
세포외소포치료제 품질관리 및 비임상 고려사항 정보집

2025. 12. 30.

주관연구개발기관 : 가톨릭대학교 산학협력단
공동연구개발기관 : 연세대학교 산학협력단
고려대학교 산학협력단
(주) 입셀
(주) 지놈앤컴퍼니
(주) 세라트젠
(주) 애임스바이오사이언스

스마트임상시험신기술개발연구사업단

- 본 정보집은 보건복지부의 재원으로 국가임상시험지원재단 스마트임상 시험신기술개발연구사업단의 지원을 받아 수행한 「첨단 바이오 분야 초기 임상시험 관련 기술 개발」 (과제고유번호: RS-2023-KH141565)의 결과물로 제작되었습니다.
- 본 정보집은 보건복지부, 식품의약품안전처 등 관련 기관의 제도 및 정책과 상이할 수 있으며, 어떠한 법적 구속력 및 책임을 가지지 않으므로 참고용으로만 활용하시기 바랍니다.
- 본 정보집의 내용은 현재의 과학적·기술적 근거 등을 토대로 작성되었으며, 향후 과학기술의 발전 및 관련 법규정의 개정 및 구체적인 사실관계의 변화 등에 따라 내용이 달라질 수 있습니다.
- 본 저작물에 대한 권한은 (연세대학교 산학협력단)에 있으며, 무단으로 지침서의 내용을 수정하여 재배포하는 것을 금합니다. 또한, 본 지침서의 전부 또는 일부를 인용·활용할 경우 반드시 출처를 명시하여야 합니다.

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용 및 사유
1	1	2024.11.13	제정
2	2	2025.12.30	첨단바이오 분야 임상시험 협의체 위원 검토 의견을 바탕으로 개정

세포외소포치료제
품질관리 및 비임상 고려사항
정보집

본 정보집의 세포외소포치료제 관련한 품질관리 및 비임상시험에 대한 고려사항은 연구개발 측면에서 정보를 제공하는 목적으로 여기서 제시하는 권고사항 및 의견은 향후 관련 분야의 과학 기술 발전 및 규제 기관의 심사 기준 재설정에 따라 변경될 수 있으며, 식품의약품안전처 등 의약품 규제기관의 정책과 심사의견과는 관련이 없음을 밝힙니다.

목차

1. 서론.....	6
1.1 배경.....	6
1.2 목적.....	6
2. 세포외소포치료제의 품질관리 사항.....	7
2.1 출발물질의 종류와 특징.....	7
2.2 세포외소포의 배양 환경, 첨가제의 품질.....	8
2.2.1 출발물질, 원료물질, 첨가제의 관리.....	8
2.2.2 제조, 분리 및 정제.....	9
2.3 공정 중 관리.....	10
2.3.1 제조의 일관성.....	10
2.3.2 순도.....	11
2.3.3 안전성 시험.....	12
2.3.4 안정성.....	14
2.4 세포외소포치료제 품질.....	18
2.4.1 세포외소포치료제 특성평가(characterization).....	18
2.4.1.1 세포외소포 수 및 크기 확인.....	18
2.4.1.2 성상시험.....	19
2.4.1.3 단백질 분석.....	19
2.4.1.4 총 지질, RNA 정량화.....	22
2.4.2 완제의약품 품질관리(Quality Control) 항목.....	22
2.4.2.1 무균시험(Sterility Test).....	23
2.4.2.2 미생물한도시험(Microbial Limits Test).....	23
2.4.2.3 엔도독신(발열성 물질) 시험(Endotoxin Test).....	23
2.4.2.4 제형-투여경로 적합성 관련 품질관리항목.....	24

2.5.2 시험법.....	25
2.5.2.1 나노입자추적분석(Nanoparticle Tracking Analysis)	25
2.5.2.2 동적광산란법(Dynamic Light Scattering).....	26
2.5.2.3 유세포분석법(Flow Cytometry).....	26
2.5.2.4 저항성펄스센싱법(Resistive Pulse Sensing).....	27
3. 세포외소포치료제의 비임상 고려사항	28
3.1 생물모델	28
3.1.1 생물모델 선택 시 고려사항	31
3.1.1.1 임상적 타당성.....	31
3.1.1.2 종간 교차반응성.....	31
3.1.1.3 투여경로의 유사성	31
3.2 비임상시험을 위한 투여량 및 투여경로 설정 시 고려사항	32
3.2.1 투여량 단위(용량 지표) 설정 및 정규화.....	32
3.2.2 투여경로 선정의 원칙: 표적조직·작용기전·제형과의 연계	32
3.2.3 분포·잔류·제거 및 반복투여 시 반응 평가.....	33
3.2.4 세포외소포 제제 특이 위험요인(면역·염증, 응집/입자성 특성, 불순물) 고려.....	33
3.2.5 개발 단계별(목적별) 접근	34
3.3 독성시험.....	34
3.3.1 단회/반복 투여 독성시험.....	34
3.3.2 유전독성시험.....	35
3.3.3 종양원성시험/발암성시험.....	35
3.3.4 면역독성시험.....	36
3.3.5 생식발생독성 등 기타 독성시험의 범위 설정.....	36
3.3.6 국소내약성(투여부위 안전성) 및 투여경로 특이 독성.....	36
3.3.7 시험물질 특성 및 품질 정보의 연계.....	37

3.4 약리작용 자료.....	37
3.4.1 효력시험	37
3.4.2 생체 내 분포.....	38
[별첨 1] 2023년 12월 개정 ‘세포외소포 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 [민원인 안내서]’ 변경대비표	40
[별첨 2] Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2023 (MISEV2023) 개정 가이드라인 변경대비표	49
4. 참고문헌.....	68

1. 서론

1.1 배경

세포외소포(Extracellular Vesicles, EV)는 질병의 진단과 치료에 적용될 수 있다는 측면에서 다양한 목적으로 활용될 수 있다. 세포외소포치료제는 이러한 세포외소포에 유전물질 등 다양한 치료 성분을 도입한 것으로, 세포외소포를 분리 및 정제하여 제조하는 의약품으로 정의한다. 세포외소포치료제의 제조와 활용은 정밀한 기술과 엄격한 품질 관리가 요구되며, 이에 따라 엑소좀 관련 제품의 안전성과 효능을 보장하기 위한 표준화된 기준이 필요한 상황이다. 특히, 세포외소포치료제의 원료가 되는 세포외소포와 그 기원세포 등에 대한 배양 조건, 생산 공정의 일관성은 제품의 특성과 안전성에 직접적인 영향을 미치므로 각 단계에서의 철저한 관리가 중요하다.

1.2 목적

본 정보집의 목적은 세포외소포치료제의 제조 및 품질관리에 대한 고려 사항과 비임상, 임상시험 시 필요한 사항들에 대한 기준을 제시하고 있다. 다른 의약품과는 다르게, 기원세포가 다르다는 세포외소포의 제조 특성 상 동일한 품질관리 기준을 적용하기 어려울 수 있다. 이 정보집에서는 세포외소포치료제에 대한 일관성 있는 품질관리 기준과 출발물질의 선택에서부터 배양 환경, 첨가제의 품질 관리, 공정 중/후의 관리까지 전반적인 과정에 대한 정보를 제시하였다. 또한, 세포외소포치료제의 비임상시험을 위한 동물모델 선정, 세포 내 분포 및 독성시험 등의 시험 기준을 제공하여 국내에서 임상시험을 계획하는 세포외소포 기반 치료제 개발자(산·학·병·연)가 연구자와 제조업체가 임상시험 진입 전 CMC/비임상 준비 단계에서 고려해야 할 사항을 안내하는 참고자료로서 도움을 주고자 하며, 법적 효력은 없다.

이 정보집은 사람, 동물, 미생물 또는 식물 유래 세포에서 생산되는 세포외소포를 통해 개발되는 세포외소포치료제에 적용되며, 함유하는 치료 성분에 따라 추가적인 고려사항(예. 유전자의 경우 유전자치료제 품질관

리 기준을 추가적으로 고려)이 필요할 수 있다.

2. 세포외소포치료제의 품질관리 사항¹

2.1 출발물질의 종류와 특징

세포외소포는 혈액, 소변, 타액 뿐만 아니라 생체 내 모든 생체액 (biofluid)에서 발견되며, 뇌, 암조직 등 생체 내 조직에서도 발견된다. 세포외소포는 다양한 생체세포에서 출발물질을 선정할 수 있기 때문에 기원세포의 수집절차, 공여자(사람 유래 세포외소포에만 해당)의 적합성 기준 및 건강상태 등이 기록되어야 한다. 세포 및 조직을 제공하는 공여자의 적합성 기준은 '세포치료제 기증자 적합성 평가 가이드라인'을 참고할 수 있다.

세포외소포를 생산하는데 있어 다양한 공여자는 기능적으로 다른 특성을 갖는 세포외소포를 생산할 수 있기 때문에 공여자에 따른 차이를 고려하여야 한다. 세포외소포치료제의 품질을 확보하기 위해서는 적절한 제조용 세포의 분리 또는 세포주의 수립과 그 관리가 중요하며, 생산 배양기간 동안 제품 품질에 영향을 미치는 각종 특성을 적절한 범위로 유지하는 것이 중요하다. 세포외소포치료제 제조에는 사람 자가유래세포, 동종유래세포, 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 및 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES), 세포주 등이 사용된다. 이 가운데 자가유래세포를 제외하고는 식품의약품안전처 '세포치료제 세포은행 평가 가이드라인(식품의약품안전처, 2023)'²을 참고하여 그 적격성을 평가한 후 제조에 사용해야 한다.

만약, 불멸화된 클론성 세포주(immortalized clonal cell lines)에서 세포외소포를 생산한다면 생산 동안 유전형, 표현형의 안정성을 엄격하게 시험하여야 한다. 왜냐하면 세포주 수립 시 장기간에 걸쳐 계대배양을 반복했을 때 표현형의 안정성에 관한 정보가 없기 때문이다. 또한, iPSC/ES 유래 세포 또는 불멸화된 세포주에서 유래한 세포외소포를 생산하는 경우 세포유래 DNA나 세포은행 중의 불순물로 혼입된 종양형성세포에서 유래한 세포외소포가 제품에 혼입되어 발생할 수 있는 종양형성을 고려해야 한다.

표 1. 출발세포 유형별 규제상 고려사항

출발세포 유형	장점	주요 위험요인	권장 특성시험
중간엽줄기세포 (MSC)	대량생산 가능, 세포 은행 구축 가능, 면역 조절능 우수	공여자 간 변이, 면역원성(동종 시), 바이러스/마이크로플라스마 오염	공여자 적합성 평가, 세포은행 적격성 평가, 무균시험, 바이러스 부정시험, 마이크로플라스마 부정시험, 핵형분석
유도만능줄기세포 (iPSC) 유래세포	다양한 세포 유형으로 분화 가능, 대량생산 가능	종양형성 위험, 유전적 불안정성, 잔류 미분화세포	종양원성 평가, 핵형분석, 유전적 안정성 시험, 분화 효율 및 순도 평가, 잔류 DNA 정량
배아줄기세포 (ESC) 유래세포	다분화능, 대량생산 가능	종양형성 위험, 윤리적 문제, 유전적 불안정성	종양원성 평가, 핵형분석, 유전적 안정성 시험, 분화 효율 및 순도 평가
불멸화 세포주	균일한 품질, 대량생산 용이, 장기 계대배양 가능	종양형성 위험, 장기 계대 시 유전형/표현형 변화, 종양형성세포 유래 세포외세포 혼입	종양원성 평가, 유전형/표현형 안정성 시험(계대별), 핵형분석, 잔류 DNA 정량
동물유래세포	특정 연구 목적에 적합	이종 감염성 인자, 이종 면역반응 유발	종 특이적 바이러스 부정시험, 마이크로플라스마 부정시험, 무균시험
미생물유래세포	대량생산 용이, 배양 조건 단순	내독소(엔도톡신) 오염, 숙주세포 단백질 잔류	엔도톡신 시험, 무균시험, 숙주세포 단백질 정량

※ 사람유래세포(MSC, iPSC, ESC 등)의 경우 자가 또는 동종유래 여부에 따라 공여자 적합성 평가, 면역원성 등 추가 고려사항이 달라질 수 있다.

2.2 세포외세포의 배양 환경, 첨가제의 품질

2.2.1 출발물질, 원료물질, 첨가제의 관리

생산에 사용하는 모든 시약의 구매 및 품질에 특별한 주의를 기울여야 한다. 시약/원료물질은 내부에서 정의한 품질 시스템을 통해 제

조사가 승인한 판매업체/공급업체로부터 공급받아야 한다. 이러한 물질의 공급업체는 제조사가 적절한 품질 검증 프로그램으로 관리해야 한다.

mRNA를 주 원료물질로 한 치료제의 경우, mRNA를 생산하기 위해 사용한 출발물질, 원료물질과 첨가제 및 지지나노입자의 지질을 포함하여 기술해야 한다. 지지나노입자와 관련하여 지지나노입자 제조에 사용한 지지의 출처 및 품질은 안전성과 품질에 대한 유의한 평가가 가능하도록 충분히 상세하게 기술해야 한다.³

세포외소포의 배양시 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 배지와 비교하여, 무혈청배지(serum-free media) 또는 소 유래 세포외소포가 제거된 배지에서 자라는 세포는 세포자체의 특성이 달라진다는 보고가 있으며 분비되는 세포외소포의 양이나 질에도 영향을 미칠 수 있기 때문에 첨가제의 관리 및 품질의 표준화가 필요하다.

2.2.2 제조, 분리 및 정제

세포외소포는 제조시에 주로 세포배양 상등액으로부터 분리, 정제되기 때문에 배양조건이 표준화되어야 하며 배치 간 재현성이 입증되어야 한다. 공정 중 계대배양 시 접종 및 수확 당시 세포밀도(density/confluence), 생존율(viability), 세포성장, 계대배양 방법, 계대횟수, 배가시간(doubling time), 산소 및 이산화탄소 농도, 배양온도, 배지첨가물, 배지조성, 배양용기 등은 세포외소포의 양이나 품질에 큰 영향을 미칠 수 있다.

세포외소포의 분리 및 정제를 위해서는 한외여과(ultrafiltration), 초원심분리, 침전, 크로마토그래피 등을 사용하거나 두 가지 이상의 방법을 조합하여 사용할 수 있다. 세포외소포를 분리하는 방법에 따라 형태학적, 단백질 및 핵산 프로파일을 포함한 정량적 측면 등, 세포외소포의 완전성(integrity), 기능적인 특성에 영향을 미칠 수 있으며 동물시험에서 체내 분포에 영향을 미칠 수 있다는 실험적인 보고가 있다. 따라서, 분리 방법에 대해 재현성, 순도, 불순물, 세포외소포의

기능적 특성과 관련하여 표준화하여야 하며 재현성을 입증하기 위하여 분리방법에 대해 상세한 기술이 필요하다. 특히, 정제 후에도 잔존하는 목적 세포외소포 이외 성분의 혼입에 주의하여야 한다. 주요 정제과정에서 공정 유래 불순물 및 제품 관련 불순물에 대한 지표를 정한 제조법을 확립할 필요가 있으며, 정제 전후 불순물 제거 정도의 비교를 공정 중 관리항목으로 설정하는 것을 고려해야 한다. 또한 제조공정이나 보존기간 중 세포외소포의 안정성(분해 및 변화체 생성)에도 주의해야 한다.

세포외소포를 확인 혹은 특성 분석을 위해서는 세포외소포에 대하여 극저온 전자현미경(cryoelectron microscope, Cryo EM)과 같은 고해상도 이미지 분석법 및 나노입자추적분석(nanoparticle tracking analysis, NTA)과 같은 단일입자분석법으로 이중 지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석이 필요하며 추가적으로, 고해상도 이미지 분석 시에는 클로즈-업(close-up)과 광시야(wild-field)의 정보를 모두 확인하는 것이 필요하다.

2.3 공정 중 관리

2.3.1 제조의 일관성

다른 생물의약품과 마찬가지로, 품목허가 신청에 앞서 다수의 연속 배치에 대하여 제조의 일관성을 확정하기 위해 밸리데이션된 방법을 사용해 시험 및 분석을 수행해야 한다. 한 배치와 시험한 파라미터의 허용 가능 범위를 벗어난 다른 배치 사이의 차이에 주목하고 연구해야 한다. 초기 임상 개발 중에는 로트 생산이 적어 생산의 일관성 증명이 제한적이거나 불가능할 수 있다.

특히, 세포외소포치료제는 살아있는 세포를 이용하여 제조하기 때문에 제조 과정 및 세포 환경에 미세한 변화라도 세포외소포 생산공정과 생물학적 성질에 영향을 미칠 수 있으며 이는 세포외소포치료제의 물리화학적 및 생물학적 특성의 변화를 초래할 수 있

다.

세포외소포의 배양 조건 및 제조 과정의 재현성 및 일관성을 유지하는 것은 기본적으로 중요하기 때문에 이에 대한 표준화가 되어야 한다. 세포외소포를 생산하는데 있어서 죽어가는 세포가 분비하는 세포 사멸체(apoptotic body)나 세포 내 성분들은 불순물이 될 수 있으므로 세포외소포 생산 세포의 생존율을 관리하는 것이 중요하며 특히 동물유래 시약을 사용하는 경우 수혜자에서 이종의 감염성 인자 또는 바람직하지 않은 면역반응을 증가시킬 수 있으므로 가능한 한 소태아혈청 등과 같은 동물유래 성분의 사용을 피해야 한다. 만약 소태아혈청을 사용할 경우, 소혈청 유래 세포외소포가 혼입되어 의도하지 않은 생물학적 영향을 일으킬 우려가 있으므로 엄격하게 관리된 소태아혈청만을 사용할 것을 권장한다.

2.3.2 순도

세포 유래 의약품의 순도관리는 제조과정 중 유입가능성이 있는 비세포성 불순물, 최종 제품의 전반적 기능에 필요하지 않는 세포 잔해 또는 세포와 같이 바람직하지 못한 특성을 최소화하는 것과 관련되어 있으며, 불순물에 대한 특성분석도 필요하다. 이러한 불순물과 불필요한 세포 성분에 대한 관리는 필수적이며, 활성 성분을 극대화하고 치료적 활성에 기여하지 않거나 치료 활성/안전성에 부정적 영향을 주는 부분은 최소화하는 것을 목표로 해야 한다.

사용되는 물질 중 잔류물(serum albumin, 항생제 등)에 대하여 잔류물의 제거방법과 잔류물질의 농도에 대한 자료가 제출되어야 한다. 또한, 유효성분을 가진 세포외소포 뿐만 아니라 활성성분을 가지지 않은 세포외소포나 제조·보존과정에서 변화·분해된 세포외소포 변화체가 포함되어 있을 수 있어, 목적 이외의 핵단백질과 같이 세포외소포에서 농축되지 않을 것으로 기대되는 단백질(예. 핵, 미토콘드리아, 골지체, 소포체(endoplasmic reticulum) 등의 구성물질)

에 대하여 기준을 설정하여 관리하여야 한다. 또한, 세포배양 및 정제농축 공정, 제제화 공정 등에서 바이러스, 미생물, 마이코플라스마, 배지성분, 시약 등이 혼입될 가능성이 있다. 따라서, 예상되는 불순물에 대한 정성·정량적 시험법 설정 및 불순물의 허용한도를 검토하여야 한다. 목적 이외의 성분 혼입을 평가하기 위한 지표로 입자의 프로파일 분석을 통한 목적 세포외소포의 비율을 평가하거나 생물학적 시험으로 역가를 측정하고 입자수 등으로 표준화하여 비교 평가하는 방법이 권장된다. 세포외소포 단백질 분석에 대한 자세한 내용은 [2.4.1.3 단백질 분석]을 참고할 수 있다.

품질관리의 일환으로서 공정 또는 주성분 관련 잔여 불순물 수준에 대한 시험은, 불순물의 적절한 제거에 대하여 생산공정을 적절하게 밸리데이션하고 생산의 일관성을 증명한다면, 식약처의 동의 하에 축소하거나 중단할 수 있다. 공정의 주기적 재밸리데이션에 관한 계획 및 규격에 대해 기술해야 한다. 공정이 밸리데이션될 때까지, 식약처가 동의한 바와 같이 다수의 로트에 대하여 불순물 시험 및/또는 측정을 지속해야 한다.

2.3.3 안전성 시험

세포외소포치료제는 외부로부터 오염될 수 있는 가능성이 있기 때문에 여러 외부 물질로 인한 오염이 없음을 입증하는 것이 중요하며 이러한 시험으로는 부정시험, 무균시험, 미생물한도시험 및 엔도톡신 시험 등을 사용할 수 있다.

마이코플라스마부정시험의 경우 세포외소포에 존재하는 마이코플라스마가 피험자의 안전에 영향을 미칠 수 있으므로 이에 대한 관리가 필요한데, 이를 위한 마이코플라스마부정시험에 사용되는 검체는 마이코플라스마 검출이 가장 용이한 시점에서 채취하는 것이 적절하다. 일반적으로 세포외소포를 분리·정제하기 전단계인 마지막 배양이 완료된 시점에서 모은 배양액과 세포를 함께 사용하

는 것이 바람직하다. 만약 신속법(예. 핵산증폭검사법)을 사용하는 경우 공정서 배양법과의 동등성을 확보하여야 한다.

세포외소포치료제는 세포를 이용하여 제조하게 되므로 바이러스에 오염될 가능성이 존재하며, 이러한 바이러스는 환자의 안전과 직결된다. 따라서 외래성바이러스부정시험의 경우 세포외소포를 분리·정제하기 전단계인 마지막 배양이 완료된 시점에서 모은 배양액과 세포를 함께 사용하는 것이 바람직하다. 세포외소포 정제 공정에서는 바이러스 제거가 어렵고, 농축 공정에서 바이러스도 농축될 가능성이 높기 때문에 농축 후 제품의 바이러스 시험 실시를 고려하여야 한다.

무균시험은 완제품에서 미생물(세균 및 진균) 오염여부를 확인하는 시험으로 대한민국약전 등 식약처장이 인정하는 공정서에 수록된 시험방법에 따라 시험을 실시하는 것이 원칙이다. 또한 측정법 및 배지의 적합성시험을 실시하여야 한다. 세포외소포치료제는 완제품에 세포를 포함하고 있지 않으나 세포로부터 생산, 분리, 정제되는 공정 중 원료·시약 또는 시설·환경에 의해 오염될 수 있으며 이는 세포외소포의 품질을 떨어뜨릴 수 있다. 따라서, 환경모니터링과 함께 공정 중 관리(in process control)시험으로 무균시험을 적절하게 수행할 것을 권장한다.

세포외소포치료제 제조공정 중 엔도톡신이 오염될 수 있으며 이를 위한 엔도톡신시험을 위해서는 원료의약품 및/또는 완제의약품의 투여방법, 투여시간, 체중 등을 고려하여 시험기준을 설정하여야 한다. 대한민국약전에 수재된 바와 같이 겔화법, 비탁법 및 비색법 중 하나를 선택하여 시험하며 각 방법에 따라 대한민국약전에 따른 시험의 정밀도와 유효성을 보증하기 위한 밸리데이션 시험을 수행한 후 유효희석배수가 결정된 시험법을 사용하여 매 제조로트마다 엔도톡신시험을 실시한다.

2.3.4 안정성⁴

세포외소포의 경우에는 생물약품으로 온도변화, 산화, 광선(빛)과 같은 환경적 요인에 매우 민감하므로, 생물학적 활성을 유지하고 변성을 방지하기 위해 엄격한 조건에서 보관하는 것이 필수적으로 요구된다. 또한 제품의 유효성과 순도 등 품질에 영향을 미칠 수 있는 외적 조건을 충분히 고려하여 사용(유효)기간 및 보관조건을 설정해야 한다.

세포외소포치료제의 품질 안정성은 **‘생물약품 안정성시험 가이드라인(식품의약품안전처, 2015)’**에 따라 세포외소포의 특성을 고려한 품질 안정성 시험을 수행한다.

표 2. 세포외소포치료제 제조공정의 예시 중 관리(In-Process Control) 항목

공정 단계	IPC 관리항목 (측정항목)	목적	측정 시점/빈도 (예시)	시험/측정 방법 (예시)	참고 허용범위 (예시*)	이탈 시 조치 (예시)
1. 세포 준비/계대배양	세포 동정/순도, 형태학적 관찰, 세포 생존율, 세포 밀도 (Confluence 포함), 계대 횟수/배가시간	원료세포 상태 및 일관성 확보	접종 전·계대 시·수확 전	현미경 관찰, 자동/수동 생존율 측정(염색), 세포 계수	생존율 \geq 80% / 계대 횟수: 사전 정의 범위	원인분석(배지/환경/오염), 재배양 또는 배치 중단
2. 생산배양(배양 조건)	pH, 용존산소(DO), 온도, CO ₂ , 교반/가스유량, 삼투압, 배지성분 (예: glucose/lactate)	배양 환경 안정화 → EV 품질/수율 변동 최소화	배양 중 연속 또는 일 1-2회	온라인 센서/로그, 오프라인 분석	pH 6.8-7.4 / DO 20-60% / 온도 36-37°C(또는 설정값)	제어값 보정, 조건 재설정, 지속 이탈 시 수확/중단 기준 적용
3. 생산배양(오염/건전성)	미생물 오염 징후, 마이코플라스마(필요 시), 세포 사멸 증가 지표	오염 및 불순물(사멸체 등) 증가 예방	수확 전 또는 공정 중 계획 시점	관찰/신속법(핵산 증폭 등)	불검출 또는 내부 기준	오염 확인 시 격리/폐기, 원인추적 및 CAPA
4. 수확(Harvest)	수확 시점(배양일/세포상태), 수확량, 탁도/입자, 세포잔사 수준(전처	수확 시점 표준화 및 후속 정제부하 관리	수확 시 매 배치	탁도, 현미경, 전처리 전후 비교	사전 정의 범위	수확 조건 조정(시간/속도/온도), 전처리 강화

	리 전후 비교)					
5. 1차 Clarification(원심/여과)	원심 조건(g/시간/온도), 여과 압력(ΔP)/막힘, 여과 전후 탁도	세포/잔사 제거 및 공정 부담 감소	공정 중 연속 모니터링	압력계, 탁도계	ΔP 내부 기준 / 탁도 감소 목표값	유량/압력 조정, 필터 교체, 일시 정지 후 재개
6. 농축(예: UF/TFF)	유량, 압력(TMP), 막 무결성/누설, 농축배수, 회수율	농축 효율 및 EV 손실·손상 최소화	공정 중 연속 + 종료 시	유량/압력 모니터링, 무결성 점검	TMP 내부 기준 / 회수율 ≥ 사전 정의값	조건 조정, 막 교체, 회수율 저하 원인분석(흡착/막 오염)
7. 정제(예: 크로마토그래피 등)	컬럼/레진 상태, 유량/압력, 분획 기준(UV/전도도 등), EV 지표(필요시)	불순물 제거 및 분획 재현성 확보	런 중 연속 + 분획 시	UV/전도도, 분획 분석(단백/입자 등)	압력/유량 내부 기준 / 분획 기준선 사전 정의	재분획/재정제, 파라미터 재설정
8. 버퍼교환/제형화 전	pH, 전도도, 삼투압, 단백/입자 농도(정규화 지표), 잔류 불순물(예: DNA/단백질)	제형화 적합성 및 배치 간 정규화	단계 종료 시	pH/전도도/삼투압 측정, 단백정량, NTA 등	pH/삼투압 내부 기준 / 입자농도 목표 ± 허용오차	농도/조성 조정(희석/농축), 추가 정제 고려
9. 멸균여과(해당 시)	여과 유량/압력, 필터 무결성(Integrity)	무균성 확보 및 공정 중 오염 관리	여과 중 + 여과 전/후	압력 모니터링, 무결성 시험	무결성 시험 '적합'	부적합 시 필터/공정 재실시, 원인분석
10. 공정 중 미생물 관리	무균시험/미생물 한도(적용 시), 환경모니터링 결과	공정 오염 위험 최소화	핵심 단계(여과 전후/충전 전 등)	공정서 시험 + 환경모니터링	불검출 또는 기준 적합	격리/재시험/배치 처리, 환경개선(CAPA)

11. 엔도톡신(중간체/완제품)	엔도톡신	환자 안전성과 직결, 공정 오염 감시	농축 후/충전 전 등	적용 시험법(겔화/비탁/비색)	투여경로 등 고려 내부 기준 설정	기준 초과 시 원료/수계/장비 원인분석, 재정제 또는 배치처리
12. 충전/보관(중간체 포함)	보관 온도/시간, 동결·해동 조건, 외관(성상), 핵심 지표 변화(필요시)	품질 변화(분해/응집) 방지	보관 중 로그 + 사용 전 확인	온도기록, 외관 확인, 필요 시 재시험	온도/시간 사전 정의 / 외관 '적합'	일탈 시 사용중지, 영향평가, 안정성/동등성 검토

* 예시값은 '참고' 수준이며, 실제 허용기준은 배양시스템(플라스크/바이오리액터), 세포원, 분리·정제법, 제형 및 목표 적응증에 따라 달라질 수 있습니다.

2.4 세포외소포치료제 품질

2.4.1 세포외소포치료제 특성평가(characterization)

세포외소포는 크기 분포가 넓고 분자적 이질성이 크며, 세포외소포를 식별하기 위한 표준화된 방법이 충분히 확립되어 있지 않아 특성평가가 어렵다. 따라서 단일 측정법만으로 세포외소포의 특성을 포괄적으로 평가하기는 어려우며, 상호보완적인 여러 분석법을 함께 적용하는 것이 권장된다.

2.4.1.1 세포외소포 수 및 크기 확인

세포외소포의 수의 확인은 제품의 용량을 확인할 수 있는 가장 직접적인 시험으로 다른 의약품의 함량시험과 유사하다. 용기에 충전된 세포외소포 수는 제품의 '원료약품 및 그 분량'을 대변할 수 있어야 한다. 세포외소포 수는 나노입자 추적분석, 저항성펄스센싱법(resistive pulse sensing, RPS), 유세포분석법(flow cytometry) 등과 같은 단일입자 분석법들을 이용하여 크기 분포와 함께 분석이 가능하며, 기존의 산란광 측정 기반의 나노입자추적분석법이 세포외소포와 함께 분리된 유사한 크기의 입자를 구분할 수 없기 때문에 단백질량 등의 시험결과와 비교가 필요하다. 시험검체는 최대한 균질하게 채취하는 것이 중요하며 매 로트 시험 시 반복시험을 통하여 시험결과의 정확성을 높이는 것이 중요하다.

세포외소포의 크기 분포는 나노입자추적분석, 동적광산란법(dynamic light scattering, DLS), 저항성펄스센싱법(resistive pulse sensing, RPS), 유세포분석법(flow cytometry) 등을 이용하여 측정할 수 있으며, 각 시험법에 대한 상세한 내용은 **[2.4.2 시험법]**에 기술하였다. 단일입자분석에서는 세포외소포의 크기는 통계값(평균값, 최빈값, 중앙값 등)으로 한정하지 않고 직경(diameter)의 분포로 나타내는 것이 바람직하다.

2.4.1.2 성상시험

세포외소포의 성상시험의 경우 외형적 특성과 형상이 잘 나타날 수 있도록 기준을 설정하여야 한다. 성상시험은 제품에 대한 기본적인 외형의 적합여부를 시험하는 것으로 육안으로 관찰한다. 주사제인 경우, 약물이 충전된 직접용기(바이알, 시린지, 백 등)를 포함하고, 해동하여 사용하는 경우에는 해동 전후의 원료(완제)의약품의 색, 형상 등을 포함하여야 한다.

세포외소포의 형태는 주로 고해상도 이미징 기술을 통해 평가되며, 이는 주사 전자현미경(SEM), 투과 전자현미경(TEM), 크라이오-EM, 원자력 현미경(AFM)을 포함한다. 빛의 회절 한계보다 큰 소포(직경 약 200nm 이상)는 일반 광학 현미경으로 평가할 수 있지만, 이미지 품질이 다를 수 있다. 예를 들어, 건조 상태에서 세포외소포는 수분이 있는 상태에서 나타나지 않는 인공적인 컵 모양을 보일 수 있다. 이미징 기술은 입자 수준에서 세포외소포의 순도를 평가할 수 있지만, 측정기구에 대한 편향 및 낮은 정보 처리량이라는 한계점이 있다.

2.4.1.3 단백질 분석

세포외소포의 일관된 특성을 가짐을 보여주기 위하여 단백질, RNA, 지질의 조성 및 양에 대한 프로파일 분석이 필요하다. 단백질, RNA, 지질의 양은 입자수 대비 단백질, RNA, 지질 등과 같은 비율로 총 양과 함께 분석할 필요가 있다. 이를 위해 최신 기술(예. LC-MS/MS)을 이용하여 최대한 많은 수의 단백질, RNA, 지질 등을 분석하는 것이 필요하다. 또한 개발자들은 세포외소포 데이터베이스를 통하여 분리한 세포외소포에서 확인된 단백질과 다른 세포외소포에서 확인된 단백질을 비교하는 것이 필요하다. 세포외소포 마커로서는 CD9, CD63, CD81과 같은 테트라스패닌, Tsg101 및 Alix의

후기 엔도솜 관련 인자 등이 알려져 있으나, 현재까지 세포외소포 마커로 특징 지어진 것은 없으므로 목적에 맞는 마커 분자를 복수 조합하여 분석하는 것이 중요하다.

표 3은 세포외소포에서 발현할 수 있는 단백질을 분류한 것이다. Category 1과 category 2는 세포외소포의 특징을 나타내는 단백질 분류이며, category 3은 일반적인 오염물(contaminants)로부터 세포외소포의 순도를 평가할 수 있는 단백질마커이다. Category 4와 category 5는 각각 세포외소포의 세포 내 기원 또는 공동 분리 단백질에 대한 추가 정보를 제공할 수 있는 마커이다. Category 1,2,3에 포함된 단백질 중 각각의 범주에서 적어도 하나의 단백질은 세포외소포 표지로 분석될 수 있다. Category 4의 단백질 분석은 선택 사항이 될 수 있으며, category 5의 단백질을 세포외소포 방출 후 세포외소포에 결합할 수 있는 최근에 설명된 세포외소포 코로나 단백질의 일부일 수 있다. 이상적으로, 세포외소포 특성분석에서 단백질마커의 농축 또는 감소가 분획되지 않은(unfractionated) 원본 재료와 비교하여 보고되어야 한다. 표 3은 포유류 세포 유래 세포외소포에서 일반적으로 발견되는 단백질의 예를 일부만 들었으며, 기술한 예시 단백질 외 다른 단백질도 동등하게 유효하게 분석될 수 있다.

표 3. EV 내 발현 단백질마커 분류 (출처: MISEV2023)

Category				
1	2	3	4	5
Transmembrane (or GPI-anchored) proteins associated with plasma membrane and/or endosomes	Cytosolic proteins in EVs	Major components of non-EV co-isolated structures	Transmembrane, lipid-bound and soluble proteins associated with intracellular compartments other than endosomes	Secreted proteins recovered with EVs
1a: multi-pass transmembrane proteins Examples: Tetraspanins (CD9, CD63, CD81, CD82); Other multi-pass membrane proteins (CD47, heterotrimeric G proteins)	2a: with lipid or membrane protein-binding ability Examples: ESCRT-I/II/III and accessory proteins; ALIX (PDCD6IP), VPS4A/B; Flotillins; caveolins	3a: lipoproteins produced mostly by liver, abundant in plasma, serum Example: Apolipoproteins	4a: nucleus Examples: Histones (HIST1H); Lamin A/C (LMNA/C)	5a: blood-derived corona proteins Examples: Apolipoproteins; Fibrinogen
1b: single-pass transmembrane proteins Examples: MHC class I or II, integrins (ITGA/ITGB), transferrin receptor (TFR2), LAMP1/2; Heparan sulphate proteoglycans including syndecans; EMMPRIN (BSG); ADAM10	2b: promiscuous incorporation into EVs Examples: Heat shock proteins (HSP70, HSP84); Cytoskeleton; Actin, tubulin;	3b: protein and protein/nucleic acid aggregates Examples: Immunoglobulins; Tamm-Horsfall protein (Uromodulin); Albumin;	4b: mitochondria Examples: VDAC, cytochrome C (CYC1); TOMM20	5b: cytokines and growth factors Examples: TGFB1/2; IFNG, VEGFA, FGF1/2, PDGF*, EGF, interleukin
1c: GPI or lipid anchored proteins Examples: Glypicans (GPC1); 5'nucleotidase CD73; Complement-binding protein CD59;		3c: exomere or supermere-enriched components Examples: HSP90AA/B; TGFBI; HSPA13; LDHA/B	4c: secretory pathway Examples: Golgi apparatus (calnexin, HSP90B1, HSPA5, GOLGA2);	5c: adhesion and extracellular matrix proteins Examples: Fibronectin (FN1); Collagens; Galectin3-binding protein; CD5L; Fetuin-A;
			4d: others Examples: Autophagosomes; Cytoskeleton; LC3; Actinin1/4;	

2.4.1.4 총 지질, RNA 정량화

세포외소포 샘플의 총 지질 정량화는 여러 가지 방법으로 수행할 수 있다. 지질 정량화를 위한 방법으로 색도 분석(colorimetric assays), 막 삽입 염료의 형광(fluorescence of membrane intercalating dyes), 전반사 푸리에 변환 적외선 분광법(total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR), 또는 크로마토그래피(chromatography)를 활용하는 것이 대표적이다. 이러한 시험 방법들 중 삽입 염료 방법과 FTIR은 적은 양의 세포외소포에 대해 충분히 민감하지 않을 수 있으며, 전문화된 장비가 필요하다. 총 지질 측정을 수행하는 과정에서 지단백질(lipoproteins)과 같은 공동 분리된 비-세포외소포 입자(Non-vesicular extracellular particles, NVEPs)로 인해 세포외소포를 과대평가할 수 있는 가능성에 대한 고려가 필요하다.

RNA의 경우 세포외소포를 분석 및 연구하는데 대표적인 분자로, 세포외소포의 기본적인 특성화는 프로파일링 및 기능 연구의 품질 관리 구성 요소 또는 정규화 요소로 총 RNA 정량화를 포함할 수 있다. 모세관 전기영동 및 기타 방법으로 총 세포외소포 RNA를 정량화 할 수 있으나, 세포외소포 농도를 나타내기 위해 총 RNA를 대리 변수로 사용하는 것은 세포외소포 물질에 매우 많은 양의 비-세포외소포 RNA가 존재하기 때문에 권장되지는 않는다.

2.4.2 완제의약품 품질관리(Quality Control) 항목^{5,6,7,8,9}

2.4.1에서 제시한 세포외소포의 특성평가(특성화)는 개발단계에서 제품의 동일성/특성 및 공정 일관성을 확인하기 위한 것으로, 모든 특성평가 시험이 로트 방출을 위한 품질관리(QC) 시험으로 직접 적용되는 것은 아니다. 로트 방출 또는 규격시험(QC)으로 채택할 항목은 제품 특성 및 위험도 평가에 근거하여 선정하며, 각 항목에

대해 시험 시점(완제 및/또는 공정중), 시험법(적격성/밸리데이션 수준 포함), 허용기준 및 기준 설정 근거를 함께 제시한다. 또한 완제의 제형 및 투여경로에 따라 무균시험, 미생물한도시험, 엔도톡신 시험 등 미생물학적 품질관리 항목과, 입자성 이물, pH/삼투압(해당 시), 충전량(fill volume)/함량(또는 함량에 준하는 지표), 용기밀봉무결성(CCI) 등 제형 적합성(사용 적합성) 관련 항목을 적절히 포함한다.

2.4.2.1 무균시험(Sterility Test)

세포외소포치료제의 제형 또는 투여경로 특성상 무균성이 요구되는 경우(예: 주사제, 안과/관절강 등 고위험 국소 투여)에는 완제(DP)에 대해 무균시험을 품질관리항목으로 설정한다. 무균시험 적용 여부 및 시험시점(완제/공정중)은 제품 특성 및 위험도 평가에 근거하여 결정하며, 필요 시 무균보증은 무균시험 단독 결과로 확보되기보다는, 밸리데이션된 멸균 또는 무균제조(무균공정)와 적절한 공정관리로 확보된다는 점을 고려하여 공정 중 관리(예: 멸균여과(sterile filtration) 조건, 필터 무결성 시험) 및 환경모니터링과 연계한 무균보증 전략을 수립한다.

2.4.2.2 미생물한도시험(Microbial Limits Test)

제형 또는 투여경로 특성상 무균제형이 아닌 경우(예: 일부 국소, 경구 등)에는 환자 안전성 확보를 위해 미생물한도시험을 품질관리항목으로 설정할 수 있다. 미생물한도시험은 제품의 사용 조건(보존제 사용 여부, 사용기간, 포장 형태 등)과 투여경로의 위험도를 고려하여 적용하며, 필요 시 특정 미생물 시험 등 추가 항목을 포함한다.

2.4.2.3 엔도톡신(발열성 물질) 시험(Endotoxin Test)

주사/체강/고위험 국소 투여 등 환자 위해도가 높은 경우에는 엔도톡신 시험을 주요 품질관리항목으로 포함한다. 허용기준은 투여경로, 투여량 및 환자군을 고려하여 설정하며,

공정 중 오염원(원료, 수계, 장비 등)에 대한 관리전략과 함께 제시한다. 또한 투여경로 특성(예: 안과용, 중추신경계 관련 경로 등)에 따라 추가 고려사항이 필요할 수 있음을 함께 기술한다.

2.4.2.4 제형·투여경로 적합성 관련 품질관리항목

세포외소포의 특성평가 항목 외에도, 완제의 제형 및 투여경로에 따라 환자 안전성 및 사용 적합성에 영향을 미치는 품질특성(quality attributes)을 선정하여 품질관리항목에 포함한다. 이때 제형 및 투여경로 특성을 고려하여 pH 및 삼투압(해당 시), 입자성 이물(가시/비가시) 및 탁도(해당 시), 충전량(fill volume) 및 함량/역가(assay/potency) 또는 이를 대체·보완할 수 있는 정량 지표(예: 입자수, 특정 마커 정량 등), 용기밀봉무결성(CCI), 보존제 함량 및 보존제 효력(보존제 사용 시), 안정성(보관조건/동결-해동 포함) 및 운송조건(해당 시) 등을 필요에 따라 포함할 수 있다.

각 항목에 대해서는 시험시점(공정중/중간체/완제), 허용기준 및 기준 설정 근거를 함께 제시한다.

2.5.2 시험법

2.5.2.1 나노입자추적분석(Nanoparticle Tracking Analysis)

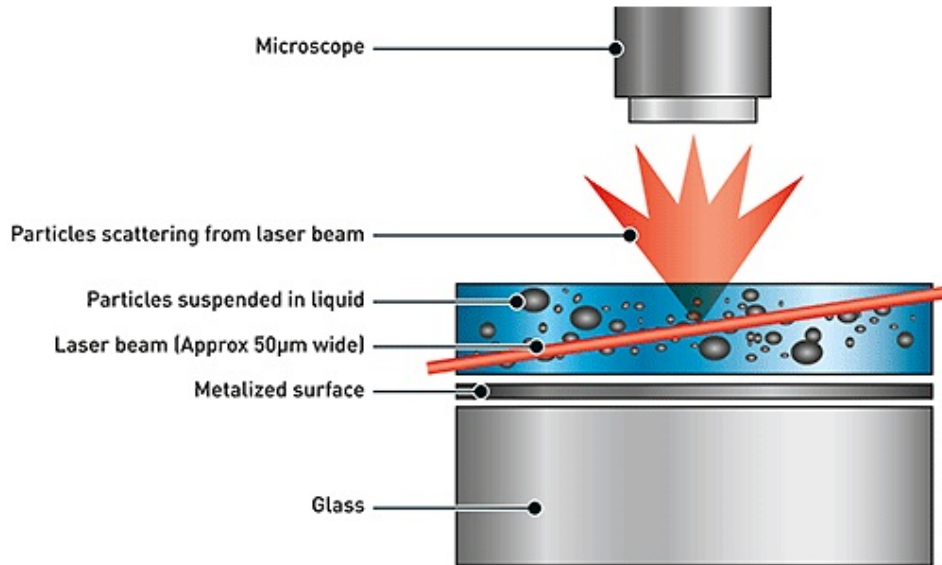


그림 1. 나노입자추적분석 모식도

[출처: <https://exosome-rna.com/nanoparticle-tracking-analysis-nta-measurements/>]

NTA(Nanoparticle Tracking Analysis, 나노입자 추적 분석)는 세포외소포 개발 분야에서 입자 크기와 농도를 추정하는데 널리 사용되는 광학 기술이다. 이 기술은 입자의 확산 계수를 측정하여 수화 직경을 추출하며, 일부 알고리즘은 단일 분산 혼합물을 더 잘 표현하도록 설계되었으나, 세포외소포처럼 다분산 분포를 가진 경우에는 부정확한 결과를 초래할 수 있다. NTA는 다양한 입자들과 대형 단백질 복합체를 포함할 수 있는 복잡한 생체 유체의 측정 시 주의가 필요하다. NTA 보고 시에는 기기 모델, 카메라 유형, 설정, 레이저 파장 및 출력, 소프트웨어 버전, 분석 설정 등을 포함하여 기록해야 하며, 알고리즘의 차이에 따른 결과 변동 가능성을 명시해야 한다. 형광 NTA를 사용하는 경우, 형광 모드와 빛 산란 모드에서의 입자 수, 라벨 제거 방법 등을 보고하는 것이 중요하다.

2.5.2.2 동적광산란법(Dynamic Light Scattering)

DLS (Dynamic Light Scattering, 동적광산란), 일명 PCS (Photon Correlation Spectroscopy, 광자 상관 분광법) 및 QELS (Quasi-Elastic Light Scattering, 준탄성 광산란)는 수용성 분산액에 있는 충분히 단일 분산된 입자의 수화 직경을 측정하는 기술이다. 이 기술은 용액 내 여러 입자에 의해 산란된 레이저 빛의 강도 자기상관 함수를 측정하여 입자의 확산 계수를 추출하고, 이를 통해 수화 직경을 구한다. 그러나 DLS는 다분산 크기 분포를 가진 세포외소포 샘플의 경우 정확한 평균 수화 직경을 결정하는 데 한계가 있다. DLS는 특히 단일 분산된 세포외소포 샘플에 대해서만 신뢰할 수 있는 데이터를 제공하며, 세포외소포 샘플에 있는 마이크로미터 이하의 입자와 잠재적 집합체의 존재를 확인하는 데 유용하다. DLS 측정 시 ISO 22412:2017 국제 표준에 따른 명명법과 보고 권장 사항을 따라야 한다.

2.5.2.3 유세포분석법(Flow Cytometry)

유세포분석법의 경우 세포외소포의 수 및 크기를 동시에 측정할 수 있는 시험법으로 주로 비드 기반 유세포분석법과 단일 세포외소포 유세포분석법을 사용할 수 있다. 먼저 비드(Bead) 기반 유세포분석은 특징적으로 세포외소포의 표면 단백질을 분석하는 데에도 주로 사용되며, 비드에 결합된 입자는 형광 결합 친화 시약(또는 여러 개의 혼합물)으로 라벨링하여 검출하게 된다. 신호 강도의 차이는 입자 농도, 에피토프(Epitope) 밀도, 직경 분포 또는 세포외소포 하위 집합의 상대적 풍부도 차이에 기인하게 된다. 데이터 및 단일 세포외소포 유세포 분석과 마찬가지로 단일 결합 비드에서의 형광분자당 등가체(Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome, MESF)로 형광 강도 통계를 나타낸다. 시험법

의 표준화를 위하여 비드를 직접 준비하는 경우 시약 및 결합 화학을 보고해야 하며, 상업용 포획 비드 시약의 경우 카탈로그 및 로트 번호를 보고해야 한다. 본 시험법을 통하여 제출해야 하는 추가 정보로는 총 비드 수, 샘플-비드 인큐베이션 시간, 인큐베이션 후 세척 방법, 검출 시약 염색 시간 및 염색 후 세척 방법이 포함되어야 한다. 단일 세포 외세포 유세포분석법의 경우 특징적으로 일반적인 유세포 분석기가 약 100 nm의 세포를 검출이 가능하다면, 약 40 nm의 세포를 측정할 수 있다는 장점이 있다. 단일 세포외 세포 유세포분석법을 통한 40 nm의 세포 데이터를 통해 입자 직경, 에피토프 풍부도, 에피토프 밀도, 유효 굴절률 및 표준화된 크기 범위 내의 입자 농도 특성을 확인할 수 있다. 단일 세포외세포 유세포 분석 결과의 해석을 위해서는 형광 및 광산란 매개 변수의 보정이 중요하며, 단일 세포외세포 유세포 분석을 사용하여 입자 농도를 보고하는 경우, 데이터의 복제 및 해석을 위해 상한 및 하한 검출 한계를 정의해야 한다.

2.5.2.4 저항성펄스센싱법(Resistive Pulse Sensing)

저항성펄스센싱법의 경우에도 마찬가지로 세포외세포의 수 및 크기를 측정할 수 있는 시험법으로, 입자의 농도와 직경을 결정하기 위해 Coulter 원리를 사용하는 비광학 기술이다. 현재 저항성펄스센싱의 구현에는 미세유체 카트리지 형식의 사전 보정된 고정 포어(pore)와 보정되지 않은 신축성 포어가 포함되며, 둘 다 직경이 약 50 nm까지 측정할 수 있다. 저항성펄스센싱법을 사용하여 복잡한 생체액에서 세포외세포의 직경 분포와 농도를 측정하는 것에 대한 해석을 주의해야 하는데 이러한 이유로 해당 시험법을 통하여 지질단백질과 큰 단백질 복합체와 같은 공동 분리체도

계산되기 때문이며 이러한 것을 세포외소포와 구별할 수 없기 때문이다. 따라서 저항성펄스센싱 결과 데이터를 보고할 때는 기기 모델, 포어 크기, 보정 비드 직경 및 출처, 소프트웨어 버전을 보고하는 것이 권장되며, 신축성 포어의 경우, 적용된 전압, 적용된 신축 및 설정을 최적화하는 절차를 공유해야 한다. 미세유체를 활용하는 경우, 물의 표면 장력을 낮추기 위한 적절한 희석 버퍼를 고려하고 보고해야 한다. 저항성펄스센싱 기술은 큰 입자에 의해 쉽게 막힐 수 있으므로 원심 분리 또는 여과와 같은 전처리 단계를 사용하여 큰 입자를 제거하는 과정이 필요할 수 있는데, 이러한 전처리의 결과로 분석 중인 세포외소포 집단을 변경하고 이로 인한 데이터 결과에 영향을 미칠 수 있으므로, 모든 전처리 절차를 명확히 명시해야 한다.

3. 세포외소포치료제의 비임상 고려사항

3.1 생물모델

세포외소포의 *in vivo* 분석은 세포외소포 방출, 분포, 약동학 및 기능에 대한 생체 내 기전에 대하여 밝힐 수 있고, 질병의 여러 측면을 재현하는 다양한 종의 생물모델에서 수행될 수 있다. 유전자 조작이 비교적 용이한 무척추동물 및 척추동물 모델은 세포외소포 라벨링을 사용하여 *in vivo* 세포외소포 분석을 할 수 있다. 아래 표 4는 EV 분석을 위한 동물 모델의 예시로, 각각의 동물모델은 세포외소포 분석에 있어서 유전자 조작 용이성과 인간 유전자와의 유사성에서 각각의 장점과 한계점을 동시에 가지고 있음을 보여준다.

표 4. *in vivo* 세포외소포 연구 사례^{10,11,12,13,14,15,16,17,18,19}

<i>In vivo</i> 모델	유래세포	유전자 조작 용이성	인간 유전자와의 유사성	장점	개발 단계별 권장 활용 목적
맥주효모균 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Unicellular yeast	++++	+	<i>in vivo</i> whole organism analysis 가능	초기 탐색: EV 방출 기전 연구
녹색조류 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Flagellated unicellular algae	++++	+	Cilia biology	초기 탐색: 섬모 관련 EV 기전 연구
속씨식물 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Leaf cells	++++	+	Plant immunity	초기 탐색: 식물 유래 EV 기전 연구
선충류 <i>Caenorhabditis elegans</i>	Embryonic cells	++++	++	EV 방출 기전, <i>in vivo</i> whole organism analysis	초기 탐색: EV 방출·분포 기전
	Larval epithelial cells			EV 방출 기전, <i>in vivo</i> whole organism analysis	초기 탐색: EV 방출·분포 기전
	Ciliated sensory neurons			Cilia biology, <i>in vivo</i> whole organism analysis, 생식기능 분석(Ciliated sensory neurons)	초기 탐색: EV 방출·분포 기전
파리 <i>Drosophila melanogaster</i>	Larval wing imaginal disc	++++	++	Wnt/Hedgehog morphogen signalling	초기 탐색: 신호 전달 기전 연구
	Larval motor neuron axon terminals			Synaptic function	초기 탐색: 신호전달 기전 연구
	Larval haemocytes			Adaptive immune system	-
	Adult male secondary cells			Large MVBs: exosome subtype biogenesis, 생식기능 분석	효력평가: 용량-반응 관계 확립
	Adult muscle cells			신경변성 분석	효력평가: 신경변성 질환 모델
Zebrafish <i>Dario rerio</i>	Embryonic yolk syncytial layer	+++	+++	Transparent embryos: EV imaging in bloodstream, 표적세포에서의 EV분포	초기 탐색: 실시간 EV 추적 및 분포 확인
	Adult osteoblasts			Fracture healing	효력평가: 골절 질환 모델
	Larval and adult cardiomyocytes			심장질환 관련 분석	효력평가: 심혈관·종양 질환 모델
	Tumor cell lines			Melanoma 관련 분석	델

닭 <i>Gallus gallus domesticus</i>	Chorioallantoic membrane cells	+	+++	High-resolution live imaging of cell migration	효력평가: 종양 전이 연구
생쥐 <i>Mus musculus</i>	Endothelial cells	++	++++	Cell type-specific EVs in plasma	초기 탐색: EV 방출·분포 기전
	Red blood cells, heart			Ischemic heart	효력평가: 허혈성 심질환, 종양 질환 모델
	Mouse tumor cells			Pre-clinical metastasis	
	Human tumor xenografts			Metastasis	

3.1.1 생물모델 선택 시 고려사항

세포외소포치료제 개발을 위한 적절한 생물모델 선택은 비임상시험의 성공과 임상 전환 가능성에 중요한 영향을 미친다. 다음 기준을 종합적으로 고려하여 개발 단계별로 적합한 생물모델을 선택해야 한다.

3.1.1.1 임상적 타당성^{20,21}

생물모델은 목표 적응증의 병태생리학적 특성을 적절히 재현할 수 있어야 한다. 질병의 발병 기전, 진행 양상, 그리고 임상적 종료점(endpoint)이 인간 질환과 유사한 모델을 우선적으로 고려한다. 예를 들어, 심근경색 치료제 개발의 경우 관상동맥 결찰 모델을, 신경퇴행성 질환의 경우 유전자 조작 또는 독소 유발 모델을 활용할 수 있다.

3.1.1.2 중간 교차반응성^{22,23}

세포외소포의 표면 마커 및 내부 cargo가 표적 세포 또는 조직과 상호작용할 수 있는지를 확인해야 한다. 특히 인간 특이적 마커를 가진 세포외소포의 경우, 생물 모델에서의 생물학적 활성이 제한될 수 있으므로 인간화(humanized) 또는 인간 세포 이식 모델의 사용을 고려한다. 중간 교차반응성이 불충분한 경우, surrogate를 사용한 독성평가를 병행할 수 있다.

3.1.1.3 투여경로의 유사성²⁴

비임상시험에서 사용하는 투여경로는 임상에서 예정된 투여경로와 동일해야 한다. 생물의 해부학적 구조 및 생리학적 특성상 동일한 투여경로 적용이 어려운 경우, 약동학 및 생체분포 측면에서 유사성을 확보할 수 있는 대체 경로를 선택하고 그 타당성을 제시해야 한다. 예를 들어, 척수강내 투여의 경우 설치류보다 대동물 모델이 기술적으로 적합할 수 있다.

3.2 비임상시험을 위한 투여량 및 투여경로 설정 시 고려사항

세포외소포 기반 치료제의 비임상시험에서 투여량 및 투여경로는 후보물질의 약리작용과 안전성 평가 결과 해석에 직접적인 영향을 미친다. 세포외소포는 생물유래 입자성 제제로서 크기 분포, 분자적 이질성, 불순물(비세포외소포 성분) 혼입 가능성 등이 존재하므로, 일반적인 저분자/단백질 의약품과 동일한 방식으로 투여량 단위를 단순 적용하기 어렵다. 따라서 비임상시험 설계 시에는 (1) 투여량 단위(용량 지표)의 정의 및 정규화, (2) 목표 적응증·표적조직과 연계된 투여경로의 타당성, (3) 분포·잔류·제거 특성 및 반복투여 시 반응, (4) 면역·염증 반응 및 입자성 특성(응집 등)에 따른 위험요인을 종합적으로 고려하여 투여전략을 수립하는 것이 바람직하다.

3.2.1 투여량 단위(용량 지표) 설정 및 정규화

세포외소포 제제의 투여량은 개발 단계 및 제품 특성에 따라 입자수(농도), 단백질량, 특정 마커 정량값, 또는 효력(활성)에 기반한 지표 등 다양한 방식으로 정의될 수 있다. 이때 단백질량이나 총 RNA/지질 등은 비세포외소포 성분의 영향을 받을 수 있어 EV의 "양"을 직접적으로 반영하지 않을 수 있으므로, 선택한 용량 지표가 무엇을 대표하는지(예: '입자수=함량에 준하는 지표')를 명확히 하고, 배치 간 비교를 위해 일관된 정규화 기준(예: 동일한 기준 지표로 투여량 설정, 보조 지표로 순도/오염 정도 확인)을 함께 제시할 필요가 있다. 또한 용량 지표는 공정변경/스케일 변경 시 변동 가능성이 있으므로, 특성평가 자료와 연계하여 측정의 재현성, 허용 가능한 변동 범위 및 결과 해석의 한계를 기술하는 것이 바람직하다.

3.2.2 투여경로 선정의 원칙: 표적조직·작용기전·제형과의 연계

투여경로는 목표 적응증, 표적조직 도달성, 작용기전 및 제형 특성에 근거하여 선정한다. 전신 투여 경로는 표적조직 접근성이 넓으나, 세포외소포의 생체 내 분포·제거 특성(예: 특정 장기에서의

포획/제거 가능성 등)에 의해 유효농도 도달이 제한될 수 있으므로, 적응증 및 기대 작용 부위에 대한 타당성을 설명할 필요가 있다. 국소 투여 경로는 목표 조직에 대한 직접 전달이 가능하나, 국소 잔류 및 확산, 조직 반응(염증/자극)과 같은 내약성 평가가 중요하다. 점막 또는 호흡기 등 특수 경로의 경우에는 투여 부위의 환경(점액, 효소, 물리적 제거 등)에 따른 제제 안정성 변화 가능성과 전달 효율을 함께 고려한다. 최종적으로, 투여경로 선택 근거는 비임상 유효성(또는 PoC), 기전 확인, 안전성 보강 등 개발 목적과 연계하여 단계적으로 제시하는 것이 바람직하다.

3.2.3 분포·잔류·제거 및 반복투여 시 반응 평가

세포외소포는 입자성 특성으로 인해 생체 내 분포와 제거 양상이 일반 약물과 다를 수 있으며, 반복투여 시에는 축적 가능성 또는 면역·염증 반응이 결과에 영향을 줄 수 있다. 따라서 투여경로 및 개발 목적에 따라 분포·잔류·제거 특성을 확인할 수 있는 평가(정성/정량적 접근 포함)를 설계하고, 단회 투여와 반복 투여에서의 반응 차이를 비교·해석할 수 있도록 계획하는 것이 바람직하다. 특히 치료효과의 지속성 평가가 필요한 경우에는 투여 후 관찰기간 설정, 반복투여 간격의 합리적 근거 제시, 투여 중·후의 생체반응(염증성 지표 변화 등) 관찰을 포함할 수 있다.

3.2.4 세포외소포 제제 특이 위험요인(면역·염증, 응집/입자성 특성, 불순물) 고려

세포외소포 제제는 원료세포 및 제조공정에 따라 표면 성분 및 동반 물질이 달라질 수 있으며, 이로 인해 면역·염증 반응, 보체 활성화 등 생체반응이 유발될 가능성이 있다. 또한 제형화 및 보관 과정에서 응집 또는 크기 분포 변화가 발생할 수 있어, 투여경로에 따라 안전성(예: 입자성 영향, 국소 자극 등)에 대한 고려가 필요하다. 아울러 비세포외소포 성분(불순물) 혼입은 유효성/안전성 해석의 혼선을 초래할 수 있으므로, 특성평가 결과(순도 지표 등)와 연계하여 투여물질의 품질 상태를 명확히 하고, 주요 불순물 관리전

락과 비임상 결과 해석 시 고려사항을 함께 기술하는 것이 바람직하다.

3.2.5 개발 단계별(목적별) 접근

초기 단계에서는 후보 세포외소포 제제의 PoC(유효성) 확인을 우선하고, 이후 단계에서 기전 확인 및 안전성 보강(반복투여, 국소내약성, 면역반응 등)을 강화하는 단계적 접근이 권장된다. 이때 동일한 투여경로라도 개발 목적에 따라 평가항목(예: 효능 지표, 분포 확인, 염증성 반응 관찰 등)과 관찰기간, 시험설계의 중점이 달라질 수 있으므로, 목적에 부합하도록 시험모델과 평가항목을 구성한다.

3.3 독성시험^{25,26,27,28,29,30}

세포외소포치료제의 비임상 안전성 평가는 일반 의약품과 동일하게 단회·반복투여 독성시험을 기본으로 하되, 세포외소포 제제의 입자성 특성, 생체분포 및 잔류, 제조공정 유래 불순물(비세포외소포 성분 포함), 면역·염증 반응 가능성 등을 고려하여 위험도 기반(risk-based)으로 시험 범위 및 평가항목을 설정하는 것이 바람직하다. 또한 최종 제형 및 투여경로에 따라 국소내약성 등 투여경로 특이 안전성 평가를 병행할 수 있으며, 유전독성·발암성·생식발생독성 등 추가 독성시험의 필요성은 제품 특성(구성 성분, 잔류물질, 투여기간/대상환자군 등)과 기존 자료의 충분성에 근거하여 사례별로 판단한다.

3.3.1 단회/반복 투여 독성시험

세포외소포(EV) 치료제의 비임상 독성평가는 계획된 임상 사용(예: 투여경로, 투여요법, 치료기간)을 지지할 수 있도록 단회투여 및 반복투여 독성시험을 적절히 수행하는 것이 바람직하다. 필요한 경우, 독성시험에서 사용할 용량 설정 및 독성의 용량-반응 특성 파악을 위해 용량범위 탐색(dose-ranging) 또는 단계적 용량평가(dose-escalation)를 실시할 수 있다. 다만 일반독성시험의 주된 목적은 표적장기(target organ) 및 독성 프로파일을 규명하고, 임상시

험의 안전한 수행을 지원하기 위한 근거(NOAE 등)를 확보하는 것이며, 단순한 용량증량 자체가 목적이 아님을 고려한다. 독성시험을 위한 동물종은 임상시험용 의약품이 인체에서 유발할 것으로 예상되는 유사한 생물학적 반응을 나타낼 수 있어서 임상시험 설계 시 참고할 수 있는 근거가 될 수 있는 적절한 관련 동물 모델이어야 하며, 한 가지 동물 종에서 평가될 가능성도 있지만, 다른 영향 인자들(예, 유전자치료제의 특성, 임상투여경로)의 안전성 평가를 위해 한 가지 이상의 종에서 평가할 필요가 있을 수 있다. 독성시험 결과에서 면역계의 이상이 의심될 경우 면역독성 시험을 추가로 수행하여야 한다.

3.3.2 유전독성시험

세포외소포는 단백질, 지질, 핵산 등 다양한 물질을 함유하고 있어 유전물질 또는 염색체에 이상을 유발할 가능성이 있다. 세포외소포 함유 물질에 대한 프로파일 분석 등이 유전독성을 예측하는데 도움이 될 수 있으며, 세포외소포의 특성을 고려하여 '의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전처, 2015)'³¹에 따라 유전독성시험을 수행한다.

3.3.3 종양원성시험/발암성시험

세포치료제 및 세포외소포치료제의 장기 안전성 평가는 제품 특성 및 임상 적용(투여기간, 대상 환자군 등)을 고려한 위험도 기반 접근이 필요하다. 일반적으로 이러한 제품에서는 전통적인 저분자 의약품에서 수행하는 장기간 발암성 시험이 항상 요구되는 것은 아니며, 제품의 특성(예: 세포/조직 유래, 공정 유래 성분, 공학적 변형 여부, 장기 잔류 가능성 등)과 이용 가능한 비임상·임상 자료를 종합하여 종양원성(종양형성 가능성) 평가의 필요성을 우선적으로 검토할 수 있다.

따라서 제품 특성에 따라 종양원성 시험을 실시할 수 있으며, 종양 원성/발암성 관련 우려가 제기되는 경우에는 발암성 평가의 필요성 및 수행 범위를 추가적으로 검토하고, 수행 여부 및 설계에 대한 과학적 근거를 명확히 제시하는 것이 바람직하다.

3.3.4 면역독성시험

일반적으로 세포외세포의 면역원성 유발가능성을 배제할 수 없으므로 면역원성시험이 요구된다. 단백질의 이상 발현은 면역계의 부적절한 활성을 유발하여 염증반응, 자가면역반응 등 이상반응을 유발할 수 있으므로 세포외세포가 가지고 있는 여러 단백질의 과발현 여부를 고려하여야 한다.³² 또한, 유전자 조작된 세포에서 세포외세포를 생산한다면 이에 따른 면역원성에 대한 영향이 고려되어야 한다.

3.3.5 생식발생독성 등 기타 독성시험의 범위 설정

가임기 대상, 임신·수유 관련 적응증, 또는 생식계·발생에 영향을 줄 수 있는 가능성이 있는 경우에는 생식발생독성 평가의 필요성을 검토한다. 그 외 광범위 장기투여가 예상되거나 특정 장기 위험이 우려되는 경우에는 제품 위험도에 따라 추가 독성시험 또는 보완 평가를 고려한다.

3.3.6 국소내약성(투여부위 안전성) 및 투여경로 특이 독성

국소 또는 고위험 경로(예: 안과, 관절강 등)로 투여되는 경우에는 투여부위 자극/염증, 조직 손상, 기능적 영향 등 국소내약성 평가를 포함하여 투여경로 특이 안전성을 확인한다. 또한 제형 특성(점도, 삼투압, pH 등) 및 입자성 특성이 국소 반응에 미치는 영향을 함께 고려한다.

3.3.7 시험물질 특성 및 품질 정보의 연계

독성시험 해석의 신뢰성을 위해 시험에 사용된 물질의 품질 상태(핵심 특성, 순도/불순물 지표, 응집 여부 등)를 특성평가 및 품질관리 정보와 연계하여 제시하고, 배치 간 변동이 안전성 결과에 미칠 수 있는 영향을 함께 고려한다.

3.4 약리작용 자료

3.4.1 효력시험

세포외세포치료제의 효력을 평가하기 위해서는 사용목적에 적절한 동물종에서 용량상승시험이 수행되어야 하며 독성평가를 병행할 수도 있다.

세포외세포치료제 특이적인 활성을 입증하기 위해 적절한 대조군을 포함한 비교 시험이 권장된다. 배양 배지 성분에 존재하는 세포외세포 또는 세포외세포 이외 비특이적 활동을 평가할 수 있는 적절한 음성대조군 설정이 특히 중요하다. 음성대조군으로서 배양 배지, 비자극세포분리 세포외세포, 세포외세포가 제거된 시료 등을 고려할 수 있다. 세포 엔지니어링을 통해 생산된 세포외세포에서는 조작되지 않은 세포 또는 관련 없는 성분으로 엔지니어링된 세포에서 유래한 세포외세포를 음성대조군으로 고려할 수 있다.

마지막으로, 효력시험을 통해 세포외세포 분리 및 농축, 저장 및 제형화 요인의 영향을 분석하여 세포외세포의 활성을 극대화하는 것을 목표로하여야 한다. 현실적으로, 모든 대조군이 하나의 특정한 시스템에서 동시에 연구될 수 없으므로 효능 분석(potency analysis)를 개발하여 비임상 및 임상 연구를 위한 유익한 대조군을 식별할 수 있다.³³

3.4.2 생체 내 분포

세포외소포의 생체 내 분포는 치료적 유효성과 함께 비표적부위의 독성에도 영향을 미칠 수 있다. 따라서 혈중 농도, 조직 분포 등을 포함한 생체내 흡수, 분포, 지속 및 소실과 같은 약동학적 특성에 대해 자세히 이해하는 것이 임상시험 설계 시 매우 중요하다. 대부분의 세포외소포의 생체분포 연구는 염색시약이나 유전자조작(예. GFP 또는 luciferase 발현), 방사성 동위 원소 또는 나노입자로 표지된 세포외소포를 검출하는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

표 5는 세포외소포의 생체내분포 평가 시 고려할 수 있는 주요 요소를 정리한 것이다. 생체내분포 평가는 투여경로 및 제형 특성에 따라 분포 양상이 달라질 수 있으므로, 표적 장기 도달성, 비표적 장기 축적 가능성, 잔류 및 제거 특성, 반복투여 시 축적/분포 변화 등을 종합적으로 고려하여 평가 목적과 설계를 수립한다. 또한 분포 확인을 위한 표지/추적 방법을 적용하는 경우에는 표지 자체가 분포 결과 해석에 미치는 영향과 한계를 함께 고려하고, 필요 시 특성평가 및 품질정보(예: 크기분포 변화, 응집, 순도/불순물 지표 등)와 연계하여 결과를 해석하는 것이 바람직하다.

표 5. 세포외소포 기원에 따른 생체 내 분포³⁴

유래세포	Specimen	Reporter	투여경로	Biodistribution Profile
Mesenchymal stem cells	Mice with acute renal failure	DiD	i.v.	Kidneys
	Mice	DiD	i.v.	Liver, spleen, spinal marrow, femur, tibia
	Mice	DiR	i.v., i.p.	Pancreas, liver, spleen, lungs, heart, tumor
	Rats	DiO	i.v.	Carotid arteries of rats
5T33 Mouse stromal stem cells	5T33MM Mice	DiR	i.v.	Liver, spleen
C2C12, B16F10 dendritic cells (DC)	Mice	DiR	i.p., s.c., i.v.	Liver, spleen, GI tract, lungs
Breast cancer cells	Mice	DiR	i.v.	Liver, spleen, some brain
Overexpressed CD47 MSC	Mice	Dil	i.v.	Liver, spleen, pancreas
MSC from adipose tissue	BALB/c mice	DiR	Intratracheal	Lungs
MMT-060562 mice breast cancer cells, MDA-MB-231 human breast cancer cells	Nude mice	CD63 with green fluorescent protein (GFP)	In the adipose tissue of the breast	Lungs
MDA-MB-231 cancer cell line	Mice	RFP, DiD	i.v.	Axillary lymph nodes

i.v., intravenous; i.p., intraperitoneal, i.n., intranasal; i.m., intramuscular; s.c., subcutaneous; RFP, red fluorescent protein;

Types of lipophilic fluorescent stains: DiD, DiI18(5); DiR, DiI18(7); DiO, DiOC18(3); Dil, DiI18(3);

[별첨 1] 2023년 12월 개정 '세포외소포 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 [민원인 안내서]' 변경대비표

목차	개정 전(2018. 12)	개정 후(2023. 12)	변경사항
1. 적용 범위	<p>또한 세포의 물리적 파쇄에 의해 만들어지는 세포외소포 모사체(mimetics)는 세포내 소기관 유래의 소포체를 포함할 수 있고 이는 세포외소포체의 순도를 떨어뜨릴 수 있기 때문에 세포외소포치료제에 해당하지 않는다.</p>	<p>또한 세포의 물리적 파쇄에 의해 만들어지는 세포외소포 모사체(mimetics)는 세포외소포치료제의 정의에 해당하지 않는다. 다만 세포외소포 모사체 등을 이용하여 의약품으로 개발하고자 한다면 이 가이드라인을 적용할 수 있으며 제품 특성에 따라 추가적인 고려사항이 있을 수 있다.</p>	내용 추가 및 변경
2. 관련 규정	<p>유전물질이 도입된 세포를 이용하여 제조되는 세포외소포치료제는 본 가이드라인과 함께 유전자치료제의 심사기준이 적용될 수 있다.</p>	<p>유전물질이 도입된 세포를 이용하여 제조되는 세포외소포치료제는 본 가이드라인과 함께 「첨단재생의료 및 첨단바이오의약품 안전 및 지원에 관한 법률」에 따른 유전자치료제의 심사기준이 적용될 수 있다.</p>	첨단재생의료법명 추가
3. 세포외소포치료제 품질 고려사항	<p>세포외소포치료제 생산을 위해서는 다음 사항에 대하여 광범위하게 고려되어야 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 세포외소포 생산을 위한 출발물질의 특성분석 (2) 세포외소포의 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석 (3) 품질관리 	<p>세포외소포치료제 생산을 위해서는 다음 사항에 대하여 광범위하게 고려되어야 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 세포외소포 생산을 위한 출발물질의 특성분석 (2) 세포외소포의 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석 (3) 품질관리 (4) 안정성 	고려 항목 추가

<p>3.1 세포외소포치료제 생산을 위한 출발물질의 특성분석</p>	<p>세포외소포를 생산하는데 있어 다양한 공여자는 기능적으로 다른 특성을 갖는 세포외소포를 생산할 수 있기 때문에 공여자에 따른 변이를 고려하여야 한다. 마스터 세포은행을 구축하는 것이 공여자에 따른 변이를 최소화하는데 도움을 줄 수 있다.</p>	<p>세포외소포를 생산하는데 있어 다양한 공여자는 기능적으로 다른 특성을 갖는 세포외소포를 생산할 수 있기 때문에 공여자에 따른 차이를 고려하여야 한다. 세포외소포치료제의 품질을 확보하기 위해서는 적절한 제조용 세포의 분리 또는 세포주의 수립과 그 관리가 중요하며, 생산 배양기간 동안 제품 품질에 영향을 미치는 각종 특성을 적절한 범위로 유지하는 것이 중요하다. 세포외소포치료제 제조에는 사람 자가유래세포, 중간엽줄기세포 등 사람 동종유래세포, 유도만능줄기세포(iPS)/배아줄기세포(ES) 유래세포, 세포주 등이 사용된다. 이 가운데 자가유래세포를 제외하고는 '세포치료제 세포은행 평가 가이드라인'을 참고하여 그 적격성을 평가한 후 제조에 사용해야 한다.</p>	<p>내용 추가 및 변경</p>
<p>3.1 세포외소포치료제 생산을 위한 출발물질의 특성분석</p>	<p>만약, 불멸화된 클론성 세포주(immortalized clonal cell lines)에서 세포외소포를 생산한다면 유전형, 표현형과 세포외소포 생산에서 안정성이 엄격하게 시험되어야 한다.</p>	<p>만약, 불멸화된 클론성 세포주(immortalized clonal cell lines)에서 세포외소포를 생산한다면 생산 동안 유전형, 표현형의 안정성을 엄격하게 시험하여야 한다. 왜냐하면 세포주 수립 시 장기간에 걸쳐 계대배양을 반복했을 때 표현형의 안정성에 관한 정보가 없기 때문이다. 또한, iPS/ES 유래 세포 또는 불멸화된 세포주에서 유래한 세포외소포를 생산하는 경우 세포 유래 DNA 나 세포은행 중의 불순물로 혼입된 종양형성세포에서 유래한 세포외소포가 제품에 혼입되어 발생할 수 있는 종양형성을 고려해야 한다.</p>	<p>내용 추가</p>

<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>세포외소포는 주로 세포배양 상등액으로부터 분리, 정제되기 때문에 배양조건이 표준화되어야 하며 배치간 재현성이 입증되어야 한다. 세포 밀도, 계대횟수, 배가시간(doubling time), 산소 농도, pH, 배양조건(배지조성, 사이토카인, 배양용기 등) 등은 세포외소포의 양이나 품질에 큰 영향을 미칠 수 있다.</p>	<p>세포외소포는 주로 세포배양 상등액으로부터 분리, 정제되기 때문에 배양조건이 표준화되어야 하며 배치간 재현성이 입증되어야 한다. 공정 중 계대배양 시 접종 및 수확 당시 세포밀도(density/confluence), 생존율(viability), 세포성장, 계대배양 방법, 계대횟수, 배가시간(doubling time), 산소 및 이산화탄소 농도, 배양온도, 배지첨가물, 배지조성, 배양용기 등은 세포외소포의 양이나 품질에 큰 영향을 미칠 수 있다.</p>	<p>세포외소포 품질에 영향을 줄 수 있는 요인 추가</p>
<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>따라서 세포외소포 생산에서 우태아혈청을 사용하고자 한다면 소유래 바이러스가 없음을 입증하는 등 엄격하게 관리된 우태아혈청만을 사용할 것을 권장한다. 가능하면 명확히 알려진 성분 또는 사람유래 성분의 비동물유래 시약을 사용할 것을 권장한다.</p>	<p>따라서 세포외소포 생산에서 소태아혈청을 사용하고자 한다면, 소유래바이러스가 없음을 입증하는 등 엄격하게 관리된 소태아혈청만을 사용할 것을 권장한다. 가능하면 동물 유래 성분을 포함하지 않는 시약이나 재조합 단백질 사용을 권장한다.</p>	<p>권장시약 수정</p>
<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>따라서, 분리 방법에 대해 재현성, 순도, 불순물, 세포외소포의 기능적 특성과 관련하여 표준화하여야 하며 재현성을 입증하기 위하여 분리방법에 대해 상세한 기술이 필요하다.</p>	<p>따라서, 분리 방법에 대해 재현성, 순도, 불순물, 세포외소포의 기능적 특성과 관련하여 표준화하여야 하며 재현성을 입증하기 위하여 분리방법에 대해 상세한 기술이 필요하다. 특히, 정제 후에도 잔존하는 목적 세포외소포 이외 성분의 혼입에 주의하여야 한다. 주요 정제과정에서 공정 유래 불순물 및 제품 관련 불순물에 대한 지표를 정한 제조법을 확립할 필요가 있으며, 정제 전후 불순물 제거 정도의 비교를 공정중 관리항목으로 설정하는 것을 고려해야 한다. 또한 제조공정이나 보존기간 중 세포외소포의 안정성(분해 및 변화체 생성)에도 주의해야 한다.</p>	<p>내용 추가</p>

<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>또한 개발자들은 EVpedia 나 Vesiclepedia 와 같은 데이터베이스를 통하여 분리한 세포외소포에서 확인된 단백질과 다른 세포외소포에서 확인된 단백질과 비교하는 것이 필요하다.</p>	<p>또한 개발자들은 EV 데이터베이스를 통하여 분리한 세포외소포에서 확인된 단백질과 다른 세포외소포에서 확인된 단백질을 비교하는 것이 필요하다. 세포외소포 마커로서는 CD9, CD63, CD81 과 같은 테트라스패닌, Tsg101 및 Alix 의 후기 엔도솜 관련 인자 등이 알려져 있으나, 현재까지 세포외소포 마커로 특징지어진 것은 없으므로 목적에 맞는 마커 분자를 복수 조합하여 분석하는 것이 중요하다. 또한, 세포외소포 특이적 단백질 뿐만 아니라, 세포외소포와 관련없는 성분을 포함하여 적어도 3 종류는 반정량적으로 분석하는 것이 권장된다.</p>	<p>내용 추가</p>
<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>세포외소포체 및 단일 소포에 대하여 Cryo TEM 등으로 이중지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석이 필요하다. 또한 용량 증량에 따른 세포외소포의 기능적 활성화에 대한 정량적인 분석이 필요하다. 이 때 최소한의 기능적 효과를 나타낼 수 있는 대조군을 설정하는 것이 중요하다. 예를 들면, 세포가 추가되지 않은 배양배지(제조에 사용되는 것처럼 37°C에서 배양된 것)에서 얻은 mock 세포외소포가 될 수 있다. 이러한 대조군은 세포외소포의 기능적 활성화의 '배경(background)효과'에 대한 정보를 제공하며 기능적 활성화에서 차지하는 수용성 성분과 세포외소포에 부착된 성분의 비율에 대한 정보를 제공한다.</p>	<p>세포외소포에 대하여 극저온 전자현미경(cryoelectron microscope, Cryo EM)과 같은 고해상도 이미지 분석법 및 나노입자추적분석(nanoparticle tracking analysis, NTA)과 같은 단일입자분석법으로 이중지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석이 필요하다. 고해상도 이미지 분석 시에는 클로즈-업(close-up)과 광시야(wild-field)의 정보를 모두 확인하는 것이 필요하다.</p>	<p>내용 수정</p>

<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>세포외소포체 및 단일 소포에 대하여 Cryo TEM 등으로 이중지질막 구조 및 크기 분포, 세포외소포의 비율에 대한 분석이 필요하다. 또한 용량 증량에 따른 세포외소포의 기능적 활성화에 대한 정량적인 분석이 필요하다.</p>	<p>세포외소포의 생물학적 활성 분석은 작용기전을 검토하여 약리작용을 바탕으로 복수의 역가 시험을 설정하여 다면적으로 실시하는 것이 권장된다. 세포외소포의 활성성분(miRNA, mRNA, 단백질 등)의 정량 또는 활성 측정, 세포증식 및 이동, 독성, 면역세포 활성화 및 억제, 유전자 발현 조절, 신호 전달 등에 대한 평가도 고려할 수 있다. 활성값은 입자수나 단백질량으로 표준화하여 평가하는 것이 권장된다. 또한 용량 증량에 따른 세포외소포의 기능적 활성화에 대한 정량적인 분석이 필요하다.</p>	<p>내용 추가 및 변경</p>
<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>성분 프로파일 분석자료 등 특성분석자료는 제조방법, 분리방법 등 제조공정 변경 시 비교동등성을 입증할 때에도 중요하다.</p>	<p>세포외소포의 조성, 물리화학적 특성 및 생물학적 활성을 포함하는 특성분석자료는 제조방법, 분리방법 등 제조공정 변경 시 비교동등성을 입증할 때에도 중요하다.</p>	<p>내용 변경</p>

<p>3.2 세포외소포치료제 제조방법, 분리 및 정제, 특성분석</p>	<p>불순물에 대한 특성분석도 필요하다. 사용되는 물질 중 잔류물(serum albumin, 항생제 등)에 대하여 잔류물의 제거방법과 잔류물질의 농도에 대한 자료가 제출되어야 한다.</p>	<p>불순물에 대한 특성분석도 필요하다. 사용되는 물질 중 잔류물(serum albumin, 항생제 등)에 대하여 잔류물의 제거방법과 잔류물질의 농도에 대한 자료가 제출되어야 한다. 또한, 유효성분을 가진 세포외소포 뿐만 아니라 활성성분을 가지지 않은 세포외소포나 제조·보존과정에서 변화·분해된 세포외소포 변화체가 포함되어 있을 수 있어, 목적 이외의 세포외소포나 변화체를 최대한 제거하는 적절한 제조공정을 확립하여야 한다. 또한, 세포배양 및 정제농축 공정, 제제화 공정 등에서 바이러스, 미생물, 마이코플라스마, 배지성분, 시약 등이 혼입될 가능성이 있다. 따라서, 예상되는 불순물에 대한 정성·정량적 시험법 설정 및 불순물의 허용한도를 검토하여야 한다. 목적 이외의 성분 혼입을 평가하기 위한 지표로 입자의 프로파일 분석을 통한 목적 세포외소포의 비율을 평가하거나 생물학적 시험으로 역가를 측정하고 입자수 등으로 표준화하여 비교 평가하는 방법이 권장된다.</p>	<p>내용 추가</p>
--	---	---	--------------

<p>3.3.2 세포외소포 수</p>	<p>세포외소포 수는 Nanoparticle Tracking analysis(NTA) 등을 이용하여 측정할 수 있다. 세포외소포에 특이적인 마커가 없고 NTA가 세포외소포와 함께 분리된 유사한 크기의 입자를 구분할 수 없기 때문에 Transmission electron microscope(TEM), Atomic force microscopy(AFM) 또는 다른 현미경적 방법 및 단백질량 등의 시험결과와 비교가 필요하다</p>	<p>세포외소포 수는 나노입자추적분석, 저항성펄스센싱법(resistive pulse sensing, RPS), 유세포분석법(flow cytometry)등과 같은 단일입자분석법들을 이용하여 크기 분포와 함께 분석이 가능하며, 기존의 산란광 측정 기반의 나노입자추적분석법이 세포외소포와 함께 분리된 유사한 크기의 입자를 구분할 수 없기 때문에 단백질량 등의 시험결과와 비교가 필요하다.</p>	<p>세포외소포 수 측정방법 추가 및 수정</p>
<p>3.3.3 세포외소포 크기</p>	<p>세포외소포의 크기 분포는 NTA, dynamic light scattering, resistive pulse sensing, fluorescence correlation spectroscopy 등을 이용하여 측정할 수 있다. 그러나 이러한 방법으로 얻어진 자료는 세포외소포와 함께 분리된 유사한 크기의 입자를 구분할 수 없기 때문에 TEM, AFM 또는 다른 현미경적 방법으로 시험한 결과와 비교가 필요하다.</p>	<p>세포외소포의 크기 분포는 나노입자추적분석, 동적광산란법(dynamic light scattering, DLS), 저항성펄스센싱법, 유세포분석 등을 이용하여 측정할 수 있다. 단일입자분석에서는 세포외소포의 크기는 통계값(평균값, 최빈값, 중앙값 등)으로 한정하지 않고 직경(diameter)의 분포로 나타내는 것이 바람직하다.</p>	<p>세포외소포 크기 측정 방법 수정 및 내용 수정</p>
<p>3.3.5 외래성바이러스부정시험</p>	<p>외래성바이러스부정시험은 세포외소포를 분리·정제하기 전단계인 마지막 배양이 완료된 시점에서 모은 배양액과 세척하기 전의 세포를 함께 사용하는 것이 바람직하다.</p>	<p>외래성바이러스부정시험은 세포외소포를 분리·정제하기 전단계인 마지막 배양이 완료된 시점에서 모은 배양액과 세포를 함께 사용하는 것이 바람직하다. 세포외소포 정제 공정에서는 바이러스 제거가 어렵고, 농축 공정에서 바이러스도 농축될 가능성이 높기 때문에 농축 후 제품의 바이러스 시험 실시를 고려하여야 한다.</p>	<p>내용 추가</p>

<p>3.3.9 순도시험</p>	<p>① 세포질 단백질(cytosolic protein) 또는 핵단백질 세포질 단백질이나 핵단백질과 같이 세포외세포에서 농축되지 않을 것으로 기대되는 단백질(예, 핵 단백질, 미토콘드리아 마커, 골지체 마커, 면역글로불린(IgG), 지질단백질) 몇 종에 대하여 잔존량에 대한 자료를 제출하여야 한다.</p>	<p>① 세포외세포와 무관한 세포 내 단백질 핵단백질과 같이 세포외세포에서 농축되지 않을 것으로 기대되는 단백질(예, 핵, 미토콘드리아, 골지체, 소포체(endoplasmic reticulum) 등의 구성물질) 몇 종에 대하여 기준을 설정하여 관리하여야 한다.</p>	<p>단백질 예시 수정 및 내용 수정</p>
<p>3.4 세포외세포치료제 안정성</p>	<p>-</p>	<p>3.4 세포외세포치료제 안정성 세포외세포치료제의 저장조건(온도, 기간)에서 품질의 안정성을 평가하기 위하여 「의약품등의 안정성시험기준」(식약처 고시)에 따라 안정성시험을 수행하여야 한다.</p>	<p>새로운 항목 및 내용 추가</p>
<p>4. 세포외세포치료제 비임상 고려사항</p>	<p>세포외세포치료제의 비임상평가 항목은 일반적인 화학의약품의 비임상평가 항목과 원칙적으로 동일하다. 세포외세포 투여가 효력, 분포, 일반독성, 면역원성, 면역독성, 안전성약리 또는 종양원성 등에 미치는 영향을 평가하여야 한다.</p>	<p>원칙적으로 세포외세포치료제의 비임상평가는 생물의약품 비임상 평가의 기본 원칙에 따른다. 세포외세포치료제가 효력, 안전성약리, 분포, 일반독성, 유전독성, 면역원성 또는 종양원성/발암성 등에 미치는 영향을 평가하여야 한다.</p>	<p>내용 수정 (화학의약품 항목과 동일 --> 생물의약품 항목과 동일)</p>
<p>4.1.1 효력시험</p>	<p>세포외세포치료제의 효력시험을 위해서는 사용목적에 적절한 동물종에서 용량증량연구가 수행되어야 하며 독성시험을 병행할 수도 있다.</p>	<p>세포외세포치료제의 효력을 평가하기 위해서는 사용목적에 적절한 동물종에서 용량증량 연구가 수행되어야 하며 독성평가를 병행할 수도 있다. 세포외세포치료제 특이적인 활성을 입증하기 위해 적절한 대조군을 포함한 비교 시험이 권장된다. 음성대조군으로서 배양 배지, 비자극세포분리 세포외세포, 세포외세포가 제거된 시료 등을 고려할 수 있다.</p>	<p>내용 추가</p>

<p>4.1.3 흡수·분포·대사·배설시험</p>	<p>따라서 조직분포, 혈중 농도, 소변에서 제거 등을 포함한 생체내 에서 분포와 세포외세포의 자세한 생체내 운명과 약동학적 특성에 대해 자세히 이해하는 것이 향후 치료적 적용에 매우 중요하다.</p>	<p>따라서 혈중 농도, 조직 분포 등을 포함한 생체내 흡수, 분포, 지속 및 소실과 같은 약동학적 특성에 대해 자세히 이해하는 것이 임상시험 설계 시 매우 중요하다.</p>	<p>내용 수정 (치료적 적용 --> 임상시험 설계 시)</p>
<p>4.1.3 흡수·분포·대사·배설시험</p>	<p>그러나 염색이나 유전자조작, 방사선 동위원소로 표지 또는 나노입자로 표지된 세포외세포를 검출하는 방법은 민감도가 낮다는 단점이 있다</p>	<p>-</p>	<p>내용 삭제</p>
<p>4.1.3 흡수·분포·대사·배설시험</p>	<p>따라서, 세포외세포의 분포를 확인하기 위하여 형광 염색과 RNA 또는 단백질을 확인하는 PCR 또는 면역염색방법 등 두 가지 방법을 병행하여 분포시험을 수행하는 것이 적절하다.</p>	<p>이와 같은 표지방법의 단점을 고려하여 세포외세포의 분포를 확인하기 위하여 형광 염색 방법과 함께 RNA 또는 단백질을 확인하는 PCR 또는 면역염색방법 등 두 가지 방법을 병행하여 분포시험을 수행하는 것이 적절하다. 또한, 방사성 동위원소를 이용한 추가적인 방법을 고려할 수 있으며 방사선표지 효율, 순도, 안정성에 대한 자료가 결과 해석에 도움이 될 수 있다.</p>	<p>내용 추가 및 변경</p>
<p>4.2.2 유전독성</p>	<p>-</p>	<p>4.2.2 유전독성 세포외세포는 단백질, 지질, 핵산 등 다양한 물질을 함유하고 있어 유전물질 또는 염색체에 이상을 유발할 가능성이 있다. 세포외세포 함유 물질에 대한 프로파일 분석 등이 유전독성을 예측하는데 도움이 될 수 있으며, 세포외세포의 특성을 고려하여 「의약품 등의 독성시험기준」에 따라 유전독성시험을 수행한다.</p>	<p>새로운 항목 추가</p>

[별첨 2] Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2023 (MISEV2023) 개정 가이드라인 변경대비표

목차 (MISEV2023 기준)	MISEV2018	MISEV2023	비고
2 Nomenclature	ISEV endorses “extracellular vesicle” (EV) as the generic term for particles naturally released from the cell that are delimited by a lipid bilayer and cannot replicate, i.e. do not contain a functional nucleus.	The term ‘extracellular vesicles’ (EVs) refers to particles that are released from cells , are delimited by a lipid bilayer, and cannot replicate on their own (i.e., do not contain a functional nucleus).	Engineered 된 세포외소포 및 다양한 환경에서 생산된 세포외소포를 고려하기 위하여 세포외소포의 정의에서 naturally 라는 표현을 삭제
2 Nomenclature	-	<p>Table 2 Quick-reference card on EV nomenclature and related terms.</p> <p>Non-vesicular extracellular particles (NVEPs): Multimolecular assemblies that are released from cells and do not have a lipid bilayer (non-vesicular extracellular particle fraction).</p> <p>Extracellular particles (EPs): Umbrella term for all particles outside the cell, including EVs and NVEPs.</p> <p>Artificial cell-derived vesicles (ACDVs): EV mimetics that are produced in the laboratory under conditions of induced cell disruption, such as extrusion.</p> <p>Synthetic vesicles (SVs): EV mimetics that are synthesized de novo from molecular components or made as hybrid entities, e.g., fusions between liposomes and native EVs.</p> <p>(후략)</p>	크기, 밀도, 구성 물질, 기원 세포 등에 따른 세포외소포를 구분하고 세포외소포 뿐만 아니라 혼동하여 사용할 수 있는 다른 물질(ectosome, microvesicle 등)도 세분화하여 용어 설정 및 정리

<p>2 Nomenclature</p>	<p>-</p>	<p>Figure 1 Hierarchy of EP nomenclature. Extracellular particles include vesicular and non-vesicular particles. This figure presents several distinctions that can be made between classes of EPs, as well as examples of possible nomenclature. EP: extracellular particle; EV: extracellular vesicle; SV: synthetic vesicle; ACDV: artificial cell-derived vesicle; NVEP: non-vesicular extracellular particle. See also Section 2 and Table 2.</p>	<p>세포외물질 구별하여 계층화한 모식도</p>
<p>3 Collection and pre-processing: pre analytical variables through to storage</p>	<p>-</p>	<p>3.1 Common recommendations</p> <ul style="list-style-type: none"> · Describe the source of EV-containing materials. For materials from human and non-human animal donors, report relevant donor characteristics, including but not limited to age, biological sex, substance exposures (medications, substance use) and disease. · Report the quantity (e.g., sample volume, mass) and quality of source material. · Provide all methodologic details of sample collection. · Consider how pre-separation storage may influence the EVs that are eventually separated. Where relevant, avoid repeated freeze-thaw cycles or assess effects of freeze-thaw. · Report all storage parameters pre- and post-EV separation (including use of preservatives or cryoprotectants, temperature, time, freezing procedure, storage vessel, number of freeze-thaw 	<p>세포외소포 채취 및 전처리 단계에서 공통적으로 고려하여야 할 사항 추가</p>

		cycles and thawing method). (후략)	
--	--	-------------------------------------	--

<p>3 Collection and pre-processing: pre analytical variables through to storage</p>	<p>-</p>	<p style="text-align: center;">3.3 Bacteria (중략)</p> <p style="text-align: center;">Recommendations:</p> <ul style="list-style-type: none"> · In addition to other culture parameters, report bacterial growth phase at harvest. <ul style="list-style-type: none"> · Limit storage prior to EV separation/concentration, especially if samples are left unfiltered. · When obtaining bacterial EVs from in vivo and environmental sources, consider that host EVs or EVs from nontarget species are likely present. · LPS and LTA are broad markers of gram-negative and -positive bacteria, respectively, with well-characterised, commercially-available affinity reagents. In many species, specific markers of EVs and non-EV materials remain unavailable. · Non-vesicular co-isolates of bacterial EVs may include pili, flagellae, phage and protein, lipoprotein and nucleoprotein complexes. 	<p>세포외소포 source로서 박테리아가 추가되고 bacterial EV 채취 및 전처리 단계에서 고려하여야 할 사항이 소개됨</p>
--	----------	--	---

<p>3 Collection and pre-processing: pre analytical variables through to storage</p>	<p>2-b) Biological fluids</p> <p>Since more than 30 types of biofluids exist in mammals, and lavages of numerous compartments add to this number (despite not being true biofluids), MISEV2018 does not provide an exhaustive review of the literature on preanalytical variables related to all biofluids. Each biological fluid presents specific biophysical and chemical characteristics that makes it different from culture conditioned medium, and this must be taken into account when isolating EVs.</p> <p>(후략)</p>	<p>3.4 Blood 3.5 Urine 3.6 Cerebrospinal fluid 3.7 Saliva 3.8 Synovial fluid 3.9 Milk</p>	<p>Biological fluid 를 blood, urine, cerebrospinal fluid, saliva, synovial fluid, milk 로 세분화하여 각 source 에서 세포외소포를 생산할 때 고려해야할 사항들을 추가함.</p>
<p>3 Collection and pre-processing: pre analytical variables through to storage</p>	<p>2-c) Tissues</p>	<p>3.10 Solid tissue</p>	<p>최신 tissue EV 연구 결과 및 그에 따른 고려사항 업데이트</p>
<p>3 Collection and pre-processing: pre analytical variables through to storage</p>	<p>2-d) Storage</p>	<p>3.12 Pre-separation and post-separation storage</p>	<p>제목 구체화 및 보고사례 추가(특히 추가된 고려사항 없음)</p>

<p>4 EV separation and concentration</p>	<p>3-EV separation and concentration: How MISEV2014 evolves in 2018 Table 1. Considerations for EV separation/enrichment</p>	<p>Figure 2 Position of some EV separation and concentration methods on a recovery (yield) versus specificity grid. Dashed blue arrows indicate combinations of methods resulting in increased specificity. Specificity can be of different types: Size exclusion chromatography (SEC) separates EVs by size from many (but not all) NVEPs, but all EV types are recovered together, while differential ultracentrifugation (dUC) separates EV subtypes based on their size/weight, but also co-isolates NVEPs at high speeds. Note that many 'exosome purification' kits use precipitation (P), thus do not isolate pure exosomes or even EVs but a mixture of EPs, while some use affinity precipitation (AP), which may be more specific to EVs but not exosomes. Those who develop new methods should consider positioning their EV outcomes on such a graph.</p>	<p>MISEV2018 의 recovery, specificity 에 따른 분류에서 각 분류에 쓰이는 분리방법에 따른 고려사항이 추가되며 세포외소포 분리방법에 대해 구체화된 가이드라인이 발표됨.</p>
---	--	---	--

<p>4 EV separation and concentration</p>	<p>-</p>	<p>4.1 EV concentration</p> <p>Summary: Concentration</p> <ul style="list-style-type: none"> · Can be done by polymer-based precipitation, filtration including tangential flow filtration, and (ultra)centrifugation. · Leads to EV-containing preparations containing variable amounts of NVEPs and proteins, depending on the exact method and variables such as filter cut-off (size or molecular weight). <p>Reporting recommendations: for concentration, report the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> · nature of the material used for concentration; <ul style="list-style-type: none"> · initial and final volumes of biofluid; · time of processing (incubation with polymer, centrifugation through filters or directly); <ul style="list-style-type: none"> · flow rate (for TFF); · size or molecular weight cut-off (for filtration/concentration); · temperature during concentration. 	
---	----------	---	--

<p>4 EV separation and concentration</p>	<p>-</p>	<p>4.2 Differential (ultra)centrifugation Summary: dUC</p> <ul style="list-style-type: none"> · Enriches for EV subtypes that are separated according to their sedimentation coefficient, proportional to their diameter and density. · Co-isolates NVEPs that have the same sedimentation coefficient as EVs, especially after high-speed and lengthy ultracentrifugation. · May induce aggregation of EVs. <p>Reporting recommendations: for differential (ultra)centrifugation, report the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> · speed, rotor type, and time of centrifugation, to allow calculation of the adjusted k-factor (to apply to other rotors) and the sedimentation coefficient of the pelleted EPs; · tube type and sample volume in the tube; <ul style="list-style-type: none"> · temperature during centrifugation; · acceleration and deceleration (brake) settings. 	
---	----------	---	--

<p>4 EV separation and concentration</p>	<p>-</p>	<p>4.3 Density gradient/cushion</p> <p>Summary: density gradients and cushions</p> <ul style="list-style-type: none"> · Can be implemented in different settings (top-down, bottom-up) depending on the aim, that is, to separate EVs from proteins, or from NVEPs, or to separate EV subtypes. · Leads to low recovery of high-purity material (based on density). <p>Reporting recommendations. For density gradients and cushions, report the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> · density material, buffer composition, and exact method of gradient/cushion preparation; · volume and concentration of material loaded, as well as method of loading onto or at the bottom of the column; <ul style="list-style-type: none"> · exhaustive description of centrifugation parameters (same as for dUC); · details of collection procedure, final densities of fractions (where relevant), and washing. 	
---	----------	--	--

<p>4 EV separation and concentration</p>	<p>-</p>	<p>4.4 Size exclusion chromatography</p> <p>Summary: SEC</p> <ul style="list-style-type: none"> · SEC is an easily accessible technique for size-based separation of particles. · Columns can be packed with a variety of matrices and at different scales, depending on desired capacity and resolution of separation. <p>Reporting recommendations. For SEC, report the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> · type of matrix and pore size; height and diameter (or volume) of matrix-containing column; · method of column packing (or source of commercially-available columns); · source, volume and particle concentration of pre-SEC sample, including any prior separation/concentration steps; <ul style="list-style-type: none"> · buffer composition; · specify gravity flow or pressure. If pressure, indicate pump system and pressure parameters; · void volume and numbers and volume of fractions collected; · any post-SEC concentration methods; · if columns are re-used, method of column regeneration and number of times the column has been used. 	
---	----------	--	--

<p>4 EV separation and concentration</p>		<p>4.5 Fluid flow-based separation</p> <p>Summary:</p> <ul style="list-style-type: none"> · Fluid flow-based separations such as AF4 can achieve size-based separations with high resolution. · Lacking a solid phase and with limited applied forces, flow is gentler than most EV separation techniques. · Size-based separation can be combined with separation by other principles by applying different types of fields. · Preparative scales can be reached with flow techniques such as free-flow electrophoresis. <p>Reporting recommendations. For flow-based separations, report the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> · all instrumentation, including pumps and collection devices; · composition of all buffers and their filtration. Especially in FFE: how properties of the buffers were confirmed; · all field characteristics such as flow rates and pressures, pH gradients, electric field; · dimensions and composition of separation chambers, including any molecular weight cutoff plates; · all relevant details of fraction collection. 	
---	--	---	--

<p>4 EV separation and concentration</p>		<p>4.6 Charge and molecular recognition-based separations</p> <p>Summary: charge and molecular recognition affinity-based methods</p> <ul style="list-style-type: none"> · Separate components of EV preparations according to surface charge or exposure of a specific molecular determinant. · Will co-isolate all EV subtypes or NVEPs which expose a given charge or molecular determinant: specificity and recovery depend on the specificity versus universality of exposure of the chosen molecular determinant. · Antibody-based affinity separation leads to co-isolation of the determinant-exposing EPs with the antibody and/or isolation beads. · Efficiency and selectivity must be quantified when establishing the protocol by quantifying material recovered in pull-down versus flow-through. <p>Reporting recommendations: for affinity-based separation, report the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> · molecule used as affinity probe (nature, source); <ul style="list-style-type: none"> · matrix (beads, gel, column); · incubation times; · buffer and number of washes; · elution process (such as elution buffer composition, time). 	
---	--	---	--

<p>4 EV separation and concentration</p>	<p>-</p>	<p>4.7 General considerations and caution on kit-based approaches</p> <p>Recommendations</p> <ul style="list-style-type: none"> · If separation/concentration is not done, indicate why. Otherwise, justify why each separation/concentration method was selected in terms of yield and specificity. · Provide sufficient methodologic detail to allow replication of each separation and concentration step. · Report any measurements that are used to assess the separation/concentration process(es). Where applicable and feasible, and especially when establishing a new workflow, check EVs before and after each step. For example, track EV marker protein levels relative to total protein to estimate fold enrichment and yield for each step. · For affinity-based EV separation approaches, establish molecular specificity of reagents and EV/EV subtype specificity of all targeted markers. 	
---	----------	--	--

<p>5 EV characterization</p>	<p>4 - EV characterization: How MISEV2014 evolves in 2018</p> <p>Table 2: Steps of EV characterization</p> <p>4-a) Quantification of EVs</p> <p>4-b) Characterization of EVs by their protein composition</p> <p>4-b-1) Selection of proteins for use as EV markers</p> <p>Table 3: Protein content-based EV characterization</p> <p>4-b-2) Methods to assess presence of proteins in EV preparations</p> <p>4-b-3) Non-protein components as markers of EVs</p> <p>4-c) Single vesicle analysis</p> <p>4-d) New recommendation: determine the topology of EV-associated components</p>	<p>5 EV characterization</p> <p>5.1 Quantification of particle number concentration</p> <p>5.2 Quantification of particle size</p> <p>5.3 Quantification of total protein</p> <p>5.4 Quantification of total lipids</p> <p>5.5 Quantification of total RNA</p> <p>5.6 Characterization of EV morphology</p> <p>5.7 Characterization of EVs by protein composition</p> <p>Table 3. Protein content-based EV characterization.</p> <p>5.8 Non-protein markers of EVs</p> <p>5.9 Localization of EV-associated components</p>	<p>정량분석(quantification) 및 특성분석(characterization) 항목을 세분화하여 고려사항 및 시험법, 기준에 대하여 설명</p>
<p>5 EV characterization</p>	<p>Table 3. Protein content-based EV characterization.</p>	<p>Table 3. Protein content-based EV characterization.</p>	<p>상위 항목(1, 2, 3 등)은 유지되었고, 하위 항목(1a, 1b, 2a, 3a 등)이 변경됨.</p>

<p>6 Technique-specific reporting considerations for EV characterization</p>		<p>6 Technique-specific reporting considerations for EV characterization</p> <ul style="list-style-type: none"> 6.1 Flow cytometry-based methods <ul style="list-style-type: none"> 6.1.1 Bead-based flow cytometry 6.1.2 Single-EV flow cytometry 6.2 Gene protein tagging 6.3 Mass spectrometry proteomics 6.4 Microscopy-based methods <ul style="list-style-type: none"> 6.4.1 Atomic force microscopy 6.4.2 Diffraction-limited fluorescence microscopy 6.4.3 Dynamic light scattering 6.4.4 Electron microscopy 6.4.5 Nanoparticle tracking analysis 6.4.6 Single-particle interferometric reflectance imaging sensing 6.4.7 Super-resolution microscopy 6.5 Nucleic acid characterization 6.6 Protein- and non-protein labelling of EVs <ul style="list-style-type: none"> 6.7 Raman spectroscopy 6.8 Resistive pulse sensing 6.9 Western blotting 	<p>세포외소포 특성분석에 사용할 수 있는 여러 방법을 소개 및 각 방법에 따른 고려사항 및 결과보고 사항을 소개</p>
---	--	---	---

<p>7 EV release and uptake</p>	<p>-</p>	<p>7.1 Approaches to modulate EV release (중략)</p> <p>Recommendations</p> <ul style="list-style-type: none"> · For genetic and pharmacological manipulations used to inhibit or stimulate EV secretion, report potential effects on other secretory or cell biological processes. For example, confirm that there is no change in cell viability, proliferation and secretion of non-EV-associated factors. · Where possible, assess whether inhibiting a specific EV production pathway leads to a change in other EV release mechanisms by assessing EV-specific cargoes or activities. · Identification of unchanged markers and the use of appropriate normalization methods are important for rigorous comparative analysis of EV preparations. <p>7.2 EV interaction with cells (중략)</p> <p>Recommendations</p> <ul style="list-style-type: none"> · Assess the suitability of the labelling/reporting system in terms of the impact on normal cellular processes, the stability of the EV-cell association, and longevity within an intracellular environment. · Report EV:recipient cell ratios and the physiological relevance of the delivered dose. 	<p>세포외소포의 mechanism of action에 따른 주변환경에 대한 영향을 시험 및 평가할 때 고려사항이 새롭게 추가됨</p>
---------------------------------------	----------	--	---

		<ul style="list-style-type: none">• Report incubation conditions, exposure time, cell densities, and configuration, for example, 2D/3D.• Evaluate binding, uptake and content transfer to identify critical mechanistic elements driving the cellular response(s).	
--	--	---	--

<p>8 Functional studies</p>	<p>5 - Functional studies: How MISEV2014 evolves in 2018</p> <p>Table 4: EV-associated and EV-excluded biological activities</p> <p>5-a) Determine the specific versus common functions of different types of EVs</p> <p>5-b) Demonstrate that the activity is observed in the absence of direct cell-cell contact</p> <p>5-c) Demonstrate that the activity is predominantly associated with EVs rather than with soluble mediators</p> <p>5-d) Demonstrate the specific association of the activity with EVs rather than with co-isolated components</p> <p>5-e) Determine whether a function is specific to exosomes, as compared with other small EVs</p> <p>5-f) How to attribute particular effects mediated by EVs to specific EV components</p> <p>5-g) Consider whether an EV-dependent function is specific to a given EV source</p>	<p>8 Functional studies</p> <p><u>MISEV2018 recommendations on functional studies of EVs continue to hold for MISEV2023.</u></p> <p>Because of the great diversity of functional studies in vivo and in vitro, we provide only general recommendations.</p> <p>First, physiologically informed dose-response and time-course studies are encouraged. Second, carefully selected EV negative controls are needed to assess the contribution of 'background' EV activity (such as EVs present in culture medium components) and/or non-specific activity of EVs other than those of interest.</p> <p>(중략)</p> <p>Third, controls consisting of non-EV-containing, EV-depleted or enzymatically treated EV separation fractions can help to identify if a function is specific to EVs or associated with co-isolating materials.</p> <p>(후략)</p>	<p>세포외소포의 기능적 분석에 대한 MISEV2018 권고 사항은 MISEV2023 에도 계속 적용</p>
------------------------------------	---	---	--

<p>9 EV analysis in vivo</p>	<p>-</p>	<p style="text-align: center;">9 EV analysis in vivo (중략)</p> <p>Recommendations (Note: These recommendations are broad, as this section of MISEV2023 is meant to raise awareness of the diversity of in vivo studies and not to make prescriptive guidelines. Innovative new approaches should thrive in diverse organisms to move the field forward.)</p> <ul style="list-style-type: none"> · Report all details of labelling and detection/imaging technologies to allow replication studies. · For exogenous EV administration, report all parameters of administration, including anatomical site, timing (bolus/continuous) and dose. · Consider and control for the possible effects of EV labelling on EV biodistribution, pharmacokinetics and function. · Consider that pharmacologic or genetic manipulations meant to block EV production in vivo may have off-target consequences. · Consider the possibility of different behaviour of endogenous and exogenous EVs. 	
-------------------------------------	----------	--	--

4. 참고문헌

- ¹ 세포외소포체치료제 품질 비임상 및 임상 평가 가이드라인(민원인 안내서), 식품의약품안전처, 2023, https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/down.do?brd_id=data0011&seq=15422&data_tp=A&file_seq=3
- ² 세포치료제 세포은행 평가 가이드라인(민원인 안내서), 식품의약품안전처, 2023, https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=15379
- ³ mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인, 식품의약품안전처, 2022, https://www.mfds.go.kr/brd/m_218/view.do?seq=33485&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=7
- ⁴ 생물약품 안정성시험 가이드라인(민원인 안내서), 식품의약품안전처, 2015, https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=12546&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=80
- ⁵ International Council for Harmonisation (ICH). Q6B: Specifications—Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (1999).
- ⁶ United States Pharmacopeia (USP). General Chapter <71> Sterility Tests.
- ⁷ USP. General Chapter <61> Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests; and <62> Tests for Specified Microorganisms.
- ⁸ USP. General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test.
- ⁹ ICH. Q5C: Quality of Biotechnological Products—Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (1996).
- ¹⁰ Welsh JA et al.; MISEV Consortium; Théry C, Witwer KW. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024 Feb;13(2):e12404. doi: 10.1002/jev2.12404. Erratum in: *J Extracell Vesicles*. 2024 May;13(5):e12451. doi: 10.1002/jev2.12451. PMID: 38326288; PMCID: PMC10850029.
- ¹¹ Zhao K, Bleackley M, Chisanga D, et al. Extracellular vesicles secreted by *Saccharomyces cerevisiae* are involved in cell wall remodelling. *Commun Biol*. 2019;2:305. Published 2019 Aug 9. doi:10.1038/s42003-019-0538-8

-
- ¹² Wood CR, Huang K, Diener DR, Rosenbaum JL. The cilium secretes bioactive ectosomes. *Curr Biol*. 2013;23(10):906-911. doi:10.1016/j.cub.2013.04.019
- ¹³ He B, Cai Q, Qiao L, et al. RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nat Plants*. 2021;7(3):342-352. doi:10.1038/s41477-021-00863-8
- ¹⁴ Jewett KA, Thomas RE, Phan CQ, et al. Glucocerebrosidase reduces the spread of protein aggregation in a *Drosophila melanogaster* model of neurodegeneration by regulating proteins trafficked by extracellular vesicles. *PLoS Genet*. 2021;17(2):e1008859. Published 2021 Feb 4. doi:10.1371/journal.pgen.1008859
- ¹⁵ Scott A, Sueiro Ballesteros L, Bradshaw M, et al. In Vivo Characterization of Endogenous Cardiovascular Extracellular Vesicles in Larval and Adult Zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(9):2454-2468. doi:10.1161/ATVBAHA.121.316539
- ¹⁶ Hyenne V, Ghoroghi S, Collot M, et al. Studying the Fate of Tumor Extracellular Vesicles at High Spatiotemporal Resolution Using the Zebrafish Embryo. *Dev Cell*. 2019;48(4):554-572.e7. doi:10.1016/j.devcel.2019.01.014
- ¹⁷ Sung BH, Ketova T, Hoshino D, Zijlstra A, Weaver AM. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun*. 2015;6:7164. Published 2015 May 13. doi:10.1038/ncomms8164
- ¹⁸ Valkov N, Das A, Tucker NR, et al. SnRNA sequencing defines signaling by RBC-derived extracellular vesicles in the murine heart. *Life Sci Alliance*. 2021;4(12):e202101048. Published 2021 Oct 18. doi:10.26508/lsa.202101048
- ¹⁹ Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*. 2015;17(6):816-826. doi:10.1038/ncb3169
- ²⁰ Martin TP, MacDonald EA, Elbassioni AAM, et al. Preclinical models of myocardial infarction: from mechanism to translation. *Br J Pharmacol*. 2022;179(5):770-791. doi:10.1111/bph.15595
- ²¹ Mustapha M, Mat Taib CN. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies. *Bosn J Basic Med Sci*. 2021;21(4):422-433. Published 2021 Aug 1. doi:10.17305/bjbm.2020.5181
- ²² ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1) Step 4, 2011.06,12, available from

https://database.ich.org/sites/default/files/S6_R1_Guideline_0.pdf

²³ ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1) Step 4, 2011.06.12, available from https://database.ich.org/sites/default/files/S6_R1_Guideline_0.pdf

²⁴ ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: GUIDANCE ON NONCLINICAL SAFETY STUDIES FOR THE CONDUCT OF HUMAN CLINICAL TRIALS AND MARKETING AUTHORIZATION FOR PHARMACEUTICALS M3(R2) Step 4, 2009.06.22, available from https://database.ich.org/sites/default/files/M3_R2_Guideline.pdf

²⁵ ICH. M3(R2): Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals.

²⁶ ICH. S6(R1): Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.

²⁷ ICH. S8: Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals.

²⁸ ICH. S2(R1): Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use.

²⁹ ICH. S1A: The need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals.

³⁰ ICH. S5(R3): Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals.

³¹ 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전처, 2015,
https://mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=10128&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=51

³² 치료용 DNA 백신의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인(민원인 안내서), 식품의약품안전처, 2015,
https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=12496&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=139

³³ Gimona, M. et al. (2021). Critical considerations for the development of potency tests for therapeutic applications of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles. *Cytotherapy*, 23,373–380.

³⁴ Aimaletdinov, A. M., & Gomzikova, M. O. (2022). Tracking of Extracellular Vesicles'

Biodistribution: New Methods and Approaches. International journal of molecular sciences, 23(19), 11312. <https://doi.org/10.3390/ijms231911312>

발행기관 연세대학교 산학협력단
발행일 2025년 12월 30일
발행인 박민수
편집위원장 민창기
편집위원 한승훈, 박성수, 장민정, 진병학
감수위원 분과위원회 위원 중 검토 의견서를 제출한 위원(희망자에 한함)

(우편번호) 서울특별시 마포구 마포대로 137 KPX빌딩 6층
문의처 전화번호 : 02-398-5082
이메일 : scrc@konect.or.kr

본 정보집은 보건복지부의 재원으로 국가임상시험지원재단 스마트임상시험신기술개발 연구사업단의 지원을 받아 수행한 「과제명 첨단 바이오 분야 초기 임상시험 관련 기술 개발」(과제고유번호: RS-2023-KH141565)의 결과물로 제작되었음을 밝힙니다.