

플라스미드 DNA 기반 치료제의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인

[민원인 안내서]

(Guideline on the Quality and Nonclinical Evaluation
of Plasmid DNA Based Gene Therapy Products)

2022. 6. 00.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 세포유전자치료제과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

**플라스미드 DNA 기반 치료제의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인
(민원인 안내서)**

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유: 「첨단재생의료 및 첨단바이오의약품 안전 및 지원에 관한 법률」 시행에 따른 변경사항 반영 및 평가 시 고려사항 추가)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
지침서·안내서 구분	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.		
<p>상기 사항에 대하여 확인하였음.</p> <p>2022년 6월 일</p> <p style="display: flex; justify-content: space-around;"> 담당자 확 인(부서장) 백 정 희, 이 재 린 오 일 응 </p>		

이 안내서는 플라스미드 DNA 기반 치료제 개발 시 고려사항에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2022년 6월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ ‘민원인 안내서’란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 식품의약품안전처의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오 생약심사부 세포유전자치료제과로 문의하시기 바랍니다.

- 전화 : 043-719-3536

- 팩스 : 043-719-3530



【공직자 부조리 및 공익신고안내】 ** 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 "국민신문고 > 공직자 부조리 신고" 코너

▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 "국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담" 코너

제·개정 이력

플라스미드 DNA 기반 치료제의
품질 및 비임상시험 평가 가이드라인
(민원인 안내서)

제·개정번호	승인일자	주요내용
안내서-0310-01	2015. 12. 30.	치료용 DNA 백신의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인 제정
안내서-0310-02	2022. 6. 00.	플라스미드 DNA 기반 치료제의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인 개정 - 가이드라인 이름 변경 포함

〈 목 차 〉

1. 서론	1
2. 플라스미드 DNA 기반 치료제의 제조방법, 특성분석 및 관리에 관한 자료	3
2.1 제조 시 일반적 고려사항(General manufacturing considerations)	3
2.2 원료의약품의 제조 및 관리(Manufacture and control of bulk purified plasmid)	3
2.2.1 일반적 정보(General information)	3
2.2.2 제조(Manufacture)	3
2.2.3 원료의약품의 특성분석(Control of bulk purified plasmid)	9
2.2.4 원료의약품의 관리(Control of bulk purified plasmid)	10
2.2.5 표준품(Reference standards or materials)	11
2.2.6 안정성(Stability)	12
2.3 완제의약품의 제조 및 관리(Manufacture and control of final formulated vaccine)	12
2.3.1 조성(Composition)	12
2.3.2 제조(Manufacture)	12
2.3.3 개발 경위(Pharmaceutical Development)	13
2.3.4 완제의약품의 관리(Control of final formulated vaccine)	13
2.3.5 표준품(Reference standards or materials)	16
2.3.6 안정성(Stability)	16
3. 비임상 시험시 고려사항	17

3.1 독성에 관한 자료(Nonclinical toxicity studies)	17
3.1.1 단회투여독성시험(Single-dose toxicity studies)	18
3.1.2 반복투여독성시험(Repeated-dose toxicity studies)	18
3.1.3 유전독성시험(Genotoxicity studies)	19
3.1.4 발암성시험(Carcinogenicity studies)	20
3.1.5 생식·발생독성시험(Reproductive and developmental toxicity studies)	20
3.1.6 면역독성시험(Immunotoxicity studies)	20
3.1.7 국소내성시험(Local tolerance studies)	21
3.2 약리작용에 관한 자료(Nonclinical pharmacology studies)	22
3.2.1 효력시험(Efficacy studies)	22
3.2.2 흡수, 분포, 대사 배설시험(Biodistribution, Persistence and Integration Analysis)	22
4. 참고문헌	24

플라스미드 DNA 기반 치료제의 품질 및 비임상 시험 평가 가이드라인

1. 서론

본 가이드라인은 면역반응을 유도하거나 활성화하는 하나 이상의 DNA 서열을 함유하는 정제된 플라스미드를 대상으로 하고 있으며, 이를 플라스미드 DNA 기반 치료제로 정의하고자 한다. 플라스미드 DNA 기반 치료제는 박테리아 등의 숙주에서 생산이 가능하도록 하는 유전자와 인체에서 면역원성을 유발하는 항원을 암호화(encoding)하는 하나 혹은 여러 개의 유전자가 포함되도록 구성되어 있다.

일반적으로, 이러한 벡터에는 항원을 암호화(coding)하는 유전자 이외에도 세균 등 숙주 내에서 선택과 복제에 필요한 DNA 염기서열을 가지고 있다. 플라스미드 DNA 기반 치료제를 투여받는 사람의 체내에서 유전자의 발현을 늘리기 위해 진핵생물의 프로모터, 인핸서(enhancer)와 전사 종결/polyA 신호를 암호화하는 염기서열을 포함하고 있으며, 면역활성 조절인자를 암호화하는 염기서열을 포함하고 있을 수 있다.

현재 플라스미드 DNA 기반 치료제는 이를 단독 사용에 한정하지 않고 바이러스 벡터나 단백질 항원으로 추가 면역하는 경우, 사이토카인이나 T 세포의 다양한 항원 결정기를 암호화하는 플라스미드 DNA와 함께 직접 주입하는 경우, 보조제(adjuncts)를 사용하여 DNA가 세포 안으로 들어가게 하거나 특정 표적세포로 가게 하는 것을 도와주거나, 또는 면역반응을 일으키는 등 다양하게 개발되고 있다.

본 가이드라인의 제정목적은 「첨단바이오의약품의 품목허가·심사 규정」(식품의약품안전처고시 제2020-82호) 제3조2항의 정의에 따라 유전질환, 암, 후천성 면역결핍증 및 기타 생명을 위협하거나 심각한 장애를 초래하는 질환 및 현재 이용 가능한 치료법이 없거나, 현재 이용 가능한 다른 치료법과 비교하여 안전성·유효성이 명백하게 개선된 경우 등에 대하여 '플라스미드 DNA 기반 치료제'를 이용하여 임상시험 승인 신청 및 품목허가를 위한 품질 및 비임상시험 제출자료를

준비할 때 필요한 개괄적인 사항을 제시하는데 있다. 품질 부분에서는 제조공정의 관리와 원료물질, 정제된 플라스미드의 특성분석 및 최종 제형 플라스미드 DNA 기반 치료제의 관리를 포함한 정제된 플라스미드의 관리를 다루었다. 비임상 시험 부분에서는 임상시험 이전에 플라스미드 DNA 기반 치료제의 평가에 적용해야 할 안전성과 유효성 평가에 관한 사항을 다루었다.

본 가이드라인은 세균에서 생물학적으로 제조하는 플라스미드 DNA로 질병 치료목적의 '플라스미드 DNA 기반 치료제'에 적용되며, 감염성 질환 예방용 백신과 화학적으로 합성한 경우는 이 가이드라인의 범위에서 제외한다.

의약품 품목허가 제출자료 요건은 「약사법」 제31조, 제35조, 제42조 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제4조, 제8조부터 제12조에 기술되어 있으며, 유전자치료제로서 플라스미드 DNA 기반 치료제의 제조판매(수입)품목허가 및 변경허가를 위한 세부 사항은 「첨단바이오의약품의 품목허가·심사 규정」(식품의약품안전처 고시)에 기술되어 있다.

또한 임상시험계획승인 시 제출되는 자료는 「약사법」 제34조제7항 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조에 따라 플라스미드 DNA 기반 치료제의 임상시험계획승인에 필요한 자료의 작성요령, 범위, 요건 등에 대한 세부 사항은 「의약품 임상시험 계획 승인에 관한 규정」(식품의약품안전처 고시)에서 정하고 있다. 동 고시 제4조에서는 임상시험계획(변경)승인 신청 시 안전성·유효성과 관련하여 제출하는 자료의 범위를 정하고 있으며, [별표 1]에 기술된 항목 중 플라스미드 DNA 기반 치료제의 특성에 따라 제출자료의 범위를 판단하게 된다.

2. 제조방법, 특성분석 및 관리에 관한 자료

2.1 제조 시 일반적 고려사항(General manufacturing considerations)

플라스미드 DNA 기반 치료제는 전통적인 방법으로 생산되는 세균 및 바이러스 제제와 마찬가지로 시작 물질과 제조공정의 적절한 관리가 최종생산물의 관리만큼 중요하다.

플라스미드 DNA 기반 치료제 또한 GMP 조건 하에서 제조하여야 한다. 따라서 발효배지의 구성성분을 포함하여 생산에 사용된 모든 물질의 품질에 적절한 주의를 기울일 필요가 있다. 역가, 무균, 엔도톡신, 안정성 등 생물학적제제에 적용되는 일반적인 품질관리 시험들이 플라스미드 DNA 기반 치료제에도 적용된다.

2.2 원료의약품의 제조 및 관리(Manufacture and control of bulk purified plasmid)

2.2.1 일반적 정보(General information)

대상 유전자 선택 이유, 플라스미드에 암호화된 기타 유전자(예: 태그, 선택 마커 또는 항생제 내성 유전자) 그리고 사용된 조절 인자들의 정당성을 제시해야 하며, 최적의 유전자 발현을 위한 코돈 변경사항 사항도 설명해야 한다. 전체 플라스미드의 염기서열을 제공해야 한다. 제품개발 및 선정된 투여경로의 이론적 근거를 포함하여 제품의 개발과 생산에 관하여 기술하여야 한다.

2.2.2 제조(Manufacture)

2.2.2.1 제조공정 및 공정관리(Manufacturing process and process control)

세포은행으로부터 발효, 수확, 정제, 원액 용기에 충전과 저장을 포함하는 제조 과정에 대해 기술하고 도식화한다. 이 제조방법에는 모든 제조단계(즉 단위 공정), 사용 시약, 주요 장비와 공정별 관리를 포함하여야 한다.

제조공정에 대한 설명은 제품의 안전성을 평가할 수 있는 정도로 충분히 상세해야 한다.

만약 비임상시험에 사용한 배치가 임상에 사용될 배치와 다르게 제조되었다면 제조공정 변경에 대하여 명확히 문서화하여야 한다. 플라스미드 DNA 기반 치료제 제조에서의 어떠한 변경이 있는 경우 비임상시험 또는 이전 단계 임상시험에 사용한 제품과의 동등성 평가가 필요할 수 있다.

2.2.2.2 발효 및 수확(Fermentation and harvest)

세균의 세포 배양에 사용되는 물질 및 그 절차를 상세히 기술한다. 생산 시 배양과정 중 일어날 수 있는 모든 외래 미생물 오염의 성격과 오염량에 대한 자료를 제공하고 오염의 적합 한도를 설정한다.

배양의 일관성, 세균 성장, 플라스미드 회수율 등에 대한 데이터를 제시하고 배양 배치의 부적합 기준을 설정해야 한다. 허용되는 세균 세포의 성장과 규모에 관한 최대 수준을 구체적으로 기술하며, 이는 생산에 사용된 발효단계나 이를 넘어선 단계의 숙주세포/플라스미드의 안정성 정보에 근거해서 판매 허가 시점까지 설정하여 해당 자료를 제출해야 한다.

생산의 마지막 단계에서 플라스미드 카피 수, 세포내에서 플라스미드의 보유 여부 및 보유 개수, 제한효소지도 등 세균 세포와 플라스미드의 특성을 조사해야 한다.

2.2.2.3 정제(Purification)

세균의 회수방법 및 플라스미드의 추출, 정제에 사용되는 방법을 기술한다. 세균의 RNA와 염색체 DNA, 선형 플라스미드 DNA 및 배양하는 동안 첨가한 물질, 엔도톡신 등의 제거에 특별한 주의를 기울여야 한다.

원치 않는 핵산뿐만 아니라 비가역적으로 변성된 플라스미드, 세균 단백질 및 탄수화물, 또는 정제과정에서 유입되는 원치 않은 화학물질과 잔류 배지성분을 포함한 기타 불순물 등을 제거하는 정제능력에 대해 철저히 조사하고, 정제과정의 재현성도 조사해야 한다. 정제 각 단계에서뿐만 아니라 전체적인 오염제거를 증명하기 위한 정제 절차의 검증이 필요할 수 있다.

필터 멤브레인이나 크로마토그래피 칼럼 등에 대해서는 사용 조건에 관한 정보도 제공해야 한다. 필터 멤브레인과 크로마토그래피는 단일제제 생산에 사용해야 한다. 만일 단일제제에 대해 칼럼과 필터를 재사용할 경우, 재사용 조건에 관해서 기술해야 한다.

2.2.2.4 원료 관리(Control of Materials)

원료의약품 제조과정에 사용되는 각각의 원료(원료약품, 출발물질, 컬럼, 용매, 시약, 촉매제 등)를 목록화하고 어느 공정에 사용되는지에 대해서도 기술한다. 제조 원료의 품질 관리에 관하여, 국제적으로 공인된 약전에 대한 참조 또는 사용된 규격에 대한 정보를 제공하고 배양 배지, 효소 등과 같은 생물학적 재료들을 포함한 원료들이 각자의 용도에 따른(외래성 인자의 제거 등) 기준에 맞는가도 기술한다. 모든 생물 유래 원료나 제조과정 중에 생물학적 원료를 사용한 원료의 경우 기원, 제조, 특성분석에 대한 정보를 포함한다. 가능한 경우 적절한 증명과 함께 바이러스 안전성에 관한 정보를 제공해야 한다.

2.2.2.4.1 숙주세포에 대한 기원, 연혁, 생산(Source, history and generation of the host cell)

세균 숙주세포의 기원, 표현형, 유전형을 포함한 자료를 제공해야 한다. 마스터 세포은행(MCB)을 개발하기 위해 숙주 세포로 형질도입하기 위한 발현구조체에 대한 분석 정보를 제공한다. 새로운 균주를 숙주세포로 사용하는 경우 발현할 수 있는 독소 유형에 대한 사항을 포함하여 특별한 주의를 할 필요가 있다.

플라스미드 DNA 기반 치료제의 염기서열을 포함한 아래 사항들을 완전하게 기술하여 제출한다.

- ① 항원을 코딩하는 유전자의 확인, 기원, 분리
- ② 전체적인 플라스미드 구축과 관련된 단계들에 대한 설명(사용된 모든 플라스미드의 출처, 그림, 유전자 재조합 과정에 사용한 중간물질 포함)
- ③ 플라스미드 구조 전체에 대한 정보
- ④ 세균에서의 복제 원점, 바이러스나 진핵세포의 프로모터 및 인핸서, 종결 서열, 선택 마커를 코딩하는 유전자 등과 같은 플라스미드 구성성분의 출처 및 기능에 대한 정보

특히 프로모터 혹은 선택 마커를 코드화하는 유전자를 특정 DNA 부분에 사용하는 것에 대한 명백한 논리를 제공하여야 하며, 선택 마커의 속성에 주의하여야 한다.

선택마커로 흔히 사용되는 항생제 내성마커 사용에 있어서, 페니실린이나 다른

베타락탐계 항생제는 피부발진에서 급성 과민증에 이르는 알러지 반응을 유발할 수 있기 때문에 사용하지 않는 것을 권고한다.

항원의 기존 염기서열에 가한 어떠한 변형에 대해서도 기술하고 설명해야 한다. 항생제 내성 유전자와 관련된 포유류 프로모터 위치와 새로운 프로모터 또는 유도물질의 사용은 신중히 고려해야 한다.

항원을 코딩하는 유전자는 포유동물 세포에서 발현하기에 적절한 코돈을 가지고 있음을 보여줘야 한다. 상동재조합(homologous recombination)을 일으킬 수 있는 삽입서열이나 말단의 긴 반복서열(long terminal repeat, LTRs)와 같이 이동성 입자(mobile elements)의 특성이 있는 특정 서열의 사용은 피해야 한다. 효소 활성과 생물학적 활성을 갖는 염기서열은 유전자 조작을 통해 불활화하여 의도하지 않은 활성을 제거하거나, 그 염기서열의 존재에 대한 타당한 설명이 필요하다. 또한 특성분석 부분에서, 플라스미드의 DNA 염기서열의 유사성 여부를 데이터베이스(The National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA 등 염기서열 데이터베이스)와 비교해서 세포 분화 및 증식 기능을 코딩하는 서열이거나 다른 예상치 못한 해독틀(reading frame)의 존재 여부와 같이 생물학적으로 중요한 의도되지 않은 염기서열의 존재 여부를 조사하는 것이 필요하다.

생산을 위해 세균으로 형질전환 시킨 후의 플라스미드에 대한 확인시험은 세균의 표현형과 더불어 재확인한다. 염기서열분석이 선호되나, 제한효소 지도도 사용할 수 있다. 숙주 박테리아 세포 내에서 플라스미드가 재배열되는 것은 허용하지 않는다. 플라스미드 간의 교차 오염이 없음을 검증해야 한다.

2.2.2.4.2 세포은행 시스템, 특성분석 및 시험(Cell banking system, characterization and testing)

세포은행 시스템, 품질관리, 생산과 저장기간, 마스터세포은행(MCB) 및 제조용 세포은행(WCB)을 만들 때까지의 과정에 대한 정보를 제공한다.

플라스미드 DNA 기반 치료제의 생산은 세포은행 시스템에 기초하여야 한다. 후기 임상시험에서는 WCB를 준비하는 것이 권장되지만, 초기 임상시험에서는 MCB를 사용하는 것이 적절할 수 있다. 플라스미드를 포함하고 있는 특성이 잘 밝혀진 세균 세포를 클론화 하여 MCB 구축에 사용한다.

MCB와 WCB의 준비는 오염을 막기 위한 적절한 주의를 가지고 GMP 기준에

따라 수행해야 한다.

MCB의 기원, 형태, 저장조건, 예상 사용기간에 관한 정보를 제공해야 한다. MCB와 WCB를 구축하는 동안에 같은 실험실에서 동일인에 의해 동시에 다른 종류의 세균을 다루어서는 안 된다. 주어진 MCB와 WCB의 저장 및 회수조건 하에서 세균 세포-플라스미드 시스템의 생존율에 대한 자료는 품목허가 신청시점까지 제출해야 한다. 새로운 WCB는 특성을 완전히 밝히고 설정된 기준에 적합해야 한다. 플라스미드를 가지고 있는 세균 세포를 확인할 수 있는 특이적 표현형을 기술해야 한다.

전체 플라스미드 DNA 기반 치료제의 염기서열은 MCB 및 WCB 단계에서 확인해야 한다. 플라스미드로부터 전장 단백질(들)이 발현되는지 특성분석을 통하여 확인해야 한다.

플라스미드의 유전적 안정성은 개발과정 중 확인해야 하며, 세포를 제품 생산 종료 후 추가적으로 배양하여 회수한 플라스미드의 특성 분석(복제 수, 크기 및 염기서열)을 통하여 확인할 수 있다.

E. Coli 유래 세포은행 시험항목

시험항목	시험대상		
	MCB	WCB ²⁾	EOPC ¹⁾
플라스미드 확인 (플라스미드 제한효소 지도 분석)	+	+	+
플라스미드 확인 (플라스미드 전체 염기서열 분석)	+	-	+
균 종(Species) 확인	+	+	+
균 계통(Strain) 확인 (lac gentotype 등)	+	-	+
세포형태 (Morphology)	+	+	+
성장특성 (Growth characteristic)	+	+	+

세균, 진균	+	+	+
박테리오파지 (Lysogenic, Lytic phages)	+	-	+
플라스미드 유지 (marker 유전자 유지 확인 등)	+	+	+
플라스미드 카피수	+	+	+
생존 콜로니 계수 (세포 생존율)	+	+	+
<p>MCB: 마스터세포은행, WCB:제조용세포은행, EOPC: 제품생산을 위해 배양되는 수준 이상으로 배양된 세포</p> <p>1) : 품목허가 신청시 제출해야 하는 자료</p> <p>2) : 제조용세포은행(WCB)를 구축하는 경우 제출</p>			

2.2.2.5 공정개발과 공정 중 관리(Process development and in-process control)

제조공정 개발 이력이 제공되어야 하며 제조 공정의 중요한 단계들에 대하여 공정관리와 피드백을 제공할 수 있도록 시험과 허용기준을 개발하여야 한다.

제조공정 검증은 사람에 사용하기에 적합한 수준으로 공정과 숙주유래 오염물질이 재현성을 갖고 일관되게 제거될 수 있음을 입증해야 한다.

정제공정 검증자료는 각각의 또는 전체의 정제과정에서 오염물질이 없음을 입증하는데 필요하다.

일반적으로 초기 임상단계에서는 공정 검증이 요구되지 않으나, 무균공정, 최종제품의 멸균과정과 세척과정 검증(특히 여러 제품을 생산하는 시설이나 계약한 생산기관에서 위탁 생산하는 경우)과 같이 중요한 단계들은 임상시험 개시 전에 검증해야 한다.

2.2.3 원료의약품의 특성분석(Control of bulk purified plasmid)

2.2.3.1 정제된 플라스미드 원료의약품의 특성분석(Characterization of bulk purified plasmid)

공정 중 시험 및 출하 시험과 함께, 정제된 플라스미드 원료의약품에 대한 확인시험, 함량(strength), 생물학적 활성과 순도를 포함한 주성분의 특성분석에 관한 자료를 제출해야 한다. 정제된 플라스미드의 특성을 화학적, 물리학적, 생물학적 방법으로 철저하게 밝히는 것이 필수적이다. 개발기간 동안, 플라스미드의 전체 염기서열을 분석하여야 하며, 전체 길이의 단백질이 잘라지거나 변형된 형태 없이 발현되는지 제시하여야 한다.

잠재적인 불순물 역시 제시하고 평가해야 한다. DNA의 변형(메틸화, 비가역적인 변성분자 형성, 핵산분해효소에 의한 부분적 분해 등)은 생물학적 및 면역학적 특성에 영향을 미칠 수 있으므로 주의를 기울여야 한다. 정제된 의약품에 있을 수 있는 숙주세포 잔여물, 잔여 RNA와 염색체 DNA 등 제조과정에서 쓰인 물질과 배지 구성물 등에 대한 자료를 제출해야 하며, 여기에는 허용되는 혹은 달성 가능한 최대 수준의 추정치를 포함하여야 한다. 변성된(denatured) 플라스미드 DNA 기반 치료제와 핵산분해효소에 의한 부분적인 분해는 폴리아크릴아마이드겔 전기영동, 액상크로마토그래피(HPLC)와 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)과 같은 분석 방법으로 관찰한다. 적절한 세포주에 플라스미드 DNA 기반 치료제를 이입하여 시험관 내에서(*in vitro*) 발현시키고, 면역형광법이나 웨스턴 블랏 등으로 발현단백질의 적절한 특성을 밝혀야 하며 동물 모델에서의 시험을 통해 플라스미드 DNA 기반 치료제가 목표하는 면역원성(immunogenic activity)을 증명하는 것이 바람직하다.

2.2.3.2 제조의 일관성(Consistency of manufacturing)

일관성을 결정할 수 있도록 가능한 많은 배치에서 특성분석이 이루어져야 한다. 각 배치에서 허용범위를 벗어나는 파라미터에서의 차이는 모두 기록해야 한다. 그러한 시험을 거쳐 얻은 자료는 규격을 설정하는 기초 자료로 사용해야 한다. 임상 개발 초기단계에서는 일관성 입증자료가 제한적일 것이며, 이후의 임상시험이 진행되고 제조경험이 쌓임에 따라 일관성을 보일 것이다. 배치 일관성에 관한 특성분석은 일반적으로 임상 3상 진행 중에, 혹은 3상 제조공정이 아직 상업적 제조 규모로 확대되지 못한 경우에는 3상 이후 품목허가 신청 전에 수행하여야 한다.

2.2.4 원료의약품의 관리(Control of bulk purified plasmid)

원료의약품의 기준 및 시험방법이 설정되고 이에 따라 분석한 원료 배치의 시험 결과도 제출해야 한다.

또한 분석법 밸리데이션 정보를 포함한 분석방법과 허용범위에 대한 설명을 제공해야 한다.

규격에는 플라스미드의 성상, 확인, 순도, 함량, 생물학적 특성, 엔도톡신 함량, 무균시험[또는 미생물한도시험(bioburden)]을 포함시킬 것을 권장한다. 규격 설정에 관한 정당성을 제출해야 한다. 개발 초기의 규격은 제한적이며 허용 기준이 넓을 수 있다.

제품의 특성분석 동안 수행하는 모든 시험항목을 플라스미드 DNA 기반 치료제의 각 배치에서 수행할 필요는 없다. 어떤 시험법의 경우 검증과 절차의 허용 확립만을 위해 요구되는 반면, 다른 시험법의 경우 생산의 일관성 확립을 위해 한정된 일련의 배치에서 요구된다. 따라서 초기 생산 배치는 확인, 순도, 역가, 품질, 안전성 및 안정성과 관련된 일관성을 확립하기 위해 포괄적인 시험분석을 수행해야 하나, 이후에는 정해진 일련의 시험법만 수행해도 적절할 것이다.

2.2.4.1 확인(Identity)

플라스미드의 특성 분석 시 확인을 위한 적절한 시험법의 선택이 이루어져야 한다. 그러나 특정 플라스미드의 특성을 분석하는 시험들은 플라스미드의 특성과 제조 및 정제방법에 따라 다를 수 있다. 각각의 정제된 플라스미드 배치의 확인시험은 PCR 분석, 시퀀싱, 제한효소 분석 및/또는 플라스미드에 삽입된 항원유전자에 대한 *in vitro* 발현(mRNA 또는 단백질) 분석 등의 적절한 방법을 통해 수행해야 한다.

2.2.4.2 플라스미드의 특성, 정량과 생물학적 활성(Nature and quantification of plasmid and biological activity)

플라스미드 정량은 대개 흡광도 260nm에서 측정한다. 초나선형 플라스미드의 비율을 확인하고 규격을 설정하여야 한다.

원료의약품의 각 배치별 생물학적 활성은 자사 표준품과 함께 적절하게 확립된

시험법으로 측정하여야 한다. 생물학적 활성은, 가능하다면, 시험관 내에서 적절한 세포주에 도입시킬 때, 항원이 발현되어야 하며, 발현된 단백질은 면역형광법 혹은 웨스턴 블랏 등의 방법으로 특성을 분석하여야 한다. 가능하다면, 시험관내 분석 값이 동물 모델에서 면역원성 혹은 유효성과 관계가 있다는 것을 보여야 한다. 대안으로, 동물모델에서 적절한 면역원성/생물학적 활성이 있음을 보여야 한다.

2.2.4.3 순도(Purity)

공정 생산능력과 가이드라인에 기초해서 모든 검출 가능한 불순물에 대하여 한도를 설정하여야 하고, 이들을 적절히 파악하고 분석하여야 한다. 숙주세포의 염색체 DNA와 RNA 및 단백질 오염정도를 평가하여야 하고 한도를 설정하고, 부적합 기준을 제시해야 한다. RNA와 숙주세포 단백질의 오염을 평가하는 데는 260nm와 280nm 파장에서의 흡광도 비교가 순도 평가에 유용할 수 있다. (적용된다면) 항생제를 포함하는 배지 구성성분과 공정 중 사용되는 물질에 대한 잔류 수준도 적절히 관리해야 한다. 최대 허용한도를 설정하고 적절성을 설명해야 한다. 순도를 증명하는데 사용하는 기술은 가능한 광범위한 물리화학적 특성에 기초하는 것이 중요하다. 여러 의약품을 생산하는 시설 혹은 위탁제조 업체에서 생산하는 경우, 다른 의약품의 오염이 없는지를 증명해야 한다.

2.2.4.4 물리학적 상태 및 정량 (Physical state and quantification of plasmid)

초나선 플라스미드의 비율을 결정하고 규격을 설정해야 한다. 플라스미드 양의 정량화는 일반적으로 260 nm에서의 흡광도를 기반으로 설정한다. 벌크 정제 플라스미드와 관련된 모든 추가 품질 매개변수(예, pH 또는 점성도 등)도 결정하고 규격을 설정한다.

2.2.4.5 안전성 (Safety)

안전성 관련 시험으로는: (a) 엔도톡신; (b) 세균 및 곰팡이 무균(검체에 대한 발육저지 활성시험 결과 포함) 또는 (c) 바이오버든(양, 식별 및 특정 원치 않는 유기체가 없음을 포함) 등을 포함할 수 있다.

2.2.5 표준품(Reference standards or materials)

시험법 표준화를 위하여 자사 표준품을 확립하는 것이 바람직하다. 원료의약품

시험에 사용되는 표준품에 대한 정보는 품목허가 신청 시에는 제출해야 한다.

최종 제형 플라스미드 DNA 기반 치료제 중 되도록이면 임상평가를 수행한 적절한 생산 배치를, 가능한 경우 완전한 염기서열분석을 포함해서 화학적 조성, 순도 및 생물활성에 대해 완전하게 특성을 분석하여, 화학적 및 생물학적 표준품으로 사용할 수 있다. 이 표준품의 특성이 생산 배치에 대한 규격을 결정하는데 근거가 될 수 있다. 최초 표준품을 대체하는 계획은 규제당국의 심사가 필요하다.

2.2.6 안정성(Stability)

안정성 평가는 의약품 등의 안정성시험기준, 생물의약품 안정성시험 가이드 라인을 준수해야 한다. 수행된 시험법의 종류와 사용된 방법, 시험 결과는 표, 그림, 서술과 같은 적절한 양식으로 요약해야 한다. 요약서에는 저장조건과 재시험날짜 혹은 유효기간에 관한 결론뿐만 아니라 결과를 포함해야 한다. 초기 임상개발기간 동안에는 제한된 안정성 정보가 예상된다. 허가 신청된 의약품의 유효기간을 증명하기 위한 추가적인 안정성 자료는 실제 사용 조건에서 장기, 실시간 안정성 시험 결과에 근거해야 한다.

2.3 완제의약품의 제조 및 관리(Manufacture and control of final formulated vaccine)

2.3.1 조성(Composition)

플라스미드 DNA 기반 치료제의 최종 조성을 문서화하여야 한다.

2.3.2 제조(Manufacture)

원료의약품으로부터 완제의약품에 이르는 제조단계를 기술한 공정 흐름도를 제공해야 한다. 제조방법에는 모든 제조단계(즉 단위 공정), 사용 물질, 주요 장비와 공정별 관리를 포함해야 한다. 제조방법에 각 공정단계에 대한 설명을 제공해야 하며 단계별로 정의해야 한다. 예를 들어 생산 규모, 배양 배지, 완충액, 첨가제, 주요장비와 공정 중 시험 및 허용한계가 있는 운영 파라미터를 포함하는 공정관리에 대한 사항 등에 대한 내용을 포함해야 한다.

2.3.3 개발 경위(Pharmaceutical Development)

항원 유전자가 삽입된 플라스미드에 대한 정보와 함께 제형 개발 경위, 부형제 (면역증강제 포함) 및 1차 포장 용기 마개 시스템의 기타 구성 요소 등에 대하여 출처, 사양 및 플라스미드 DNA 기반 치료제에서의 최종 농도 등에 대한 세부 정보를 포함해야 한다.

2.3.4 완제의약품의 관리(Control of final formulated vaccine)

완제의약품의 기준 및 시험방법을 설정하고 정당화하여야 한다.

또한 분석법 밸리데이션 정보를 포함한 분석방법과 허용범위에 대한 설명을 제공해야 한다.

규격에는 플라스미드의 확인시험, 정상, 함량, 순도, 역가, 엔도톡신 함량, 무균을 포함시킬 것을 권장한다. 규격에 관한 타당성을 제출해야 한다. 개발 초기의 규격은 제한적이며 허용기준이 넓을 수 있다.

하나 이상의 플라스미드가 최종 제형에 존재하는 경우 한 플라스미드의 효능을 다른 플라스미드와 구별하는 것이 간단하지 않을 수 있다. 이러한 경우, 최종 제제의 효능을 확립하기 위해 각 별크 정제 플라스미드에 대한 시험관내 발현을 평가할 수 있다. 즉, 최종 제품에서 각 플라스미드의 역가를 다른 플라스미드와 구별할 수 없는 경우, 존재하는 각 플라스미드의 역가로부터 최종 제품의 역가를 유추하여 계산할 수 있다. 그러나 개별 플라스미드의 효능을 변경할 수 있는 보조제 또는 촉진제가 최종 제형에 있는 경우 이 접근 방식은 신뢰할 수 없다.

모든 배치에 대한 시험결과 요약서를 제출해야 한다. 완제의약품 시험의 적절성에 대해서는 사례별로 고려해야 하며 타당하여야 한다.

최종 제형을 포함한 플라스미드 기반 DNA 치료제의 여러 배치들에 대하여 일관성을 확인할 수 있을 정도로 완전히 특성분석해야 한다. 배치간의 차이를 명시해야 한다. 이러한 연구에서 얻어진 데이터는 완제의약품의 규격을 설정하는 근거로 사용한다.

분석법 개발 등 배치간 비교를 위하여 배치별로 보관시료를 보유할 것을 권장한다.

2.3.4.1 확인(Identity)

치료제의 매 배치마다 확인시험을 수행하여야 한다. 확인시험은 DNA 서열 분석 및/또는 PCR 분석이나 제한효소 지도의 확인, 일시적 형질주입(transient transfection) 후 발현되는 항원 측정 등을 할 수 있다.

2.3.4.2 순도(Purity)

매 배치마다 순도를 측정하였을 때 설정된 한도 내에 들어가야 한다. 세균 유래 오염물질에 대해 민감하고 신뢰할 수 있는 분석법을 수행하고 정제된 플라스미드 원료에 있는 오염물질에 대해 상한선을 정한다.

최종 제품 플라스미드의 형태는 예를 들어 겔 전기영동 등이나 다른 방법을 통해 플라스미드가 분해되지 않았음을 입증하고 확인해야 한다. 포장 마개 시스템 적합성, 침출물 및 추출물에 대해서도 평가할 필요가 있다.

여러 의약품을 생산하는 시설 혹은 위탁생산기관에서 생산할 경우, 다른 의약품에 대한 오염이 없음을 입증하여야 한다.

2.3.4.3 함량(Content, strength or quantity)

플라스미드 DNA 기반 치료제는 플라스미드 중량(함량)에 근거하여 투여량을 결정한다. 일반적으로 플라스미드 중량은 260 nm에서의 흡광도에 의해 설정되며, 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 비교하면 순도를 평가하는 데 유용할 수 있다.

2.3.4.4 기타 품질 평가 요소(Other quality parameters)

기타 품질 매개변수도 역시 설정하고 관리해야 한다. 중요한 품질 매개변수에는 성상 및 pH가 포함된다. 또 다른 중요한 품질 매개변수는 초나선 플라스미드의 전체 양에 대한 백분율(플라스미드는 부분 풀림이 있는 원형 또는 선형과 같은 다른 형태로 존재할 수 있음)이다. 제품 특성에 따라 삼투압 및 점도와 같은 다른 매개변수의 제어가 중요할 수 있다. 또한 제한효소 처리 지도, 겔 또는 모세관 전기영동 및/또는 HPLC와 같이 원료의약품의 순도 또는 동일성을 평가하는데 사용

하는 방법으로 품질을 평가할 수 있다. 플라스미드 DNA 기반 치료제가 동결건조된 경우, 잔류 수분 테스트와 같은 기타 시험은 제형뿐만 아니라 제품의 물리적 특성을 확인하기 위해 필요할 수 있다.

2.3.4.5 역가(Potency)

역가는 자사 표준품과 함께 정량적이고 검증된 적절한 분석법으로 측정하여야 한다. 최종 치료제 제형의 역가는 타당한 사유가 없는 한 확립해야 하고, 플라스미드 DNA 기반 치료제의 유효성과의 상관성이 있어야 한다.

기능적인 활성과 상관성이 있는 역가시험을 확립해야 한다. 이것은 발현량을 시험관내에서 정량적으로 확인하거나, 또는 적절한 면역반응을 유도하는데 필요한 최소량을 결정하기 위하여 확립된 동물모델에서 역가측정이 요구될 수도 있다. 이는 일반적으로 시험관내 발현 시스템의 형태를 취한다. 표적 단백질은 적합한 세포주의 형질주입에 의해 시험관내에서 발현될 수 있고, 발현된 mRNA 또는 발현된 단백질은 예를 들어 정량적 RT-PCR(mRNA의 경우) 또는 면역형광 또는 웨스턴 블롯(이 경우 단백질)로 확인할 수 있다.

세포 기반 역가 분석의 경우, 시험에 사용하는 세포의 일관된 공급을 보장하기 위해 세포은행을 사용하여 세포를 관리하는 것이 중요하다. 또한 시험에 사용되는 세포는 외래성 인자, 마이코플라스마/스피로플라스마(후자는 관련 있는 경우에만), 박테리아/진균 및 마이코박테리아(해당되는 경우)가 없는지 평가해야 할 것이며, 이렇게 적절하게 제어된 세포만 사용해야 한다.

2.3.4.6 무균 및 기타시험(Safety, including sterility and endotoxin testing)

치료제의 각 배치에 대해 무균 시험을 실시해야 한다. 치료제가 비경구 경로로 투여되는 경우, 무균 시험을 생략하고 적절한 대체 바이오버든 시험을 적용하는 것은 정당화될 필요가 있다. 또한, 각 배치에 대해 엔도톡신 시험을 수행하고 적절한 규격을 정의해야 한다.

2.3.4.7 다수의 플라스미드로 구성된 치료제(Multi-component Gene Therapy Products)

한 개 이상의 플라스미드가 제형화된 플라스미드 DNA 기반 치료제에 포함

되어 있을 경우에는 부가적인 사항을 더 고려해야 한다. 여러 가지 플라스미드로 이루어진 치료제에서는 플라스미드가 부가적인 항원, 사이토카인 또는 기타 플라스미드 DNA 기반 치료제의 안전성에 영향을 미치거나 효능을 증가시키는 생물활성 물질 등을 암호화할 수 있다. 각각의 플라스미드에 대해서, 개발의 전체적인 개요를 기술하고 정제된 플라스미드 원료의약품의 생산관리와 특성분석을 위에서 언급하고 있는 대로 수행해야 한다. 완제의약품 관리는 신중한 관리가 필요한데, 이는 여러 개 플라스미드 DNA 기반 치료제의 조합 (combination)과 이들의 상호작용에 의하여 역가가 결정될 수 있기 때문이다.

2.3.5 표준품(Reference standards or materials)

최종 제형 플라스미드 DNA 기반 치료제 중 가능하다면 임상평가가 수행된 적절한 생산 배치에 대해 완전한 염기서열분석을 포함한 화학적 조성, 순도 및 생물활성에 대해 완전하게 특성을 분석하여, 화학적 및 생물학적 표준품으로 사용할 수 있다. 이는 생산 배치들의 품질을 평가하는 기초로 사용해야 한다.

2.3.6 안정성(Stability)

적절한 안정성 평가는 치료제 개발에 있어 필수적인 부분이다. 따라서 실제 사용될 용기에서 최종제품의 안정성이 확인되어야 하며, 그 결과는 적절한 저장조건에서의 유효(사용)기간 설정에 사용한다. 안정성시험에는 초나선 플라스미드의 비율, 함량, 성상 등을 포함할 수 있다. 보관 안정성과 함께 용기 마개 시스템의 적합성(침출물/추출물 평가 포함)을 평가하고 논의해야 한다. 실시간 안정성 시험은 이 목적에 따라 수행해야 하며, 가속시험은 의약품의 안정성에 대한 보조적인 근거자료를 제공하고, 안정성 여부를 결정하는데 사용된 시험법의 속성을 재확인할 수 있다. 안정성 평가는 의약품 등의 안정성 시험기준, 생물의약품 안정성시험 가이드라인에 따라 평가해야 한다.

3. 비임상 시험 시 고려사항

원칙적으로 모든 새로운 플라스미드 DNA 기반 치료제, 플라스미드 DNA 기반 치료제/면역증강제 조합에 대한 비임상 평가는 반드시 수행해야 한다. 플라스미드 기반 DNA 치료제의 특징, 투여경로(비강 내, 정맥 내, 근육 내, 혹은 경구 투여 등), 제형 (리포좀 캡슐화, poloxamers 등), 그리고 플라스미드의 흡수를 증가시키기 위한 기술(전기천공 등)은 비임상 시험의 설계 시 고려하고 반영해야 한다. 한 개 이상의 개별 플라스미드로 구성된 의약품의 경우, 특정한 플라스미드 한 개가 중대하고 높은 위험성을 보이지 않는다면, 사람에게 투여될 완제의약품(플라스미드 DNA 기반 치료제 제형)으로 시험할 것을 권고한다. 플라스미드 간의 상호작용이 없다면, 다양한 플라스미드로 구성된 의약품에 대한 안전성 평가 자료는 그 플라스미드의 일부를 포함한 제품의 안전성 평가에 적용될 수 있다. 사례별로 규제기관과 사전상담을 통해 제출자료에 대해 논의할 것을 권고한다.

플라스미드 DNA 기반 치료제의 비임상 안전성 평가를 계획할 때는, 여기에서 제시된 내용에 추가하여 「생물의약품 비임상시험 가이드라인(2014)」, 「유전자 치료제 비임상시험 평가 가이드라인(2021)」 등을 참고할 수 있다.

3.1 독성에 관한 자료(Nonclinical toxicity studies)

비임상 안전성평가의 일반적인 목적은 신약이 예기치 않은 부작용의 가능성을 가지고 있는지 사전에 평가하는 것이다. 시험의 설계는 예정 임상에서 사용할 내용을 고려해야 하고, 플라스미드 DNA 기반 치료제와 관련된 평가에 초점을 맞추어야 한다. 화학적 합성으로 만들어지는 의약품에 대해 권장하는 고전적인 안전성과 독성 평가는 DNA 평가 내용 및 범위와 차이가 있을 수 있다. 다른 생물학적 제제처럼 동물모델을 이용한 안전성 평가에는 ① 약리학적 활성 등을 나타낼 수 있는 적절한 동물종의 선택과 생리학적 상태, ② 용량, 투여경로 및 방법(횟수 및 기간)을 포함한 약물전달 방법을 고려해야 한다.

독성시험은 비임상시험관리기준을 준수하여 실시하여야 하며 시험물질은 임상 시험에서 사용할 예정인 것과 동등해야 한다. 가능하다면 동일한 배치의 시험물질을 비임상 안전성 평가와 초기 임상시험에 사용하는 것이 바람직하다. 플라스미드 DNA 기반 치료제는 분포시험 등을 독성시험과 함께 수행할 수 있다. 이러한 경우

시험방법 및 평가기준 등의 타당성이 과학적·합리적으로 인정되어야 하며 새로 개발된 방법이 완전히 확립되지 않았을 때에는 비임상시험관리기준에 적합하지 않은 부분을 명확히 기재하고 GLP 원칙을 준수하여 수행할 수 있다.

3.1.1 단회투여독성시험(Single-dose toxicity studies)

생물학적으로 반응하는 적절한 동물 1종에 대해서 실시할 수 있으며, 제품은 선택된 동물 중에서 면역원성이 있어야 한다. 중대한 독성이 발현되거나 필요하다고 판단될 경우 추가 종에 대해 실시할 수 있다.

시험연구는 적절한 몇 가지 용량 군 그리고 용매대조군 혹은 다른 적절한 대조군을 포함해야 한다. 용량 및 투여횟수 설정 시 임상계획 용량 보다 높은 농도를 사용하여 연구할 수 있다. 가속화된 플라스미드 DNA 기반 치료제 투여 일정을 고려할 수 있으며, 임상예정 횟수 혹은 그 이상을 투여할 것을 권고한다.

독성 평가는 급성기간과 유전자치료제의 발현 및 잔류회복기간(추적기간)에서 즉, 최종 투여 후 인체소실에 대한 근거에 따라 아직 체내에 잔류되는 초기 수일(예. 2~3일)에서와 체내에서 소실되는 후기 수주 이후(예. 14~21일)에서 평가되는 것을 고려할 수 있다.

일반적으로, 영장류 동물에서의 시험연구는 사람 대상의 임상시험 진입 시 요구되지 않는다. 하지만, 만약 예상되는 독성이 종 특이적이라면, 영장류와 형질전환 마우스 모델에서 임상에서의 독성을 더 많이 예측할 수 있을 것이다.

평가에는 매일 일반증상 관찰과 투여 부위 반응, 사료섭취량 및 체중 측정을 포함해야 한다. 실험실적 평가에는 혈액학적 검사, 혈액화학검사, 뇨검사 등을 포함해야 한다. 부검은 적절한 조직 범위(예. 투여 부위, 비장, 간, 신장, 장, 뇌, 골수, 난소/정소, 폐, 림프절, 심장과 부신 등)에서 육안적 관찰 혹은 조직병리학적 검사를 통해 이루어져야 한다. 관찰된 사항은 시험물질과의 연관성, 형태, 중증도와 관련지어 평가해야 한다.

3.1.2 반복투여독성시험(Repeated-dose toxicity studies)

환자에게 반복투여 되는 경우에 실시하며 투여용량, 경로와 빈도는 임상에서

계획된 용법·용량을 따라야 하고, 투여횟수는 임상시험에서 계획된 것과 동일하거나 그 이상이어야 한다. 평가 시 고려사항은 단회투여시험 권고사항을 따른다.

3.1.3 유전독성시험(Genotoxicity studies)

DNA 또는 염색체 성분과 직접 작용할 가능성이 없다면 일반적인 유전독성 시험 항목은 플라스미드 DNA 기반 치료제에 적용하지 않을 수 있다. 그러나, 이전에 시험한 적 없는 새로운 면역증강제나 첨가제 등을 함유한 경우 유전독성시험이 요구될 수 있다. 체내 분포시험을 통해 플라스미드 DNA 기반 치료제의 분포 및 체내 지속성을 평가해 투여 60일 이후 최대검출부위에서 숙주세포 gDNA 1 µg당 30 copies 미만의 플라스미드가 검출된다면, 추가적인 삼입 분석시험은 필요하지 않을 수 있다.

3.1.4 발암성시험(Carcinogenicity studies)

일반적인 발암성시험을 실시할 필요는 없으나, 이전에 시험한 적 없는 새로운 면역증강제나 첨가제 등을 함유한 경우 발암성시험이 요구될 수 있다. 세포배양에서 포유동물 세포에 주입된 DNA는 세포 내 유전물질에 삽입될 수 있으며 복제되는 동안 계속 유지될 수 있다. 이론적으로, 생체 내(*in vivo*)에서 외부 DNA가 감수성이 있는 세포 내로 들어가면 활성 종양유전자가 삽입에 의하여 숙주세포의 원종양 유전자(proto-oncogene)가 활성화되거나 억제 유전자의 활성이 억제되어 세포 변형을 초래하고 종양세포를 형성할 수 있다. DNA 삽입은 ① 유전체로의 무작위적 삽입, ② 유전체와 플라스미드의 유사 염기서열 간 상동 재조합, 혹은 ③ 레트로 바이러스의 직접 삽입기전에 의해서 일어날 수 있다. 이 가이드에 적용되는 제제들은 대부분은 무작위 삽입에 의한 가능성에 해당할 것이다. 또한 플라스미드 DNA 기반 치료제의 염기서열이 사람 유전체와 광범위하게 서열 동질성을 갖거나 종양 형성 가능성이 있는 서열이 벡터에 포함된 경우 역시 발암성시험을 고려하여야 한다. 숙주 염색체에 플라스미드 DNA 기반 치료제 특이적인 서열이 삽입되는지를 검토한 후 제품개발 진행여부를 판단하여야 한다.

숙주세포 염색체에 대한 삽입여부를 확인한 시험 등에서 플라스미드 DNA 기반 치료제의 삽입활성이 매우 높은 경우 또는 생명을 위협하지 않는 상황에서 장기간 사용하는 경우 등에서 발암성시험을 고려할 수 있다.

3.1.5 생식·발생독성시험(Reproductive and developmental toxicity studies)

생식선 및 생식기관에서 발현 및 발현지속에 관한 자료가 요구된다. 플라스미드 DNA 기반 치료제가 생식기관 조직에서 일정 시간 이상 존재하여, 삽입되는 경우 생식세포의 변형을 일으킬 수 있다. 따라서 생식세포로 분포되거나, 삽입 혹은 발현될 가능성에 대해 반드시 조사하여야 한다. 암수 동물의 생식기관에서 DNA의 존재와 지속성 조사는 qPCR(Quantitative real-time PCR)과 같은 시험 수행을 통해 얻을 수 있다. 일정 시간이 지난 후에도 생식기관에서 플라스미드 DNA가 계속 존재하는 경우 더 많은 시험, 즉 난자와 정자세포에 대한 조사와 수정능 및 일반적 생식능력에 미치는 영향에 대한 고려가 필요하다. 그리고 배·태자 및 출산 전 독성시험은 임상시험에서 의도하는 사용과 환자군에 따라 임신 가능성이 있는 여성들이 제품에 노출될 경우 요구될 수 있다. 그러나 정당한 이유가 있는 경우 즉, 생존을 위협받는 환자군에서는 피임 등에 대한 동의를 받는다면, 사람에게 처음 적용되는 임상시험시 생식발생독성자료가 반드시 요구되지 않을 수도 있다.

생식선 및 생식기관에서 발현되지 않는다면 수태능 및 일반생식독성시험이 필요하지 않을 수 있으며 생식선과 생식기관의 조직병리학적 자료(반복투여독성시험 자료 등)로서 대체할 수 있다.

3.1.6 면역독성시험(Immunotoxicity studies)

도입유전자가 발현된 단백질 및 벡터에 포함되어 있는 단백질 등에 의한 항원성 유발 및 그 외의 바람직하지 않은 면역반응을 일으킬 가능성에 관한 자료가 요구된다. 단백질의 이상 발현은 면역계의 부적절한 활성을 유발하여 급·만성의 염증반응, 자가면역반응 및 정상조직의 파괴를 유발할 수 있으므로 플라스미드 DNA 기반 치료제 항원의 과발현 여부를 고려하여야 한다. 자가면역반응이 임상시험이나 비임상시험에 잠재적인 위험요소가 될 수 있다면 이러한 질환 유발이 관찰될 수 있도록 충분한 기간 동안 비임상시험을 실시하여야 한다. 플라스미드 DNA 기반 치료제와 관련된 면역 관련 우려는 다음과 같다.

- ① 플라스미드 DNA 기반 치료제의 사용이 플라스미드 DNA에 대한 자가항체 생성을 촉진할 가능성
- ② 전신성 홍반성낭창(systemic lupus erythematosus, SLE)과 같은 전신적 자가

면역질환을 유발하거나 촉진시킬 수 있는 위험

- ③ 플라스미드 DNA 기반 치료제-발현 항원을 생산하는 세포에 대해 국소 면역 반응을 유발하여 결과적으로 특정 장기에 대한 자가면역반응이 발생할 위험
- ④ 발현되는 항원에 대한 면역반응이 유도되지 않고 면역관용(immune tolerance)이 발생할 위험
- ⑤ 플라스미드 구조에 존재하는 CpG motif 때문에 숙주세포의 사이토카인 반응을 편향적으로 변화시킬 가능성
- ⑥ 사이토카인 혹은 다른 면역조절 단백질 등을 동시에 발현하는 플라스미드 기반 DNA 치료제에 의해 면역저해, 만성염증, 자가면역반응 등 의도하지 않은 부작용이 발생할 가능성
- ⑦ 생체 내에서 발현된 항원이 의도치 않은 활성을 보일 가능성

또한, 도입유전자가 발현된 단백질(사이토카인 등)에 대하여 면역이 생성된 경우, 그와 상응하는 내인성 단백질과의 잠재적 교차반응을 시험할 것을 권고한다.

우선적으로 면역독성을 평가하기 위해서는 단회 또는 반복투여독성시험 등에서 백혈구, 림프구 및 혈청글로불린의 혈액학적 변화, 면역계통 장기의 중량 및 조직학적 변화 등의 표준독성시험결과, 약물 약리학적 특성, 대상환자군, 알려진 면역조절제와 구조 유사성, 약물분포, 임상정보에 기반한 근거 중심으로 면역독성 시험 추가 수행여부를 판단하게 된다. 추가되는 시험의 종류로는 T-세포 의존성 항체반응, 자연살해세포 기능시험, 면역표현형 검사, 대식세포/호중구 기능, 세포매개성 면역측정시험법 등이 있다.

동물모델을 이용한 연구에서는 잠재적 부작용을 평가하기 위해 시험물질에 생물학적 활성을 보이는 동물모델이나 상응하는 동물유전자를 포함하는 벡터를 이용하는 것을 고려할 수 있다.

3.1.7 국소내성시험(Local tolerance studies)

적절한 동물종을 이용하여 투여부위의 자세한 임상·병리학적 관찰이 필요하고, 생검 또는 부검에서 얻어진 투여부위 조직의 병리학적 평가 등을 실시하는 국소 내성 시험이 필요할 수 있다. 그러나 임상에 적용되는 제품과 동등한 조성 및

투여경로를 이용한 단회투여 독성시험 등에서 투여부위의 변화가 임상, 병리학적으로 상세하게 평가하였다면 별도의 국소내성 시험은 생략할 수 있다.

3.2 약리작용에 관한 자료(Nonclinical pharmacology studies)

3.2.1 효력시험(Efficacy studies)

플라스미드 DNA 기반 치료제의 경우 유전자치료제에서 요구되는 효력시험으로써 ① 배양세포로의 유전자전달(transformation) 후 항원 등의 단백질 발현을 보는 시험관 내(*in vitro*) 시험과 ② 감수성 있는 동물에서의 효력을 평가하는 생체 내(*in vivo*) 시험이 모두 요구될 수 있다.

감염성 질환 또는 암 질환 치료에 쓰이는 플라스미드 DNA 기반 치료제의 동물 효력 평가 시 해당 플라스미드 DNA 기반 치료제가 동물모델에서 면역활성을 보인 평가결과를 제출해야 한다. 여기에는 항원 특이적인 항체 역가, 혈청 중화항체 역가, 혈청전환, 사이토카인을 분비하는 세포의 활성과/혹은 세포 매개성 면역반응의 측정이 포함된다. 시험연구는 면역반응 지속성에 대한 정보를 제공할 수 있도록 설계해야 한다. 암 질환 치료 플라스미드 DNA 기반 치료제의 경우, 임상 치료대상 암세포를 동물에 이식한 모델을 제작한 후 플라스미드 DNA 기반 치료제 투여에 따른 암 치료에 미치는 영향(크기 등)을 평가하는 것을 우선적으로 고려할 수 있다. 감염성 질환 치료제 플라스미드 DNA 기반 치료제의 경우 투여 후 해당 독소 또는 독성 균주를 직접 투여하는 공격시험을 통해 보호효과를 추가적으로 평가할 수 있다. 만약 플라스미드 DNA 기반 치료제가 인간 사이토카인을 발현한다면, 종 특이성을 고려해야 한다. 즉, 인간 사이토카인에 반응하는 동물모델을 선택하거나 어려운 경우 이에 상응하는 동물 사이토카인을 사용한 모델을 사용할 수 있다. 동물군의 경우 양성, 음성 대조군 및 용량반응성을 확인할 수 있는 적절한 군을 배정해야 한다.

3.2.2 흡수, 분포, 대사 배설시험(Biodistribution, Persistence, and Integration Analysis)

투여 후의 플라스미드 DNA 기반 치료제 분포, 지속성 및 삼입여부를 결정하는 시험을 실시하여야 한다. 가능한 임상시험과 동등한 시험물질과 투여경로로 수행

하는 것이 바람직하다. 만약 의도하지 않은 곳에 플라스미드 DNA 기반 치료제가 분포되었다면 플라스미드 DNA 기반 치료제의 분포가 병리학적 현상과 관련되어 있는지 조사하고 표적, 비표적 기관에서의 유전자와 발현물질의 지속성 여부를 평가할 수 있는 연구를 수행하여야 한다. 전형적인 생물학적 분포 연구는 초기(예. 1~7일)와 후기(예. 2~3달) 시점을 포함한 여러 시점에서 플라스미드 존재 여부를 평가하는 것이다. 분석조직은 혈액, 심장, 뇌, 간, 신장, 골수, 난소/정소, 폐, 림프절(장간막 등), 비장, 부신 그리고 투여 부위를 포함한다. 플라스미드 DNA 기반 치료제의 존재 유무는 qPCR 방법으로 수행하며 시험방법은 밸리데이션하여야 한다. 이러한 분석법은 숙주세포 gDNA 1 µg당 플라스미드 DNA 100 copies 미만을 정량할 수 있어야 한다. 생체분포 시험 시 밸리데이션 및 단계별 시험방법 등에 대한 내용은 「정량 PCR을 이용한 유전자치료제 생체분포 시험방법 밸리데이션시 고려사항(2010)」을 참고할 수 있다.

분포/지속성 연구에서 플라스미드 DNA 기반 치료제 접종 60일 후에 모든 동물의 어떤 조직에서도 숙주세포 gDNA 1 µg당 30 copies 이상의 플라스미드 DNA가 검출되지 않는다면 추가 삽입연구가 요구되지 않을 수 있다. 만약 플라스미드 DNA가 어떤 동물의 어떤 부위에서든 이보다 유의하게 높은 수준으로 존재한다면, 플라스미드 DNA 기반 치료제를 접종한 동물의 유전체에 플라스미드 DNA가 삽입되었는지에 대해 시험할 것을 권고한다. 플라스미드 DNA 기반 치료제의 삽입과 관련된 우려사항은 플라스미드 삽입이 암 억제 유전자의 활성을 감소시키거나 발암 유전자의 활성을 증가시킬 경우, 돌연변이 위험이 있을 수 있다. 더불어 플라스미드 DNA 기반 치료제의 삽입은 염색체의 절단이나 재배열 유도를 통하여 염색체 불안정화라는 결과를 초래할 수도 있다. 전형적으로, DNA 유전체로부터 플라스미드 DNA를 검출하는 방법으로는 qPCR이 사용된다. 특별히 디자인된 PCR 프라이머는 삽입되거나 삽입되지 않은 플라스미드를 구별하기 위해 사용할 수 있다. 임상시험 전 제출된 분포시험 자료와 달리 플라스미드 DNA 기반 치료제의 흡수 혹은 분포에 영향을 줄 수 있는 벡터 혹은 유전자, 전달 방식, 투여경로, 최종 제형 등에 변경이 발생하는 경우 추가적인 시험이 요구될 수 있다.

4. 참고문헌

- 1) Guidelines for Assuring the Quality and Nonclinical Safety Evaluation of DNA Vaccines, World Health Organization, 2005 (Annex 1, WHO Technical Report Series No. 941)
- 2) WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, World Health Organization, 2005 (Annex 1, WHO Technical Report Series No. 927)
- 3) Guidelines on the quality, safety and efficacy of plasmid DNA vaccines, World Health Organization, 2021 (Annex 2, Replacement of Annex1 of WHO Technical Report Series No. 941), 2021
- 4) Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications, FDA Department of Health and Human Services, 2007
- 5) Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines, FDA Department of Health and Human Services, 2011
- 6) Concept paper on guidance for DNA Vaccines, European Medicines Agency, 2012
- 7) 생물의약품 비임상시험 가이드라인, 식품의약품안전처, 2014
- 8) 생물의약품 안정성시험 가이드라인, 식품의약품안전처, 2015
- 9) 유전자치료제 비임상시험 평가 가이드라인, 식품의약품안전처, 2021



플라스미드 DNA 기반 치료제의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인

발행일 2022년 6월

발행인 서경원

편집위원장 박인숙

편집위원 오일웅 양성준 최경숙 박정연 박송희 백정희
박지원 유혜선 이재린 한덕희 홍영기 유지수
류정임

발행처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부
세포유전자치료제과



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원