C, Borgida A, Hutchinson S, Dodd A, Begora M, Chadwick D, Serra S, Knox JJ, Gallinger S, Hedley DW, Muthuswamy L, Tsao MS. Patient-derived tumor xenograft and organoid models established from resected pancreatic, duodenal and biliary cancers. *Sci Rep*. 2021 May 19;11(1):10619.

Ergang Wang, Kun Xiang, Yun Zhang, Xiao-Fan Wang, Patient-derived organoids (PDOs) and PDO-derived xenografts (PDOXs): New opportunities in establishing faithful pre-clinical cancer models, *Journal of the National Cancer Center*, Volume 2, Issue 4, 2022, Pages 263-276, ISSN 2667-0054

Emin Gayibov, Tomáš Sychra, Alžta Spálenková, Pavel Soucek, Martin Oliverius, The use of patient-derived xenografts and patient-derived organoids in the search for new therapeutic regimens for pancreatic carcinoma. A review, *Biomedicine &*

Pharmacotherapy, Volume 182, 2025,
117750, ISSN 0753-3322,

Shogen, Y., Seishima, R., Takimoto, T. et al. Subtype-specific heterogeneity of anti-epidermal growth factor receptor antibody sensitivity in KRAS-mutant colorectal cancer revealed by patient-derived organoids. *Sci Rep* (2026).

MERCK. PDO 기반 환자 맞춤형 암 치료 설계 방법: 공정, 모델 비교, 활용 전략. 2025.

Ruixin Yang, Yingyan Yu, Patient-derived organoids in translational oncology and drug screening, *Cancer Letters*, Volume 562, 2023, 216180, ISSN 0304-3835.

Brandi, R., Palcau, A. C., Migliano, E., Strano, S., & Blandino, G. (2025). Patient-Derived Tumour Organoids (PDOs) may help oncologists in clinical practice. *Personalized Medicine*, 22(6), 503–510.

Zhao R, Feng Q, Xia Y, Liao L, Xie S. Iteration of Tumor Organoids in Drug Development: Simplification and Integration. *Pharmaceuticals* (Basel). 2025 Oct 13;18(10):1540.

D. Khorsandi, J.-W. Yang, S. Foster, S. Khosravi, N. Hosseinzadeh Kouchehbaghi, F. Zarei, Y. B. Lee, F. Runa, A. Gangrade, L. Voskanian, D. Adnan, Y. Zhu, Z. Wang, V. Jucaud, M. R. Dokmeci, X. Shen, F. Bishehsari, J. A. Kelber, A. Khademhosseini, N. R. de Barros, Patient-Derived Organoids as Therapy Screening Platforms in Cancer Patients. *Adv. Healthcare Mater.* 2024, 13, 2302331.

Wang, Q., Yuan, F., Zuo, X. et al. Breakthroughs and challenges of organoid models for assessing cancer immunotherapy: a cutting-edge tool for advancing personalised treatments. *Cell Death Discov.* 11, 222 (2025).

Zhu, J., Ji, L., Chen, Y. et al. Organoids and organs-on-chips: insights into predicting the efficacy of systemic treatment in colorectal cancer. *Cell Death Discov.* 9, 72 (2023).

Zhou T, Wang Q, Zhang M, Huang Y. Harnessing human tumor organoids for cancer modeling and precision therapy. *Protein Cell.* 2026 Aug 1;17(8):704-731.

Marrit Putker. Why Organoids Are Superior for Drug Screening: Answering Top Research Questions. *CROWN BIOSCIENCE*. May 27, 2024

Md Zahirul Islam Khan, Somrita Roy, Soumya Nair, Asma Pinkey, Taslim Al-Hilal, Helen Ka-Wai Law and Sourav Roy. Recent advancements and limitations of intestinal organoids for clinical applications. 2026 *Prog. Biomed. Eng.* 8-3. 032010.

Xianq D, He A, Zhou R, Wanq Y, Xiao X, Gonq T, Kanq W, Lin X, Wanq X, PDO-based DST Consortium, Liu L, Chen YG, Gao S, Liu Y. Building consensus on the application of organoid-based drug sensitivity testing in cancer precision medicine and drug development. *Theranostics* 2024; 14(8):3300-3316.

Fan X, Hou K, Liu G, Shi R, Wang W, Liang G. Strategies to overcome the limitations of current organoid technology - engineered organoids. *Journal of Tissue Engineering.* 2025;16.

GEN(Genetic engineering & Biotechnology News. Organoids as Predictive Translational Models for Drug Development. Retrospective clinical concordance supports earlier, patient-relevant decisions. April 1, 2026.

Ma YS, Yang XL, Xin R, Wu TM, Shi Y, Dan Zhang D, Wang HM, Wang PY, Liu JB, Fu D. The power and the promise of organoid models for cancer precision medicine with next-generation functional diagnostics and pharmaceutical exploitation. *Transl Oncol.* 2021 Aug;14(8):101126.

Junhao Liang, Haobo Yao, Yinghui Feng, Xin Shu, You Zheng, Xiang Gao, Wenhui Zhou, Advances in Organoids for Drug Development: From Discovery to Delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2026, 108876, ISSN 1773-2247.

Choi H, Choi SM, Wang S, Chung JW. Construction and Application of Patient-derived Organoid Models for Gastrointestinal Cancer Precision Therapy. *JDCR* 2025;13:168-179.

Liu C, Qin T, Huang Y, Li Y, Chen G, Sun C. Drug screening model meets cancer organoid technology. *Transl Oncol.* 2020 Nov;13(11):100840. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100840. Epub 2020 Aug 18.

Jabs J, Zickgraf FM, Park J, Wagner S, Jiang X, Jechow K, Kleinheinz K, Toprak UH, Schneider Nie, JH., Wan, CY., Li, H. et al. Personalized prediction of chemotherapy efficacy in osteosarcoma through patient-derived organoids: correlation with survival and tumor proliferation potential. *J Exp Clin Cancer Res* 45, 16 (2026).

Ma YS, Yang XL, Xin R, Wu TM, Shi Y, Dan Zhang D, Wang HM, Wang PY, Liu JB, Fu D. The power and the promise of organoid models for cancer precision medicine with next-generation functional diagnostics and pharmaceutical exploitation. *Transl Oncol.* 2021 Aug;14(8):101126. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101126. Epub 2021 May 18.

Meric-Bernstam F, Lloyd MW, Koc S, et al. Assessment of patient-derived xenograft growth and antitumor activity: the NCI PDXNet consensus recommendations. *Mol Cancer Ther* 2024;23(7):924–38.

Xiang D, He A, Zhou R, et al. Building consensus on the application of organoid- based drug sensitivity testing in cancer precision medicine and drug development. *Theranostics* 2024;14(8):3300–16.

Ostrop J, Zwiggelaar RT, Terndrup Pedersen M, Gerbe F, Bösl K, Lindholm HT, Díez-Sánchez A, Parmar N, Radetzki S, von Kries JP, Jay P, Jensen KB, Arrowsmith C, Oudhoff MJ. A Semi-automated Organoid Screening Method Demonstrates Epigenetic Control of Intestinal Epithelial Differentiation. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jan 21;8:618552.

Sanne M. van Neerven, Rana Ramadan, Milou S. van Driel, David J. Huels, Louis Vermeulen, Intestinal organoid co-culture protocol to study cell competition in vitro, *STAR Protocols*, Volume 3, Issue 1, 2022, 101050, ISSN 2666-1667.
Danielle Hamm. Nuffield Council on Bioethics say need for governance of neural organoids further demonstrates why the UK must strengthen anticipatory regulation. Director of the Nuffield Council on Bioethics. 12th May 2026.

AstraZeneca's global website. Clinical Trial Endpoints in Cancer Research: Four Terms You Should Know. 24 September 2018

Chayu Yang, Zachery Keepers, Hem D. Shukla, Lei Ren, Tumor organoids modeling reveals timed responses and interplay of radiotherapy and chemotherapy in pancreatic cancer, *Radiotherapy and Oncology*, Volume 218, 2026, 111470, ISSN 0167-8140.

Y. Dinakarkumar, S. K. Ganesan, R. M. John, et al. " Synergistic Integration of Artificial Intelligence, Organoid Models, and Multi-Omics Technologies in Contemporary Drug Discovery." *Advanced Therapeutics* 9, no. 1 (2026): e00532.

Abibscience. Flow Cytometry Gating: A Practical Guide to Sequential Gating Strategies. 2026-06-24. www.abinscience.com/archive/4011

Thalheim T, Siebert S, Quaas M, Herberg M, Schweiger MR, Aust G, Galle J. Epigenetic Drifts during Long-Term Intestinal Organoid Culture. *Cells.* 2021 Jul 7;10(7):1718.

Zhao Z, Chen X, Dowbaj AM, Sljukic A, Bratlie K, Lin L, Fong ELS, Balachander GM, Chen Z, Soragni A, Huch M, Zeng YA, Wang Q, Yu H. Organoids. *Nat Rev Methods Primers.* 2022;2:94.

Jensen K, Little M. Organoids are not organs: Sources of variation and misinformation in organoid biology. *Stem Cell Reports*, 18, 1255-1270. 2023.

Hartung T, Morales Pantoja IE, Smirnova L. Brain organoids and organoid intelligence from ethical, legal, and social points of view. *Front Artif Intell.* 2024 Jan 5;6:1307613.

Sakr, J. (2026). Definition-Independent Governance in Brain Organoid Ethics: Moving

Beyond the Consciousness Threshold. *AJOB Neuroscience*, 17(2), 93–96.

Zhili G, Nenghua Z. Ethical review key considerations for organoid applications in biomedical research-a systematic review. *Front Cell Dev Biol*. 2026 May 20;14:1721946.

Zhao M, Lin T, Zhang R, Zhong H, Niu Q, Zhou X, Wang Q. Ethical Challenges and Governance Strategies for Microphysiological Systems Technology. *Biology (Basel)*. 2026 Jul 7;15(13):1092.

Zhou, LB., Lei, YT. & Han, XX. Charting bioethical frontiers: China's human organoid guidelines in a global context. *Military Med Res* 12, 64 (2025).

132. Gap Filling을 위한 맞춤 비임상 전략과 Country K의 비임상 정책 현실

1. 환자 맞춤형 비임상 전략과 규제 측면의 중요성

- 제약 산업은 확고히 전환되었음. **다양한 약물 치료법의 시대**, 전통적인 저분자와 항체 치료제를 빠르게 넘어선 변화. 오늘날의 치료 파이프라인은 다음과 같은 첨단 치료법에 의해 주도되고 있음: **항체-약물 접합체(ADC), mRNA 치료법, siRNA/ASOs, 표적 단백질 분해체(PROTACs)**, 그리고 **세포/유전자 치료제**. 각각은 근본적으로 고유한 개발 패러다임을 요구함(Blanco 등, 2020; Henderson 등, 2025).
- 이러한 복잡한 방식들이 종종 인간 특이적 생물학과 상호작용하기 때문에, 전통적으로 획일적 동물실험은 **임상 실패율 90%**라는 엄청난 결과를 낳았음. 이러한 종간 차이의 격차를 메우기 위해 신약 개발사들이 Organoid, Organ-on-a-Chip), In-silico와 컴퓨터 시뮬레이션, AI 예측 모델 등의 NAM을 이용하거나 이를 기반으로 **환자 맞춤형 비임상 전략 (Patient-Tailored Nonclinical Strategies)**을 도입하고 있음.
- 환자 맞춤형 비임상 전략(Patient-Tailored Nonclinical Strategies)을 추구하는 것은 주로 소수 환자와 희귀질환에 적용되기에 글로벌 정책의 받아쓰기에 바쁜 Country-K의 비임상 정책을 글로벌 수준으로 올리는 가장 바쁜 방안임.
- 그러나, 국내 인허가 과정에서 이와 같은 환자 맞춤형 비임상 전략을 수용할 입장이며 이에 대한 규제 근거는 마련하고 있을까?

2. 비임상 전략과 해외 규제 기관의 정책

- <표>와 같이 전환기 시대의 신약개발에 각 국가별 비임상 전략에 대한 규제기관의 세부 지침을 나타낸 것임. 대부분 국가별 규제기관에서 환자중심 및 인체-기반 시험법(NAM, new approach methodology)에 대한 비임상 정책을 수행 및 마련(FDA, 2026. Tan 등, 2025; Roberts, 2023; 김윤미, 2026).

<표> 국가별 비임상 전략에 대한 규제기관의 세부 지침

규제기관	핵심 비임상 규제정책	핵심내용
US FDA(미국 식품의약국)	• 동물실험 의무화 폐지 및 인체기반-접근법인 (NAM, new approach methodologies) 수용	• FDA는 2022년 말 'FDA 현대화법 2.0(FDA Modernization Act 2.0)'을 통과시키며 신약 허가 신청 시 동물실험 자료를 필수로 제출해야 하던 규정을 삭제했
	• 유연하고 간소화된 비임상 프로그램 운영:	• CDER(의약품평가연구센터)은 약물 특성에 따라 시험동물 수나 종을 줄이거나, Organoid, Organ-on-a-Chip), In-silico와 컴퓨터 시뮬레이션, AI 예측 모델 등의 NAM을 비임상 데이터로 인정하는 가이드라인을 구체화하고 있음
	• 희귀질환용 세포-유전자 치료제 (Cell-Gene Therapy) 유연성 확대	• 소수 환자군을 위한 혁신 치료제의 경우, 전통적 비임상 모델로는 효과 입증에 어렵다는 점을 인정하고 환자 유래 세포 기반 평가 등 과학적으로 타당한 환자-맞춤형 비임상 설계를 권장함
EMA(European)	• 3R 원칙(Alternative, Reduction, Replacement)	• EMA는 비임상 단계에서 동물실험을 대체 (Replacement), 감소(Reduction), 고통 완화

Medicines Agency 유럽 의약품청)	Refinement)의 엄격한 적용	(Refinement)하려는 노력을 규제의 기본 가치로 삼고 있음
	• 환자 데이터와의 연계 강조	• 비임상 단계에서 수집된 바이오마커와 메커니즘 데이터가 실제 환자의 임상 설계(초기 투여 용량 설정, 환자 선정 기준 등)에 직접 연결될 수 있도록 비임상-임상 통합 맞춤형 전략을 요구
	• VDS(Voluntary Data Submission, (자발적 데이터 제출) 플랫폼	• EMA는 오가노이드 및 OoC의 MPS(microphysiological system, 미세생리시스템) 기업들이 신약 허가 절차 외에 자발적으로 데이터를 제출하고 검증받을 수 있는 VDS 플랫폼을 운영 중임
중국 국가약품 감 독 관 리 국 (NMPA) 및 일본 의약품 의료 기기 종합 기 구 (PMDA)	• 글로벌 규제 조화 (Regulatory Reliance)	• FDA 및 EMA의 환자 중심·첨단 바이오 비임상 가이드라인을 빠르게 흡수하고 있음. • 다국적 임상 및 해외 진출을 준비하는 기업들을 위해 규제 심사 절차를 현대화하고 있음
Country K	• K-바이오 대도약, 이제는 속도"...식약처, 규제 혁신·글로벌 조화 가속 • 신약개발의 동반자"...달라지는 규제기관의 역할 • 내용없는 요란한 구호 정책	• 미국 식품의약국(FDA), 유럽의약품청(EMA), 일본 의약품의료기기종합기구(PMDA) 등 주요국 규제기관과 다자간 협력회의 및 양자 워크숍을 열어 바이오 의약품 허가·심사 과정에서 발생하는 주요 규제 현안을 논의(2026.08.27.). • 유럽의약품청(EMA)이 주관하는 의약품 과학적 공동평가 프로그램인 'OPEN 프로그램'에 공식 참여

3. 전통적 비임상 전략의 Gap 분석

- ① **동물 모델의 종간 차이(Species Difference):** 동물의 생리·대사·면역 체계는 인간과 상이합니다. 동물 실험에서 확인된 효능(Efficacy)과 독성(Toxicity)이 인간에게 그대로 재현되지 않는 경우가 많음.
- ② **표현형 중심의 한계:** 과거의 독성 평가는 장기 무게 변화, 혈액학적 분석 등 외형적 결과에 의존하여, 분자 수준의 미세한 세포 독성이나 인간 특이적 대사체를 발견하기 어려웠음.
- ③ **임상 설계와의 불일치:** 비임상 시험의 투여 경로, 투여 기간, 바이오마커가 실제 임상 1/2상 프로토콜과 유기적으로 연계되지 않아 중개연구(Translational) 관점의 공백이 발생하고 Gap filling 필요성.

4. 전통적 비임상 전략과 환자 맞춤형 비임상 전략의 비교

- <표>에서처럼 전통적 비임상 전략과 환자 맞춤형 비임상 전략의 비교임. 현재 대부분의 신약 개발의 적응증(indication)은 항체-약물 접합체(ADC), mRNA 치료법, siRNA/ASOs, 표적 단백질 분해체(PROTACs), 그리고 세포/유전자 치료제로 개발이 가능한 희귀질환이 다수임. 따라서 **Country K에서는 모든 신약의 비임상 자료 평가를 전통적 비임상 전략인 가이드라인 문서의 체크리스트에 의존함. 이는 해당 약물과 타깃 환자군에 가장 적합한 중간 Gap을 채우기에는 부족하며 결과적으로 신약 개발의 장애물이 됨.**

<표> 전통적 비임상 전략과 환자 맞춤형 비임상 전략의 비교

구분	전통적 비임상 전략	환자 맞춤형 비임상 전략 (규제기관 권장 방향)
평가 모델	• 획일적인 표준 실험동물(설치류, 영장류) 중심	• 환자 유래 오가노이드, Organ-on-a-chip, 유전자 가위 활용 질환 모델 동물
데이터 도출	• 전신 독성 및 부작용의 단순 관찰	• AI·빅데이터 기반 타겟 예측, 유전형 및 바이오마커 기반의 정밀 유효성 검증
규제 관점	• 가이드라인 문서의 체크리스트 충족 여부	• '과학적 타당성(Science-led)': 해당 약물과 타겟 환자군에 가장 적합한 모델 조합인지 평가

5. Gap filling과 Country K의 비임상 정책 방향

- 전통적으로 획일적 동물실험과 가이드라인 문서의 체크리스트 충족 여부로 규정되는 전통적 비임상 전략이 임상 실패율 90%의 결과를 극복하기 위한 Country K의 비임상 정책의 추구 방향

- 인체 및 환자-유래 Organ-on-a-chip 및 3D 오가노이드(Organoids)의 결과를 비임상 결과와의 차이를 극복할 수 있는 gap filling 정책의 적용 노력. 확인된 결과, 환자-유래 organoid의 임상 결과와의 일치율은 70%임(Romero 등, 2025). 지금까지 그 어떤 비임상 모델도 이를 넘는 자료는 없음.
- 인허가 속도는 전통적 비임상 전략에 특화된 인재가 아닌 과학적 타당성(Science-led)을 추적 및 판단할 수 있는 능력에 있음. 예를 들어 <표>와 같이 약물의 모달리티마다 중요한 비임상 Gap이 무엇이며 이를 어떻게 극복할 수 있는 전략을 안내할 수 있는 인재 양성이 필요. 특히 NAM처럼 아직 국제적으로 규제 경험이 충분히 축적되지 않은 기술일 수록 주요 규제기관이 과학적 판단을 할 수 있는 능력이 중요함.

<표> 약물 모달리티별 비임상 Gap과 Gap-filling 전략

모달리티 유형	중요한 비임상 Gap	Gap-filling 전략
mRNA 및 올리고뉴클레오타이드 (siRNA/ASO)	<ul style="list-style-type: none"> 조직 특이적 전달 장벽 비표적 축적 / 선천적 면역 독성 	<ul style="list-style-type: none"> 맞춤형 지질 나노입자(LNP) 공학 Off-target 스크리닝을 위한 고급 다중 오믹스 프로파일링
항체-약물 접합체(ADC)	<ul style="list-style-type: none"> 조기 탑재체 방출(안정성) Bystander 효과 독성 	<ul style="list-style-type: none"> 고체 상태 화학 및 초기 조제 최적화 실시간 영상 모니터링 동역학적 처리
표적 단백질 분해체 (PROTACs)	<ul style="list-style-type: none"> 후크 효과(nonlinear hook kinetics) 낮은 수용성 / 투과성 	<ul style="list-style-type: none"> 후크 효과(hook effect, 정량분석법을 방해하는 유형)를 규명하기 위한 정량적 시스템 약리학(QSP, Quantitative Systems Pharmacology) 모델링 맞춤형 지질 기반 또는 계면활성제 공용매 제형
세포 및 유전자 치료 (CAR-T / TCR-T)	<ul style="list-style-type: none"> 제조 확장성(CMC) 종양 외, 표적 장기 독성 	<ul style="list-style-type: none"> 조기 통합 품질 바이 디자인(QbD, Quality by Design) 표준 가상 환자 그룹을 시뮬레이션하는 다중 규모 디지털 트윈(Multi-scale Digital Twins)

- 임상 예측 중심의 'Fail-Fast' 프로세스 구축

- **체크리스트 탈피:** 가이드라인이 요구하는 항목을 채우는 것에 만족하지 않고, '이 약물이 인체 내에서 왜 실패할 수 있는가?'라는 질문에 초점을 맞춘 자체 검증 시험 (Investigator-initiated studies)을 포트폴리오에 추가해야 함.
 - **희귀환자에게 미세용량 투여 시험(Microdosing / Phase 0):** 희귀질환 치료제인 경우 비임상 후기 단계에서 환자에게 극소량을 투여하여 안전성을 확보한 상태로 약물동태(PK) 프로파일을 조기에 확인하는 방안을 고려해야 함.
- ④ 인공지능(AI) 및 인실리코(In Silico) 모델링 연계: 정량적 시스템 독성학(QST) 및 정량적 시스템 약리학(QSP)을 통해 컴퓨터상에서 인체 내 약물 동태와 독성을 시뮬레이션이 필요함. **그러나 데이터가 동물 또는 인체(환자) 중심인지 그리고 digital twin의 사용 유무에 대한 평가가 이루어져야 함.**

<참고자료>

Romero JM, Magrill J, Kalashnikov N, Luo YZ, Chen OJ, Busque S, Ma R, Atallah A, Lazaratos AM, Mendelson D, Wilson L, Deshmukh S, Taifour T, Sorin M, Arthur I, Kuasne H, Levett JY, Wang Y, Seufferlein T, Kleger A, Gout J, Beutel AK, Brugarolas J, Poshusta ZS, Hogenson TL, Fernandez-Zapico ME, Hamada A, Yagishita S, Nichols A, Barrett JW, Papaccio F, Castillo J, Inoue M, Massfelder T, Lang H, Lindner V, Nilsson J, Dantes Z, Wells GA, Kim SH, Ittmann MM, Villanueva H, Lerner SP, Sikora AG, Theillet C, Huang DQ, Khuong-Quang DA, Yeung JC, Siegel PM, Watson IR, Zogopoulos G, Rose AAN, Dankner M. Comparative analysis of patient-derived organoids and patient-derived xenografts as avatar models for predicting response to anti-cancer therapy. medRxiv [Preprint]. 2025 Aug 12:2025.08.10.25333051. May 23, 2024

Blanco MJ, Gardinier KM. New Chemical Modalities and Strategic Thinking in Early Drug Discovery. ACS Med Chem Lett. 2020 Jan 14;11(3):228-231.

Trevor J Henderson, Emerging modalities in therapeutics: A comprehensive guide. DDN. Oct 18, 2025. www.drugdiscoverynews.com/emerging-modalities-in-therapeutics-a-comprehensive-guide-16744.

Erika Russell. The translational gap in AI drug discovery: Why preclinical predictions fail in humans. DDN. Jan 26, 2026. www.drugdiscoverynews.com/enabling-the-translational-gap-with-ai-16965

CN Bio. Addressing the challenges of developing new modality drugs.DDN. Mar 1, 2025. www.drugdiscoverynews.com/addressing-the-challenges-of-developing-new-modality-drugs-16248

Xyzagen. Nonclinical Gap Analysis. 2026. www.xyzagen.com/solutions/regulatory-strategy-scientific-writing/nonclinical-gap-analysis/

Chengbin Xue, Fujia Sun, Hui Zhu, Jianfeng Shi, Jiaqi Wang, Qiuwen Sun, Muyuan Tong, Xiaosong Gu, Qianqian Han, Wei Shi, Advancements, Strategies, and Challenges in Organoid-Based Drug Evaluation for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Engineering, Volume 62, 2026, Pages 34-50, ISSN 2095-8099.

Mirlohi MS, Yousefi T, Aref AR, Seyfoori A. Integrating New Approach Methodologies (NAMs) into Preclinical Regulatory Evaluation of Oncology Drugs. Biomimetics (Basel). 2025 Nov 24;10(12):796.

Srinivasulu Meruva Pallampati. From Models to Medicine: How Quantitative Science is Closing the Translational Gap. EXCELRA. 2024. www.excelra.com/blogs/models-to-medicine-drug-development/

Mohamed El-Tanani, Syed Arman Rabbani, Yahia El-Tanani, Ismail I. Matalka, Ikramy A. Khalil, Bridging the gap: From petri dish to patient - Advancements in translational drug discovery, Heliyon, Volume 11, Issue 1, 2025, e41317, ISSN 2405-8440.

Mao, X., Wang, Z., Kong, S. et al. The evolving global landscape of first-in-class oncology drug innovation. Sig Transduct Target Ther **11**, 174 (2026).

133. 기사 - 토종 동물시험업체 '수주 가뭄' 심화에 대한 의견

1. 토종 동물시험업체 '수주 가뭄' 심화 기사

- 다음의 기사처럼 신약의 비임상 독성시험과 관련된 대부분의 기업이 적자를 내면서 운영에 어려움을 겪고 있음.

<기사> 한국경제 토종 동물시험업체 '수주 가뭄' 심화 이민형 2026. 10. 6. 18:08

- 적자 늪 빠진 비임상 CRO
- 바이오 신약 R&D 증가에 국내 주요 업체 '적자 행진'
- 신약개발사 '해외 위탁' 선호. 해외수주·AI 활용 확대 과제로

- 신약 개발에 필요한 동물시험을 대신 수행하는 국내 주요 업체들이 적자의 늪에서 헤어 나오지 못하고 있다. 신약 개발사들이 시험 설계 단계부터 해외 규제당국의 허가 대응 경험과 네트워크가 풍부한 다국적 시험수탁기관(CRO)을 선호하면서 수주 경쟁에서 밀리고 있어서다.



◇“외국 CRO에 잠식 가속화”

- 6일 금융감독원 전자공시시스템에 따르면 국내 주요 비임상 CRO 기업인 바이오톡스텍과 코아스템캠온은 2023년부터 올해 상반기까지 4년째 영업적자를 이어가고 있다. 코아스템캠온은 올 상반기 103억원, 바이오톡스텍은 20억원의 영업손실을 기록했다. 비임상 CRO는 사람 대상 임상시험에 앞서 동물 등을 이용해 약의 효과와 안전성을 확인하는 시험을 수행하는 업체다. 국내 시장은 코스닥 상장사인 두 회사와 정부출연 국가독성과학연구소(KIT)가 과점 형태를 띠고 있다.
- 신약 후보물질의 유효성 평가 등 비임상 시험을 주력으로 하는 HLB바이오스텝도 수주 부진으로 시험시설 가동률이 낮은 수준에 머물고 있다. 이 회사의 유효성 시험 가동률은 2023년 49.0%에서 2024년 27.9%로 떨어진 뒤 지난해에도 35.6%에 그쳤다. 올해 상반기에는 45억원의 영업손실을 냈다.
- 국내 비임상 CRO가 고전하는 데는 신약 개발사들의 해외 업체 선호 영향이 크다. 한 CRO 기업 관계자는 “국내 제약·바이오 기업 대부분이 기술수출을 목표로 하다 보니

랩코프, 찰스리버 등 외국계 기업을 선호하는 경향이 뚜렷해지고 있다”고 진단했다. 식품의약품안전처에 따르면 국내 보건·의료 관련 실험동물 사용량은 2025년 약 297만 마리로 2022년 314만 마리에서 3년간 5.4% 줄어들었다. 이 기간 국내 제약·의료기기·화장품 산업의 연구·개발(R&D) 투자가 35.4% 증가한 것과 대조적이다.

◇인력 유출까지 ‘악순환’ 우려

- 국내 CRO 기업의 수주 부진이 지속되면서 전문인력 유지에도 어려움이 커지고 있다. 차별화한 보상을 제공하기 어려워지면서 우수 인력이 바이오·제약 회사 등으로 꾸준히 이탈하고 있어서다. 비임상시험은 고도의 기술력과 노하우를 요구해 담당인력의 기술 육성에 많은 시간과 비용이 들어간다. 수주가 줄어 시험시설 가동률이 떨어지더라도 이런 비용은 단기간에 줄이기 어렵다. 한 국내 CRO 업체 관계자는 “국내 업체도 일부 효능·독성시험에서 경쟁력을 갖추고 있지만 해외 허가 경험과 글로벌 고객망에서는 대형 업체에 밀리는 게 사실”이라며 “수주 부진이 장기화하면 전문인력 유출과 시험 역량 약화로 이어져 경쟁력이 더 떨어질 수 있다”고 우려했다.
- 국내 비임상 CRO가 수익성을 회복하려면 핵심 강점인 의사소통과 신속성, 대관업무 효율 등에서 격차를 더욱 벌려야 한다는 분석이 나온다. 해외 인허가에 활용할 수 있는 시험 역량 강화와 첨단 기술기업으로의 전환도 장기 과제다. 전우빈 벨류파인더 선임연구원은 “데이터와 인공지능(AI) 기반 기술집약형 사업 모델로 전환하면 외형 성장과 수익성 개선을 동시에 기대할 수 있을 것”이라고 말했다.

<이민형 기자 meaning@hankyung.com>

2. 한국의 비임상 독성시험의 미국 등의 글로벌 독성시험과 비교

구분	국내 GLP 독성시험 수준	미국 top-tier CRO 수준
1) 포지티브 규제 환경	• 한국은 규정에 허용된 것만 인정하는 ' 포지티브 규제 ' 경향이 강함.	• 미국 FDA는 법적으로 금지되지 않은 모든 혁신적 접근을 허용하는 ' 네거티브 규제 ' 방식
견해	<ul style="list-style-type: none"> • 중개과학(Translational Science)은 비임상과 임상 결과의 연관성 해석 역량 격차를 줄이기 위한 접근이라고 할 수 있음. • 미국 등 선진국은 동물이나 대체 모델의 데이터를 인간에게 어떻게 대입할지 연구하는 중개과학 및 예측 독성학 역량이 두텁지만, 국내 제약·바이오 업계는 단순히 가이드라인에 맞춘 시험(Check-box) 위주로 수행하는 경향이 있어 데이터 해석과 시험 디자인의 유연성이 부족함. • 이와 같은 유연성은 독성학에 대한 기초 지식이 있을 때 적용이 가능하며 중개과학의 부족함은 높은 임상 실패율과 연관이 있음. • 특히 미국은 2022년과 2025년에 FDA 현대화법 2.0(FDA Modernization Act 2.0), 3.0을 통과시켜 신약 허가 시 동물실험 자료가 의무가 아님을 	

	<p>법제화하고 약 200여 개의 대체시험법을 허용하고 있음. 반면 한국은 오가노이드, 생체조직칩(MPS) 등 첨단 대체시험법 개발 역량은 뛰어나지만, 활용률이 18.2%에 그치는 등 실제 산업계와 규제 당국의 수용 및 법제화 속도가 상대적으로 느림.</p>	
2) 규제 표준	OECD 가이드라인 완벽 준수	글로벌 규제 표준 수립 및 주도
견해	<ul style="list-style-type: none"> • OECD 독성시험 가이드라인은 약물과 다른 비의도적 화학물질에 대한 독성시험 가이드라인임. 미국은 OECD 가이드라인보다 ICH 가이드라인 및 자체 가이드라인을 사용함. • 독성시험에서 가장 중요한 것은 임상시험에서 안전용량을 결정하는 NOAEL(no observed adverse effect level) 추정하는 것임. OECD와 미국 FDA가 제시하는 NOAEL의 개념이 다름. • 특히 OECD 가이드라인 NOAEL만 존재하지만 약물에 대한 독성시험의 FDA 가이드라인은 NOAEL 전후 NOEL과 LOAEL를 두어 용량-반응관계를 명확하게 설정을 유도함. • OECD 독성시험 가이드라인은 단순하며 독성시험의 해석 영역이 그렇게 중요하지 않음. 반면에 약물에 대한 독성시험은 확인된 변화에 대해 독성학적 해석을 기반으로 약물의 진정한 독성을 구분하여 NOAEL이 결정됨. • 이와 같은 차이로 임상시험에서 약물의 therapeutic range가 적게는 2배 많게는 10 이상을 차이를 유도하여 신약 개발 실패에 기여함. • 특히 OECD 가이드라인은 비의도적 화학물질에 대한 가이드라인인데 20여종의 다양한 약물이 출현한 현재에도 적용되고 있음. 	
3) 품질/인증	미국 FDA GLP 실사 통과 및 전 세계 규제기관에서 무조건 신뢰하 AAALAC 완전 인증	는 레벨
견해	<p>GLP 실사는 독성시험의 질을 결정하는 것이 아니라 신뢰성을 결정하는 것임. 독성시험의 신뢰성을 기본으로 하고 질적 향상을 우선하여야 되는데 규제기관 자체부터 질적 향상에 관심이 없고 신뢰성 확인에 중점을 둠. 신약 개발에 실질적으로 도움이 되는 독성시험에서 변화가 진정한 독성 유무 판단과 해석에는 전혀 관심이 없고 그러한 능력도 없는 것이 현실임. 이와 같은 규제기관의 현실적 문제가 국내 독성시험의 수준이 글로벌 수준과 차이 낄게함.</p>	
4) 데이터 해석	정형화된 독성 데이터 생산 우수, 심층 해석은 보완 필요	오랜 축적 데이터를 기반으로 한 독성 병리 해석 노하우 탁월
견해	<ul style="list-style-type: none"> • 대부분의 독성시험에서 변화 지표는 형태학적 및 생리학적 변화에 대해 정성적이고 정량적임. 그러나 이들 지표는 기능을 나타내는 것이 아님. 일부 지표가 상승되거나 저하되어도 기관 및 기관계의 기능이 저하는 되는 것이 아님. • 이와 같은 변화를 통해 용량-반응관계를 파악하고 가장 낮은 변화가 가역적이고 기능적 변화를 유도하지 않는다면 치료 용량으로 포함이 되도록 하는 독성 병리 해석에 대한 논문 고찰 등에 대한 노력이 없음. • 이를 극복하기 위해서는 시험물질에 의한 변화가 없다면 독성시험의 결 	

	<p>과를 규제기관은 받아들이지 않아야 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 이는 약물 반응을 보다 올바른 해석과 더불어 신약 개발에 도움이 되는 therapeutic range를 넓히는 역할을 함.
--	---

3. 결론

- 결론적으로 국내 GLP 독성시험의 낮은 수준은 미국과 비교해 데이터 신뢰성 자체의 차이이기보다는, 규정에 허용된 것만 인정하는 '포지티브 규제' 경향에 기인함. 반면에 미국 FDA는 법적으로 금지되지 않은 모든 혁신적 접근을 허용하는 '네거티브 규제' 방식으로 적용하여 규제의 유연성을 높임.
- 국내와 미국의 규제기관에서 심층적인 독성 전문 해석 인력의 두터움에서 오는 차이와 더불어 중개과학 및 예측 독성학의 높은 역량에 기인하는 것으로 판단됨.