

독성시험의 현실과 FDA 사례를 고려한 성공적인 IND를 위한 Weight-of-Evidence approach

2025. 09. 08

AITOX

detox35@daum.net
www.darwinconsultings.com

박영철 (독성학박사)

내용

Part I. Evidence-based toxicology와 Weight-of-Evidence(WoE)

Part II. 3가지 극복을 위한 독성시험 및 규제 분야에서의 Dilemma와 해결

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)
2. The study director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)
3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)
4. The regulatory agency's Dilemma(규제기관의 딜레마)

Part III. AI-based toxicology prediction을 통한 weight of evidence 가능성

Part IV. 비임상 독성연구에 대한 결론

Part I. Evidence-based toxicology와 Weight-of-Evidence(WoE)

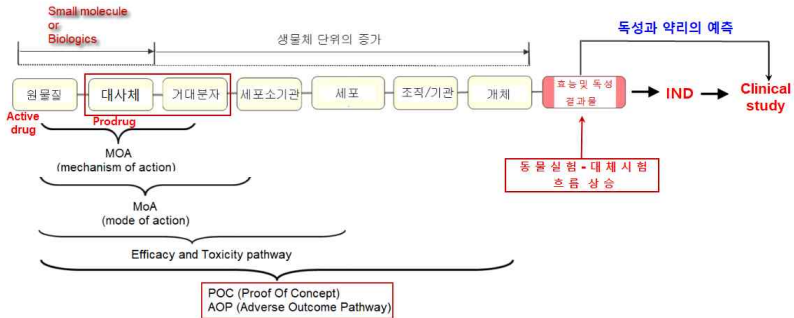
1. Evidence-based medicine vs Evidence-based toxicology

<그림에서처럼 MOA에서 POC까지의 신약개발 과정에서 자료의 3가지 특성>

- 투명성(transparency), 객관성(objectivity), 일관성(consistency)을 만족시키는 신약 → Evidence-based medicine

<비임상안전성 측면에서 다양한 상황>

- 독성학적 특성 3가지에 대한 부족성, 독성시험 가이드라인 부재, 동물실험 제한, 새로운 약물_MODAL리티의 출현, 독성과 약리작용 용량에서의 중첩, 중간 차이, 병용요법 및 복합체 등에 의한 다각적 이해 등 → Evidence-based toxicology



<그림> MOA에서 POC까지의 생물체 단위별 단계

2. Evidence-based toxicology vs Weight of evidence(증거 가중치, WoE)

- **Weight of evidence:** ①독성의 다양한 정보와 ②자료의 부정확성 및 상반적 상황에서 자료의 결정 과정을 묘사할 때 사용되는 용어
- **Weight of evidence 이 없다면** evidence-based toxicology approach이 될 수 없음. 따라서 evidence-based toxicology approach의 핵심 도구(Hartung, 2009)
- Weight of evidence의 2가지 특성은 증거의 **신뢰성(believability)**과 **설득력(persuasiveness)**
- <그림>에서처럼 2007년 WoE 합동연구 시작과 2017년 EFSA - Evidence-based toxicology에 대한 **최초 가이드 라인**

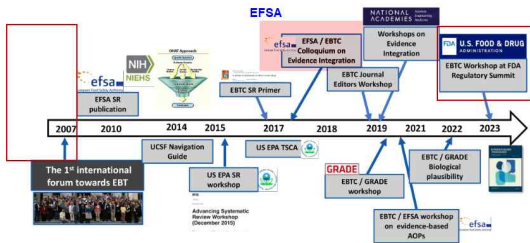


Figure 2. Timeline of evidence-based toxicology movement. EBT: evidence-based toxicology; EBTC: Evidence-Based Toxicology Collaboration; EFSA: European Food Safety Authority; US EPA: US Environmental Protection Agency; US EPA IRIS: US EPA Integrated Risk Information System; GRADE: The Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation working group; US EPA TSCA: 2016 Frank R. Lautenberg Chemical Safety for the 21st Century Act, updating the US EPA Toxic Substances Control Act; SR: systematic review; UCSF: University of California San Francisco.

3. EFSA의 Evidence-based toxicology & Weight of evidence

- Guidance on the use of the **weight of evidence approach** in scientific assessments(EFSA Journal, 2017)
- Unstructured evidence retrieval → Data weight → **Toxicity-related gap filling**

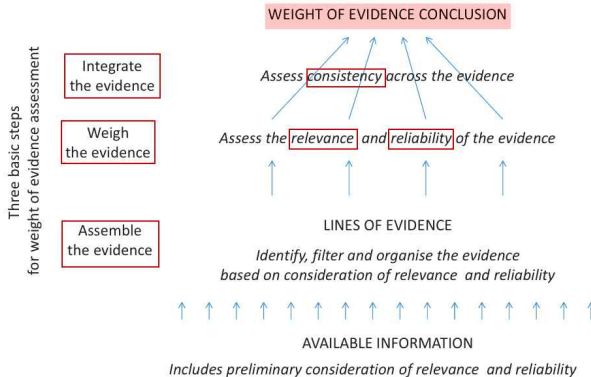


Figure 2: Relationship of relevance (including biological relevance), reliability and consistency to the three basic steps of weight of evidence assessment and to the conclusion for a weight of evidence question

4. 2025 BIO Regulatory Innovation Conference(바이오 규제 혁신 컨퍼런스)

- 2025년 4월 23일-24일에 개최된 2025 BIO Regulatory Innovation Conference(바이오 규제 혁신 컨퍼런스)에서 미국 FDA IND를 위한 **Pharmacology/Toxicology reviewer** 신양미 박사님의 발표에 대한 중요성
- 비임상연구의 글로벌화를 위한 **Turning point**



The poster for the 2025 BIO Regulatory Innovation Conference, titled "Roadmap to the Finish Line", is set against a dark blue background with a starry pattern. At the top left is the conference logo, and at the top right is a QR code with the text "미국규제전문가 초청 바이오 규제 혁신 컨퍼런스" and "등록하기はこちら". The main title "2025 BIO REGULATORY INNOVATION CONFERENCE" is in large, bold, green and white letters, followed by the subtitle "Roadmap to the Finish Line". Below this, the dates "2025.04.23 (Wed) - 24 (Thu)" and the venue "Sheraton Grand Incheon Hotel" are listed. A central text box contains the conference's purpose: "미국규제전문가와 신약 연구개발 기업 간의 교류를 통해 최신 정보를 공유하고, 규제 장벽을 효과적으로 극복할 수 있는 실질적인 팁과 노하우를 제공하는 2025 BIO Regulatory Innovation Conference에 여러분을 초대합니다." Below this is a section titled "Moderator & Speakers" which lists various topics and the experts who will be speaking or moderating. The topics include CMC Small Molecules, CMC Small Molecules / Biology, Non-Clinical (Small Molecules / Biology), Clinical (Small Molecules / Biology), and Regulatory. Each topic is accompanied by a small portrait of the speaker and their name and affiliation. The speaker Yangmee SHIN, Ph.D., is highlighted with a red box.

미국규제전문가 초청
바이오 규제 혁신 컨퍼런스

2025 BIO REGULATORY INNOVATION CONFERENCE
Roadmap to the Finish Line

2025.04.23 (Wed) - 24 (Thu) | Sheraton Grand Incheon Hotel

미국규제전문가와 신약 연구개발 기업 간의 교류를 통해 최신 정보를 공유하고,
규제 장벽을 효과적으로 극복할 수 있는 실질적인 팁과 노하우를 제공하는
2025 BIO Regulatory Innovation Conference에 여러분을 초대합니다.

Moderator & Speakers

Moderator 1 Day 1 & DAY 2

이선희
Sun Hee LEE, Ph.D.
Ewha Womans Univ.
Regulatory science expert member of
the National Bio-Pharmaceutical Commission

최준영
Jun Young CHOI, Ph.D.
Head, Division of R&D, ST Pharm

CMC Small Molecules

Strategies to Streamline CMC Development
and Expedite Regulatory Clearance:
Risk- and Platform- Based Approaches

CMC Small Molecules / Biology

Key Regulatory and CMC Considerations
for the Next Drug Modalities

박준태
Jun Tae PARK, Ph.D.
U.S. Regulatory Expert, KODEI

Non-Clinical (Small Molecules / Biology)

Current Nonclinical Testing Paradigms
for Drug Development: A Regulatory
Perspective

신양미
Yangmee SHIN, Ph.D.
U.S. Regulatory Expert

Clinical (Small Molecules / Biology)

Clinical Development Strategy:
The Good and The Ugly

정상목
Sang Mok CHUNG, Ph.D.
U.S. Regulatory Expert
BBOSTAR

Regulatory

Regulatory Strategies in Successful Drug
Development and Approval

안해영
Hae-Young AHN, Ph.D.
U.S. Regulatory Expert
AblBio Consulting

주최 | KoreaBio® 후원 | The Yakup 약업신문 후원 | 신약연구를 선도하는 KRPIA 한국규제혁신지원센터

<USFDA의 IND를 위한 비임상 리뷰에 대한 특징적 사례>

사례-1) ADC 치료제는 페이로드(payload)의 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(생식발달독성) 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.

5. FDA의 비임상시험 새 기준 제시 - WoE 중심 규제 패러다임 전환

<참고기사 원문> 약업신문 권혁진 기자<hjkwon@yakup.com> 입력 2025-05-29 06:00

① Weight-of-Evidence(WoE), 새로운 규제 언어

② 가이드스 수용 넘어, 과학적 설득력과 전략적 데이터로 글로벌 규제 대응 필요

③ 첨단 기술 기반 대체시험법 도입에 따른 비임상 생략 및 축소 진행 중

- 결과적으로 in vivo보다 기존의 자료 또는 in vitro-기반 자료로 IND를 극복!!!
- 접근 방법은 Weight-of-Evidence(WoE)

Part II. 3가지 극복을 위한 독성시험 및 규제 분야에서의 Dilemma와 해결

- ① Weight-of-Evidence(WoE), 새로운 규제 언어
- ② 가이드선 수용 넘어, 과학적 설득력과 전략적 데이터로 글로벌 규제 대응 필요
- ③ 첨단 기술 기반 대체시험법 도입에 따른 비임상 생략 및 축소 진행 중

<4가지 분야에서 이해와 해결을 위한 접근>

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)
2. The study director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)
3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)
4. The regulatory agency's Dilemma(규제기관의 딜레마)

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

1) Adverse effect vs Non-adverse effect의 분류

① 4대 Adverse effect(역작용)

1. Changes which are clearly **adverse**
2. Changes which are adverse only at **higher severities**
3. Changes which are **adverse only** when seen in combination with **deleterious findings**(기능저하)
4. Test item-related exacerbations of **spontaneous findings**

② 4대 Non-adverse effect(비역작용)

1. **Adaptive** changes
2. **Secondary changes** and physiological responses due to **minor perturbations of homeostasis**
3. Minor changes due to **pharmacological effects**
4. Test substance-related changes of **low severity, with no functional disturbance**

(Lewis 등, 2002, Gopinath 등, 2019)

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect(비역작용) 예시

① **Adaptive changes**(reversible and show little negative functional impact) - 다양한 조직에서 **hypertrophy**(비대)

Mucosa hypertrophy



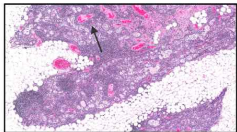
Figure 14. Diffuse mucosal hypertrophy, caecum, Sprague-Dawley rat. H&E.

(Gopinath 등 2019)

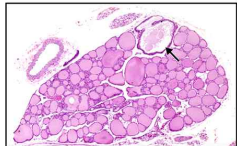
1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect의 예시

① **Adaptive changes** - Thymic involution(위축) & Congenital cyst(선천성 낭포)



Thymic involution in
a chronic rat study



Congenital cyst in
a rodent study

<참고문헌>

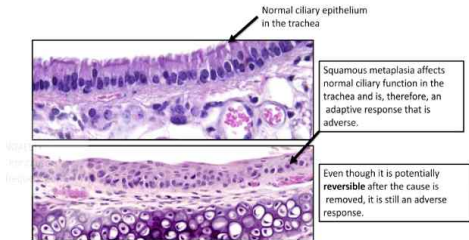
- International Academy of Toxicology Pathology (IATP)-Focus on Tox Path
- **Adverse, Non-adverse and Adaptive Responses in Toxicologic Pathology** by Robert R. Maronpot(2016)
- 32nd JSTP Annual Meeting, Takamatsu, Japan
- Website: focusontoxpath.com

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect의 예시

① **Adaptive changes**: Squamous metaplasia(편평화) → 기관의 정상적인 섬모 **기능의 감소**

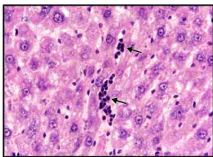
- An adaptive change can sometimes **be adverse**



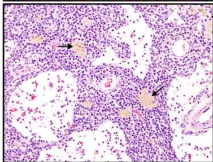
1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect(비역작용) 예시

② **Secondary changes** - Extramedullary hematopoiesis(**골수외조혈**) as secondary response to **bone marrow suppression**



Extramedullary hematopoiesis
in the liver – a secondary
response to bone marrow
suppression



Pigment in a lymph node – a
normal function in a
draining lymph node



<참고문헌>

- International Academy of Toxicology Pathology (IATP)-Focus on Tox Path
- **Adverse, Non-adverse and Adaptive Responses in Toxicologic Pathology** by Robert R. Maronpot(2016)
- 32nd JSTP Annual Meeting, Takamatsu, Japan
- **Website:** focusontoxpath.com

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect(비역작용) 예시

② **Secondary changes** - Adrenal gland의 Zona glomerulosa hypertrophy(부신피질의 구상대 비대)

- Secondary to **urinary electrolyte imbalances**, such as increased sodium excretion or increased urinary volume.

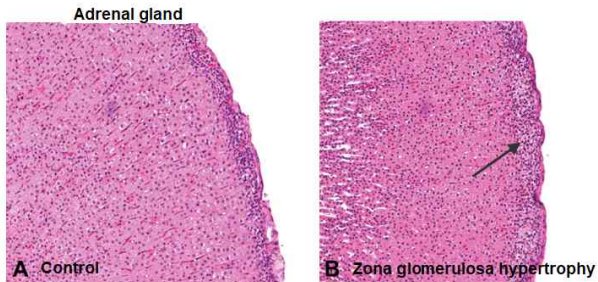


Figure 16. A, Control B, Zona glomerulosa hypertrophy, adrenals, Han Wistar rat. H&E.

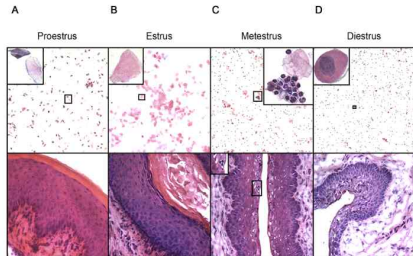
(Gopinath 등 2019)

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect(비역작용) 예시

② Secondary changes - Mild hormonally mediated changes in the female reproductive tract

- Estrous cycle



Tissue changes in the FRT during the estrous cycle of the mouse. Vaginal smears were taken from naive virgin C57BL/6 female mice (8–12 weeks old) over the course of one estrous cycle and used for determination of cycle stage. Mice were killed at PE (A), E (B), ME (C) and DE (D) and tissue sections of vagina were cut. Vaginal smears (top panel) and tissue sections (bottom panel) were stained with H&E. The insets in the top panel show typical cell types found in vaginal smears of each cycle stage. The inset in the bottom panel shows neutrophils present in vaginal epithelium. Representative images from conventional cycle stage assessments are shown. Top panel, 100× magnification; bottom panel, 400× magnification.

- 그 외 호르몬에 의한 변화: Keratinization or mucification of the vaginal epithelium, dilation of the uterine lumen, and a decrease in corpora lutea

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect(비역작용) 예시

③ Minor changes due to pharmacological effects - Reversibility

- 면역장기: Increased or decreased **cellularity**(세포충실도: 세포 vs 지방의 비율) of one or more compartments of Primary(골수, 흉선), Secondary(림프절, 비장, 점막관련 림프조직), Tertiary(비정상적인 조직에서 새롭게 형성되는 림프구조) lymphoid organs

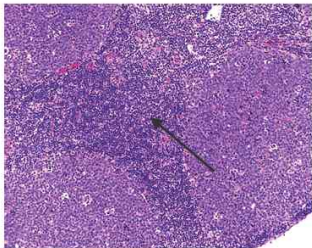


Figure 17. Increased cellularity, germinal centers, CD-1 mouse. H&E.

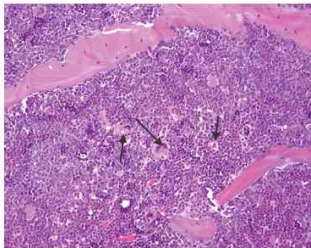


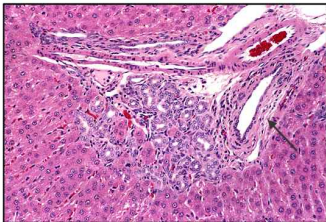
Figure 18. Increased granulopoiesis, bone marrow, CD-1 mouse. H&E.

(Gopinath 등 2019)

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect의 예시

④ Low severity, with no functional disturbance - Bile duct hyperplasia(담관 이상 증식)



Bile duct hyperplasia
in a chronic rat study

<참고문헌>

- International Academy of Toxicology Pathology (IATP)-Focus on Tox Path
- **Adverse, Non-adverse and Adaptive Responses in Toxicologic Pathology** by Robert R. Maronpot(2016)
- 32nd JSTP Annual Meeting, Takamatsu, Japan
- Website: focusontoxpath.com

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

2) Non-adverse effect의 예시

④ Low severity, with no functional disturbance - Hypertrophy, droplet, Vacuolation

Goblet cell hypertrophy

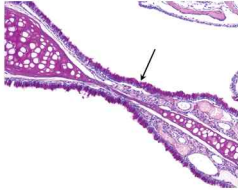


Figure 19. Goblet cell hypertrophy, nasal turbinates, CD-1 mouse. Periodic acid-Schiff stain.

Eosinophilic droplets



Figure 21. Eosinophilic droplets in olfactory epithelium, nasal turbinates, CD-1 mouse. H&E.

Fatty vacuolation

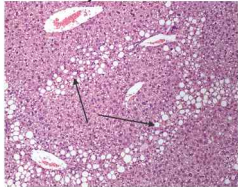


Figure 20. Fatty vacuolation, liver, mouse. H&E.

Vacuolation

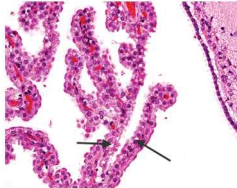


Figure 22. Vacuolation, choroid plexus, cynomolgus monkey. H&E.

(Gopinath 등 2019)

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

3) 조직병리학적 변화를 **Non-adverse effect**으로 결정 -고려할 2가지 요소

- Non-adverse effect's histopathological findings such as these do not compromise normal tissue physiology

- ① Do not impair functional capacity,
- ② Do not increase susceptibility to other influences

<예시>

- Bile duct , Lymphoid 등의 hyperplasia
- Microsomal enzyme induction
- Decreased serum ALT and AST
- Extramedullary hematopoiesis in liver

<참고문헌>

- International Academy of Toxicology Pathology (IATP) - **Focus on Tox Path**
- **Adverse, Non-adverse and Adaptive Responses in Toxicologic Pathology** by Robert R. Maronpot(2016)
- 32nd JSTP Annual Meeting, Takamatsu, Japan
- **Website: focusontoxpath.com**

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

3) 실제 사례 - 바이오의약품(재조합 단백질)의 독성시험에 있어서 판정

분류	수컷		암컷	
	측정지표	용량군	측정지표	용량군
비시점 물질- 유래 변화	주사부위의 피하에서 다소성의 출혈 2례	대조군	주사부위의 피하에서 다소성의 출혈 3례	대조군
	주사부위 진피에 다소성 다형핵혈구 침윤 1례	대조군	주사부위의 다소성 다형핵혈구 침윤 1례	대조군
	주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 2례	회복군의 대조군	진피에 다소성의 단핵혈구 침윤 1례	대조군
	폐의 다소성의 폐포상피세포의 증식 2례	회복군의 대조군	주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 1례	회복군의 대조군
	주사부위 피부의 피하에 다소성의 단핵혈구 침윤 1례	회복군의 대조군	폐의 다소성의 폐포상피세포의 증식 1례	회복군의 대조군
	주사부위의 피하에 다소성의 출혈 2례	100	폐의 다소성의 폐포상피세포의 증식 2례	100
	주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 1례	200	주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 3례	100
	주사부위 진피에 다소성의 단핵혈구와 진피 다형핵혈구 침윤 각 1례	200	주사부위 피부의 피하에 다형핵혈구 침윤 2례	100
	폐에 폐포상피세포의 다소성 증식 1례	200		
	주사부위 피하에 다소성의 출혈 1례	400	폐의 다소성의 폐포상피세포의 증식 2례	200
	주사부위 피하 다형핵혈구 침윤 1례	400	주사부위 피부의 피하에 다소성의 출혈 2례	200
	주사부위 진피에 다소성의 단핵혈구 침윤 1례	400	주사부위 피부의 다형핵혈구 침윤 1례	400
	주사부위 진피에 다형핵혈구 침윤 2례	400		

사람물질- 유래 경미한 조직학적 변화 (NOAEL 기준)	간의 글로망혈관(Sinusoid)내에 다형성핵혈구 침윤 3례	100	간의 글로망혈관내에 다소성의 다형핵혈구 침윤 3례	100
	비장의 다소성 출혈 2례	100	비장의 다소성의 출혈 3례	100
	비장의 다형핵혈구 침윤 3례	100	비장의 다형핵혈구 침윤 3례	100
	장간막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 2례	100	척골막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 1례	100
	폐에 폐포상피세포의 다소성 증식 (Hyperplasia) 1례	200	장간막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 2례	100
	간의 글로망혈관내에 다소성의 다형핵혈구 침윤 3례	200	간의 글로망혈관내에 다소성의 다형핵혈구 침윤 3례	400
	비장의 백색수질에 다소성의 출혈 2례	200	비장의 백색수질에 다소성의 출혈 3례	400
	비장의 적색수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 3례	200	비장의 적색수질 다형핵혈구 침윤 3례	400
	장간막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 2례	200	척골막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 1례	400
	간의 글로망혈관내에 다소성의 다형핵혈구 침윤 3례	400	장간막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 1례	400
	비장의 백색수질에 다소성의 출혈 2례	400	간의 글로망혈관내에 다소성의 다형핵혈구 침윤 2례	400의 회복군
	비장의 적색수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 3례	400	비장의 백색수질에 다소성의 출혈 2례	400의 회복군
	척골막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 3례	400	비장의 적색수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 1례	400의 회복군
	간막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 2례	400	척골막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 1례	400의 회복군
	간의 글로망혈관내에 다소성의 다형핵혈구 침윤 2례	400의 회복군	장간막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 1례	400의 회복군
	비장의 백색수질에 다소성의 출혈 1례	400의 회복군		
	척골막혈관점의 수질에 다소성의 다형핵혈구 침윤 1례	400의 회복군		

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

4) 시험물질에 의한 세포 증식 및 면역세포 침윤, 출혈에 대한 Weight of evidence

- ① ISR(injection site reaction, 주사부위 반응)
- ② 바이오의약품의 영향 - 약리학적 반응
- ③ 변화에 대한 판정의 중요한 기준 - **Safety concern**

참고문헌을 통한 시험물질의 약리작용 Weight of evidence

Abstract

- Positively Regulates Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells(MSC)

Abstract

- Human mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) have capabilities for multi-differentiation, immunomodulation, and hematopoietic support.

Abstract

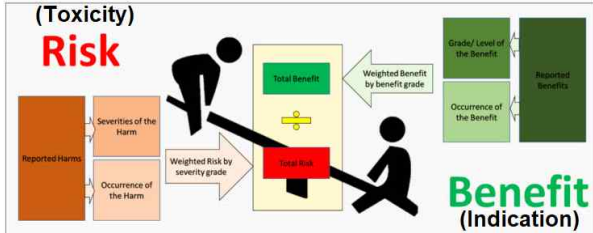
- Plasmin-independent and highly specific thrombolytics that can dissolve intravascular thrombi specifically with bleeding risk.

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)

4) 시험물질에 의한 세포 증식 및 면역세포 침윤, 출혈에 대한 **Weight of evidence**

③ 변화에 대한 판정의 중요한 기준 - **Safety concern: 가역성과 질병과의 관계 측면에서 결정**

- **Safety concern**의 판단 기준: 독성시험은 정상동물로 수행되며 확인된 adverse effect와 Indication의 **weight of evidence** (FDA, 2005)
- **Weight of Evidence: Risk-benefit analysis** → **Toxicity-indication analysis**

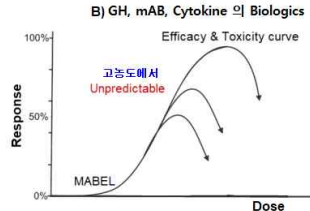
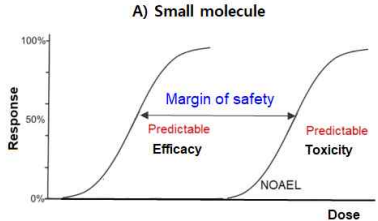


2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

1) 약물 모달리티별 독성 및 유효성의 용량-반응곡선의 차이에 대한 인식

- (그림 - A)의 Small molecule과는 다르게 (그림 - B)의 Biologics는 효력과 독성의 반응이 동일 곡선상에 존재하며 이는 Metabolism vs Biotransformation의 차이에 기인

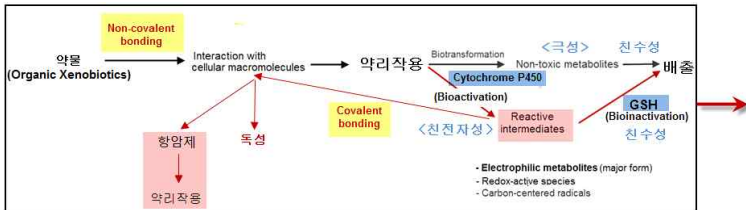
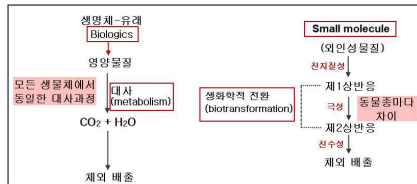
- 성장호르몬, 항체, 사이토카인 등의 독성시험



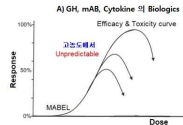
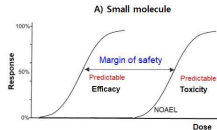
2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

2) Metabolism vs Biotransformation(생화학전 전환)에 대한 이해

<그림-1 Biologics vs Biotransformation>



<그림-2 외인성물질의 Biotransformation>

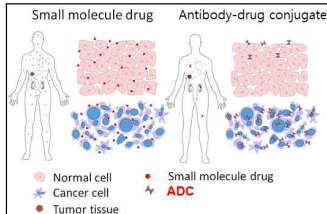


2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

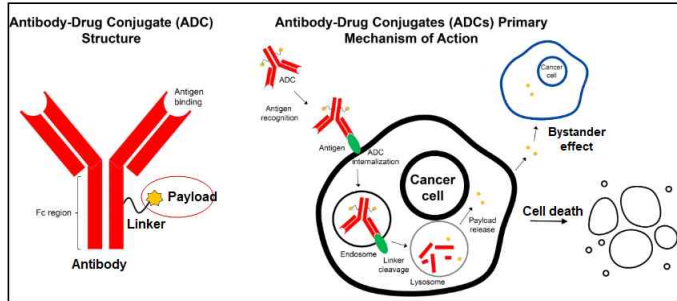
3) Biotransformation-기반 신약 개발의 응용: 항체-약물접합체(antibody-drug conjugate, ADC)

3-1) 병용요법과 ADC의 차이

<그림-1> 병용요법과 ADC의 독성 차이



<그림-2> ADC의 구성과 약리기전



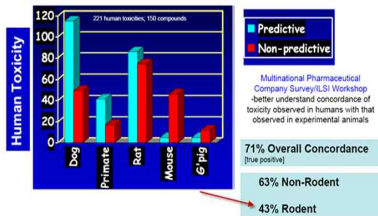
(Yabukarski, 2024)

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

3) Biotransformation-기반 신약 개발의 응용: 항체-약물접합체(antibody-drug conjugate, ADC)

3-2) 종별 독성 일치성과 종별 Cytochrome P450

<그림> 종별 독성의 일치성



(Olson 등, 2000)

<표> 종별 cytochrome P450

Toxin-drug metabolizing CYP isozymes; CYP 1, 2, 3 families

CYP family	CYP subfamily	CYP isozyme	Human	Monkey	Rat	Mouse
CYP1	CYP1A	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1	CYP1A1 CYP1A2 CYP1B1
	CYP2A	CYP2A6 CYP2A7 CYP2A13	CYP2A6 CYP2A7 CYP2A13	CYP2A23 CYP2A24	CYP2A1 CYP2A2 CYP2A3	CYP2A4 CYP2A5 CYP2A12 CYP2A22
	CYP2B	CYP2B6 CYP2B7	CYP2B6 CYP2B7	CYP2B17	CYP2B1 CYP2B2 CYP2B3	CYP2B9 CYP2B10
CYP2	CYP2C	CYP2C8 CYP2C9 CYP2C18 CYP2C19	CYP2C8 CYP2C9 CYP2C18 CYP2C19	CYP2C20 CYP2C43	CYP2C6 CYP2C7 CYP2C11 CYP2C12 CYP2C13 CYP2C22 CYP2C23	CYP2C29 CYP2C37 CYP2C38 CYP2C39 CYP2C40 CYP2C44 CYP2C50 CYP2C54 CYP2C55
	CYP2D	CYP2D6 CYP2D7 CYP2D8	CYP2D6 CYP2D7 CYP2D8	CYP2D17 CYP2D19 CYP2D29 CYP2D30 CYP2D42	CYP2D1 CYP2D2 CYP2D3 CYP2D4 CYP2D5 CYP2D18	CYP2D9 CYP2D10 CYP2D11 CYP2D12 CYP2D13 CYP2D22 CYP2D26 CYP2D34 CYP2D40
	CYP2E	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1	CYP2E1
	CYP3A	CYP3A4 CYP3A5 CYP3A7 CYP3A43	CYP3A4 CYP3A5 CYP3A7 CYP3A43	CYP3A8	CYP3A1/23 CYP3A13 CYP3A9 CYP3A18 CYP3A62	CYP3A11 CYP3A13 CYP3A16 CYP3A25 CYP3A41 CYP3A44
	Concordance rate to Human P450		26%	14%	11%	

Concordance rate to Human P450

26%

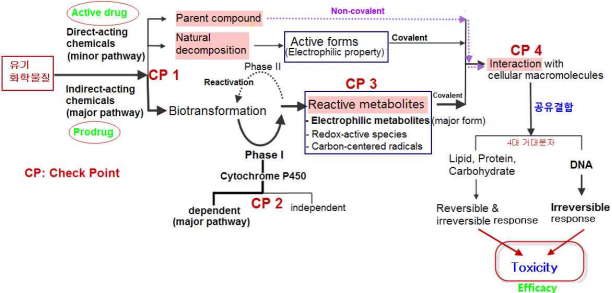
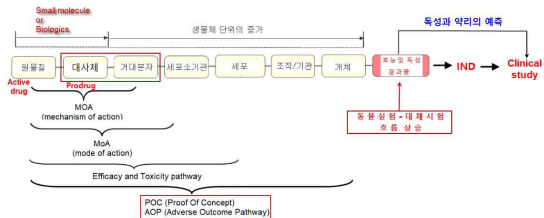
14%

11%

(Konstandi 등, 2014)

2. Small molecule의 독성기전에 대한 확실한 이해를 통해 다양한 약물 modality의 독성 이해 필요성

<그림-1> 약물의 단위별 연구 구분



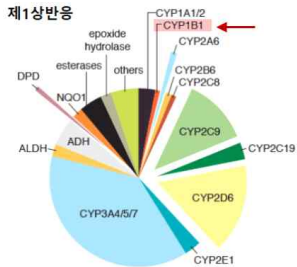
<그림-2> Small molecule의 독성기전에 대한 Central dogma

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

3) Biotransformation-기반 신약 개발의 응용: 항체-약물접합체(antibody-drug conjugate, ADC)

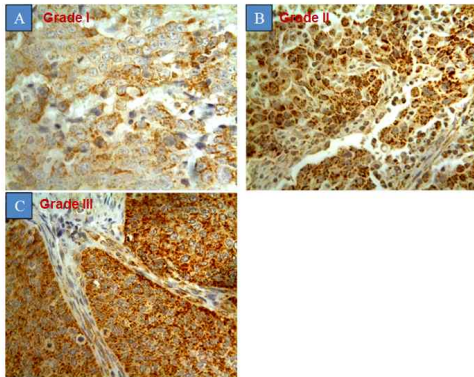
3-3) 인체의 Cytochrome P450 발현과 암세포에서의 발현

<그림-1>인체의 Cytochrome P450별 발현 정도와 CYP1B1



(Sim et al., 2012)

<그림-2> 자궁경부암 등급별에서의 CYP1B1 강도



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.

(Alshammari 등, 2021)

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

3) Biotransformation-기반 신약 개발의 응용: 항체-약물접합체(antibody-drug conjugate, ADC)

3-3) CYP1B1 substrate(prodrug) and hard electrophilic metabolites

Electrophiles(친전자성 대사체)

Hard:

Alkyl carbonium ions, Benzylic carbonium ions

Soft:

Acrylamide, Acrolein, Acrylonitrile, Quinone

Nucleophiles(친핵성 Protein & DNA)

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

(LoPachin 등, 2005)

3-4) Prodrug **DMBA** : 2차에 걸친 CYP1B1에 의한 친전자성대사체 생성

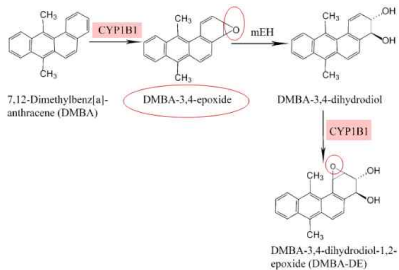


FIG. 1. Metabolic pathway for potential bioactivation of DMBA via CYP1B1 and mEH leading to systemic immunotoxicity.

(Gao 등, 2007)

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

4) Small molecule과 Biologics의 차이

- 두 모달리티에 따른 독성 및 독성시험에서 특징에 따라 시험물질에 의한 변화에 대한 **과학적 설득력**

항목	Small molecule(저분자 합성의약품)	바이오향약품
① 투여 경로와 흡수의특성 • ISR의 문제	• 주로 경구투여 및 빠른 흡수	• 비경구투여 의 주사 및 느린 흡수
② 동물종의 선택 • 영양물질 또는 외인성물질에 의해 1종 또는 2종을 이용한 독성시험	• 정상동물 • 대사 및 중간 차이로 설치류 및 비설치류 등 2종 이상	• 표적-특이적 정상동물 또는 형질전환 동물종(Namdari 등, 2021) • 표적을 가진 동물 1종
③ 독성시험 항목	• 유전독성 & 발암성 시험	• 종양원성 시험 • 항원성
④ 약물의 동태와 분포	• 일반적인 약물 동태학적 지표 • 수시간에서 수일 반감기	• 생체 내 분포 및 소멸에 대한 자료 • 수일에서 수개월의 반감기
⑤ 독성기전 • 약물 모달리티의 차이에 따라 용량 MRSD 결정에 중요	• Off-target effect • 전신독성 • 독성대사체(ractive metabolites) 및 약리 작용 • NOAEL	• On-target effect • 국소독성 • 과잉 약리작용 • NOAEL & MABEL
⑥ 독성시험 조합의 특성	• Standard plan	• Case by case

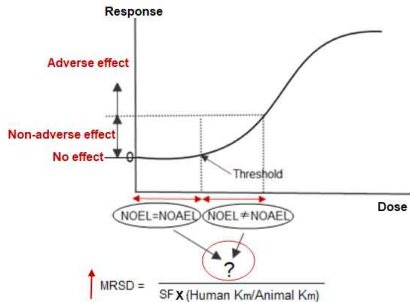
2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

5) USFDA vs 국내 규제기관의 NOAEL 차이 - No effect vs Non-adverse effect vs Adverse effect

<Weight of evidence-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**(no observed adverse effect level) is not the same as the **NOEL**(no observed effect level), 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.)

• NOEL과 NOAEL 의 차이점



- 임상최대권장초기용량(maximum recommended starting dose, MRSD)

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

6) USFDA vs 국내 규제기관의 NOAEL 차이 - No effect vs **Non-adverse effect** vs Adverse effect

<Weight of evidence-2> Jessica C. Graham, Sathanandam S. Anand, Joel Bercu, Lauren Besenhofer, Christina de Zafra, Yu Feng, Craig Fisher, Jedd Hillegass, Richard Hutchinson, Robert Jolly, Chandrika Moudgal, Tyler Nicholas, Daniela Olszova, Matthew Schmitz, Florian Semmelmann, **Safety assessment of protein A** and derivation of a parenteral health-based exposure limit, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 153, 2024, 105700, ISSN 0273-2300,

3.1.2. Repeat dose toxicity

The repeat dose nonclinical studies of PA identified in the literature review are listed in Table1. Non-GLP and GLP repeat dose studies of PA primarily utilized IV administration in rats, dogs, and monkeys(Bernton and Haughey, 2014;Rayet al., 1984; Yanagimoto et al., 1989). PA administration was well tolerated in all nonclinical species up to the highest doses tested of 40 µg/kg, 12 µg/kg, 100 µg/kg, or 1000 µg/kg in mice, rats, dogs, and monkeys, respectively (Table1). **Non-adverse findings included:** increased phagocytic activity in mice; increased mean protein levels in the urine and increased alkaline phosphatase levels in the blood in monkeys; and transiently increased polymorphonuclear cells and decreased lymphocyte and monocyte counts in dogs. No other PA-related toxicity was reported in any of the repeat-dose studies.

Table 1

Overview of non-clinical repeat dose toxicity studies of PA.

Species; No. of Animals per Group; GLP Status	Dose Level (µg/kg bw); Route of Administration; Regimen	Duration	NOAEL
Cynomolgus monkey; Main study: 3M/3F; Recovery: 2M/2F; GLP	0, 1, 5, 25 (IV; QW, 12 doses total)	3 months; 4 weeks recovery	25 µg/kg ^b
Cynomolgus monkey Main study: 5F (IV), 2F (SC); recovery: 2F (IV); GLP	0, 5, 25, 100 (IV); 5 (SC); (QW)	6 weeks; 4 weeks recovery	100 µg/kg ^b
Cynomolgus monkey; 2M; Non-GLP ¹	160, 400, 1000 (IV; QD)	4 weeks	1000 µg/kg ^b
Cynomolgus monkey; Main study: 6M/6F; Recovery: 2M/2F; GLP	0, 1, 3, 5 (IV; QW)	28 days; 4 weeks recovery	5 µg/kg ^b
Dogs with venereal tumors; number of animals and sex not available; Non-GLP ¹	100 (IV; Q2W)	5 weeks	100 µg/kg ^c
Sprague-Dawley rat & 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced tumor-bearing rat; ≥3F; Non-GLP ¹	0, 12 (IV, Q2W)	5 weeks	12 µg/kg ^c
Swiss albino mouse; 10M; Non-GLP ¹	Avg of 40–50 (IP, twice weekly)	4 weeks	N/A

(Graham 등, 2024)

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

7) mRNA 백신의 반복투여시험 분석

- **Weight of evidence-3: COVID-19 mRNA 백신**
- **MRT5500의 반복시험의 결과**

Table 1 Studies on the adverse/toxic effects of COVID-19 vaccines (or candidates)

COVID-19 vaccine or candidate*	Animal species	Main results about safety	References
BNT162b2	Rats	No adverse effects of the vaccine were seen on female mating performance, fertility, or on ovarian and uterine parameters. There were no toxic/adverse effects on embryo-fetal, postnatal survival, growth, and on the development of the offspring at the end of the lactation	Bowman et al. (2021)
AZD1222	Mice	No adverse effects were observed on female reproduction, fetal/pup survival, and fetal external, visceral, and skeletal alterations. No differences with controls were noted on physical development, while no abnormal gross pathology findings were found in pups and dams	Stebbins et al. (2021)
AS03-CoVLP	Rats	No adverse effects of the vaccine candidate on the fertility and reproductive performance of the rats were noted. There was no evidence of adverse effects on embryofetal development/teratogenicity, or pre-weaning development of the F1 offspring	Dubé et al. (2022)
MRT5500	Rabbits and mice	MRT5500 was safe and well-tolerated. The biodistribution data demonstrated that the components of the vaccine formulation were predominantly observed at the injection site and in the draining lymph nodes	Broudic et al. (2024)
Inactivated SARS-CoV-2 vaccine (Vero cells)	Guinea pigs	No deaths, abnormal reactions at the injection site, clinical symptoms, or differences in body weight were found in comparison to controls	Huang et al. (2022)
TKSB01 plasmid	Rats	Neither mortality, nor signs of toxicity were found, including injection site reactions. Histopathological exam showed muscle fiber necrosis associated with subchronic inflammation at the injection sites	Ramot et al. (2021)
C1-cell expressed receptor-binding domain (C1-RBD)	New Zealand white rabbits	The results on the adverse/toxic effects study did not show signs of local or systemic toxicity	Ramot et al. (2022)

(Domingo, 2024)

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

7) mRNA 백신의 반복투여시험 분석

• Weight of evidence-3: COVID-19 mRNA 백신

• The findings that contributed mostly to the variation in the RDT studies were, however, immunostimulatory and of reversible nature and other trends were absent.

• 판단기준: Safety concern

• NOAEL: 135 µg mRNA /dose

Sex Group (µg mRNA/dose)	Males				Females			
	0	15	45	135	0	15	45	135
Overall body weight gain in g								
Day 1 to Day 44	823.5	819.4	679.2	703.7	923.5	899.3	894.5	817.4
Food consumption in g (% from control group in brackets)								
Day 1 to Day 2	172.20	170.30	145.70 (-15%)	102.90** (-40%)	172.40	171.60 (-5%)	163.80 (-33%)	115.00** (-33%)
Day 22 to Day 23	188.30	183.10	142.80** (-24%)	112.00** (-41%)	193.20	186.30 (-6%)	180.80 (-23%)	149.10** (-23%)
Day 43 to Day 44	183.30	178.00	146.80 (-20%)	100.60** (-45%)	175.40	175.70 (-8%)	161.40 (-28%)	125.90* (-28%)
Fibrinogen (g/L)								
Day 3	2.911	4.277** (x 1.47)	3.902** (x 1.34)	4.041** (x 1.39)	2.339	3.760** (x 1.61)	3.740** (x 1.60)	4.180** (x 1.79)
Day 45	2.619	4.117** (x 1.57)	3.685** (x 1.41)	3.893** (x 1.49)	2.391	3.736** (x 1.56)	3.330* (x 1.39)	4.019** (x 1.68)
PT (s)								
Day 3	8.96	8.44** (-6%)	8.16** (-9%)	7.96** (-11%)	9.01	8.42* (-7%)	8.22** (-9%)	8.10** (-10%)
Day 45	9.75	9.06 (-8%)	8.93** (-8%)	8.96* (-8%)	8.77	8.31* (-5%)	8.48 (-5%)	8.03** (-8%)
CRP (mg/mL)								
Day 3	2.69	60.00* (x 22.3)	109.79** (x 40.8)	188.30 (x 70.0)	5.49	52.98 (x 9.7)	93.74** (x 17.1)	165.78** (x 30.2)
Day 45	2.86	95.54* (x 33.4)	139.96** (x 48.9)	262.35** (x 91.7)	3.56	58.68** (x 16.5)	105.55** (x 29.7)	169.25** (x 47.5)

Abbreviations: A/G: albumin/globulin ratio; CRP: C-reactive protein; PT: prothrombin time.

*p ≤ 0.05, and **p ≤ 0.01.

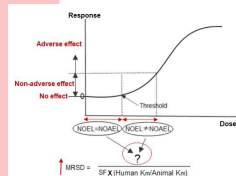
(Domingo, 2024)

2. The Study Director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)

8) Weight of Evidence-4: No effect vs Non-adverse effect vs Adverse effect의 구분 방법

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	- 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	- 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	- 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).

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-1) 독성시험 측면에서 시험 방법에 대한 섬세하고 올바른 이해 - 2주 반복투여시험 비교

<표-1> 식약처: 의약품등의독성시험기준 (2022) - 고시

1. 임상시험을 위한 반복투여독성시험의 최소 투여기간은 다음 표와 같다.

임상시험기간 중 약물투여기간	최소 투여기간	
	설치류	비설치류
~2주	2주	2주
2주 ~ 6개월	임상시험 중 약물투여기간	임상시험 중 약물투여기간
> 6개월	6개월	만성[주5]

<표-2> US FDA M3(R2) (2010): (GUIDANCE DOCUMENT, 민원 안내서)

Table 1 Recommended Duration of Repeated-Dose Toxicity Studies to Support the Conduct of Clinical Trials

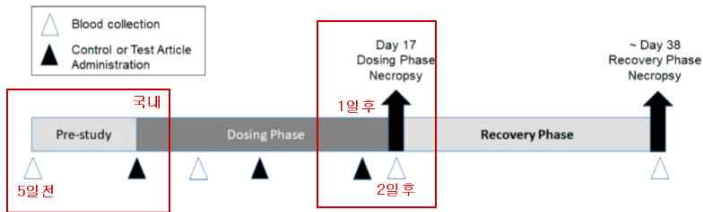
Maximum Duration of Clinical Trial	Recommended Minimum Duration of Repeated- Dose Toxicity Studies to Support Clinical Trials	
	Rodents	Nonrodents
Up to 2 weeks	2 weeks ^a	2 weeks ^a
Between 2 weeks and 6 months	Same as clinical trial ^b	Same as clinical trial ^b
> 6 months	6 months ^{b, c}	9 months ^{b, c, d}

a. In the United States, as an alternative to 2-week studies, extended single-dose toxicity studies (see footnote c in Table 3) can support single-dose human trials. Clinical studies of less than 14 days can be supported with toxicity studies of the same duration as the proposed clinical study.

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-2)독성시험 측면에서 개발의 섬세하고 올바른 방법이해 - 백신의 반복투여시험시험방법의 차이

- 동물용량 = 사람용량(Unit/kg)
- 임상시험에서 1회 주사하는 경우 독성시험에서는 2주 동안 3회 주사
- GLP 기업의 차이: 국내 vs 미국



3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-3)독성시험 측면에서 개발의 섬세하고 올바른 방법 이해 - 점안제의 반복투여독성시험에 대한 이해

- 시험물질: **합성펩타이드**의 예시
- MRSD의 결정: 용량 vs **횟수**

<표-1> 문의 사항

토끼 13주 반복독성시험	마우스/토끼 효력시험	임상 예정 용량	비글 13주 반복독성시험
0.05%, 0.075%, 0.1% (3회/일)	0.01%, 0.02%, 0.03% (2회/일)	0.01%, 0.02%, 0.05% (2회/일)	?

<표-2> NOAEL을 얻지 위한 점안제 투여방법

Table 15: Local exposure margin comparison for cetirizine ophthalmic solution 0.24%

	Cetirizine ophthalmic solution	# of drops/dose	# of doses per eye per day	MOE Exposure margin from the clinical dose
Clinical dosing	0.24%	1 per eye	Labeled dose = 2	1 x
5-day rabbit topical ocular toxicity study	0.24%	1 per eye	NOAEL = 3	1.5 x
6-month rabbit topical ocular toxicity study	0.24%	1 per eye	NOAEL = 3	1.5 x

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

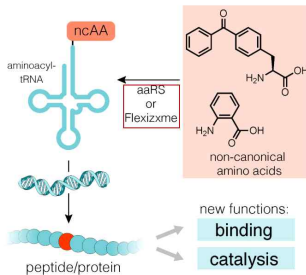
3-4) 독성시험 측면에서 개발의 섬세하고 올바른 방법이해 - **Polypeptide의 유전독성**

- 식약처 가이드라인 수행

- 그러나 먼저 Canonical amino acid(정형 아미노산) vs Noncanonical AA(비정형아미노산)에 대한 이해 필요

➢ Canonical amino acid로 구성된 polypeptide → **biologics 독성시험 및 TK(toxicokinetics)**

➢ <그림>에서처럼 Canonical AA + noncanonical AA의 **복합 polypeptide가 오늘날의 치료제 특성** (Hou 등, 2025; Chen 등, 2022)



(Mayer 2019; Zhou 등, 2024)

<Figure> nCAA aminoacylation of tRNA by **flexizyme or aaRS**(aminoacyl-tRNA synthetases)

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

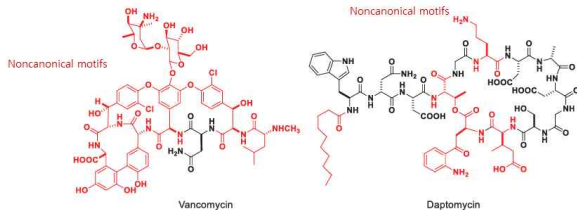
3-4) 독성시험 측면에서 개발의 섬세하고 올바른 방법이해 - Polypeptide의 유전독성

- <표>에서처럼 Non-canonical AA-함유 Polypeptide 치료제의 유전독성시험: Considerations for the genotoxicity assessment of middle size peptide drugs containing non-canonical amino acid residues(Mishima 등, 2023)

<표> Polypeptide 치료제별 유전독성시험

Small molecule	Polypeptide as biotherapeutics	Non-canonical AA-함유 Polypeptide
필수적	비필수	필수적

- 이유는 <그림>에서처럼 Noncanonical peptides 잔기의 공유결합 가능성(Bai 등, 2025)



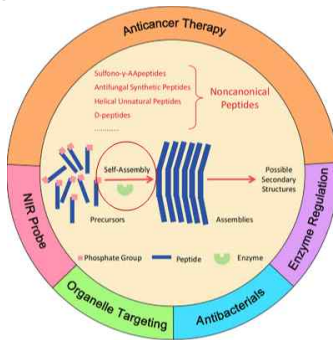
Scheme 1. The structures of vancomycin and daptomycin (noncanonical motifs are in red color, same for all figures).

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-5) Canonical AA + 합성 Non-canonical amino acid의 새로운 조합을 통한 신약 개발 활성

- Canonical AA 20개와 현재까지 400여개의 새로운 non-canonical amino acid 합성 및 Self assembly를 통해 **10¹³ ncAA-containing peptides 이상 조합**이 가능하여 다양한 활용성
- 시험책임자는 이에 대한 정보를 통해 시험 수행의 필요성

<그림-1> Canonical AA+Noncanonical AA의 다양한 응용

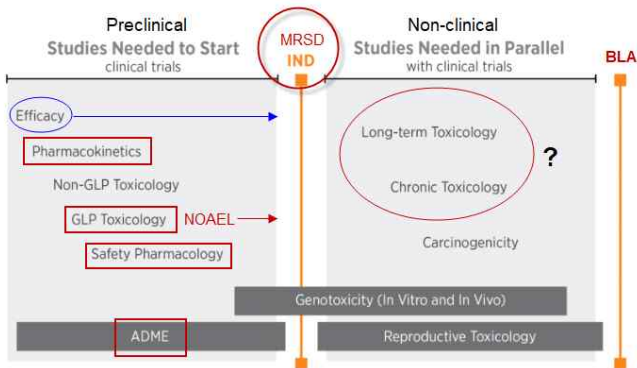


(Bai 등, 2025)

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간 측면에 대한 weight of evidence

① Monoclonal antibody 치료제의 3개월 독성시험 vs 6개월-1년 독성시험 예시

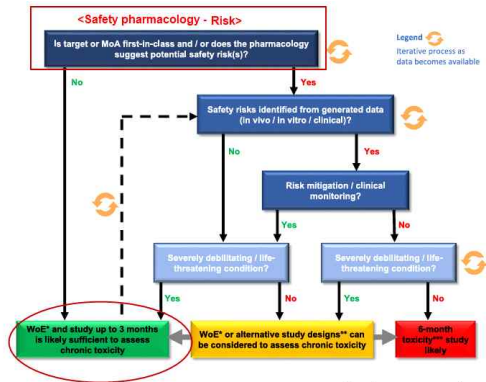


3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간에 대한 weight of evidence

① Monoclonal antibody 치료제의 3개월 독성시험 vs 6개월-1년 독성시험 예시

- **Weight of evidence-1** - 142 mAbs 분석
- Safety pharmacology에 No risk이면 3개월 독성시험이면 충분



(Chien 등, 2023) Re-evaluating the need for chronic toxicity studies with therapeutic monoclonal antibodies, using a **weight of evidence** approach

WoE* and study up to 3 months is likely sufficient to assess chronic toxicity

(caption on next column)

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간에 대한 weight of evidence

② 독성시험 가이드라인에서 예시 Weight-of-Evidence 예시 - 유전독성

<가이드라인 예시> ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use(2012)

<Page 15/28>

5.2.2. Evaluation of positive results obtained in vitro in mammalian cell assays

Recommendations for assessing weight of evidence and follow-up testing for positive genotoxicity results are discussed in IWGT reports (e.g., Thybaud et al., 2007). In addition, the scientific literature gives a number of conditions that can lead to a positive in vitro result of questionable relevance. Therefore, any in vitro positive test result should be evaluated based on an assessment of the weight of evidence as indicated below. This list is not exhaustive, but is given as an aid to decision-making.

i. The conditions do not occur in vivo (pH; osmolality; precipitates)

(Note that the 1 mM limit avoids increases in osmolality, and that if the test compound alters pH it is advisable to adjust pH to the normal pH of untreated cultures at the time of treatment)

ii. The effect occurs only at the most toxic concentrations.

- In the MLA(gene mutation assay) increases at $\geq 80\%$ reduction in RTG(Relative Total Growth).
- For in vitro cytogenetics assays when growth is suppressed by $\geq 50\%$
- If any of the above conditions apply the weight of evidence indicates a lack of genotoxic potential; the standard battery (option 1) can be followed
- Thus, a single in vivo test is considered sufficient.

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간에 대한 weight of evidence

② 독성시험 가이드라인에서 예시 Weight-of-Evidence 예시 - 유전독성

- Positive case이라도 False positive if no dose-response

Concentrations (µg/ml)		Guangdong CDC					Zhejiang IFDC				
		Cytotoxicity (%)		Micronucleated cells (%)			Cytotoxicity (%)		Micronucleated cells (%)		
		Mean	SD	Mean	SD	P value (vs. Vehicle)	Mean	SD	Mean	SD	P value (vs. Vehicle)
48 h	Vehicle	0.00	1.56	0.50	0.10		0.00	6.94	1.10	0.17	
	0.05	19.63	4.03	0.50	0.10	0.572	17.25	9.42	1.50	0.36	0.104
	0.1	25.41	5.56	0.57	0.06	0.430	21.37	1.89	1.33	0.21	0.240
	0.25	45.25	5.27	0.67	0.06	0.249					
	0.5	55.99	8.74	0.90	0.10	<0.05	39.80	10.46	2.20	0.40	<0.001
	1	57.64	7.34	1.00	0.10	<0.05	35.29	3.53	1.73	0.31	<0.05
	1.5						34.90	12.43	1.60	0.60	0.058
72 h	Vehicle	0.00	10.13	0.53	0.12		0.00	5.82	0.37	0.06	
	0.01	-7.71	9.40	0.73	0.06	0.208	22.70	13.65	0.43	0.06	0.419
	0.025	11.95	4.26	0.66	0.14	0.300					
	0.05	24.29	4.03	1.14	0.06	<0.01	56.31	4.14	0.63	0.06	0.100
	0.1						58.19	5.93	1.13	0.32	<0.01
	0.25	33.33	13.21	1.00	0.17	<0.05					
	0.5						60.07	4.06	0.82	0.22	<0.05

Bold values indicate $P < 0.05$.

(Chen 등, 2022)

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간에 대한 weight of evidence

③ 독성시험 가이드라인에서 에서 Weight-of-Evidence 예시 - 발암성

<가이드라인 예시> ICH guideline S1B(R1) on testing for carcinogenicity of pharmaceuticals (2022)의 Addendum

• Addendum S1B(R2) Addendum 접근: Small molecule의 2년 랫드 연구에 대한 유용성을 결정하는데 WoE 접근법

① 정보 수집: 시험관 내, 생체 내 또는 인실리코 연구, 의뢰자가 수행한 시험 또는 개발과 관련된 문헌

② 정보 내용: WoE를 위한 6가지 주요 factor

③ 약동학 및 전신 노출 데이터

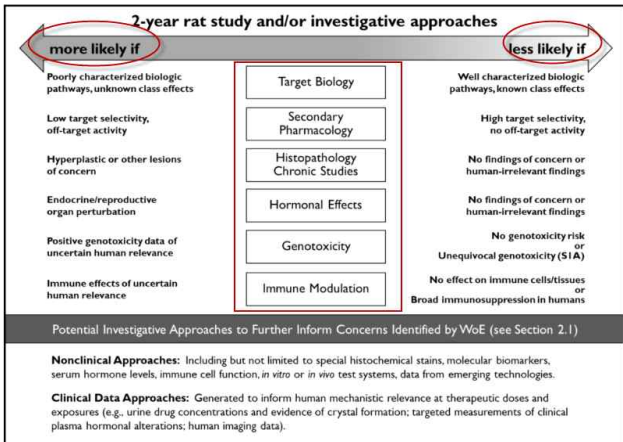
3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간에 대한 weight of evidence

③ 독성시험 가이드라인에서 예시 Weight-of-Evidence 예시 - 발암성

• <표>에서처럼 WoE를 위한 6가지 주요 factor의 체크를 통해 결정

• <표> WoE를 위한 6가지 주요 factor와 발암 가능성



3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간에 대한 weight of evidence

③ 독성시험 가이드라인에서 예시 Weight-of-Evidence 예시 - 발암성

• 6가지 주요 WoE 요인에 대한 평가 결과와 규제기관의 협의

WoE 평가 결과	규제와 관련 다음 단계
• 인간의 발암 가능성이 높을 경우	• WoE 평가의 문서화를 통해 2년간의 쥐 연구 및/또는 마우스 연구가 인체 발암성 확인을 위한 가치가 없다는 것 을 규제기관과의 논의함 (Document WoE assessment, and seek regulatory agreement that a two-year rat study and/or mouse study will not provide value)
• 인간의 발암 가능성은 거의 없을 경우	• WoE 평가 문서화를 통해 2년간의 랫드에 대한 발암성 연구가 가치를 제공하지 않을 것이라는 규제 합의 구함. 발암성시험이 필요하지 않을 경우도 있지만 형질전환 마우스 연구는 필요할 수도 있음 (Document WoE assessment, and seek regulatory agreement that a two-year rat study will not provide value. A transgenic mouse study may still be needed, though there are cases where no carcinogenicity testing is required.)
• 인간의 발암 가능성에 대한 불확실성	• 2년간의 랫드 발암성 연구 와 추가적인 생체 내 발암성 연구를 수행 (Conduct the two-year rat carcinogenicity study and possibly additional in vivo carcinogenicity studies.)

• 결론: 불확실성을 제거할 수 있는 문헌 고찰을 통한 WoE 제시

(Reference)

- Proposed Change to Rodent Carcinogenicity Testing of Pharmaceuticals – Regulatory Notice Document, ICH, 2016.
URL: https://database.ich.org/sites/default/files/S1%28R1%29_EWG_RND.pdf The ICHS1 Regulatory Testing Paradigm of Carcinogenicity in Rats: Status Report 2021, ICH, 2021.
URL: https://database.ich.org/sites/default/files/S1_StatusReport_2021_0823.pdf Hisada S, Tsubota K, Inoue K, Yamada H, Ikeda T, Sistare FD. Survey of tumorigenic sensitivity in 6-month rasH2-Tg mice studies compared with 2-year rodent assays. J Toxicol Pathol. 2022 Jan;35(1):53-73. doi: 10.1293/tox.2021-0031. Epub 2021 Nov 1. PMID: 35221496. PMCID: PMC8828610.

3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)

3-6) 개발의 비용과 시간에 대한 weight of evidence

④ weight of evidence를 이용한 자료 제출 전망 → 급속한 변화

- Table 1은 미국 FDA 및 EMA에서 승인된 3920 종(small molecule + biologics)에 대한 비임상 독성시험 및 임상시험에서 확인된 **adverse effect**의 건수를 나타낸 것임(Clark 등, 2018)
- 비임상 독성시험에 확인된 **adverse effect**는 임상시험 건수의 약 20.3%에 불과함.

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	14,662 276,082
Monkey (unspecified)	6,760
Rhesus monkey	2,743
Pig	2,059
Guinea pig	1,326

cris.msu.edu
cris.msu.edu · weight-of-evidence

Weight of Evidence - Center for Research on Ingredient Safety

May 19, 2025 · In ingredient safety, WoE is typically used to understand safety, toxicity, and/or risk. Rather than relying on a single study or data source, the WoE methodology considers...

content.sph.harvard.edu
content.sph.harvard.edu · www.hsph · sites

Hypothesis-Based Weight of Evidence: An Approach to Assessin...

Existing weight-of-evidence approaches have been criticized as either too formulaic, ignoring the complexity and case-specificity of scientific interpretation, or too vague, simply calling for...

Premier Research
premier-research.com · perspectives · weight-of

Premier Research | Weight-of-Evidence Assessments: Unpacking ...

Feb 1, 2023 · The term "weight of evidence" appears 18 times in FDA guidance documents and is primarily applied when assessing developmental and reproductive toxicity, immunotoxicity....

PubMed
pubmed.ncbi.nlm.nih.gov · 36592682

Re-evaluating the need for chronic toxicity studies with ...

We evaluated whether a 6-month toxicity study is necessary to assess the long-term safety of mAbs. Data on First-in-Human (FIH)-enabling and chronic toxicity studies were shared for 142...

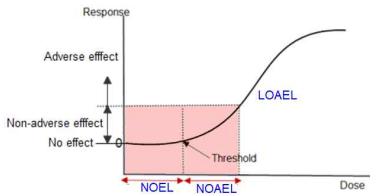
4. The regulatory agency's Dilemma(규제기관의 딜레마)

① 규제기관 및 독성시험 기관은 **No effect(NOEL)** vs **Nonadverse effect(NOAEL)** vs **Adverse effect(LOAEL)** 구별 능력이 있는가?

→ NOEL과 NOAEL의 구별을 통해 용량-반응곡선을 통해 독성 예측력 향상 노력 필요성

② 모든 모달리티의 **safety concern**과 **risk-benefit analysis** 적용함으로 개발자-친화적 독성에 판단 능력?

→ **FDA처럼 Pharmacology/Toxicology reviewer system** 설치로 통해 **IND 전문성 확보**



$$MRSD = \frac{?}{SF_x \text{ (Human Km/Animal Km)}}$$

〈그림 6-4〉 NOEL≠NOAEL 개념이 MRSD 설정에 미치는 영향:

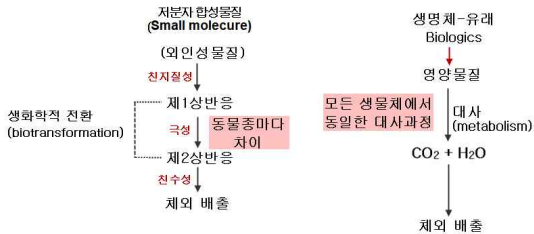
4. The regulatory agency's Dilemma(규제기관의 딜레마)

③ 약물 모달리티별 MRSD 산출을 위한 구성

- 종간 차이: **HED** (Human equivalent dose: 동물-인체 등가용량)의 **응용 불필요 - 동일한 대사 과정으로 종간 차이가 없음**
- 종내 차이: **SF** (Safety Factor, 안전계수)

공식) MRSD 산출 공식

그림-1) 바이오의약품의 대사 과정



1) Small molecule

$$HED = NOAEL \times (Animal\ Km / Human\ Km)$$

$$MRSD = \frac{HED}{SF(10)}$$

2) 바이오의약품

$$HED = NOAEL \times (Animal\ Km / Human\ Km)$$

$$MRSD = \frac{HED}{SF(10)} = \frac{NOAEL}{SF(10)}$$

<결론>

1. The Pathologist's Dilemma(조직병리학자의 딜레마)
 2. The study director's Dilemma(시험책임자의 딜레마)
 3. The Developer's Dilemma(개발자의 딜레마)
 4. The regulatory agency's Dilemma(규제기관의 딜레마)
- 독성학 및 독성시험의 기본원리에 대한 이해 부족으로 가이드스 높은 의존성과 **글로벌 변화에 대한 대처 능력 부족**
 - **국내**에서 승인된 신약의 개발 비임상자료와 **해외** 승인된 신약의 개발 **비임상자료에 대한 비교를 통한 새로운 접근 필요성**
 - 특히 규제기관의 개발-친화적인 **weight of evidence**에 대한 역량 강화

Part III. AI-based toxicology prediction을 통한 weight of evidence 가능성

1. 오늘날 신약 개발의 3가지 특징

1) 신기전 치료제(Drug modality)의 빠른 변화

- 지난 20년 동안 17 모달리티 출현(Boston consulting group, 2023)

2) 플랫폼 기술 (Platform Technology) 시대

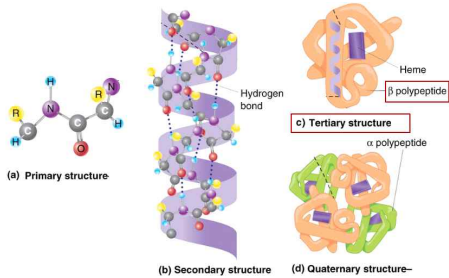
- 신약 플랫폼 기술 1개로 다양한 의약품 개발: 예시) Lipid nanoparticle, ADC, Chimeric Antigen Receptor(CAR)-**various cell lines**
- 표적약리의 높은 정밀성 ↔ 전신독성 감소

3) 인공지능-기반 신약개발과 비임상연구

- 구글 딥마인드 - **Alphafold 3**: 2억 개에 달하는 단백질 구조
- 중학생과학: AI 단백질 구조 탐구 키트

2. AI-based 비임상유효성 Alphafold 3 vs AI-based 비임상독성시험

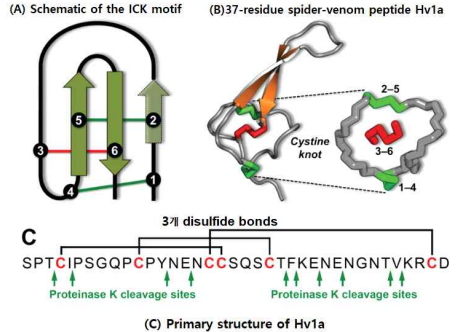
<그림-1> 단백질 구조 예측 vs 단백질 독성 예측



<www.biology4alevel.blogspot.com>

<그림-2> Spider-venom peptide ω -hexatoxin-Hv1a.

- Inhibitor cystine knot(ICK, 억제제 시스틴 매듭)



(Herzig 등, 2015)

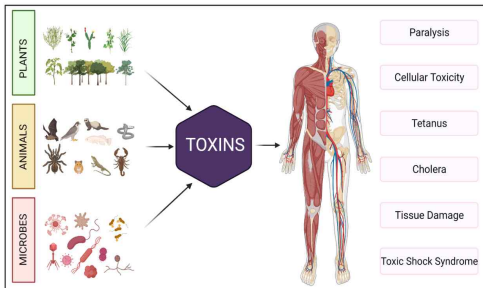
3. 현재 독성 예측이 가능한 약물 모달리티와 AI-기반 독성 예측 프로그램

	Small molecule	Polypeptide
구성	•분자량 1000 이하의 유기물질	•50-100 개정도의 단일 체인의 아미노산
Input features for encoding	•물리화학적 특성	•물리화학적 특성과 독성과 관련된 특정 아미노산 서열
Model	•Regression & classification model	•Classification model
Learning approach	•Similarity-based approach	•Similarity/alignment(배열순서)or modif based approach
Database	•Drugbank, ToxCast, ChEMBEL, 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 발암성제외
CYP450 의한 Reactive metabolite로 전환	• CYP450의 기질이며 전환(외인성물질)	•기질이 아니며 전환되지 않음 (내인성물질)
예측 프로그램	• 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 - Profa cgen • FP-ADMET • ADMETlab • pkCSM • Deep-PK • 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
		• Toxteller • ToxinPredictor • ToxNet • NNTox • MAI-TargetFisher • ToxIBTL • ToxinPred3.0 • BloxyBetPrediction • ATSE

3. AI을 이용한 polypeptide & protein 독성예측

1) 독성예측의 database 특성

- ML training : 생물체에서 인체 독성을 유발하는 Toxin(단백질 및 polypeptide)은 1만여종 vs 독성을 유발하지 polypeptide도 1만여종으로 patterns analysis
- MERCI(The Motif-Emerging and with Classes-Identification) tool:독성단백질에서 특정 아미노산의 서열 구성 Motifs(아미노산 배열의 작은 구조) - Cancer, neurodegenerative disease, 감염병 등의 질환과 관련 5518 toxic protein
- DL training : ANN-기반으로 단백질 구조 특성과 독성과의 관계



➤ 독성예측방법: Polypeptide 및 단백질의 4차원 구조 각각 chain에 대한 amino acid sequence (FASTA format) 입력한 모델 예측일뿐 4차원 구조 자체를 가지고 단백질 독성 분석은 불가

3. AI을 이용한 polypeptide & protein 독성예측

2) ToxinPred3.0와 Melittin(벌독)

- Melittin- 항균성

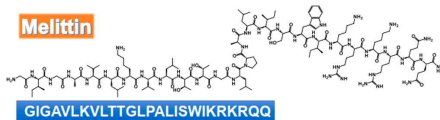


Table 1. Anti-bacterial properties of bee venom and its compounds.

Bee Venom/Isolated Compounds	Organism	Method	Dose/Mode of Action
Melittin	<i>S. aureus</i>	Disc diffusion	MIC 8 µg/mL
Melittin Hybrid			
Cecropin A-melittin (CAM)	<i>E. coli</i>	Microtiter broth dilution	MIC 3.7 µg /mL
CAM-W	<i>E. coli</i>	Microtiter broth dilution	MIC 0.3 µg/mL

MIC, Minimum inhibitory concentration

- Melittin-기반 항균제개발 →

- FASTA format

① Melittin: GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

② CAM: KWKLFFKKIEKVGQGIGAVLKVLTTGL

③ CAM-W: KWKLWKKIEKWGQGIGAVLKWLTTWL-NH2

3. AI를 이용한 polypeptide & protein 독성예측

3) ToxinPred3.0의 선택적 model

- ① ET(Extra Trees) Model
- ② Hybrid (ET+MERCI)
- ③ DL Model
- ④ Hybrid (DL+MERCI)

Select Machine Learning Technique used for developing model

ET based

Hybrid (ET+MERCI)

DL based

☒ Hybrid (DL+MERCI)

Select the Threshold value:

0.5

- **MERCI:**
- **Cancer, neurodegenerative disease, 감염병 등의 질환과 관련 5518 toxic protein**

Subject	Sequence	Dose/Mode of Action	ML Score	Prediction	PPV
Seq_1	GIGAVLKVLTTGLPAL...	MIC 8 µg/mL	0.82	Toxin	0.894
Seq_2	KWKLFKKIEKVGQGI...	MIC 3.7 µg/mL	0.485	Non-Toxin	0.48
Seq_3	KWKLWKKIEKWQG...	MIC 0.3 µg/mL	0.57	Toxin	0.585

Subject	Sequence	ML Score	MERCI Score (+ve)	MERCI Score (-ve)	Hybrid Score	Prediction	PPV
Seq_1	GIGAVLKVLTTGLPAL...	0.82	0	-0.5	0.32	Non-Toxin	0.262
Seq_2	KWKLFKKIEKVGQGI...	0.485	0	-0.5	0.0	Non-Toxin	0.0
Seq_3	KWKLWKKIEKWQG...	0.57	0	-0.5	0.07	Non-Toxin	0.0

Subject	Sequence	Dose/Mode of Action	DL Score	Prediction	PPV
Seq_1	GIGAVLKVLTTGLPAL...	MIC 8 µg/mL	0.636	Toxin	0.667
Seq_2	KWKLFKKIEKVGQGI...	MIC 3.7 µg/mL	0.897	Toxin	0.989
Seq_3	KWKLWKKIEKWQG...	MIC 0.3 µg/mL	0.938	Toxin	1.0

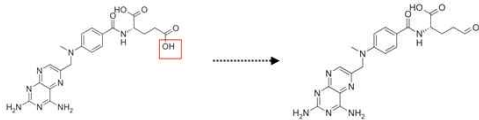
Subject	Sequence	ML Score	MERCI Score (+ve)	MERCI Score (-ve)	Hybrid Score	Prediction	PPV
Seq_1	GIGAVLKVLTTGLPAL...	0.636	0	-0.5	0.136	Non-Toxin	0.021
Seq_2	KWKLFKKIEKVGQGI...	0.897	0	-0.5	0.397	Non-Toxin	0.362
Seq_3	KWKLWKKIEKWQG...	0.938	0	-0.5	0.438	Non-Toxin	0.416

4. 합성물질의 **MRSD** (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-1) Small molecule의 AI-Based MRSD prediction

- 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

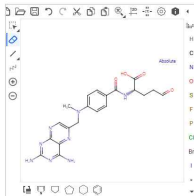


(Unknown molecule)



[Home](#) [About](#) [FAQ](#) [Help](#) [Citing](#) [Contact](#) [Terms of Use](#)

For information: We have changed the look and feel of our tool. However, we have **NOT** changed the underlying technologies and parameters. Consequently, this updated Web tool provides exactly the same results as the previous version.



(Marvin JS)

Enter a list of SMILES here:

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
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

[Fill with an example](#)

[Clear](#)

[Run!](#)

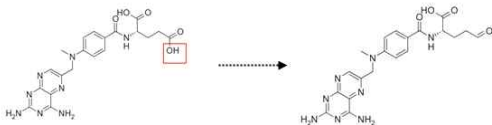
- Methotrexate-OH의 Smiles**

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

4. 합성물질의 **MRSD** (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-2) 단회 독성 - **LD₅₀** 예측

- LD₅₀: 계체군의 50% 치사량
- Methotrexate: 45 mg/kg
- Methotrexate-**OH**: 1.45mg/kg에서 3 mg/kg으로 평균 2.363 mg/kg
- 독성이 강해진 이유: **-OH는 극성기(polar group)로 체내 흡수를 저해**



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](#)).

Acute Oral Test (LD50) prediction을 위해 이용된 Software

- Pubchem과 Marvin JS 프로그램
- **Pro-Tox 3.0 prediction: 3mg/kg**
- Swissadme
- ADMETlab 3.0
- BioTransformer 3.0
- TOXSTAR
- ADMET-AI
- OECD QSAR toolbox
- ADMETSAR 3.0
- **AI Drug Lab: 1.45 mg/kg**
- **Vega-GUI-1.2.4: Prediction is N/A**
- ADME/Tox Prediction - Profacgen
- FP-ADMET
- **ADMETlab: 2.762 mg/kg**

- **ADMET-AI: 2.24 mg/kg**
- Interpretable-ADMET
- OptADMET
- vNN-ADMET
- ADMET-score
- DL-AOT Prediction
- ToxRefDB v2.0
- eToxPred
- T3DB
- ToxRead
- ChemoSAR

4. 합성물질의 **MRSD** (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-3) 대사(Metabolism, Biotransformation) - **BioTransformer 3.0** (TMIC)

- Phase 1 reaction: **Methotrexate**의 -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

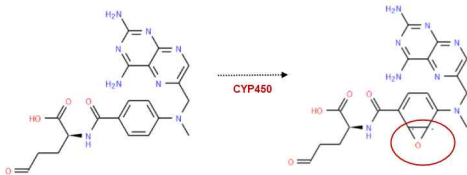
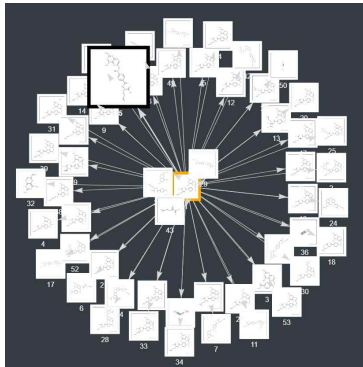
• **No reactive metabolite**

Result ID	Predicted Result	SMILES	Chemical Formula	Major Isotopic Mass (Da)	Reaction Type	Reaction Info	Biotransformation Reaction
1		<chem>NC(=O)C1=CN=C2N=C(C(=O)N1)C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	424.1007	N-Dealkylation of mixed tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
2		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	254.1011	N-Dealkylation of mixed tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
3		<chem>CC1=CC=C(C=C1)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	190.0903	N-Dealkylation of mixed tertiary amine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
4		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	454.1113	Hydroxylation of non-terminal aliphatic carbon adjacent to aromatic ring	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
5		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	454.1132	Aldohyde oxidation	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
6		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	454.1113	N-Hydroxylation of primary arylamine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
7		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	454.1113	N-Hydroxylation of primary arylamine	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
8		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	454.1113	alpha-Hydroxylation of carbonyl group	Enzyme: Cytochrome P450 1A2 Biocatalyst: HUMAN	
9		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	440.1102	Reduction of aldehyde to alcohol	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 Biocatalyst: HUMAN	
10		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	454.1132	Hydroxylation from CyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 Biocatalyst: HUMAN	
11		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	454.1107	N-Dealkylation from CyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 Biocatalyst: HUMAN	
12		<chem>NC(=O)C1=CC=C(C1)C(=O)N1C(=O)C2=O</chem>	C14H16N8O4	26.0156	N-Dealkylation from CyProduct	Enzyme: Cytochrome P450 3A4 Biocatalyst: HUMAN	

4. 합성물질의 **MRSD** (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-4) 대사(Metabolism, Biotransformation) -Way2Drug의 예시

- Phase 1 reaction: 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



- **Epoxidation: reactive metabolite의 확인**
- **Reactive metabolite + Glutathione 결합 여부**
- **거의 모든 항암제 + ligand = Reactive metabolite**

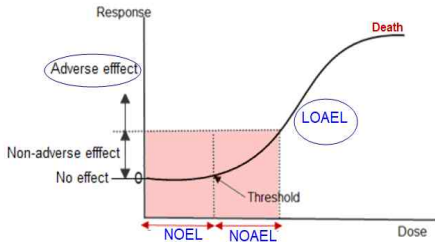
4. 합성물질의 **MRSD** (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-5) 반복투여독성시험 - **LOAEL** 예측

- LD_{50} : 평균 2.363 mg/kg
- **LOAEL**(lowest observed adversed effect level, 최소독성용량): 1.8358 mg/kg/day으로 추정됨.
- **해석**:(LD_{50} :LOAEL)의 일반적인 ratio: 2-2.5이라는 고려할 때 LD_{50} 과 LOAEL의 ratio는 1.28으로 낮다고 할 수 있음.
그러나 LD_{50} 의 독성 강도에 따라 분류한 GHS에 따르면 시험물질은 가장 강한 독성분류인 Category 1에 해당됨.
이는 독성의 용양반응곡선이 대단히 steep하기 때문에 시험물질의 LD_{50} 과 LOAEL의 ratio인 1.28은 acceptable.

AI-based LOAEL prediction을 위해 응용된 software

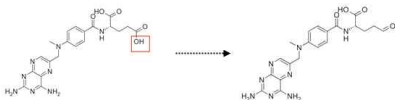
- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Pubchem과 Marvin JS 프로그램• Pro-Tox 3.0 prediction:• Swissadme• ADMETlab 3.0• BioTransformer 3.0• TOXSTAR• ADMET-AI• OECD QSAR toolbox• ADMETSAR 3.0• AI Drug Lab:• Vega-GUI - 1.2.4: LOAEL 1.8358 mg/kg/day• ADME/Tox Prediction - Profacgen• FP-ADMET• ADMETlab: | <ul style="list-style-type: none">• ADMET-AI:• Interpretable-ADMET• OptADMET• vNN-ADMET• ADMET-score• ADMET-Print• DL-AOT Prediction• ToxRefDB v2.0• eToxPred• T3DB• ToxRead• ChemoSAR• Toxin predictor |
|---|---|



4. 합성물질의 MRSD (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-6) 반복투여독성시험 - LOAEL의 적용범위(Applicability domain)

- Vega-GUI-1.2.4: LOAEL 1.8358 mg/kg/day
- Methotrexate-OH의 시험물질 구조



● AI-based toxicity prediction에서 적절한 Model의 3요소

- 1) Toxic endpoint와의 모델 적절성 - **규제 독성시험**의 종류에 대하여 적절한 모델
- 2) Model의 적용범위 - **Data의 특성**
- 3) Model의 정확도 - **실측치와 예측치**의 차이에 대한 모델 성능을 검토하기 위한 지표

VEGA

LOAEL (CONCERT/Coral) 1.0.0

page 233

3.1 Applicability Domain:

Similar Compounds, with Predicted and Experimental Values



	Compound #1 CAS: 64-75-5 Dataset id:45 (Training Set) SMILES: <chem>O=C(N)C=3C(=O)C4(O)(C(O)=C2C(=O)c1c(O)ccccc1C(O)(C)C2CC4C(C=C3)(O)N(C)C)</chem> Similarity: 0.707 Experimental value : 2.799 Predicted value : 3.141
	Compound #2 CAS: 473289-62-2 Dataset id:521 (Training Set) SMILES: <chem>O=C(O)C3N2C(=O)C(NC(=O)C(C)C(C)SC(=O)C)Cc1ccccc1C2CCC3</chem> Similarity: 0.682 Experimental value : 3.204 Predicted value : 4.058
	Compound #3 CAS: 111991-09-4 Dataset id:516 (Training Set) SMILES: <chem>O=C(Nc1nc(OC)cc(n1)OC)NS(=O)(=O)c2ncccc2(C(=O)N(C)C)</chem> Similarity: 0.673 Experimental value : 1.176 Predicted value : 2.144
	Compound #4 CAS: 1397-94-0 Dataset id:343 (Training Set) SMILES: <chem>O=CNC2CCCC(C(=O)NC1C(=O)OC(C)C(C)OC(=O)CC(C)C)C(C(=O)OC1(C)CCCCC(C)C2(O)</chem> Similarity: 0.671 Experimental value : 0.301 Predicted value : 1.193
	Compound #5 CAS: 87546-18-7 Dataset id:421 (Training Set) SMILES: <chem>O=C(OC(CCC)C)Coc1cc(O)Fcc1C)N2C(=O)C(C=C(C2(=O)CCCC3</chem> Similarity: 0.666 Experimental value : 1.113 Predicted value : 2.888
	Compound #6 CAS: 134605-64-4 Dataset id:360 (Training Set) SMILES: <chem>O=C(OC(C(=O)OCC=C(C)C)C)c1cc(O)cc1C)N2C(=O)C=C(N(C2(=O)C)C(F)(F)F</chem> Similarity: 0.665 Experimental value : 1.274 Predicted value : 1.856

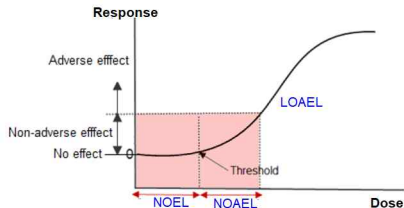
4. 합성물질의 **MRSD** (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-7) 반복투여독성시험의 **NOAEL** 예측

- LD_{50} : 평균 2.363 mg/kg
- LOAEL(lowest observed adverse effect level, 최소독성용량): 1.8358 mg/kg/day 추정
- NOAEL(No observed adverse effect level, 최대무독성용량): 0.3633 mg/kg/day 추정
- 해석: 반복투여독성시험에서 고용량으로 MTD(maximum tolerated dose)으로 선택하지만 LOAEL 및 NOAEL을 실제시험에 동시에 얻기가 쉽지 않음

AI-based NOAEL 예측을 위한 Software

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Pubchem과 Marvin JS 프로그램• 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: NOAEL 0.3633 mg/kg/day• ADME/Tox Prediction - Profacgen• FP-ADMET• ADMETlab: | <ul style="list-style-type: none">• Interpretable-ADMET• OptADMET• vNN-ADMET• ADMET-score• ADMET-Print• DL-AOT Prediction• ToxRefDB v2.0• eToxPred• T3DB• ToxRead• ChemoSAR |
|--|---|



$$\text{DNEL \& MRSD} = \frac{\text{NOAEL}}{\text{SF (Human Km/Animal Km)}}$$

<그림> Risk assessment의 최종 목적

4. 합성물질의 **MRSD** (maximum recommended starting dose, 최대임상권장초기용량)

4-8) MRSD 예측

- 임상최대권장초기용량 (maximum recommended starting dose, MRSD)
- 산출 공식

$$\text{MRSD} = \frac{\text{HED}}{\text{SF}(10)}$$

$$\text{HED} = \text{NOAEL} \times (\text{Animal Km} / \text{Human Km})$$

- Rat NOAEL = 0.3633 mg/kg/day
- HED = 0.3633 mg/kg/day $\times$ (6/37)
- **MRSD = 0.059 mg/kg/day ($\div$) 10 = 5.9 μ 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

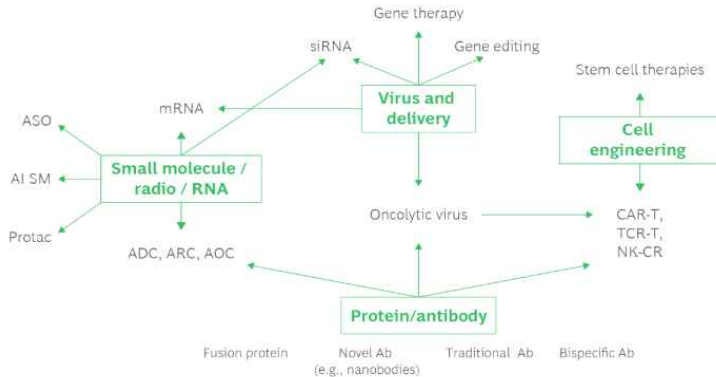
5. AI-based toxicity prediction of small molecule and peptide, Protein - 결론

- ① AI-based toxicity prediction 프로그램을 통해 IND를 위한 MRSD 산출 가능
- ② Mode of mechanism과 함께 제시 및 검증의 필요성
- ③ Non-genotoxic & Non-carcinogenic small molecule의 예측에 대한 제한
- ④ 독성과 관련한 AI-based toxicity prediction은 생식발달독성 등의 target organ toxicity에 초점을 두어 개발의 필요성 - **Weight of evidence model** 다수
- ⑤ 독성 자료의 gap filling에 유용성은 있을 수 있지만 MOA를 통한 기전설명 동반의 필요성
- ⑥ Small molecule은 양적 및 질적 예측이 가능하지만 Protein 및 polypeptide의 AI-기반 예측은 질적 평가 가능

Part IV. 비임상 독성연구에 대한 결론

1. 미래의 신약 개발 예측

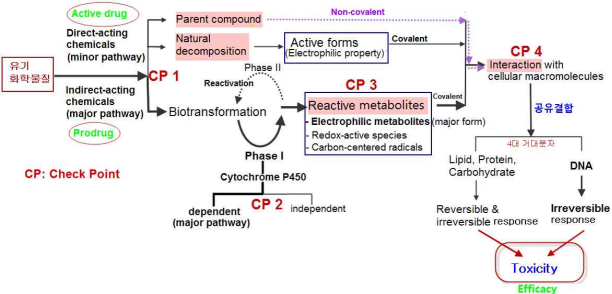
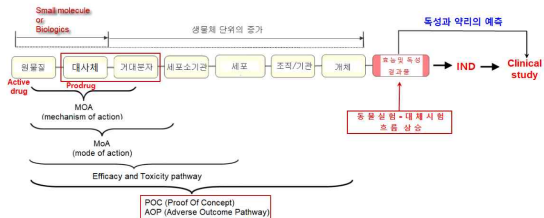
- AI 및 플랫폼 기술을 중심으로 상호 협종연행을 통한 다양한 약물 모달리티 출현



(Boston consulting group, 2023)

2. Small molecule의 독성기전에 대한 확실한 이해를 통해 다양한 약물 modality의 독성 이해 필요성

<그림-1> 약물의 단위별 연구 구분



<그림-2> Small molecule의 독성기전에 대한 Central dogma