

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1031560)

항암신약 후보물질 전임상 및 초기임상 시험 II

Bridging Novel Leads for Anticancer Therapeutics to
Preclinical/Early Clinical Phases

과제책임자 : 김 인 후

국 립 암 셴 터

(뒷면)

(측 면)

↑
5cm
↓↑
항
암
신
약
후
보
물
질
전
임
상
및
초
기
임
상
시
험국
립
암
센
터↑
3cm
↓

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구
사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시
국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야
합니다.

(14 pont, 고딕체)

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “ 항암신약 후보물질 전임상 및 초
기임상 시험 II ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2013. 01 . 28

국립암센터

과 제 책 임 자 : 김 인 후

연 구 원 : 김 학 균

” : 이 상 진

” : 김 윤 희

참여기업명 : 대웅제약, 앱자인, 유영제약

목 차

< 요약 문 >

(한글)-----	6
(영문)-----	8
1. 연구의 최종목표-----	10
2. 연구의 내용 및 결과-----	10
3. 연구결과 고찰 및 결론-----	63
4. 연구성과 및 목표달성도-----	68
5. 연구결과의 활용계획-----	72
6. 참고문헌-----	73
7. 첨부서류	

< 요약 문 >

접수번호				과제번호		
과제명		항암신약 후보물질 전임상 및 초기임상 시험 II				
과제책임자		성명	김인후	주민등록번호	581121-*****	
		전화번호	2511	전자우편	ihkim@ncc.re.kr	
색인단어	국문	항암 유전자치료제, 항암 항체 치료제, 임상 0상 시험			보안등급	
	영문	anti-cancer gene therapy, anti-cancer antibody therapy, phase 0 clinical trial			보안	일반
<p>◆ 최종 연구목표</p> <p>가. 아데노바이러스 Ad5.CMV.TR.HSVtk와 나노(NCC-K1) 복합체를 이용한 두경부암 유전자 치료제의 전임상 시험 및 Ad5.CMV.TR.HSVtk 단독의 뇌암 치료를 위한 전임상 시험 나. HGF 중화 항체 치료제의 적용증 확대 및 전임상 시험 수행 다. 항암제 임상 0/1 상 시험을 위한 고민감도 고재현성 약동력학 분석 시스템 개발</p>						
<p>◆ 연구 내용 및 방법</p> <p>○ 효능시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 확립된 NSCLC, Sarcoma, HCC 암세포 이식 동물 모델에서 HGF 중화항체의 효능 시험 - 두경부암에서 아데노바이러스와 나노복합체의 항암 효능시험 - 뇌암에서 아데노바이러스 AdCMV.Rz.HSVtk의 항암 효능 검증 - 검증된 효과를 바탕으로 임상 개발 전략 마련 <p>○ 전임상 시료 생산</p> <ul style="list-style-type: none"> - 아데노 바이러스와 나노복합체 생산 (GMP 시설에서 전임상 및 임상시험 등급) - 전임상 시험을 위한 HGF 중화 항체 대량 생산 scale-up 완료 - 대량 배양, 대량 정제 process 에 따른 대량 생산 및 분석 - Formulation study를 통한 제형 선정 및 기준 및 시험법에 따른 시료 분석 - 안정성 시험 및 안정성 개선 방법 탐색 <p>○ 전임상시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - AdCMV.Rz.HSVtk와 나노복합체를 이용한 두경부암 임상시험을 위한 전임상 프로토콜 확립 - AdCMV.Rz.HSVtk와 나노복합체의 독성시험, Bio-distribution, 특성분석 - AdCMV.Rz.HSVtk 단독의 뇌암 임상시험을 위한 전임상 프로토콜 확립 및 전임상시험 (독성시험, Bio-distribution) - HGF 항체의 원숭이에서 PK/PD study - HGF 항체의 면역원성 (immunogenicity) 시험 - HGF 항체의 GLP 독성(단회 독성 완료, 반복 독성 개시) 						

- HGF 항체의 Bio-distribution 연구

○ 임상 0/1상 시험 인프라 구축

-protein precipitation 후 Agilent 1260 microflow LC- triple quadrupole에서 분석하는 방법으로 irinotecan 과 SN38을 고민감도로 측정하는 방법론을 확립함

-상기 방법으로 0상 임상 시험 수행에 필요한 민감도를 달성할 수 있었으며, 상기 방법론을 ICR mice에 irinotecan을 투여한 후 채취한 검체에서 validate한 결과, 분석샘플 83.3 % 에서 variability가 20 % 이하로, 전체 재분석 시료 67 %의 variability가 20 % 미만이 되는 것을 요구하고 있는 EMA 의 까다로운 기준도 통과할 수 있는, 재현성이 우수한, 신뢰성이 있는 분석법 임을 입증하였음.

-그리고 nanoLC를 성공적으로 pharmacokinetics 에 접목시키는 방법론을 개발하여 어떤 약제로 0상 임상 시험을 수행하더라도 trough level을 민감하게 (100 pg/mL of SN38) 쫓 수 있는 infrastructure를 구축하였고, 이는 국제적으로도 최초의 성과라고 여겨짐

○ 임상시험 대상자 선정 및 임상시험의 상세 프로토콜 완성

-임상시험 대상자 군의 기준을 마련하고 프로토콜을 작성

-IND filing: 바이러스 제제는 filing, HGF 항체는 반복 독성 결과 이외의 모든 준비 완료 (반복 독성 결과 창출 후 IND filing)

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수		
IF 합		
기타 성과		

-정성적 성과

- 아데노바이러스의 효능을 향상시키는 최적의 나노 농도와 복합체를 형성 조건 확립
- 유전자치료제의 두경부암과 뇌암 적용을 위한 전임상 프로토콜 확립 및 전임상 시험 수행
- 적응증 확대를 위한 NSCLC, sarcoma model에서 항체 효능 확인
- 전임상 시료 생산 및 기시법에 의한 확인 완료
- 제형완료 및 안정성 확인
- 원숭이에서 전임상 시험 시행
- Tissue cross-reactivity, cell banking and characterization

임상 0 상 수행을 위한 약리학 분석 방법론 확립 및 검증

- IND 자료 확보

◆ 참여연구원 (당해연도 참여인 원)	성 명	김인후 외 44인
	주민등록번호	

Project Summary

Title of Project	Bridging Novel Leads for Anticancer Therapeutics to Preclinical/Early Clinical Phases II
Key Words	preclinical study, therapeutic antibody, gene therapy, pharmacokinetic analytic system for phase 0
Project Leader	In-Hoo Kim
Associated Company	DaeWoong, Yuyoung
<p>This research proposal aims at supporting anti-cancer reagents that has been discovered in National Cancer Center and already proven to be potentially druggable. This research proposal intended to support the following four studies: 1) pre-clinical trial of therapeutic antibody enabling to neutralize HGF for targeting NSCLC sarcoma and HCC, 2) completion of pre-clinical trial (toxicology, efficacy) of adenovirus Ad5CMV.Rz.HSVtk/NCC-K1 complex for head and neck cancer and 3) pre-clinical trial of Ad5CMV.Rz.HSVtk for glioma, and 4) establishment of a repetitive and sensitive system to analyze pharmacokinetics during phase 0/1.</p> <p>1) With respect to anti-HGF therapeutic antibody, this project established the protocol and analytic method for the mass-production of anti-HGF antibody. The protocol was well documented in case of IND filing to KFDA. With highly purified antibody, PK/PD, immunogenicity, toxicity, bio-distribution was completed using monkeys during the pre-clinical trial. The <i>in vivo</i> anti-cancer efficacy of HGF-neutralizing antibody for NSCLC sarcoma was also evaluated. Overall, anti-HGF antibody is ready for IND filing to KFDA.</p> <p>2) With respect to adenovirus Ad5.CMV.Rz.HSVtk gene therapy, this project established the pre-clinical study protocol of the complex between adenovirus and nano-material NCC-K1 for the treatment of head and neck cancer. Since NCC-K1 have never been in clinical trial, the cost of pre-clinical study requested by KFDA was so high that this project could not afford to do it and could not proceed. Therefore, this project included</p>	

another goal, preclinical trial of intra-cranial injection of adenovirus for glioma clinical trial. This pre-clinical trial is on-going.

3) With respect to establishment of a repetitive and sensitive system to analyze pharmacokinetics during phase 0/1, we measured plasma irinotecan and SN38 after protein precipitation using Agilent 1260 microflow LC- triple quadrupole. Using this protocol, we were able to achieve the sensitivity and reproducibility that can satisfy EMA guideline and therefore can be applicable to phase 0 clinical trial. Also, we established a protocol for using nanoLC- triple quadrupole, for the first time. We were able to achieve the sensitivity (100 pg/mL) and reproducibility that can satisfy EMA guideline.

2. 연구의 내용 및 결과

1) 연구의 최종목표

최종목표:

- 가. 아데노바이러스 Ad5.CMV.TR.HSVtk와 나노(NCC-K1) 복합체를 이용한 두경부암 유전자 치료제의 전임상 시험 및 뇌암 치료를 위한 Ad5.CMV.TR.HSVtk 단독의 전임상 시험
- 나. HGF 중화 항체 치료제의 적용증 확대 및 전임상 시험 수행
- 다. 항암제 임상 0/1 상 시험을 위한 고민감도 고재현성 약동력학 분석 시스템 개발

2) 연구수행방법

2-1. 효능시험

- 확립된 NSCLC, Sarcoma 세포주를 동물에 이식하여 전임상 시험을 위하여 대량 생산된 HGF 중화항체의 항암 효능을 검증하고자 함
- 두경부암 세포주를 이용하여 아데노바이러스 Ad5CMV.Rz.HSVtk와 나노 NCC-K1의 복합체에 의한 in vitro cytotoxicity를 평가하고, 동물에 xenograft를 만들고 intra-tumoral 주사 후에 종양의 성장이 억제되는지를 평가하고자 함
- 뇌암 세포주를 이용하여 아데노바이러스 Ad5CMV.Rz.HSVtk에 의한 in vitro cytotoxicity를 평가하고, 누드마우스에 xenograft를 만들고 intra-cranial로 주사 후에 종양의 성장이 억제되는지를 MRI로 평가하고자 함
- 검증된 효과를 바탕으로 임상 개발 전략 마련

2-2. 전임상 시료 생산

- 아데노바이러스 Ad5CMV.Rz.HSVtk를 GMP 시설에서 대량 생산하고 나노 NCC-K1를 Sigma에서 구입하여 대응제약의 약제 시설 혹은 국립암센터의 GMP 시설에서 임상시험을 위한 제재로 패키지 하고자 함
- 전임상 시험을 위한 HGF 중화 항체 대량 생산을 위하여 항체 생산 세포주를 대량으로 배양하고 항체 생산의 scale-up을 완료 하고자 함. 또한, 생산된 항체의 정제 및 HPLC를 이용한 분석시스템을 구축하고자 함
- 임상시험에 사용하고자 하는 항체의 제형을 선정하고 시험법에 따른 시료를 분석

할 수 있는 기반을 구축하고자 함.

2-3. 전임상시험

- AdCMV.Rz.HSVtk와 나노복합체를 이용한 두경부암의 임상시험을 위한 IND filing에 필요한 전임상 프로토콜 확립하고자 함. 나노 NCC-K1이 임상시험에 쓰여진 사례가 없으므로 나노와 바이러스의 단독 독성시험/bio-distribution과 나노/아데노바이러스 복합체의 독성시험/bio-distribution이 진행되어야 함.

- 선행연구에서 본 연구진은 AdCMV.Rz.HSVtk의 intravenous 주사를 통한 독성시험과 bio-distribution 연구를 완료하였으나 뇌암 임상시험에 필요한 독성시험과 bio-distribution은 바이러스를 intra-cranial로 주사하는 전임상 시험이 필요하므로 이에 필요한 전임상 프로토콜을 확립하고 전임상시험을 수행할 필요가 있음.

- 항체 anti-HGF 항체의 원숭이를 이용한 PK/PD study, 면역원성 (immunogenicity) 시험, GLP 독성(단회 독성 완료, 반복 독성), Bio-distribution 연구에 필요한 프로토콜을 작성하고 KFDA에 IND filing에 필요한 전임상을 수행하고자 함.

2-4. 임상 0/1상 시험 인프라 구축

-임상 0상 시험을 위한 고민감도 고재현성 약동학 분석법을 확립하고 항암제의 임상0/1상 시험에서 적용할 수 있는 프로토콜을 확립하고자 함.

-확립된 약동력학 분석법에 기반하여 임상 0/1상 시험 인프라를 구축하고자 함.

2-5. 임상시험 대상자 선정 및 임상시험의 상세 프로토콜 완성

-유전자치료제와 항체치료제의 임상시험 대상자 군의 기준을 마련하고 프로토콜을 작성하여 IND filing에 필요한 서류를 마련하고자 함.

-IND filing: 바이러스 제제는 filing, HGF 항체는 반복 독성 결과 이외의 모든 준비 완료 (반복 독성 결과 창출 후 IND filing)

3) 연구수행 내용 및 결과

3-1) 나노와 아데노바이러스 복합체를 이용한 유전자 치료제 개발

3-1-1. 암세포를 특이적으로 표적하는 AdCMV.TRz.HSVtk 제작

-hTERT를 제단하는 Ribozyme.HSV.tk의 기작은 그림 1에 보듯이 hTERT를 인지하는 ribozyme에 의해서 hTERT mRNA를 절단하고 치료유전자와 접합시켜 새로운 mRNA를 만듦.

- 이러한 기작은 TERT가 다량으로 발현되는 암세포에서 주로 치료유전자를 발현함으로써 정상세포에 손상을 줄임.

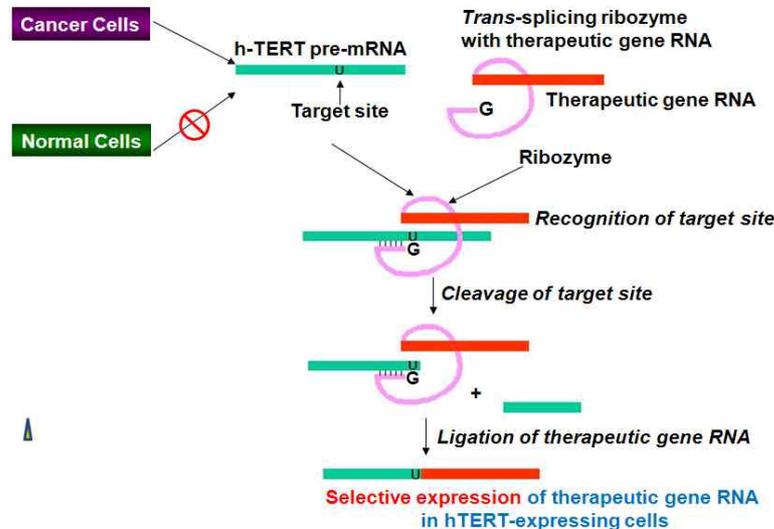
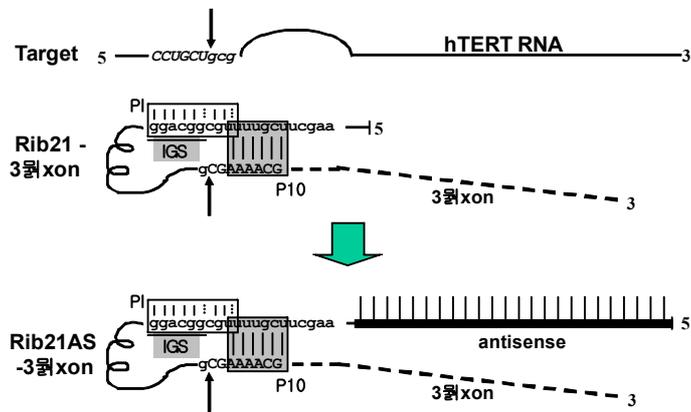


그림 1. trans-splicing ribozyme을 이용한 치료유전자 발현 기작. (Hong et. al. Mol Ther.2008.Jan;16(1):74-80., Jeong et. al. Clin Cancer Res. 2008. Jan 1;14(1):281-90)

- 위에서 기술한 것처럼 TERT의 catalytic domain을 코딩하는 mRNA의 표적사이트와 이를 인지하여 제단하는 ribozyme의 염기서열은 그림 2. 에서 보여 주듯이 타깃하는 특이성(specificity)를 높이기 위하여 ribozyme의 3'에 100개의 hTERTRNA의 상보적인 서열을 넣어줌.



Mol Ther (2005) 12:824-834: IF=5.443

그림 2. mRNA 표적 site와 ribozyme의 염기 서열

- hTERT를 표적하고 제단하는 ribozyme에 의해서 CMV.HSVtk의 발현이 조절되는 유전자를 탑재한 아데노바이러스를 제작함. 아데노바이러스는 E1과 E3가 결손된 복제 능력을 상실함 아데노바이러스 임. Ad5CMV.Rz.HSVtk라고 명명 함.



그림 3. 아데노바이러스의 구조

- hTERT를 인지하는 mRNA를 제단하여 HSVtk를 발현하는 카세트를 탑재한 아데노바이러스에 의한 항암 효과를 대장암 세포주인 HT-29를 이용하여 in vitro와 in vivo xenograft 동물 모델에서 평가하였음 (그림 4).

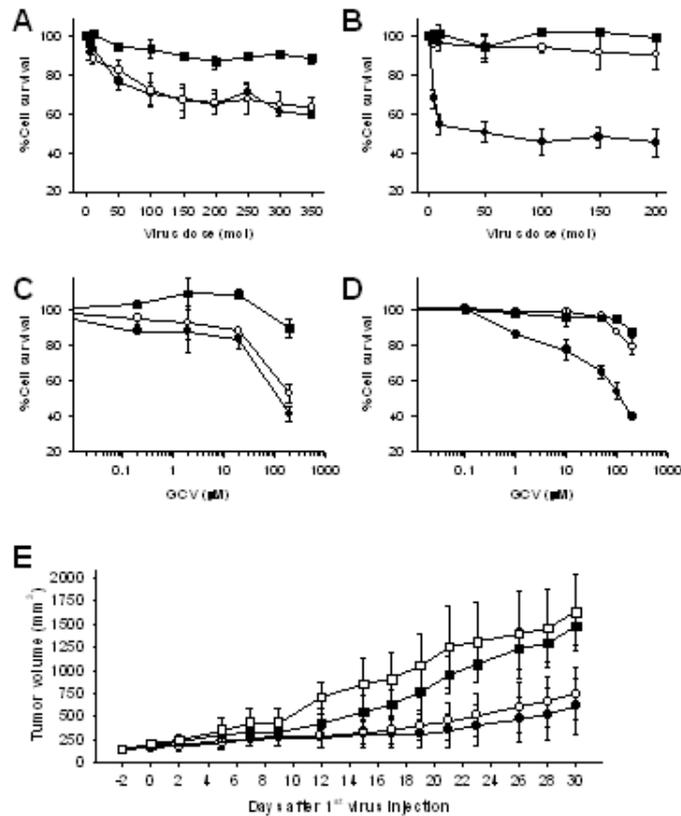


그림4. Ad-Ribo-HSVtk에 의한 종양억제효과. (A) Ad5CMV.Rz.HSVtk의 효과와 종양특이성을 세포주에서 실험하였다. hTERT(+) HT-29 세포주는 아래의 아데노바이러스에 의해 감염되었다. Ad5CMV.Rz.HSVtk (○), Ad-HSVtk (●), or Ad-Mock (■). (B) hTERT(-) SKLU-1 세포주를 사용하여 A에서와 같이 실험하였다. (C) HT-29 세포주를 30 moi의 Ad5CMV.Rz.HSVtk (○), Ad-HSVtk (●), or Ad-Mock (■)의 아데노바이러스로 처리하고 다른 농도의 GCV하에서 사이토크 효과를 측정하였다. (D) SKLU-1 세포주를 사용하여 C에서와 같이 실험하였다. (E) 종양억제 능력을 in vivo에서 xenograft 모델을 사용하여 보여주었다. Ad5CMV.Rz.HSVtk/GCV (○, n = 12), Ad-HSVtk/GCV (●, n = 12), Ad-Mock/GCV (■, n = 9) or PBS/PBS (□, n = 9).

- 위의 실험에서 보듯이 바이러스를 주사하고 12일이 지나면 종양의 growth를 억제하는 바이러스의 치료 효과가 떨어짐을 알 수 있으므로 아데노바이러스 치료의 효능을 개선할 필요가 있음.

3-1-2. Adenovirus의 infection 효율을 증가시키는 특정인자의 발굴

- 그림 5A의 RT-PCR 결과에서 알 수 있듯이, 아데노바이러스 수용체인 CAR가 없는 CT-26 마우스 대장암 세포는 세포수준에서 뿐만 아니라 그림 5B의 CT26의 xenograft에서도 Ad5 serotype의 아데노바이러스의 전달 효율은 0에 가까우며, 본

연구에서 그림 5C에서 보듯이 예비 연구를 통해 특정인자가 CAR의 존재 여부와 무관하게 여러 세포주에서 아데노바이러스 (Ad5-CMV-GFP)의 전달 효율을 상당히 증가시킴을 확인하였음.

- 특정인자는 CAR가 존재하는 세포의 경우라도, 아데노바이러스의 전달효율을 동반 상승 시키게 되는데, Hepa1-6세포의 경우 90% 이상의 감염효율을 보임.

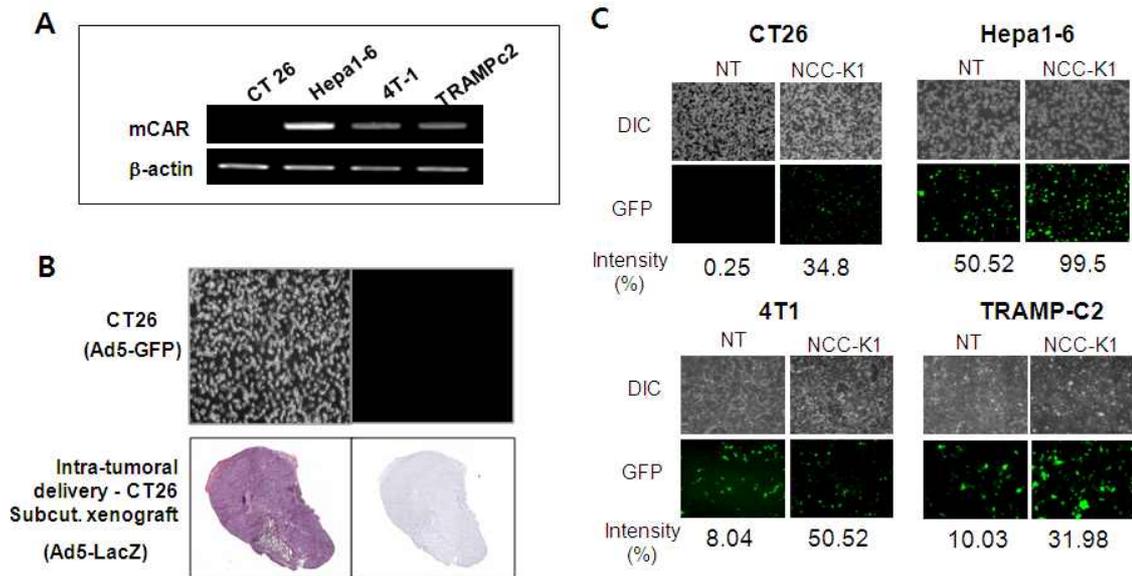


그림 5. NCC-K1에 의한 아데노바이러스(Ad5) 전달효율 증가. 4가지의 마우스 세포주들은 RT-PCR을 통하여 확인한 결과, 각기 CAR의 발현 정도가 다르며 그림C에서 보는 바와 같이, Ad5-CMV-GFP (2000 vps)를 infection 시킬 때에 NCC-K1 나노를 0.2 mM 농도로 함께 처리하고 48시간 후에, FACS를 이용하여 GFP의 발현량을 정량하고 아데노바이러스의 전달 효율을 측정하였음.

- CT-26 세포주를 이용한 피하종양모델에, 종양의 크기가 50mm³이상이 되었을 때, 아데노바이러스를 직접 intratumoral injection (5 X 10⁸ pfu)하고 유전자의 발현을 조사하기 위해 LacZ 유전자에 대해서는 B-gal staining (그림 6A)을, Luciferase 유전자에 대해서는 Luciferrin을 투여하여 optical imaging 장비 (Xenogen) 하에서 luminiscence를 측정하였음 (그림6B). 모두 특정인자의 존재하에서만 유전자가 발현되는 양상을 보임.

- 전달 매개체인 특정자 존재 여부에 따라 치료유전자인 HSV-thymidine kinase의 발현이 달라지고 이에 의해 성공적인 종양억제 효과를 유도한 것이라는 것을 검증하기 위하여 CT-26 세포주를 이용한 피하종양모델에, CMV-TK 아데노바이러스를 직접 intratumoral injection (5 X 10⁸ pfu)하고 매일 GCV를 투여하여, 유전자의

발현 및 종양 억제 효과를 관찰하였으며 Thymidine kinase의 발현은 ^{18}F -FHBG probe를 이용 PET-CT fusion imaging으로 검증하였음 (그림 7).

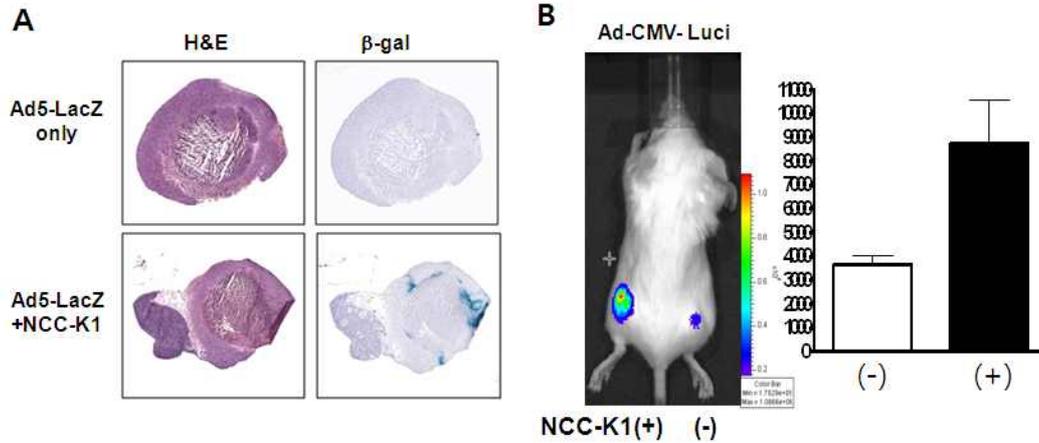


그림 6. NCC-K1에 의한 아데노바이러스(Ad5) 전달효율 증가

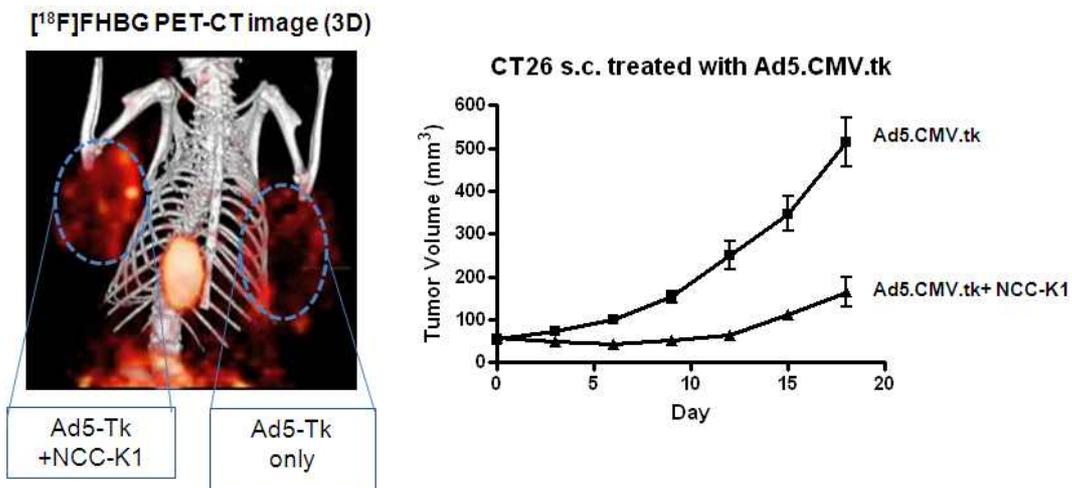


그림 7. NCC-K1에 의한 아데노바이러스 전달효율 증가에 따른 종양억제 효과

3-1-3. NCC-K1에 의한 아데노바이러스 전달 효율의 in vivo monitoring 방법 개발

- 특정인자가 아데노바이러스 전달 뿐만 아니라 자성을 띠고 있으므로 존재여부를 MRI로도 검증할 수 있으므로 T2-조영효과를 보이는 특정인자를 세포에 처리하여 48시간 후, 튜브에 침전시켜 MRI로 관찰하였을 때 그림 8과 같이 현저한 대조 영상이 생성됨.

- GCV를 처리하면서 시간을 두고 관찰한 결과, 6마리를 대상으로 한 mice 실험에서, 공히 특정인자와 함께 thymidine kinase 유전자를 처리한 오른쪽 부위의 종양만이 성장이 저해되는 효과를 얻을 수 있음. Diffusion MR을 시행하여 보면, 양쪽 종양 부위 모두 실험 시작 단계에서는 necrosis 없이 정상적인 상태에서 수행한 것이므로, 이 결과는 NCC-K1에 의해 전달된 아데노바이러스에 의한 것임을 알 수 있음 (그림 10).

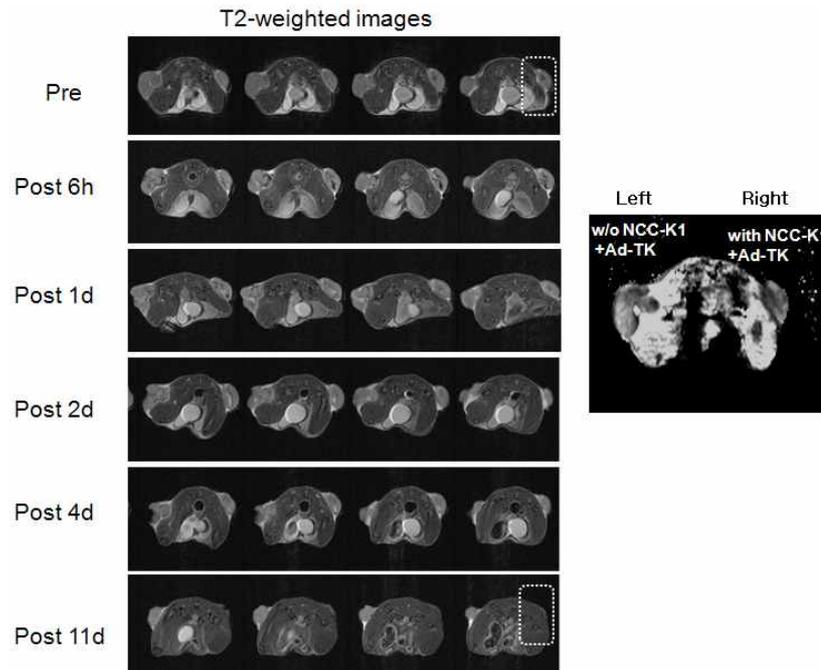
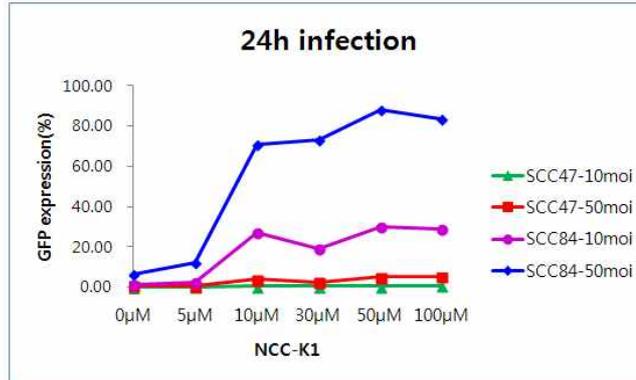


그림 10. 특정인자에 의한 아데노바이러스의 전달 효율의 in vivo 모니터링

3-1-4 세포 감염을 극대화하기 위한 바이러스와 나노 결합의 최적화 농도를 결정하기 위하여 10MOI와 50MOI의 AdCMV.GFP 바이러스를 여러 농도의 나노와 결합하고 두 가지의 세포(SCC47, SCC84)를 감염시키고 24시간 후에 GFP를 발현하는 세포 수를 세었음. 아래의 그림에서 보듯이 10 μ M부터 100 μ M까지 GFP를 발현하는 세포의 수가 변하지 않음. 따라서 NCC-K1이 독성을 최소화하고 바이러스를 세포로 감염시키는 최적의 농도를 10 μ M로 결정할 수 있음.

	NCC-K1 Conc. (μM)					
	0 μM	5 μM	10 μM	30 μM	50 μM	100 μM
SCC47-10moi	0.18	0.30	0.67	0.41	0.76	0.77
SCC47-50moi	0.79	0.64	4.18	2.63	5.16	5.36
SCC84-10moi	1.41	2.51	27.22	19.24	29.87	28.85
SCC84-50moi	6.67	12.44	71.17	73.32	88.09	83.83



10 μM NCC-K1

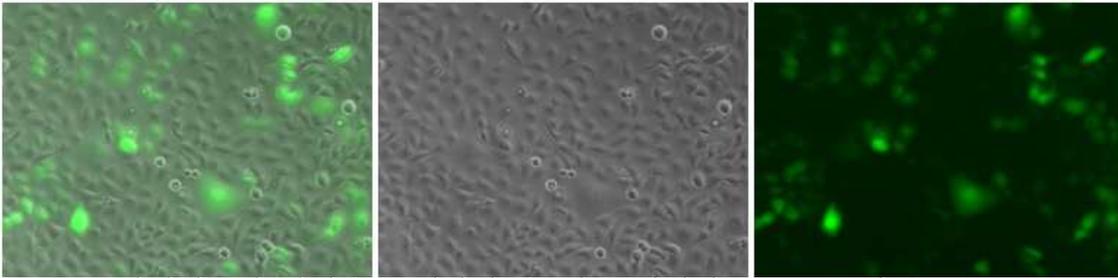


그림 11. 바이러스의 감염을 극대화할 수 있는 최적의 NCC-K1의 농도 10 μM (위)와 NCC-K1의 농도에서 SCC84세포에서 발현하는 GFP 사진(아래)

3-1-5 NCC-K1과 바이러스의 복합체가 효율적으로 세포사멸을 유도하는지를 확인하기 위하여 NCC-K1의 10 μM 과 여러 수의 바이러스를 감염시키고 3일 후에 세포 사멸을 MTT 에세이를 진행하였음. 아래의 그림에서 보듯이 AMC3 세포주를 바이러스와 나노복합체는 효과적으로 세포 사멸을 유도하였으며 나노복합체는 바이러스의 감염을 증가시킴으로써 낮은 수의 바이러스를 가지고 효율적으로 세포 사멸을 유도하였음. 한편, SCC47세포주는 NCC-K1에 의해서 세포 사멸의 효율이 증가하지 않는 것으로 미루어 NCC-K1의 효과는 세포특이적인 것을 확인 할 수 있었음.

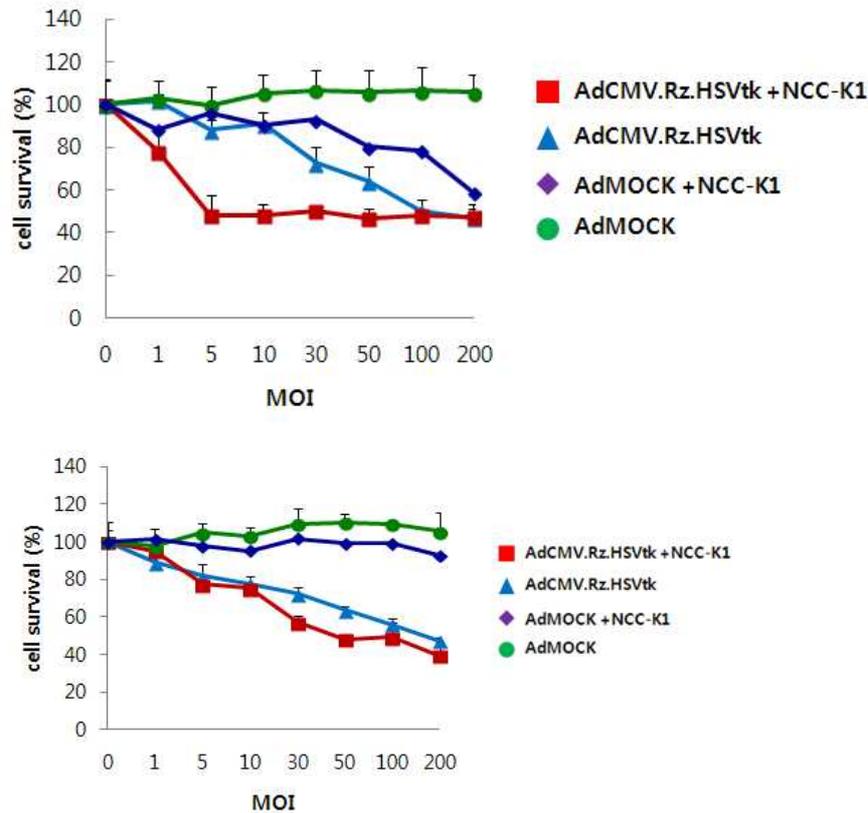


그림 12. 10 μ M의 NCC-K1의 농도에서 AdCMV.Rz.HSVtk에 의한 AMC3(위)와 SCC47(아래) 세포의 사멸

3-2) 아데노바이러스 AdCMV.Rz.HSVtk를 이용한 뇌암의 전임상 시험

3-2-1 AdCMV.Rz.HSVtk에 의한 뇌암 임상 적용을 위한 효능시험

-AdCMV.Rz.HSVtk에 의한 *in vitro* 세포 사멸 효과 확인하기 위하여 바이러스를 여러 농도로 세포를 감염시키고 GCV 존재하에서 세포사멸을 MTT 에세이로 확인하였음. 바이러스는 위에서 언급되었듯이 hTERT를 많이 발현하는 암 세포주를 표적하도록 제작되었으므로 정상세포에는 바이러스의 cytotoxicity가 없는지를 확인하기 위하여 정상astrocyte에 바이러스를 감염시키고 MTT에세이를 수행하였음. 아래의 그림에서 보듯이 바이러스는 정상 astrocyte에 cytotoxicity가 거의 나타나지 않았음.

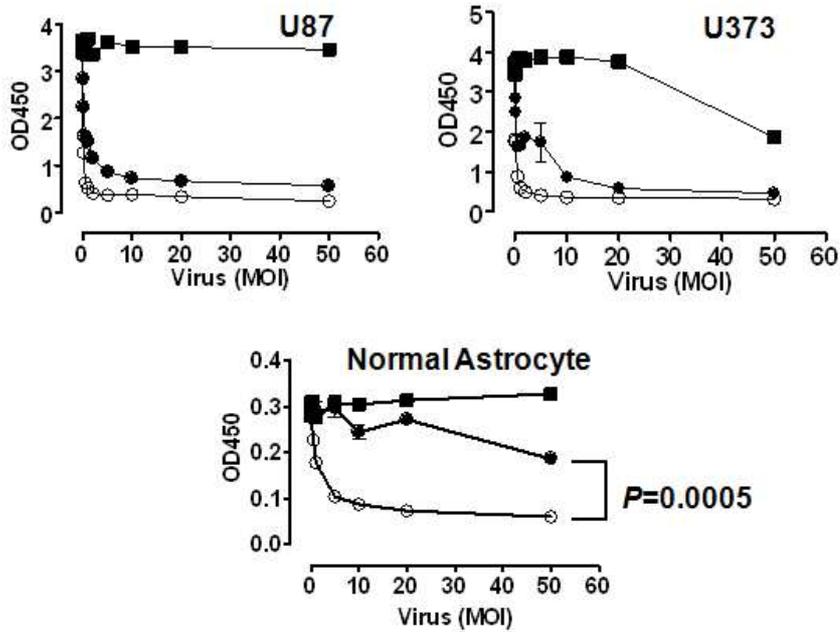


그림 13. AdCMV.Rz.HSVtk에 의한 뇌암 세포주의 세포 사멸. 바이러스의 종양특이적 세포 사멸 효과를 확인하기 위하여 정상 astrocyte를 포함시켰음

-AdCMV.Rz.HSVtk에 의한 in vivo 종양 성장 억제 효과를 확인하기 위하여 U87 세포주를 subcutaneous 종양을 누드마우스에 만들고 5×10^8 pfu 바이러스를 intra-tumoral로 주사하고 종양의 성장을 측정하였음. 아래의 그림에서 보듯이 대조군(AdMOCK으로 처리된 종양)과 비교하여 AdCMV.Rz.HSVtk로 처리된 종양(그림14의 오른쪽)은 성장이 크게 저하되었으며 왼쪽의 사진에서 확인할 수 있음.

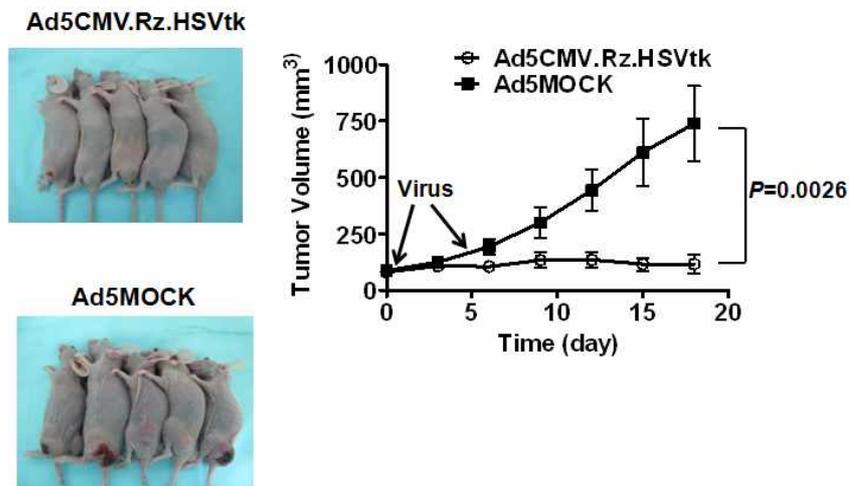


그림14. 누드마우스의 피하에 U87 세포주를 주입하여 xenograft를 만들고

Ad5CMV.Rz.HSVtk 혹은 AdMOCK를 intra-tumoral로 두 차례 주사하고 종양의 성장을 측정하였음(오른쪽). day20에 종양을 가지고 있는 마우스를 사진을 보여 주고 있음(왼쪽)

-뇌실에 종양을 형성 (orthotopic xenograft)하고 바이러스를 뇌실의 종양으로 intratumoral로 주사하여 마우스의 survival을 측정하였음. 아래의 그림에서 보듯이 AdCMV.Rz.HSVtk에 의해서 치료된 마우스의 생존이 크게 향상되었음을 확인 할 수 있었음.

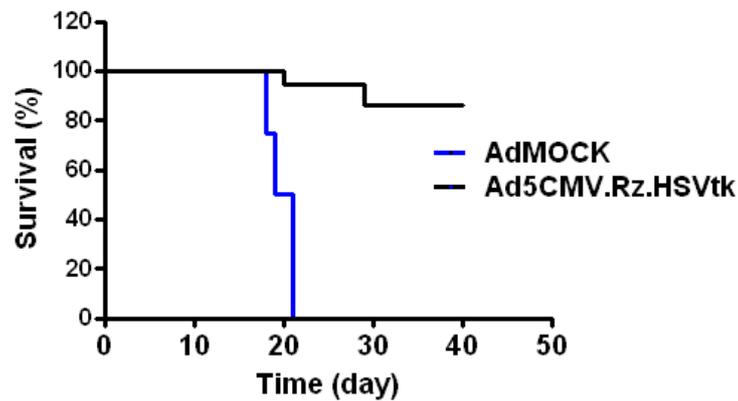


그림15. 누드마우스의 뇌실에 U87 세포주를 이용하여 종양을 만들고 종양을 5×10^9 바이러스로 한번 처치한 후 마우스의 생존을 평가하였음.

-바이러스로 처리된 뇌실의 종양 성장을 확인하기 위하여 일주일 간격으로 마우스의 뇌를 MRI로 확인하였으며, 24일 후에 종양을 수거하여 H&E로 염색하였음. MRI의 영상이미지는 대조군의 바이러스와 비교하여 AdCMV.Rz.HSVtk 바이러스로 처리된 종양이 7일 이후로 성장하지 못함을 확인 할 수 있음.

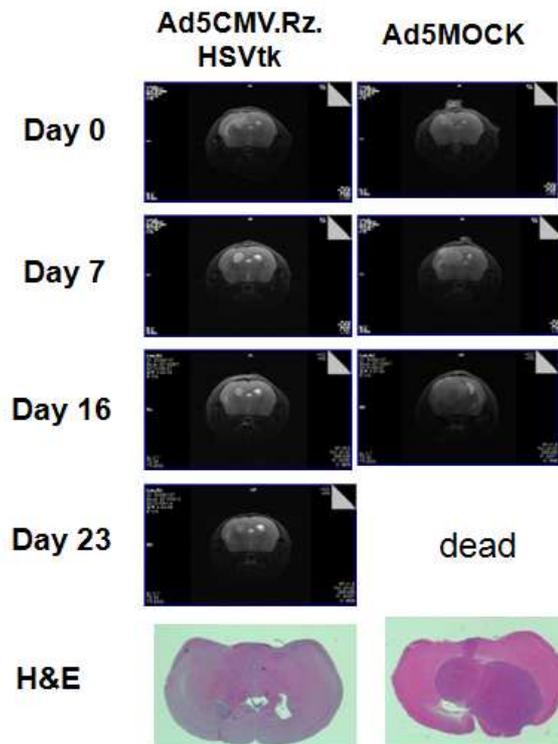


그림16. 바이러스로 처치 한 후 날짜 별로 종양의 크기를 MRI로 측정하였으며, 24일 후에 마우스의 뇌를 고정하여 H&E로 염색하였음.

3-2-2 AdCMV.Rz.HSVtk에 의한 뇌암 임상 적용을 위한 독성시험 (진행중)

-독성시험 프로토콜은 MPI와 협의 하에 작성하고 실험을 진행중이며 아래는 독성 시험의 프로토콜을 정리하였음

1.1.1.Study Director

Jeffrey W. Allen, Ph.D.

Telephone:269-668-3336 ext. 2383

Telefax:269-668-4151

E-mail:jeff.allen@mpiresearch.com

1.1.2.Alternate Contact

Mark D. Johnson, M.S.

Telephone:269-668-3336 ext. 1375

Telefax:269-668-4151

E-mail:mark.johnson@mpiresearch.com

Study Initiation Date: Date Study Director signs Study Approval-Initiation Line in this protocol

Experimental Starting Date (OECD): To be added by amendment

Experimental Start Date: To be added by amendment

Experimental Termination Date: To be added by amendment

Draft Report Mail Date: To be added by amendment

Experimental Completion Date (OECD): Date Anatomic Pathology Contributor report is signed

1.3 Quality Assurance

This study will be subjected to periodic inspections and the data, draft and final reports will be reviewed by the Quality Assurance Department of MPI Research in accordance with MPI Research's Standard Operating Procedures. Study quality assurance inspection records will be made available to the Sponsor Representatives during visits to MPI Research.

1.4 Alteration of Design

Changes to this approved protocol may be made as the study progresses, and all reasonable efforts will be made to discuss necessary changes, in advance, with the Sponsor. Due to the urgent or temporary nature of some protocol changes, the Study Director may authorize a change using a Planned Study Deviation/Event form. The form will describe the change, the rationale for the change, and the effective date (or date range, in the instance of a temporary modification) of the change. Such situations will be considered planned deviations until the protocol amendment is prepared and signed, when applicable. In the instance of temporary modifications where a permanent change to the protocol will not be made, the situation will be considered a planned deviation and no protocol amendment will be issued. Resulting protocol amendments will be signed and dated by the Study Director and will identify the date of Sponsor approval, either written or verbal. Signed protocols and protocol amendments will be issued to the Sponsor and appropriate MPI Research personnel.

1.5. Declaration of Intent

This study may be submitted to the United States Food and Drug Administration (FDA).

2. TEST AND CONTROL ARTICLES

2.1 Description of Test Articles

2.1.1.Identity

DWP455 is a modified replication incompetent adenoviral vector being developed to explore its clinical use as an anti-cancer therapeutic.

A description, lot number, storage conditions, expiration date, safe handling procedures, physical properties, as well as other relevant information will be documented in the study data.

2.1.2. Test Article Properties

The Sponsor will provide documentation on the purity (and/or strength), composition, stability, and other pertinent information on each batch of test article, unless otherwise noted. If the Sponsor does not supply the above information (e.g. certificate of analysis), this will be listed as a GLP deviation in the final report.

2.2 Test Article Preparation

The test article will be received sterile from the Sponsor at the appropriate concentrations in appropriately sized aliquots to allow fresh formulations for each concentration on each day of dosing. Test article will be stored frozen (-50° to -90° C). No adjustment will be made for purity. The formulations must be used within 6hours of thawing.

2.3. Analyses

All analytical work will be conducted by MPI Research, Inc., Mattawan, MI using an analytical method developed by MPI Research and validated under MPI Research Study Number 1951-004. If any results fail to meet the required acceptance criteria per MPI Research SOP ANA-7, the samples will be re-analyzed in accordance with MPI Research SOP ANA-49.

2.4 Reserve Sample

A reserve sample from each batch of test article used in this study will be collected and stored at MPI Research in a secure area with the appropriate environmental controls. If multiple studies are conducted with the same test article, a common reserve sample may be taken and labeled appropriately.

2.5 Test Article Disposition

Any remaining test article will be shipped to a Sponsor-designated location after completion of the study. The Sponsor will be notified prior to such shipment. Alternatively, MPI Research will dispose of the test article after completion of the study (additional cost).

2.6. Adjuvant Article

2.6.1. Identity

Ganciclovir is a synthetic guanine derivative active against cytomegalovirus (CMV). Clinically, following initial DWP455 administration ganciclovir will be administered for approximately 14 days. Ganciclovir sodium is commercially available for intravenous injection as Cytovene-IV®.

A description, lot number, storage conditions, expiration date, safe handling

procedures, physical properties, as well as other relevant information will be documented in the study data.

2.6.2. Adjuvant Article Properties

Documentation of the strength, purity, composition, stability, and other pertinent information on each batch of adjuvant article, will be limited to that information listed on the label of this commercially available material, unless otherwise noted.

2.7. Adjuvant Article Preparation

Ganciclovir (Cytovene-IV[®]) will be provided by the Sponsor. It will be diluted according to enclosed prescribing information with Sterile Water for Injection, USP, to a final concentration of approximately 50 mg/ml. Fresh ganciclovir solutions will be prepared daily and kept at room temperature. All solutions will be used within 24 hours of preparation.

2.8. Description of Control Article

2.8.1. Identity

0.9% Saline for Injection, USP

A description, lot number, storage conditions, expiration date, safe handling procedures, physical properties, as well as other relevant information will be documented in the study data.

2.8.1. Control Article Properties

Documentation of the strength, purity, composition, stability, and other pertinent information on each batch of vehicle, will be limited to that information listed on the label of this commercially available material, unless otherwise noted.

3. TEST SYSTEM

3.1. Species

Mouse

3.2. Strain

CrI:CD1[®](ICR)

3.3. Source

Charles River Laboratories

3.4. Justification of Test System

The current state of scientific knowledge and the applicable guidelines cited previously in this protocol do not provide acceptable alternatives, *in vitro* or otherwise, to the use of live animals to accomplish the purpose of this study. “The development of knowledge necessary for the improvement of the health and

well-being of humans as well as other animals requires *in vivo* experimentation with a wide variety of animal species.” “Whole animals are essential in research and testing because they best reflect the dynamic interactions between the various cells, tissues, and organs comprising the human body.”

The mouse is a frequently used model for evaluating the toxicity of various classes of chemicals and for which there is a large historical database.

3.5. Expected Age

The test animals will be approximately 11 - 12 weeks of age at arrival.

3.6. Expected Body Weight

The males will weigh 35 to 44 g and the females will weigh 26 to 32 g at arrival, as measured within 3 days of arrival. The actual range may vary but will be documented in the data.

3.7. Number of Animals

3.7.1. Number Ordered

Males: 58

Females: 58

3.7.2. Number on Study

Males: 48*

Females: 48*

* Up to 58 animals may undergo surgery to allow for 48 animals on study

3.7.3. Justification for Number on Study

This study was designed to use the fewest number of animals possible, consistent with the objective of the study, the scientific needs of the Sponsor, contemporary scientific standards, and in consideration of applicable regulatory requirements cited previously in this protocol. This study is designed to use the smallest number of animals possible that will allow sufficient group sizes for meaningful statistical analysis of data.

3.7.4. Selection for Study

All animals placed on study will have body weights that fall within $\pm 20\%$ of the mean body weight for each sex. If not enough animals fall within this weight range to satisfy the number of animals required to go on study, the Study Director will be notified to ascertain the appropriate action to be taken.

Animals considered suitable for study will be weighed prior to treatment. After the appropriate number of animals with the highest and lowest body weights has been excluded, the remaining required number of animals on study will be randomized, by sex, into treatment groups using a simple randomization procedure.

3.7.5.Method of Identification

Each animal will be assigned an animal number to be used in Provantis[®] and will be implanted with a microchip bearing a unique identification number. The individual animal number, implant number, and the MPI Research study number will comprise a unique identification for each animal. The animal cage will be identified by the study number, animal number, group number, and sex.

3.8. Husbandry

3.8.1.Acclimation

All animals will be permitted an acclimation period of at least 2 weeks. During this acclimation period, all animals will be observed daily for any clinical signs of disease and all animals will be given a detailed clinical examination prior to selection for study. All animals with any evidence of disease or physical abnormalities will not be selected for study.

3.8.2.Housing

Upon receipt, the animals will be housed 3-4 per cage for several days to allow time to adapt to the automatic watering system. Subsequently, the animals will be caged individually in suspended, stainless steel, wire-mesh type cages. Solid-bottom cages will not be used in general because rodents are coprophagic and the ingestion of feces containing excreted test article and metabolic products or ingestion of the bedding itself could confound the interpretation of the results in this toxicity study. However, during the study, if any animal develops a large mass on the ventral surface or lesions attributable to the wire mesh cage bottoms, the animals will be transferred to solid bottom cages for the remainder of the study or until the lesions have healed or regressed sufficiently for the animals to be returned to wire mesh bottomed cages. These cage changes and the use of nonaromatic bedding, from an approved supplier, will be documented in the study data. Animal enrichment will be provided as described in MPI Research SOP ACU-89. As these animals are being treated with a potential infectious agent, the animals and the waste generated in the animal room will be considered infectious and therefore BSL-2 procedures will be observed.

3.8.3.Environmental Conditions

Fluorescent lighting will be provided via an automatic timer for approximately 12 hours per day. On occasion, the dark cycle may be interrupted intermittently due to study-related activities. Temperature and humidity will be monitored and recorded daily and maintained to the maximum extent possible between 68 to 79° F and 30 to 70%, respectively.

3.8.4.Diet and Drinking Water

3.8.4.1. Basal Diet

The basal diet will be block Lab Diet[®] Certified Rodent Diet #5002, PMI Nutrition International, Inc. This diet will be available *adlibitum* unless designated otherwise. Each lot number used will be identified in the study records.

3.8.4.2. Basal Diet Contaminants

The Study Director is not aware of any potential contaminants likely to be present in the certified diet that would interfere with the results of this study. Therefore, no analyses other than those routinely performed by the feed supplier will be conducted.

3.8.4.3. Water

Tap water will be supplied *adlibitum* via an automatic water system unless otherwise indicated.

3.8.4.4. Water Contaminants

The drinking water used will be monitored for specified contaminants at periodic intervals according to MPI Research SOP CLM-1. The Study Director is not aware of any potential contaminants likely to be present in the water that would interfere with the results of this study. Therefore, no analyses other than those mentioned in this protocol will be conducted.

4. Study Design

Group	Treatment (vp ¹ per animal)	Number of Animals (M/F)	Interventions		Necropsy (M/F)		
					Day 8	Day 22	Day 43
			Intracranial Injection	Ganciclovir (IP twice daily for 14 days)	Day 8	Day 22	Day 43
Toxicology							
1	Control	6/6	X	X	-	-	6/6
2	Ganciclovir only	6/6	-	X	-	-	6/6
3	Low Dose	6/6	X	X	-	-	6/6
4	Mid Dose	6/6	X	X	-	-	6/6
5	High Dose	6/6	X	X	-	-	6/6
Biodistribution/Immunology							
6	Control	3/3	X	X	1/1	1/1	1/1
7	High Dose	15/15	X	X	5/5	5/5	5/5
¹ vp= virus particles							

5. TEST ARTICLE AND VEHICLE ADMINISTRATION

5.1. Route of Administration

The test article and vehicle will be administered by injection into the right corpus callosum.

5.2. Justification for Route of Administration

The intracranial route is a potential route of human exposure to this test article.

5.3. Frequency of Administration

The test article and vehicle will be administered on Day 1 as a single injection into the right corpus callosum.

5.4. Dose Levels

To be determined

5.5. Dose Volume

Total volume will be 5 μ l.

5.6. Justification of Dose Levels

The dose levels will be selected by the Sponsor, or in consultation with the Sponsor, on the basis of available data from previous studies.

5.7. Test Article Administration

The test article and vehicle will be administered via injection into the right corpus callosum.

6. ADUVANT ARTICLE ADMINISTRATION

6.1 Route of Administration

The adjuvant article will be administered by intraperitoneal injection.

6.1. Justification for Route of Administration

The intraperitoneal route is a commonly used route of administration for this adjuvant article with this species.

6.2. Frequency of Administration

The adjuvant article will be administered twice daily, every 12 hours, beginning of Day 2 for 14 days.

6.3. Dose Levels

25 mg/kg ganciclovir every 12 hours

6.4. Dose Volume

Dose volume will be 0.5 ml/kg. For a 40 g mouse, total volume will be 0.02 ml

6.5. Justification of Dose Levels

The dose levels will be selected by the Sponsor, or in consultation with the

Sponsor, on the basis of available data from previous studies.

6.6. Adjuvant Article Administration

The adjuvant article will be administered via intraperitoneal injection twice daily approximately 12 hours apart.

7. Animal preparation

7.1. Preoperative Procedures

Animals will not be fasted. Preoperative procedure will be conducted per SOP SRG-50. Anesthesia will be induced and maintained as indicated in Table 2. The dorsum of the head will be shaved.

7.2. Surgical Procedure

The animal will be mounted in a stereotactic frame. The surgical site will be cleansed with alternating chlorhexidine scrub and solution. A midline incision will be made in the dorsum of the head and the will be reflected laterally from the cranium. The periosteum will be bluntly scraped from the skull. Bregma will be identified and proper coordinates for the right corpus callosum will be located (-0.35 mm to bregma, 1.25 mm to the right of midline). A small hole will be drilled into the skull at the specified coordinates and the tip of a 33 gauge blunt needle will be placed on the surface of the dura. The needle will be lowered 1.0 mm into the corpus callosum. The animal will be dosed with test article or control article in a total volume of 5 µl at a rate of 0.5 µl/min. The needle will be left in place for 15 seconds to prevent back flow of test article up the needle tract. The needle will then be removed. The incision will be closed with absorbable suture and skin glue.

Isoflurane	-	To effect, inhalation by facemask or intubation	-
Buprenorphine	-	0.05 mg/kg SC	-
Dexmetomidine	-	0.03 mg/kg SC	-
Atipamezole	-	0.5 mg/kg SC	-
LRS	-	1 mL SC	-
0.9% NaCl	-	As needed for irrigation	-

*Alternatives may be administered. Any alternative medications including dosage, route and frequency of administration will be recorded in the study data.

Post-operative procedures will be conducted per MPI Research Standard Operating Procedures (SOP) SRG-50.

8. Antemortem Study Evaluations

8.1. Ophthalmoscopic Examinations

All animals in all groups will be examined pretest and all survivors examined again prior to each scheduled necropsy in accordance with MPI Research SOP TOX-61. The ophthalmoscopic examinations will be conducted by a veterinary ophthalmologist.

8.2. Cageside Observations

All animals will be observed at least twice a day for morbidity, mortality, injury, and availability of food and water in accordance with MPI Research SOP ACU-65. Any animals in poor health will be identified for further monitoring and possible euthanasia.

8.3. Detailed Clinical Examinations

A detailed clinical examination of each animal will be performed once daily for Study Days 1-16 then weekly thereafter. Observations will include, but will not be limited to, evaluation of the skin, fur, eyes, ears, nose, oral cavity, thorax, abdomen, external genitalia, limbs and feet, respiratory and circulatory effects, autonomic effects such as salivation, nervous system effects including tremors, convulsions, reactivity to handling, unusual behavior.

8.4. Body Weights

Body weights will be measured and recorded within 3 days of arrival, at least once prior to randomization, and daily for Study Days 1-16 then weekly thereafter during the study in accordance with MPI Research SOP TOX-4.

8.5. Food Consumption

Food consumption will be measured and recorded daily for Study Days 1-16 then weekly thereafter during the study. Food efficiency will be calculated each week food consumption is measured.

8.6. Clinical Pathology

The animals will have free access to drinking water and food prior to blood sample collection. Blood samples (maximum obtainable) will be taken via the orbital sinus after carbon dioxide/oxygen inhalation. The order of bleeding will be alternating (one animal from each dose group, then repeating) to reduce handling and time biases. If samples need to be recollected for hematology or coagulation parameters for sample quality purposes (e.g., clotted sample), animals do not need to be fasted. Due to the sample volume size and the number of tests indicated, it is likely that

not all tests will be completed for all animals. The study data and final report will indicate tests not conducted as insufficient sample where appropriate.

The following clinical pathology tests will be conducted:

8.6.1.Hematology

Three animals per sex per group (Groups 1-5) at termination.

- leukocyte count (total and absolute differential)
- erythrocyte count
- hemoglobin
- hematocrit
- mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration (calculated)
- absolute reticulocytes
- platelet count
- blood cell morphology

8.6.2.Clinical Chemistry

Three animals per sex per group (Groups 1-5) at termination.

- alkaline phosphatase
- total bilirubin (with direct bilirubin if total bilirubin exceeds 1 mg/dL)
- aspartate aminotransferase
- alanine aminotransferase
- urea nitrogen
- total protein
- albumin
- globulin and A/G (albumin/globulin) ratio (calculated)
- glucose
- calcium
- phosphorus

Adrenal glands	X	X	X
Blood	-	-	X
Brain (cerebrum, midbrain, cerebellum, medulla/pons)	X	X	X
Epididymides	-	-	X
Heart	X	X	X
Kidneys	X	X	X
Liver	X	X	X
Lung with bronchi	X	X	X
Lymph Nodes, cervical and inguinal	-	-	X

Ovaries	X	X	X
Pituitary gland	X	X	X
Prostate gland	X	X	X
Salivary gland, mandibular ^c	X	X	X
Salivary gland, parotid	X	X	X
Salivary gland, sublingual		X	X
Seminal vesicles	X	X	X
Spleen	X	X	X
Testes	X	X	X
Thymus	X	X	X
Thyroid gland (with parathyroid) ^e	X	X	X
Uterus with cervix	X	X	X
Vagina	-	-	X
Gross lesions		X	
Tissue masses with regional lymph node ^f		X	

9. Euthanasia

9.1. Moribundity

Any moribund animals, as defined by MPI Research SOP ACU-47, will be euthanized for humane reasons and to prevent the loss of tissues through autolysis. All animals euthanized *in extremis* or found dead will be subjected to a routine necropsy. Where practical, a full set of tissues as listed in the Postmortem Study Evaluations portion of this protocol will be collected and preserved in the appropriate fixative.

Blood samples for clinical pathology as well as one toxicokinetic sample will be collected, if possible, from animals euthanized *in extremis* following veterinary consultation, and processed according to the respective sections of this protocol. If the samples are collected following anesthesia or euthanasia, veterinary consultation is not required prior to collection.

9.2. Methods of Euthanasia

Euthanasia will be by carbon dioxide inhalation followed by an MPI Research SOP (NEC-12) approved method to ensure death, e.g. exsanguination.

9.3. Final Disposition

All surviving animals placed on study will be euthanized at their scheduled necropsy or, if necessary, euthanized *in extremis*. Extra animals obtained for this study, but not placed on study, will be transferred to either an MPI Research stock or training colony, or euthanized and discarded. The final disposition of each animal will be

documented in the study records.

10.1. Tissue Collection for qPCR

One animal/sex in Group 6 (control) and five animals/sex in Group 7 designated for qPCR analysis will be euthanized after 8, 22 and 43 weeks of treatment. Approximately 1 mL of blood and tissues samples will be collected (200–300 mg or complete organ if less than 300 mg). One section of each tissue (for biodistribution analysis) will be placed in labeled cryovials, snap-frozen in liquid nitrogen, and then stored on dry ice or at approximately -50 to -90°C until analyzed by the Cellular and Molecular Biology Lab at MPI Research. Care will be given to ensure that cross contamination between tissues does not occur. Gloves will be changed between collection and dissection of each tissue for PCR analysis. In addition, non-disposable instruments will be wiped down with a 10% bleach solution, rinsed with water followed by a wipe down of 100% ethanol between groups. The cutting board will be wiped down with a 10% bleach solution, rinsed with water followed by a wipe down of 100% ethanol between each of the above organs. Any remaining tissue from each organ listed below will be placed in a separate vial and frozen for possible later evaluation. All collected samples will be stored frozen at -70°C . Samples will be collected from the following tissues:

- Blood
- Brain
- Epididymides
- Heart
- Liver
- Lung
- Lymph nodes (cervical and inguinal)
- Ovary
- Prostate
- Seminal vesical
- Thymus
- Testes
- Uterus
- Vagina

10.2. Blood Collection

The animals will have free access to drinking water and food prior to sample collection. Blood samples (maximum obtainable) will be collected via the vena cava after carbon dioxide inhalation at designated termination. The blood samples will be split into two equal aliquots. One aliquot will be placed into a tube containing

K₂EDTA and stored frozen at -80°C until qPCR analysis. The second aliquot will be placed in non-additive tubes and then stored frozen at -70°C until transfer to the MPI Research Immunology lab for analysis.

10.3. PCR Blood/Tissue Analysis

qPCR will be performed on tissues and blood using the methods qualified under MPI research study number 1951-004. Tissue and Blood collected from designated animals at 8, 22 and 43 days after treatment will be subject to DNA isolation and PCR analysis. Tissues will be processed, nucleic acid extracted, and DNA concentration and purity measured by UV absorbance. Samples will be analyzed in triplicate with up to 1µg of genomic DNA per well. In the event 1µg cannot be analyzed due to low yield, the maximum of DNA available will be analyzed. One replicate will be spiked with a known number of copies of the target gene. If PCR inhibitors are detected in a given specimen's DNA, it will be reanalyzed using less DNA.

Assessment of adenovirus integration into host DNA will be performed as a non-GLP exception if evidence of persistence of the virus over time exists. Persistence of the virus in tissue and blood will be evidence by similar DNA concentration at 4 and 13 weeks.

10.4. Immunogenicity Analysis

As detailed in section 10.2., blood from one animal/sex in Group 6 (control) and five animals/sex in Group 7 designated for immunogenicity analysis will be collected after 8, 22 and 43 day of treatment and processed to serum for quantification of anti-nuclear antibodies, anti-adenovirus antibodies and anti-double-stranded DNA antibodies. Immunogenicity analysis will be performed on blood samples using the methods qualified under MPI research study number 1951-005.

10.5. Histopathology

Complete necropsy examinations will be performed under procedures approved by a veterinary pathologist on all animals found dead, euthanized *in extremis*, or euthanized at scheduled necropsies in accordance with MPI Research SOP NEC-4 2. Examinations will be performed 7 days a week. Animals that are found dead after regular working hours will be refrigerated overnight and necropsies performed at the start of the next working day. At the termination of the study (Day 43) all appropriate animals will be euthanized and examined.

The animals will be examined carefully for external abnormalities including palpable masses. The skin will be reflected from a ventral midline incision, and any subcutaneous masses will be identified and correlated with antemortem findings. The abdominal, thoracic, and cranial cavities will be examined for abnormalities and the organs removed, examined, and, where required, placed in neutral buffered formalin, except that the eye including optic nerve and testes will be fixed using a

modified Davidson's fixative. Formalin will be infused into the lung via the trachea and into the urinary bladder.

Body weight and the organ weights identified in the following table will be recorded for all animals at scheduled necropsies, excluding animals from biodistribution groups, and appropriate organ weight ratios will be calculated (relative to body and brain weights). Paired organs will be weighed together. Organs will not be weighed for animals found dead or euthanized *in extremis*. A combined weight of the thyroid gland with bilateral parathyroid glands will be obtained, and the right mandibular/sublingual salivary glands will be weighed together. The thyroid/parathyroid gland and pituitary gland will be weighed following fixation.

Microscopic examination of fixed hematoxylin and eosin-stained paraffin sections will be performed on sections of tissues indicated in all animals found dead or euthanized *in extremis*.

Representative samples of the following listed tissues will be collected and placed in the appropriate fixative for possible future examination (additional cost).

Organs or Tissues to be Weighed, Preserved, and Microscopically Examined

Adrenal glands	X	X	X
Blood	-	-	X
Brain (cerebrum, midbrain, cerebellum, medulla/pons)	X	X	X
Epididymides	-	-	X
Heart	X	X	X
Kidneys	X	X	X
Liver	X	X	X
Lung with bronchi	X	X	X
Lymph Nodes, cervical and inguinal	-	-	X
Ovaries	X	X	X
Pituitary gland	X	X	X
Prostate gland	X	X	X
Salivary gland, mandibular ^c	X	X	X
Salivary gland, parotid	X	X	X
Salivary gland, sublingual		X	X
Seminal vesicles	X	X	X
Spleen	X	X	X
Testes	X	X	X

Thymus	X	X	X
Thyroid gland (with parathyroid) ^e	X	X	X
Uterus with cervix	X	X	X
Vagina	-	-	X
Gross lesions		X	
Tissue masses with regional lymph node ^f		X	

^cThe combined weight of the right mandibular/sublingual salivary gland will be obtained.

^eParathyroid glands cannot always be identified macroscopically. They will be examined if in the plane of section and in all cases where they are noted as grossly enlarged.

^fA regional lymph node drains the region where a tissue mass is located. A regional lymph node may not always be identified when a mass is present.

11. STATISTICS

<Statistics>

12. STUDY REPORTS

12.1. Progress/Status Reports

Regular progress reports will be submitted to the Sponsor throughout the study. The frequency of these reports will be determined after consultation with the Sponsor.

12.2. Final Report

After completion of the study, a comprehensive draft report containing the results of all tests, analyses, observations and measurements required by this protocol, and an interpretative summary of the study results will be submitted to the Sponsor. The report will include all items required by the applicable regulatory agency. After resolution of any Sponsor comments, 1 electronic copy (PDF) of the final report will be issued.

Six months after issuance of the draft report, if no requested revisions or instructions to finalize have been communicated by the Sponsor, the draft report will be issued as a final report, signed by the Study Director, and submitted to the Sponsor. Any modifications or changes to the draft report requested 6 months after issuance of the draft will be performed at additional cost to the Sponsor.

13. DATA AND SPECIMEN RETENTION

All raw data, documentation, records, protocol, specimens, samples and the final

report generated as a result of this study will be retained at MPI Research or an MPI Research contracted archive facility for a period of 1 year following the issuance of the draft report. The Sponsor will be contacted annually by MPI Research Archive staff regarding the retained material and will be responsible for the incurred costs for the return, disposal, or continued storage of any study generated material retained after that time.

14. ANIMAL WELFARE

MPI Research is committed to complying with all applicable regulations governing the care and use of laboratory animals. Animal welfare for this study will be in compliance with the U.S. Department of Agriculture's (USDA) Animal Welfare Act (9 CFR Parts 1, 2 and 3). *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, Washington, D.C., 2011, will be followed. This facility maintains an Animal Welfare Assurance statement with National Institutes of Health, Office of Laboratory Animal Welfare.

To ensure compliance:

- A. This protocol will be reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) before animal receipt or transfer.
- B. The Sponsor, by his or her approval, attests that the activities specified in this protocol do not unnecessarily duplicate any previous experiment.

“Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training”, Federal Register, 1985 May 20; 50(97).

“Position Statement on the Use of Animals in Research”, 1993 Feb 26; NIH Guide 22(8).

Franklin, K.B.J. and Paxinos, G. (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Third Edition. New York: Elsevier.

Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol.* 2002 Jul-Aug;30(4):524-33.

3-3) HGF 중화 항체의 전임상 시험

3-3-1. 생체 효능 (적응증 추가) 연구

- 적응증 추가를 위해 NSCLC (비소성폐암), sarcoma (육종), GC (위암), HCC (간암) 등 HGF/Met signaling이 암 진행에 관여하는 암종을 중심으로 다양한 방법으로 동물 모델 확립.
- Sarcoma의 경우 HGF를 secretion하므로 autocrine loop을 이용하고 NSCLC

와 GC의 경우 HGF의 수용체인 c-Met은 발현이 되나 HGF를 발현하지 않기 때문에 HGF를 secretion하는 MRC-5 (human lung fibroblast)를 함께 sc injection하여 tumor를 만들고 MRC-5가 함께 존재할 때 증가된 tumor growth를 HGF항체가 inhibition하는 지 확인함. HCC cell line의 경우 NSCLC, GC와 같이 c-Met만을 발현하여 MRC-5를 함께 injection하여 model을 만드는 것을 시도하였으나 MRC-5의 존재가 tumor growth를 증가시키지 못해 HGF 과발현 세포주를 만들어 동물모델을 확립함.

- 확립된 모델을 이용하여 HGF 항체가 선별된 암종에 효과가 있는지 확인한 결과 NSCLC, sarcoma 모델에서 HGF 항체가 tumor 성장을 억제하는 것을 확인함.
- NSCLC의 경우, H1975 cell line을 MRC-5와 함께 injection하여 tumor 성장이 증가하였으며 HGF항체에 의해 증가된 tumor 성장이 억제되는 것을 확인함 (그림 17).

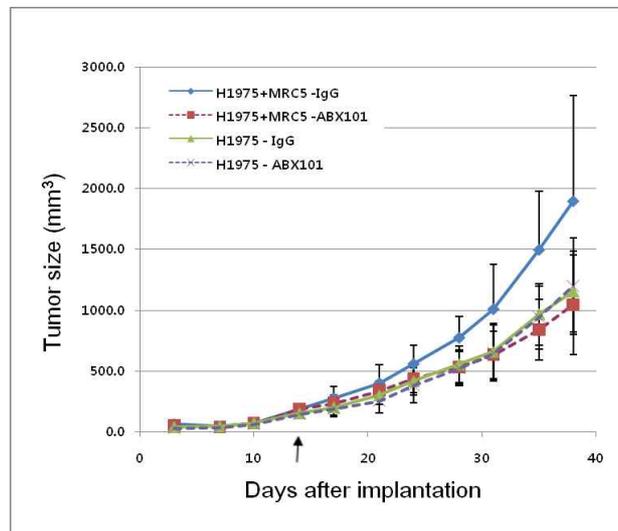


그림 17. NSCLC model에서 HGF 항체에 의한 tumor 성장 억제

- SK-LMS-1을 이용한 leiomyosarcoma model에서는 HGF 항체 1mg/kg이상에서 tumor 성장 억제효과를 보였음 (그림 18).

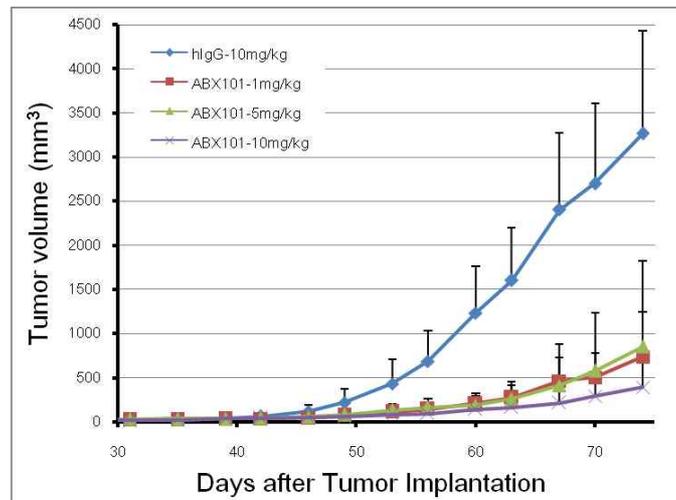


그림 18. Sarcoma model에서 HGF항체에 의한 tumor 성장 억제

3-3-2. HGF 중화항체의 epitope mapping

- HGF는 그림3과 같이 5개의 domain (N, K1-4)을 가진 a-chain과 SPH domain을 가진 b-chain으로 구성되어 있으며 c-Met과의 결합에 a-chain과 b-chain이 모두 관여하는 것으로 알려져 있음. a-chain 중 특히 NK1이 결합에 중요할 것으로 여겨지며 이를 통해 strong 결합이 이루어지고 b-chain을 통해 weak 결합이 이루어진다고 보고되어 있음.
- HGF 항체가 HGF의 어느 부분에 결합하는 지 epitope을 mapping하고자 N, K1, NK1, K2-4, SPH domain을 cloning하여 glycosylated protein이므로 mammalian cell에서 발현, 정제하였음.
- SPR을 통해 각 domain과 HGF 항체와의 결합을 확인한 결과, NK1 domain에 강하게 결합하며 K2-4 domain에는 아주 약하게, SPH domain에는 결합하지 않는 것을 확인하였음 (그림20). N, K1 domain에는 NK1보다는 약간 낮은 결합을 보였음.

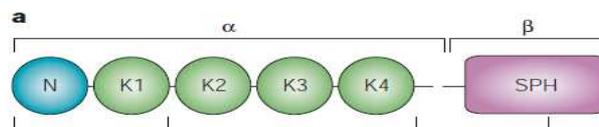


그림 19. HGF domain 구조

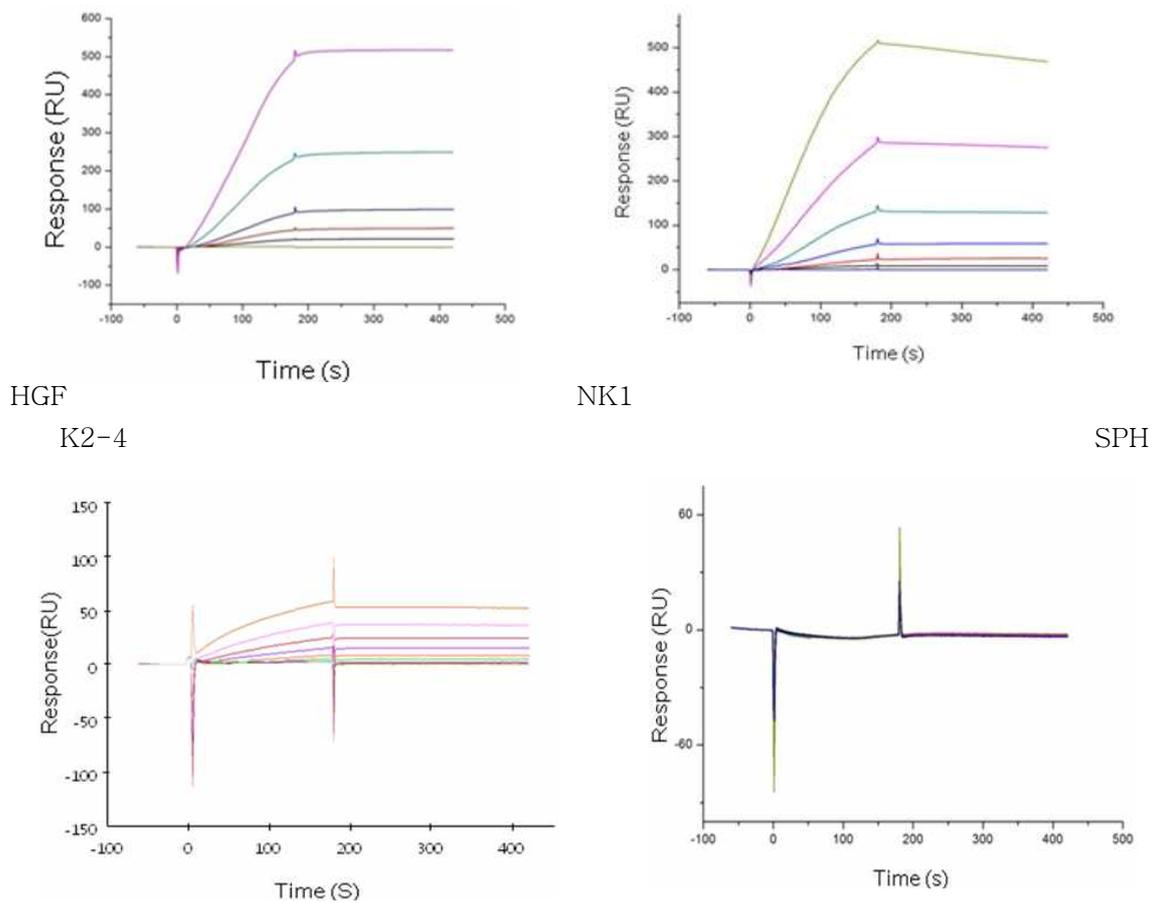


그림 20. HGF항체의 epitope mapping 결과. HGF 항체는 HGF의 N-terminal domain인 NK1과 결합함.

3-3-3. 항체 생산 세포주 개발 및 banking

- 항체 생산 세포주 안정성 연구: 개발된 항체 생산 세포주를 계대하면서 세포수, viability, 항체 titer (생산량)를 측정하여 생산 세포주의 안정성 연구를 수행함. 그림 20와 같이 passage 40부터 passage 80까지 안정한 viability, cell density, titer를 유지함.

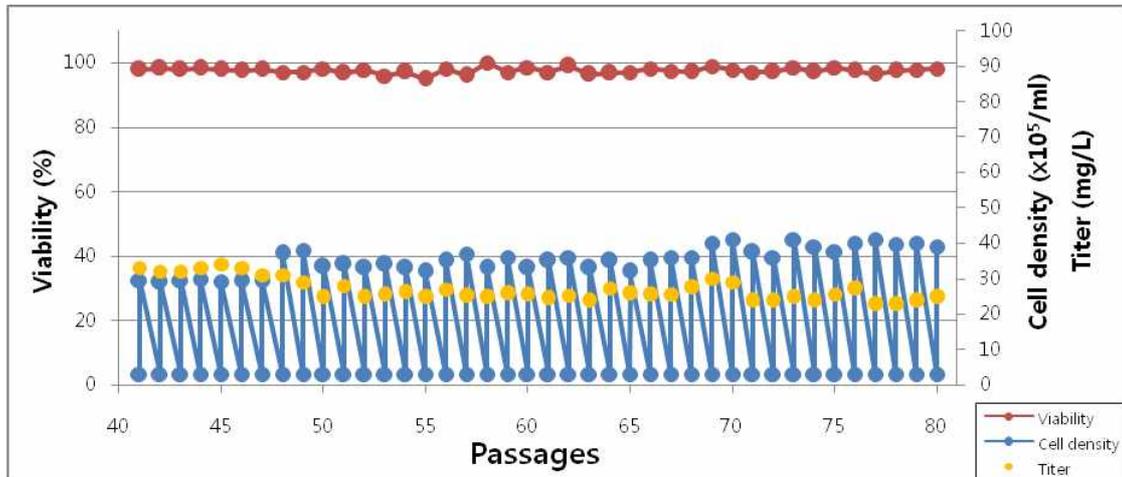


그림 21. 생산 세포주의 성장, 항체 생산 안정성

- Passage 40, 50, 60, 70, 80 세포를 shake flask에서 6일동안 batch culture하여 항체 생산성 (productivity)을 확인한 결과 80mg/L를 유지하는 것으로 확인되었음 (그림 21).

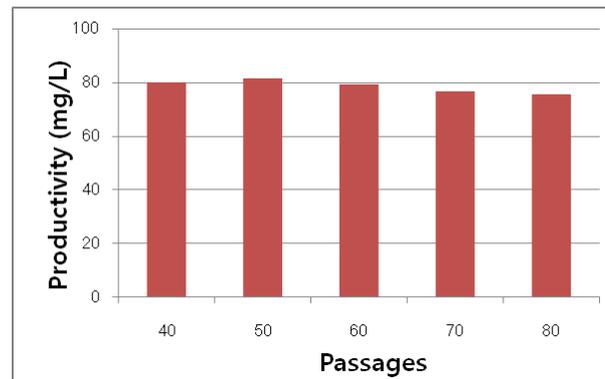


그림 22. 각 passage 세포의 항체 생산성 (batch culture 결과)

- Cell banking (MCB, WCB): 검증된 CRO를 통해 GMP 시설에서 master cell bank, working cell bank를 각 200 vial씩 제작함.

- 세포주 characterization (MCB, WCB): master cell bank, working cell bank에 표 1의 항목과 같이 확인 (Identity), 세포의 형태 (Morphology) 및 성장특성, sterility (세균, 진균, mycoplasma), 외래성 오염인자 (adventitious virus) test 등 특성분석을 수행함.

표 1. Characterization 분석 항목

시험항목	시험대상		
	MCB	WCB	EOPC
확인 (Identity)	+	+	+
안정성(Stability)	+		(+)
세포형태 (Morphology)	+	+	+
성장특성 (Growth characteristics)	+	+	+
유전적 안정성 (genetic stability)	+	-	(+)
세포유전학 (cytogenetics)	(+)	(+)	(+)
무균(sterility)			
세균, 진균	+	+	+
마이코플라즈마/스피로 플라즈마	+	+	+
마이코박테리아	(+)	(+)	(+)
외래성 오염인자 (Adventitious agent)			
체외시험 (<i>in vitro</i> assay)	+	+	+
체내시험 (<i>in vivo</i> assay)	+	+	+
TEM	+	-	+
Antibody production assay	(+)	-	(+)
Bovine viruses	(+)	(+)	(+)
Porcine viruses	(+)	(+)	(+)
Retroviruses	+		+
Tests for specific viruses	(+)	-	+
종양형성능 (tumorigenicity)	(+)	-	+
발암원성 (oncogenicity)	(+)	-	(+)

(+) : 필요한 경우 시험 할 수 있음

3-3-4. 공정 개발 연구

: Scale-up 과정을 통하여 기 설정된 배양 및 정제법을 적용하여 실제 항체 생산 세포주에서 trial batch를 진행하여 항체를 생산함. 이 후 생산된 항체를 기준 및 시험법 전 항목 및 특성분석을 위한 실험을 진행하여 실제 공정 적용 가능성을 파악하고 각 step별 문제점 발생 시 이를 해결하기 위한 추가 보완 실험을 실시하여 pilot scale의 공정 설정을 진행함.

1) 생산세포주의 배양 공정 설정

: 기존 예비 세포주를 이용하여 설정된 각종 배양 변수를 생산 세포주에 적용하여 최적의 배양 조건을 설정함

- 배지 조건 설정 : Basal Media, Feed Media, Glucose, Glutamine 농도 등
- Feeding 방법 설정 : Feed media, glucose 및 glutamine feeding 농도 및 시기 설정
- 물리적 변수 설정 : 배양 온도, pH, DO, stirring speed 등 물리적 변수 조절

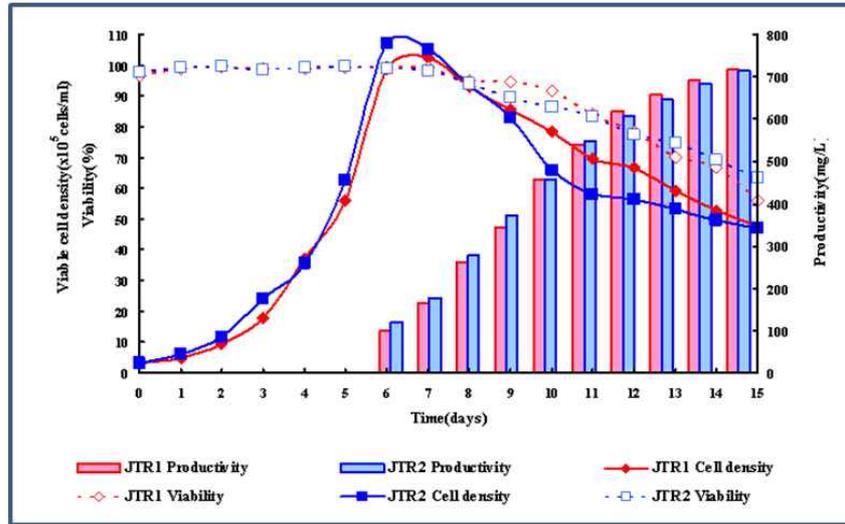


그림 23. 5L scale Jar type bioreactor를 이용한 생산세포주의 배양공정 설정 결과 예. Feed Media (15% --> 20%)의 농도 및 용존산소량의 증가 (50% --> 70%)를 통하여 기존 조건에서 550mg/L에서 700mg/L로 발현양이 증가되고 세포 생존률도 높아짐. JTR1 : Feed media 20%, DO 70%, JTR2 : Feed media 20%, DO 50%

2) 배양 공정의 Scale-up 및 공정 적용

: 생산 세포주를 이용하여 설정된 공정변수를 적용하여 5L --> 50L --> 200L scale 의 배양을 진행하여 200L scale 까지 Scale up을 완료함

배양 scale	세포배양기의 종류	배양 일수	최대 세포수 (cells/ml)	생산항체량 (mg/L)
5L	Jar type bioreactor	13일	1.5×10^7	600 ~ 700
50L	Single use bioreactor	14일	1.5×10^7	550
200L	Single use bioreactor	14일	1.3×10^7	630

표 2. 생산 세포주의 배양공정 scale-up 결과에 대한 요약. 기존 5L scale 에서 설정된 배양 공정 변수가 200L scale까지 동일한 성장곡선을 보이며 유사하게 적용되었으며, 최대 세포수, 생산량 측면에서 유사한 결과를 보임.

3) 정제 공정의 설정

: 생산 세포주 배양액을 이용하여 기존 설정된 정제 변수를 적용하여 200L scale 로 정제공정을 진행하고 품질 규격을 만족하는 것을 확인하여 200L scale 까지 scale up을 완료함

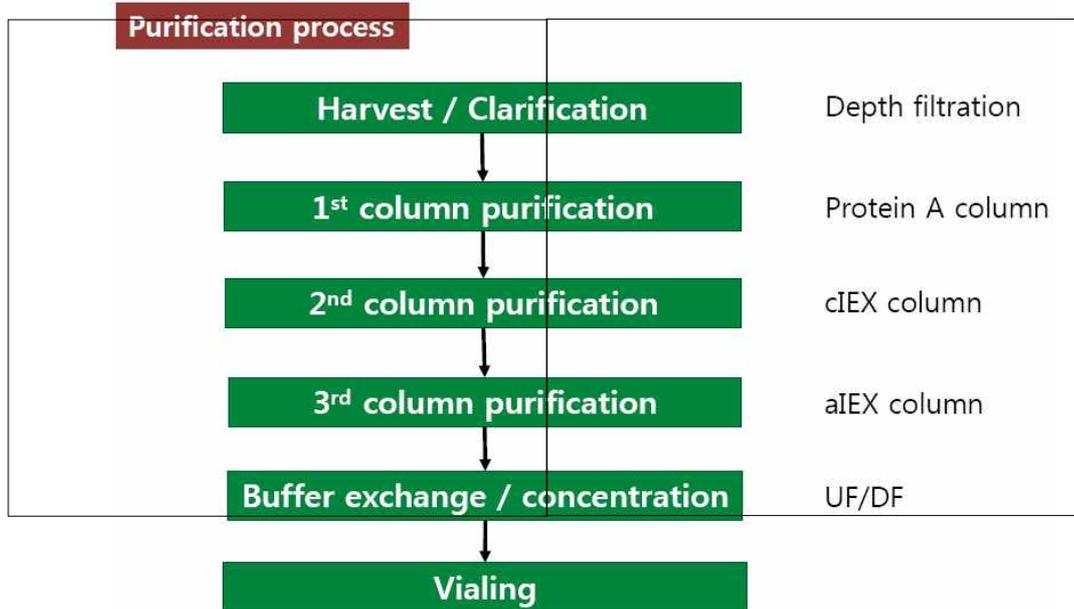
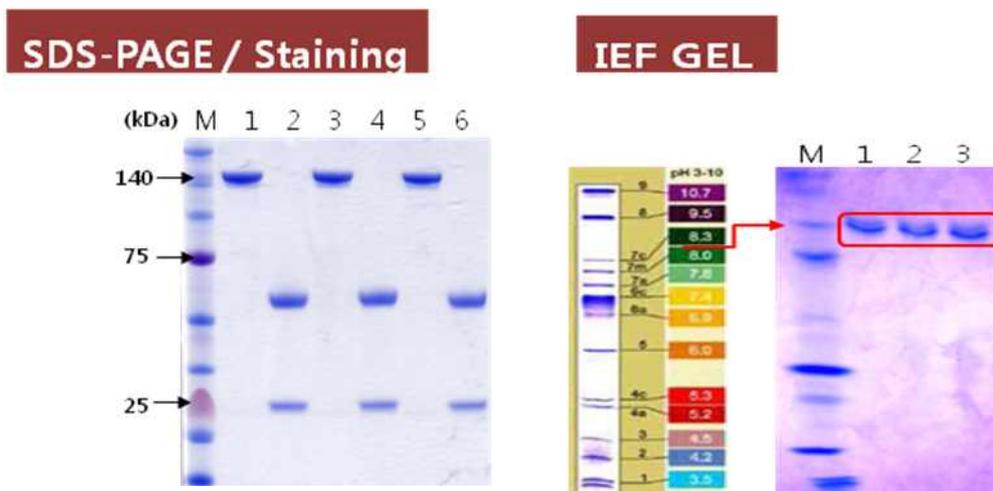


그림24. 설정된 정제 공정 Process의 순서도. 전체공정의 최종 수율은 50%이상, 설정된 기준 및 시험 방법의 분석항목의 기준에 적합함을 확인



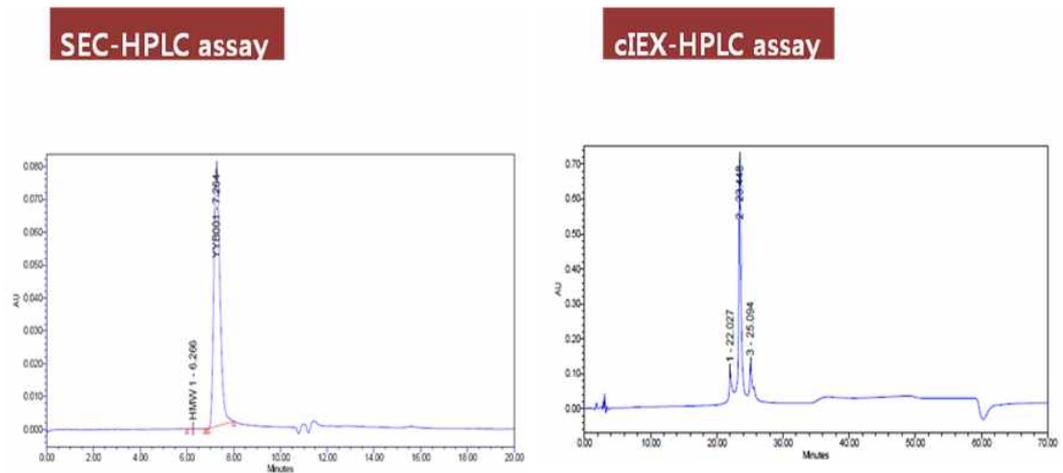


그림 25. 정제된 항체의 품질 및 성질 규명을 위한 분석 결과. 순도 및 활성 측면에서 기준 및 시험 항목을 만족하는 우수한 품질을 보임으로서 설정된 정제공정을 확인함

3-3-5. 제형개발 및 항체의 특성 분석

: 후보물질의 제제화를 위하여 buffer조건과 각종 부형제 및 첨가제를 선별하여 제형 개발을 진행하고, 이를 이용하여 예비 안정성 시험을 진행하였으며, 후보물질의 peptide mapping, 당분석, 등전점 분석 등 허가 진행을 위한 특성 분석을 완료함.

1) 제형 선정

: 각종 부형제 및 첨가제를 혼합하여 여러 가지 제형을 제조하고 각 제형별로 항체의 효능, 특정 온도에서 일정 시간 동안의 안정성, agitation, freezing/thawing 시 안정성 자료를 확보하여 최종 제형을 선정함.

① Buffer

- 20mM Sodium phosphate, 150mM NaCl, pH 7.0
- 20mM Sodium citrate, 150mM NaCl, pH 6.8

② pH range

- pH 3.5 ~ pH 7.5 using citrate, phosphate buffer

③ Additive / Detergent

- Arginine : 0.1, 0.2, 0.3, 0.4M
- Histidine : 0.1, 0.2, 0.3, 0.4M
- rHSA : 2.5mg/ml, 5.0mg/ml, 10mg/ml
- Polysorbate 80 : 0.07, 0.05, 0.035, 0.025%
- Polysorbate 20 : 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125%

--> 각 조건의 조합으로 후보물질의 물리적 안정성, 활성 등을 검토하여 최종적으로

로 20mM Sodium phosphate, 150mM NaCl, pH 7.0 with 0.01% Tween 20을 최종 제형으로 선정함.

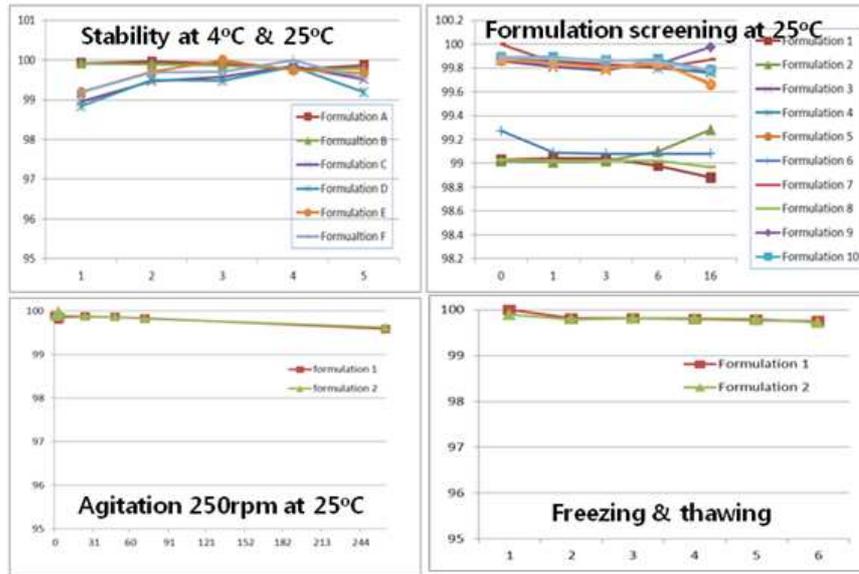


그림 26. 제형선정의 각 제형별 예비 안정성 시험 후 SEC를 이용한 각 보존조건에서 soluble aggregate 분석결과, 특정 제형에서 5주간의 안정성 확인 결과를 이용하여 최종 제형을 선별.

2) 후보물질의 안정성 시험

: 선정된 최종 제형을 이용하여 실제 보존 조건 및 가속 시험 조건에서 각 배치별, 농도별 조건에서 안정성 시험을 진행 중에 있으며, 선정된 제형에서 5개월 이상 안정성을 확보함

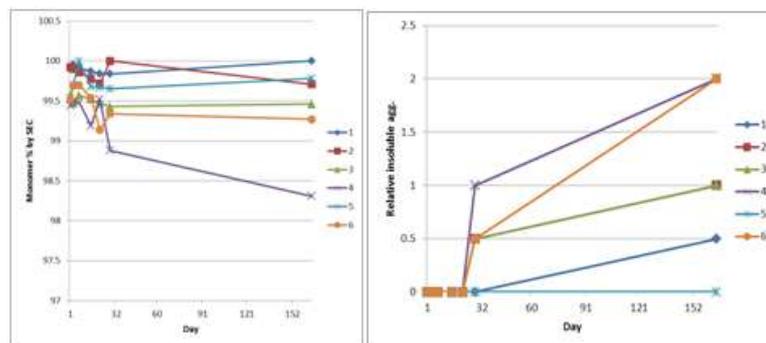


그림 27. 최종제형 조건에서 각 batch 및 농도별 soluble 및 insoluble aggregates 분석결과. 5개월 이상 안정성 시험 진행 중이며 후보물질의 농도가 증가할수록 안정성이 감소하는 경향을 보임.

3) 항체의 물리화학적 성상 규명

: 항체 물리화학적 특성 규명을 위한 방법으로 LC mass를 이용한 intact mass analysis, peptide mapping, 당구조 분석 및 capillary electrophoresis를 이용한 단백질의 고차구조 및 변이체 생성유무 등을 확인하였음.

Mass analysis

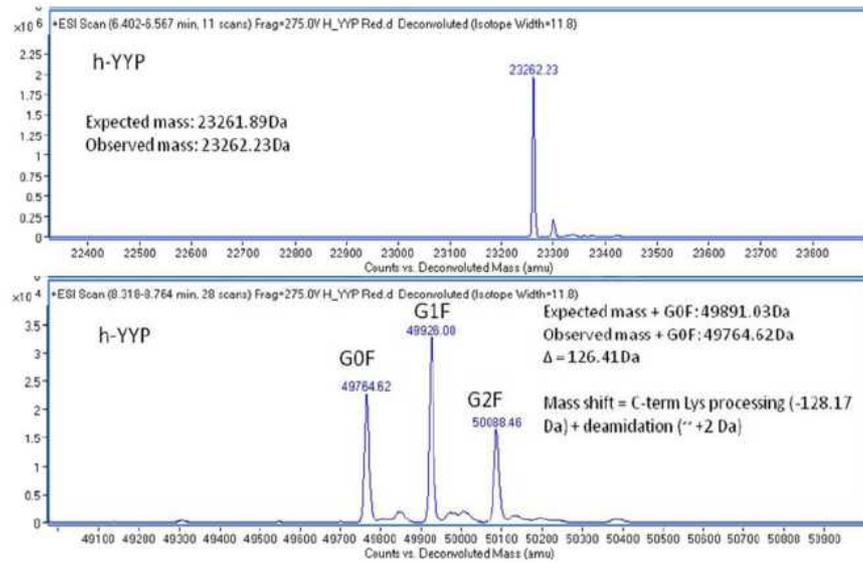


그림 28. ESI Q-TOF을 이용한 후보물질의 intact mass analysis와 당분석 결과. Light chain의 경우 예상 값과 동일한 23262.23Da 이었으며, Heavy chain의 경우는 49764.62Da으로 이는 C-terminal Lys processing 과 deamidation의 결과로 해석됨.

P Peptide mapping – LC-MS/MS

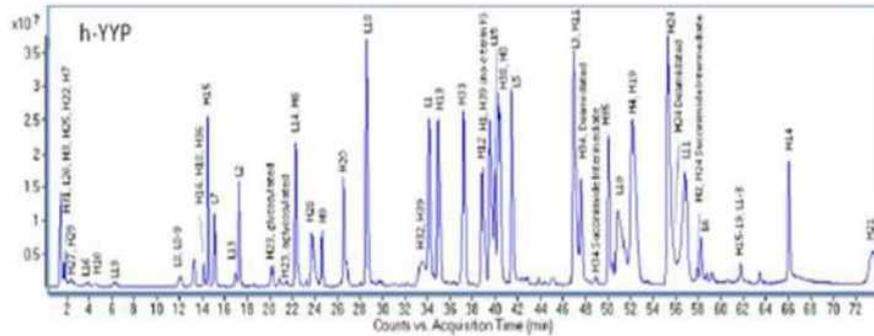


그림 29. Trypsin digestion 후 ESI Q-TOF을 이용한 Peptide mapping 결과. 전체 sequence 중 Heavy chain은 98.2%, Light chain은 96.2%의 아미노산 서열을 분석하였으며, 예상된 염기서열과 정확히 일치하여 제조된 후보물질을 확인할 수 있었음.

cIEF

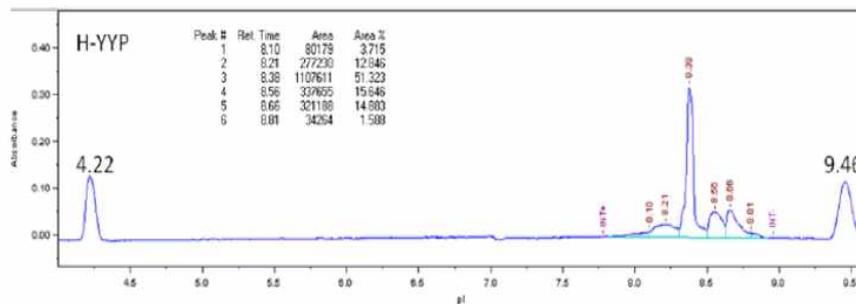


그림 30. cIEF을 이용한 후보물질의 pI 값 결정. 측정된 후보물질의 pI값은 8.38이었음.

3-3-6. 대량 생산

1) 예비독성 시험 진행을 위한 50L scale 시료 생산

: Scale-up 과정을 통하여 기 설정된 배양 및 정제법을 적용하여 예비독성 시험용 시료를 50L scale 배양을 통하여 제조하였으며, 기준 및 시험법에 만족하는 시료를 예비독성 시험 및 TCR에 이용하였으며, 설정된 공정변수를 활용하여 200L 비임상 시료 제조에 활용함.

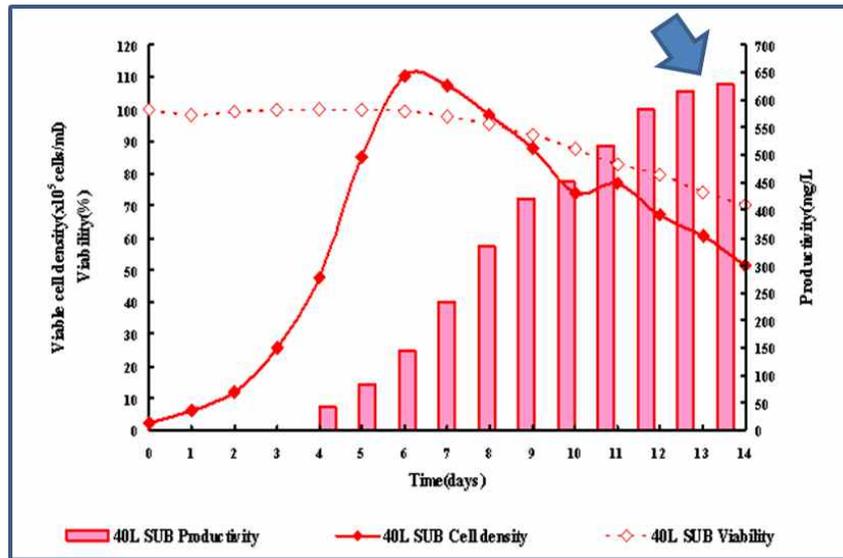


그림 31. 시료 생산을 위한 배양공정. 설정된 배양공정을 50L scale SUB에 적용하였으며, 발현양은 650mg/L, 최대 세포수는 1.2×10^7 /ml이었음.

표 3. 예비독성 시료 제조용 정제 공정 (최종 수율은 44%, 약 12g의 시료 확보)

	cIEX	mAb (mg)	Yield(%)
Harvest		26961	-
Depth filter		17553	65.11%
Protein A		15378	87.61%
Protein A-Depth filter		14265	92.76%
cIEX		13331	93.46%
aIEX		13527	101.47%
Concentration/Buffer exchange		12036	89.0%
		12036	44.6%

표 4. 제조된 예비독성 시험용 시료의 기준 및 시험법 결과

시험과목	기준	단위	결과	판정
성상	무색 혹은 약간 황색의 투명 액체	해당없음	무색의 투명 액체	합격
pH	6.4 – 7.5	해당없음	7.2	합격
엔도독신	≤ 0.5	EU/mg	0.08	합격
SDS-PAGE (환원)	표준품과 동일	해당없음	-	합격
SDS-PAGE (비환원)	표준품과 동일	해당없음	-	합격
Western blot	표준품과 동일	해당없음	-	합격
IEF	표준품과 동일	해당없음	-	합격
Binding ELISA	표준품과 동일	해당없음	-	합격
UV Spectrophotometer	실측치	mg/ml	12.3	해당없음
Bioassay	80 – 120	%		
IE-HPLC	표준품과 동일	해당없음	-	합격
SE-HPLC	≥ 98	%	99.71	합격
잔류 host cell protein	≤ 100	ng/mg	0.12	합격
잔류 protein A	≤ 100	ng/mg	0.158	합격

2) GLP 반복독성 시험 진행을 위한 200L scale 시료 생산

: Scale-up 과정을 통하여 기 설정된 배양 및 정제법을 적용하여 GLP 독성 시험용 시료 제조를 위해 200L scale 배양 및 정제 공정을 진행하였음. 기준 및 시험법에 만족하는 시료를 63g 제조하였고, 향후 3 batch를 더 진행하여 GLP 반복독성 시료로 활용할 계획임.

- 대량 생산된 항체를 표준품 제작, 안정성 시험, 전임상 시험에 활용함.
- 50L 배양공정 --> 200L scale up 배양 진행: Xcellerex 200L SUB 이용.
- Scale up 정제 공정 진행: 대전 테크노파크, AKTA process 이용.
- 배양 및 정제 공정: 50L scale 공정 변수 재현
- 수율 : 56%, 전임상 시료 63g 확보

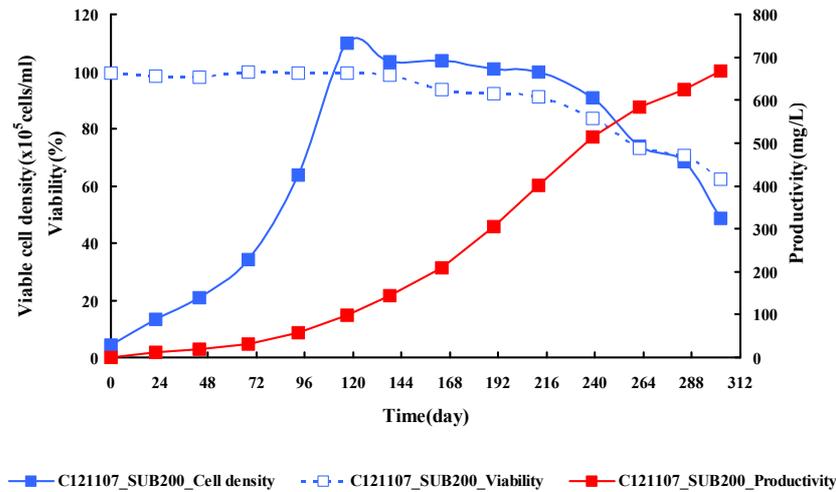


그림 32. 전임상 시료 생산을 위한 200L scale 배양공정. 설정된 배양공정을 200L scale SUB에 적용하였으며, 발현량은 670mg/L, 최대 세포수는 1.2 x 10⁷/ml이었음.

표 5. 제조된 전임상용 시료의 기준 및 시험 결과

시험항목	기준	단위	결과
성상	무색 혹은 약간 황색의 투명한 액체	해당없음	적합
pH	6.4~7.5	해당없음	7.0
무균	무균이어야 함.	해당없음	-
엔도톡신	<0.5	EU/mg	< 0.0118
SDS-PAGE(환원)	표준품과 동일	해당없음	
SDS-PAGE(비환원)	표준품과 동일	해당없음	
Western blot	표준품과 동일	해당없음	
IEF	표준품과 동일	해당없음	
Binding ELISA	표준품과 동일	해당없음	
Concentration(UV spec.)	-	mg/ml	21.20
Concentration(Protein A HPLC)	-	mg/ml	21.55
Polysorbate 20	0.01±0.005	%	
Bioassay	80~120	%	-
IE-HPLC	표준품과 동일	해당없음	적합
SE-HPLC	≥98	%	99.89
잔류 host cell protein	≤100	ng/mg	1.57
잔류 host cell DNA	≤10	pg/mg	7.40
잔류 protein A	≤100	ng/mg	0.75

3-3-7. 전임상 시험

- Monkey 전임상 예비독성, PK 시험을 시행하기 위해 적합한 CRO를 광범위하게

조사하여 선정함.

- Monkey에서 전임상 예비독성을 10mg/kg, 50mg/kg, 200mg/kg으로 4주 반복 투여한 후, 혈액학적, 조직학적 독성을 확인하며, TK 시험을 진행.
- 임상 예상 농도인 10mg/kg을 투여한 후 bleeding하여 PK 시험을 진행.
- 항체 formulation study, 안정성 사전 시험 결과에서 얻은 자료를 바탕으로 전임상 시험에 필요한 항체의 제형을 선정하고 시험 기간 중 안정성 등의 사전 데이터를 확보함.
- FDA, EMEA, KFDA 가이드라인에서 제시하는 37종의 사람 정상 조직과 이에 반응하는 monkey의 여러 정상 조직을 이용한 immunohistochemistry를 검증된 GLP 기관에서 진행함으로써 독성 시험에서 특히 주의하여 관찰할 조직에 대한 정보를 획득하고 IND 자료 확보를 진행.
- 4주 반복 시험에서 얻은 monkey 혈청에서 anti-drug antibody를 확인함으로써 immunogenicity 확인 시험 진행.
- 반복 투여 독성 시험 완료 후 IND 신청 준비를 위한 자료 확보 중.

3-4) 항암제 임상 0/1 상 시험을 위한 고민감도 고재현성 약동력학 분석 시스템 개발

3-4-1. Microflow LC optimization

-일반 (microflow) HPLC-triple quadrupole을 이용한 분석법은 irinotecan 및 irinotecan의 active metabolite인 SN38을 동시에 측정할 수 있도록 고안하였으며, 물질의 안정성 부분을 제외하고는(FDA 권고사항 준수: S Bansal *et al.*, *AAPS J* 2007, 9. E109-E114) 2012년도에 발간된 European Medicines Agency (EMA)의 bioanalytical method validation 가이드라인을 준수하도록 하였음.

-분석법 개발은 분석기기가 도입되고 2주가 2012년 8월 1일서부터 시작하였음. HPLC column은 분석의 속도와 적절한 감도를 위하여 50 x 21 mm의 작은 HPLC column들을 사용함. 분석법 개발 및 validation을 위하여 분석하고자 하는 물질(irinotecan 및 SN38)들을 구입한 뒤, 표준원액을 dimethyl sulfoxide에 녹여서 조제함(농도: 각각 1 mg/mL). 이 표준원액을 water/methanol 70:30 (v/v) 희석하여 원하는 농도의 표준작업용액을 조제하였음. 실험 시 발생하는 무작위 및 정오차(분석시료 준비 중, 크로마토그래피를 이용한 정제 중 또는 MS/MS를 이용

하여 검출 중)를 보정하기 위하여 internal standard는 irinotecan 및 SN38과 비슷한 화학적 구조를 가진 camptothecin으로 선택하였음. Internal standard 표준 용액은 dimethyl sulfoxide에 녹였으며 (1 mg/mL) 하위 표준작업용액들은 methanol에 희석하여 사용하였음 (50 ng/mL)

-분석법 개발 중 첫 번째 단계인 질량분석기 최적화 작업은 농도 1 ng/mL 표준 작업용액(irinotecan 및 SN38)을 준비하여 기기에 주입하면서 수행되었음. 여러 가지 조건들을 실험한 결과 irinotecan 및 SN38 분석을 위한 최적화된 질량분석기 조건들은 다음과 같음:

ESI polarity: positive mode
 Dry gas temperature: 300 °C
 Dry gas flow: 15 L/min
 Sheath gas temperature: 350 °C
 Sheath gas flow: 11 L/min
 Nebulizer: 30 psi
 Capillary voltage: 3500 V
 Nozzle voltage: 500 V

-상위 조건이 확정된 후, 최적화 된 HPLC (기기: Agilent 1260) 조건을 구하기 위하여 acetonitrile, methanol 등의 organic modifier와 0.1 % formic acid in water, 0.1 % acetic acid in water, 5 mM ammonium formate in water, 5 mM ammonium acetate in water 등의 water with additives 또는 buffer들을 서로 조합하여 가장 빠르면서도 재현성이 좋으며, 분석물들의 intensity들을 높여주면서 동시에 물질들간의 분리능력이 좋은 LC 조건을 구하였음. 여러번의 반복 실험 결과 isocratic mode에서 2.5분동안 5 mM ammonium formate in water/acetonitrile 75:25 (v/v) 조합을 300 µL/min의 유속으로 사용하는 것이 원하는 조건들을 가장 충족하였음. 또한 추가실험 뒤 표준작업용액은 5 mM ammonium formate in water/acetonitrile 75:25 (v/v) 조합이 최적인 것으로 판명되어서 변경을 하였음.

-분석시료 조건은 mouse plasma 상에서의 irinotecan의 불안정성을 고려, 최대한 빠르고 간단하면서도 재현성이 우수한 방법을 선택하도록 하였음. 여러 가지 실험 결과 490 µL의 mouse plasma에 10 µL의 표준작업용액을 spike 한 뒤, 여기에 20 µL의 1 M ZnSO₄ 용액을 넣어 irinotecan의 degradation의 원인 중 하나인 carboxylesterase를 일정시간동안 저해하였음 (L Goldwirt *et al.*, *J Pharm*

Biomed Anal 2012, 66, 325-333). 이 mixture에서 50 μ L를 채취한 후 500 μ L의 methanol을 이용하여 protein precipitation을 수행하는 전처리 방법을 선택하였으며. 재농축 및 재조성은 수행하지 않았음.

-EMA에서 요구하는 validation 작업에 들어가기 전 분석법 개발이 최적화되어 있는지 확인하기 위하여 공혈장을 이용하여 분석에 지대한 영향을 끼치는 phospholipid들의 interferences들을 분석조건 속에서 확인하였고, 이와 더불어 metabolite들의 interferences들도 실제 마우스에 irinotecan들을 주입한 뒤 분석조건에서 분석물들과 interferences들이 없는 것을 확인하였음. 또한 고농도의 시료 주입 후 발생할 수 있는 carryover 효과에 대해서도 고농도 주입 뒤 공혈장들을 2개 연속으로 주입하여 분석물 또는 internal standard peak가 없음을 확인한 뒤, 최저정량한계 농도(S/N ratio 10 이상)가 5 ng/mL인 것을 확인하였음. 최종적으로는 5 ng/mL - 1000 ng/mL의 검량선 시료(6 points)들을 준비한 뒤, 5번 반복분석하여 직선성 등을 확인하였음 (weight: $1/x^2$).

-분석법 개발이 끝난 뒤 EMA에서 요구하는 validation 작업을 진행하였음. validation을 위하여 독립적으로 칭량된 표준원액으로서부터 상위 기재된 방법으로 LQC (저농도 품질관리시료, 15 ng/mL), MQC (중농도 품질관리시료, 150 ng/mL), HQC (고농도 품질관리시료, 750 ng/mL)을 조제하였음. 분석법의 일내 정확성 및 정밀성 (within-run accuracy) 평가는 LQC, MQC, HQC 외에도 LLOQ (최저정량한계농도, 5 ng/mL) 4가지 농도에서 수행되었으며, 각 농도당 5개의 replicate를 상위 기재된 분석시료준비법으로 전처리 되었고 분석되었음. 분석결과 (Table 6, Table 7) 모든 농도들에서 EMA가 요구하는 정확성 (85 - 115 %) 및 정밀성 (CV < 15 %)을 달성하였음.

표 6. irinotecan의 일내 정확성 및 정밀성 시험

Date of analysis: Sep. 21, 2012

	LLOQ		LQC		MQC		HQC	
	Conc (ng/mL)	Acc (%)						
Replicate 1	4.77	95.3%	14.72	98.1%	148.92	99.3%	698.12	93.1%
Replicate 2	5.11	102.2%	15.56	103.8%	161.51	107.7%	735.54	98.1%
Replicate 3	4.63	92.6%	15.87	105.8%	158.40	105.6%	783.86	104.5%
Replicate 4	4.63	92.6%	15.82	105.4%	151.37	100.9%	778.39	103.8%
Replicate 5	4.96	99.3%	15.82	105.5%	157.08	104.7%	710.35	94.7%
Mean (ng/mL)	4.82		15.56		155.46		741.25	
Mean acc (%)	96.4%		103.7%		103.6%		98.8%	
SD (ng/mL)	0.21		0.48		5.18		38.87	
CV (%)	4.38%		3.11%		3.33%		5.24%	

표 7. SN38의 일내 정확성 및 정밀성 시험

Date of analysis: Sep. 21, 2012

	LLOQ		LQC		MQC		HQC	
	Conc (ng/mL)	Acc (%)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	Conc (ng/mL)	Acc (%)
Replicate 1	5.48	109.6%	14.04	93.6%	150.41	100.3%	778.57	103.8%
Replicate 2	4.92	98.5%	15.21	101.4%	160.87	107.2%	756.85	100.9%
Replicate 3	4.75	95.0%	15.09	100.6%	158.46	105.6%	787.34	105.0%
Replicate 4	4.67	93.5%	15.88	105.9%	149.80	99.9%	790.20	105.4%
Replicate 5	4.89	97.8%	15.72	104.8%	159.38	106.3%	732.55	97.7%
Mean (ng/mL)	4.94		15.19		155.78		769.10	
Mean acc (%)	98.9%		101.3%		103.9%		102.6%	
SD (ng/mL)	0.32		0.72		5.26		24.26	
CV (%)	6.43%		4.76%		3.38%		3.15%	

-분석법의 일간 정확성 및 정밀성 (between-run accuracy) 평가는 상위 기재된 일내 정확성 및 정밀성 테스트를 5회 반복한 뒤, 각 테스트들의 평균 값들을 토대로 정확성과 정밀성을 계산하였음. 분석결과 (표 8, 9) 모든 batch들에서 EMA가 요구하는 정확성 (85 - 115 %) 및 정밀성 (CV < 15 %)을 달성하였음.

표 8. irinotecan의 일간 정확성 및 정밀성 시험 결과

Batch	Parameters	LLOQ	LQC	MQC	HQC
1 (2012.09.20)	Mean (ng/mL)	4.65	14.54	146.98	715.85
	Mean acc (%)	93.1%	96.9%	98.0%	95.5%
	SD (ng/mL)	0.23	0.64	5.34	41.75
	CV (%)	4.86%	4.38%	3.63%	5.83%
2 (2012.09.21)	Mean (ng/mL)	4.82	15.56	155.46	741.25
	Mean acc (%)	96.4%	103.7%	103.6%	98.8%
	SD (ng/mL)	0.21	0.48	5.18	38.87
	CV (%)	4.38%	3.11%	3.33%	5.24%
3 (2012.09.24)	Mean (ng/mL)	4.87	14.78	148.23	738.53
	Mean acc (%)	97.4%	98.5%	98.8%	98.5%
	SD (ng/mL)	0.14	0.23	3.24	20.79
	CV (%)	2.96%	1.57%	2.19%	2.82%
4 (2012.09.25)	Mean (ng/mL)	4.75	14.75	144.57	689.97
	Mean acc (%)	94.8%	98.3%	96.4%	92.0%
	SD (ng/mL)	0.11	0.84	4.34	9.22
	CV (%)	2.34%	5.70%	3.00%	1.34%
5 (2012.09.26)	Mean (ng/mL)	5.07	16.52	167.05	807.99
	Mean acc (%)	101.5%	110.1%	111.4%	107.7%
	SD (ng/mL)	0.07	0.22	3.34	13.17
	CV (%)	1.30%	1.35%	2.00%	1.63%
	Average of means (ng/mL)	4.83	15.23	152.46	738.72
	Between-run acc (%)	96.6%	101.5%	101.6%	98.5%
	SD (ng/mL)	0.16	0.82	9.11	43.89
	Between-run CV (%)	3.24%	5.38%	5.98%	5.94%

표 9. SN38의 일간 정확성 및 정밀성 시험 결과

Batch	Parameters	LLOQ	LQC	MQC	HQC
1 (2012.09.20)	Mean (ng/mL)	5.57	16.20	164.42	822.11
	Mean acc (%)	111.4%	108.0%	109.6%	109.6%
	SD (ng/mL)	0.54	0.55	4.07	34.14
	CV (%)	9.66%	3.43%	2.48%	4.15%
2 (2012.09.21)	Mean (ng/mL)	4.94	15.19	155.78	769.10
	Mean acc (%)	98.9%	101.3%	103.9%	102.6%
	SD (ng/mL)	0.32	0.72	5.26	24.26
	CV (%)	6.43%	4.76%	3.38%	3.15%
3 (2012.09.24)	Mean (ng/mL)	5.16	15.05	144.24	722.31
	Mean acc (%)	103.3%	100.4%	96.2%	96.3%
	SD (ng/mL)	0.15	0.34	3.18	22.34
	CV (%)	2.96%	2.26%	2.21%	3.09%
4 (2012.09.25)	Mean (ng/mL)	4.43	13.89	137.13	673.85
	Mean acc (%)	88.6%	92.6%	91.4%	89.9%
	SD (ng/mL)	0.17	0.81	3.65	15.20
	CV (%)	3.74%	5.82%	2.66%	2.26%
5 (2012.09.26)	Mean (ng/mL)	4.76	14.86	147.34	742.47
	Mean acc (%)	95.2%	99.1%	98.2%	99.0%
	SD (ng/mL)	0.11	0.50	4.57	13.95
	CV (%)	2.40%	3.37%	3.10%	1.88%
Average of means (ng/mL)		4.97	15.04	149.78	745.97
Between-batch acc (%)		99.5%	100.3%	99.9%	99.5%
SD (ng/mL)		0.43	0.83	10.57	55.01
Between-batch CV (%)		8.61%	5.49%	7.06%	7.37%

Batch	Parameters	LLOQ	LQC	MQC	HQC
1 (2012.09.20)	Mean (ng/mL)	4.65	14.54	146.98	715.85
	Mean acc (%)	93.1%	96.9%	98.0%	95.5%
	SD (ng/mL)	0.23	0.64	5.34	41.75
	CV (%)	4.86%	4.38%	3.63%	5.83%
2 (2012.09.21)	Mean (ng/mL)	4.82	15.56	155.46	741.25
	Mean acc (%)	96.4%	103.7%	103.6%	98.8%
	SD (ng/mL)	0.21	0.48	5.18	38.87
	CV (%)	4.38%	3.11%	3.33%	5.24%
3 (2012.09.24)	Mean (ng/mL)	4.87	14.78	148.23	738.53
	Mean acc (%)	97.4%	98.5%	98.8%	98.5%
	SD (ng/mL)	0.14	0.23	3.24	20.79
	CV (%)	2.96%	1.57%	2.19%	2.82%
4 (2012.09.25)	Mean (ng/mL)	4.75	14.75	144.57	689.97
	Mean acc (%)	94.8%	98.3%	96.4%	92.0%
	SD (ng/mL)	0.11	0.84	4.34	9.22
	CV (%)	2.34%	5.70%	3.00%	1.34%
5 (2012.09.26)	Mean (ng/mL)	5.07	16.52	167.05	807.99
	Mean acc (%)	101.5%	110.1%	111.4%	107.7%
	SD (ng/mL)	0.07	0.22	3.34	13.17
	CV (%)	1.30%	1.35%	2.00%	1.63%
Average of means (ng/mL)		4.83	15.23	152.46	738.72
Between-run acc (%)		96.6%	101.5%	101.6%	98.5%
SD (ng/mL)		0.16	0.82	9.11	43.89
Between-run CV (%)		3.24%	5.38%	5.98%	5.94%

-분석법의 특이성 시험을 위하여 6가지 서로 다른 마우스에서 공혈장을 채취한 뒤 2등분하여 한 등분체는 바로 전처리 하고 (double blank) 다른 한 등분체에는 최저정량한계 농도 (5 ng/mL)를 spike한 뒤 전처리 함. 이후 각각의 시료들을 분석하여 irinotecan과 SN38의 및 internal standard인 camptothecin retention time 주변에 interfering peak이 없거나, interference가 존재하더라도 peak area ratio가 분석물의 경우 20 %, internal standard의 경우 5 % 미만인 것을 확인하는 방식으로 수행하였음. 실험결과 (표 10) 분석물 및 internal standard

retention time 주변에 interference들이 없는 것이 확인 되었음.

표 10. 특이성 시험 결과

Date of analysis: Sep. 26, 2012

Replicate	CPT11			SN38			CPT		
	Peak area		Peak area ratio (%)	Peak area		Peak area ratio (%)	Peak area		Peak area ratio (%)
	Double Blank	LLOQ		Double Blank	LLOQ		Double Blank	LLOQ	
1	0	2915	0.00%	0	162	0.00%	29	33083	0.09%
2	0	2918	0.00%	0	182	0.00%	29	32817	0.09%
3	0	2853	0.00%	0	181	0.00%	18	32912	0.05%
4	0	2731	0.00%	0	161	0.00%	24	32978	0.07%
5	0	2792	0.00%	0	172	0.00%	0	32850	0.00%
6	0	2715	0.00%	0	167	0.00%	13	32490	0.04%

-생체시료효과 시험은 특이성 시험과 동일하게 6가지 서로 다른 마우스에서 공혈장을 추출한 뒤 전처리한 후 분석표준물질을 첨가한 시료들의 signal들을 동일한 농도의 분석물 및 internal standard와 대비하여 3가지 농도 (LQC, MQC, HQC)에서 평가되며, 모든 농도에서의 결과들에 대한 변동계수가 <15% 여야 하는데, 분석 결과 (표 11) EMA에서 요구하는 각 농도에서의 internal standard normalized matrix factor (분석물의 생체시료효과/내부표준물질의 생체시료효과)의 변동계수가 4 % 이하인 것으로 나타났으며, 따라서 특정 개체의 생체시료효과가 분석의 정확성과 정밀성에 미치는 영향은 매우 미미한 것으로 확인됨

표 11. 생체시료효과 시험 결과

Date of the analysis: Oct. 2, 2012

Sample/QC	CPT11 internal standard normalized MF		
	LQC	MQC	HQC
1	0.82	0.83	0.83
2	0.78	0.85	0.86
3	0.83	0.84	0.85
4	0.78	0.82	0.87
5	0.80	0.85	0.86
6	0.75	0.85	0.85
Mean	0.79	0.84	0.85
SD	0.03	0.01	0.01
CV (%)	3.6%	1.5%	1.5%

Sample/QC	SN 38 internal standard normalized MF		
	LQC	MQC	HQC
1	0.85	0.85	0.86
2	0.84	0.87	0.86
3	0.79	0.89	0.86
4	0.85	0.87	0.89
5	0.81	0.86	0.88
6	0.83	0.87	0.87
Mean	0.83	0.87	0.87
SD	0.02	0.01	0.01
CV(%)	2.9%	1.6%	1.2%

-validation 기간 동안 작성된, 7 points들로 이루어진 검량선들은 모두 EMA의 기준을 충족하였음 (각 point 당 정확성이 85 - 115 %, 최저정량한계에선 80 - 120 %, 표 12, 13). 각각의 point들은 매우 높은 정확성 및 정밀성을 보여주었으며, 5

ng/mL에서 1000 ng/mL 범위의 농도에서 직선성 ($r^2 > 0.997$)을 보여주었음.

표 12. CPT11 검량선 시험

Batch	STD1		STD2		STD3		STD4		STD5		STD6		STD7	
	Conc (ng/mL)	Acc (%)												
1 (2012.09.20)	4.99	99.9%	9.95	99.5%	25.12	100.5%	51.11	102.2%	101.91	101.9%	487.91	97.6%	984.20	98.4%
2 (2012.09.21)	4.90	98.0%	10.64	106.4%	23.75	95.0%	48.31	96.6%	102.30	102.3%	509.69	101.9%	997.45	99.7%
3 (2012.09.24)	5.00	99.9%	9.87	98.7%	25.55	102.2%	50.78	101.6%	103.07	103.1%	499.84	100.0%	946.56	94.6%
4 (2012.09.25)	4.94	98.7%	10.10	101.1%	25.60	102.4%	51.02	102.0%	102.46	102.5%	495.25	99.1%	943.07	94.3%
5 (2012.09.25)	4.92	98.4%	10.34	103.4%	24.56	98.2%	50.75	101.5%	102.70	102.7%	498.78	99.8%	960.35	96.0%
Mean (ng/mL)	4.95		10.18		24.92		50.39		102.49		498.29		966.33	
Mean acc (%)	99.0%		101.8%		99.7%		100.8%		102.5%		99.7%		96.6%	
SD (ng/mL)	0.04		0.31		0.77		1.18		0.43		7.90		23.75	
CV (%)	0.88%		3.08%		3.11%		2.33%		0.42%		1.59%		2.46%	

Batch	Slope	Intercept	R ²
1 (2012.09.20)	0.815902	0.006661	0.99959727
2 (2012.09.21)	0.716714	0.010686	0.99792607
3 (2012.09.24)	0.655738	0.003546	0.99889417
4 (2012.09.25)	0.783207	0.003189	0.99880114
5 (2012.09.25)	0.704946	0.009277	0.99901669
Mean			0.998847068
SD			0.000600862
CV (%)			0.06%

표 13. SN38 검량선 시험

Batch	STD1		STD2		STD3		STD4		STD5		STD6		STD7	
	Conc (ng/mL)	Acc (%)												
1 (2012.09.20)	5.02	100.4%	9.88	98.8%	24.71	98.8%	52.50	104.1%	102.22	102.2%	473.46	94.7%	1009.95	101.0%
2 (2012.09.21)	4.91	98.2%	10.55	105.5%	23.94	95.8%	49.51	99.0%	99.95	100.0%	512.08	102.4%	991.99	99.2%
3 (2012.09.24)	5.06	101.2%	9.80	98.0%	24.28	97.1%	51.35	102.7%	101.11	101.1%	507.84	101.6%	982.29	98.2%
4 (2012.09.25)	4.93	98.5%	10.21	102.1%	25.19	100.8%	51.11	102.2%	100.93	100.9%	497.61	99.5%	959.03	95.9%
5 (2012.09.26)	4.93	98.5%	10.31	103.1%	24.85	99.4%	50.56	101.1%	99.12	99.1%	499.78	100.0%	987.93	98.8%
Mean (ng/mL)	4.97		10.15		24.59		51.01		100.67		498.15		986.24	
Mean acc (%)	99.4%		101.5%		98.4%		101.8%		100.7%		99.6%		98.6%	
SD (ng/mL)	0.07		0.31		0.49		1.10		1.18		15.00		18.40	
CV (%)	1.33%		3.05%		1.99%		2.15%		1.17%		3.01%		1.87%	

Batch	Slope	Intercept	R ²
1 (2012.09.20)	0.048367	4.77E-04	0.99875927
2 (2012.09.21)	0.054189	9.71E-04	0.99864408
3 (2012.09.24)	0.063062	7.57E-05	0.99936098
4 (2012.09.25)	0.060809	1.65E-04	0.99930851
5 (2012.09.26)	0.052513	5.74E-04	0.99964411
Mean			0.99914339
SD			0.000424909
CV (%)			0.04%

-이 외에도 dilution integrity 실험을 수행하여 최고정량한계 농도를 초과하는 시료 또는 시료량이 부족한 시료를 동일한 공 생체시료로 희석한 후 희석과정의 오차가 포함된 정량의 정확성, 정밀성을 측정, EMA 기준인 $\pm 15\%$ 미만인 것을 확인하였음 (2000 ng/mL을 4배 희석).

-분석물질의 안정성은 FDA가 주관한 3rd AAPS/FDA Bioanalytical Workshop에

서 제시한 권고사항 및 실험 protocol들을 준수하였으며, 냉해동 안정성의 경우 2 번 주기, 단기 안정성의 경우 4 °C에서 2시간동안 안정성이 확보되는 것을 확인하였음.

-다음으로 in vivo sample 에 대한 분석에 상기 방법론을 적용하였습

irinotecan 4 mg/kg을 intraperitoneal injection 하였는데, 이 용량은 0상 임상시험에 필요한 1/50 rat NOAEL 에 준하는 용량임. 이후 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 240 min 및 360 min에 혈액을 각 point당 3마리의 마우스로부터 채취하고 1 M ZnSO₄ 주입 후 빠르게 분리하여 혈장을 획득하였음. 이후 상위 분석방법에 따라 시료 전처리를 수행하였음. EMA의 요구사항에 따라 한 분석 batch에 2개의 검량선 및 8 개의 품질관리시료 (LLOQ 2개, LQC 2개, MQC 2개 및 HQC 2개)를 실제시료 앞뒤로 배치한 뒤 동일한 방법으로 전처리 후 같이 분석을 하였음. 분석 결과 모든 검량선과 (표 14) 모든 품질관리시료가 (표 15) EMA가 요구하는 통과기준을 충족시켰으며, 분석된 study 시료들도 성공이 분석되었음. 참고로 분석된 27개의 study 시료 중 3개를 재분석하였으나 (이상 농도) 재분석 결과는 original 결과와 동일하였음.

표 14. Study 시료 분석시 사용된 검량선

CPT11 CC set 4 (2012.10.10)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	SN38 CC set 4 (2012.10.10)	Conc (ng/mL)	Acc (%)
STD 1	4.94	98.9	STD 1	4.95	99.1
STD 2	9.96	99.6	STD 2	10.11	101.1
STD 3	26.11	104.4	STD 3	25.09	100.4
STD 4	51.91	103.8	STD 4	50.98	102.0
STD 5	101.64	101.6	STD 5	102.81	102.8
STD 6	492.66	98.5	STD 6	500.26	100.1
STD 7	930.53	93.1	STD 7	946.33	94.6
Slope	0.676209		Slope	0.046058	
Intercept	0.008166		Intercept	6.23E-04	
R ²	0.99795311		R ²	0.99901265	

표 15. Study 시료 분석시 사용된 품질관리시료

CPT11 CC set 1 (2012.10.05)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	SN38 CC set 1 (2012.10.05)	Conc (ng/mL)	Acc (%)
STD 1	4.97	99.4	STD 1	4.95	99.0
STD 2	10.15	101.5	STD 2	10.34	103.4
STD 3	24.39	97.6	STD 3	24.02	96.1
STD 4	51.04	102.1	STD 4	49.68	99.4
STD 5	102.28	102.3	STD 5	101.99	102.0
STD 6	514.77	103.0	STD 6	512.40	102.5
STD 7	942.05	94.2	STD 7	976.44	97.6
Slope	0.668574		Slope	0.049192	
Intercept	0.004206		Intercept	5.46E-05	
R ²	0.99860741		R ²	0.99897993	
CPT11 CC set 2 (2012.10.05)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	SN38 CC set 2 (2012.10.05)	Conc (ng/mL)	Acc (%)
STD 1	5.01	100.3	STD 1	4.96	99.3
STD 2	9.90	99.0	STD 2	10.11	101.1
STD 3	24.92	99.7	STD 3	24.95	99.8
STD 4	51.11	102.2	STD 4	50.80	101.6
STD 5	102.64	102.6	STD 5	101.09	101.1
STD 6	492.65	98.5	STD 6	495.10	99.0
STD 7	976.93	97.7	STD 7	980.76	98.1
Slope	0.647695		Slope	0.048044	
Intercept	0.009942		Intercept	6.18E-04	
R ²	0.99952266		R ²	0.99976455	
CPT11 CC set 3 (2012.10.10)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	SN38 CC set 3 (2012.10.10)	Conc (ng/mL)	Acc (%)
STD 1	4.96	99.1	STD 1	5.03	100.5
STD 2	10.18	101.8	STD 2	10.04	100.4
STD 3	24.92	99.7	STD 3	23.74	95.0
STD 4	49.17	98.3	STD 4	50.34	100.7
STD 5	104.07	104.1	STD 5	104.57	104.6
STD 6	506.21	101.2	STD 6	516.70	103.3
STD 7	957.16	95.7	STD 7	955.58	95.6
Slope	0.711299		Slope	0.047159	
Intercept	0.001802		Intercept	1.13E-04	
R ²	0.99899762		R ²	0.99819964	
CPT11 QC (2012.10.05)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	SN38 QC (2012.10.05)	Conc (ng/mL)	Acc (%)
LQC 1	15.53	103.5	LQC 1	14.66	97.7
MQC 1	146.23	97.5	MQC 1	145.28	96.9
HQC 1	710.28	94.7	HQC 1	747.92	99.7
DQC 1	455.87	94.0	DQC 1	479.62	98.9
LQC 2	15.33	102.2	LQC 2	14.93	99.5
MQC 2	150.10	100.1	MQC 2	148.78	99.2
HQC 2	723.86	96.5	HQC 2	750.28	100.0
DQC 2	461.06	95.0	DQC 2	475.10	97.9
CPT11 QC (2012.10.10)	Conc (ng/mL)	Acc (%)	SN38 QC (2012.10.10)	Conc (ng/mL)	Acc (%)
LQC 3	14.96	99.7	LQC 3	14.78	98.5
MQC 3	154.41	102.9	MQC 3	148.42	98.9
HQC 3	729.64	97.3	HQC 3	728.37	97.1
DQC 3	491.22	101.3	DQC 3	458.99	94.6
LQC 4	15.46	103.0	LQC 4	14.86	99.1
MQC 4	156.22	104.1	MQC 4	149.19	99.5
HQC 4	764.42	101.9	HQC 4	749.25	99.9
DQC 4	494.00	101.8	DQC 4	462.16	95.3

-분석을 통하여 측정된 농도들을 (표 16) 검량선에 대입하여 계산한 뒤, irinotecan 및 SN38 각각의 분석물에 대하여 concentration-time profile을 작성하였음.

Irinotecan (Figure 1)의 경우 360 min time point가 최저정량한계 이하의 농도를 보였으므로 0 ng/mL으로 표시하여 처리하였음. SN38의 경우 (Figure 2) 360min time-point에도 정량이 가능하였음.

표 16. 실제 study 시료 농도

Dates of analysis : Oct. 5, 2012 and Oct. 10, 2012

CPT11	10	15	30	45	60	120	240	360
Concentration replicate 1 (ng/mL)	263.65	168.77	212.30	111.07	119.03	33.89	5.07	NR
Concentration replicate 2 (ng/mL)	274.62	302.62	217.22	167.01	116.46	28.42	8.17	5.92
Concentration replicate 3 (ng/mL)	260.83	284.88	234.70	207.62	95.54	41.18	8.11	NR
Mean (ng/mL)	266.37	252.09	221.41	161.90	110.34	34.50	7.12	0
Standard deviation (ng/mL)	7.29	72.70	11.77	48.48	12.88	6.40	1.77	0.00
Coefficient of variation	2.7%	28.8%	5.3%	29.9%	11.7%	18.6%	24.9%	0.0%
SN38	10	15	30	45	60	120	240	360
Concentration replicate 1 (ng/mL)	116.75	198.48	126.51	57.34	134.29	23.08	6.29	NR
Concentration replicate 2 (ng/mL)	177.74	161.48	126.08	91.66	100.89	35.96	6.81	8.20
Concentration replicate 3 (ng/mL)	169.58	182.75	119.46	72.16	122.04	33.41	6.68	6.02
Mean (ng/mL)	154.69	180.90	124.02	73.72	119.07	30.82	6.59	7.11
Standard deviation (ng/mL)	33.11	18.57	3.95	17.21	16.90	6.82	0.27	1.54
Coefficient of variation	21.4%	10.3%	3.2%	23.3%	14.2%	22.1%	4.1%	21.7%

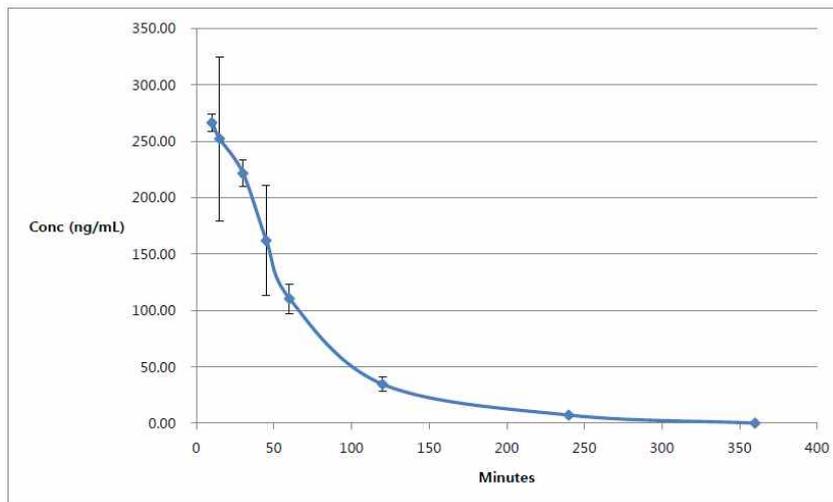


그림 33. irinotecan concentration-time profile

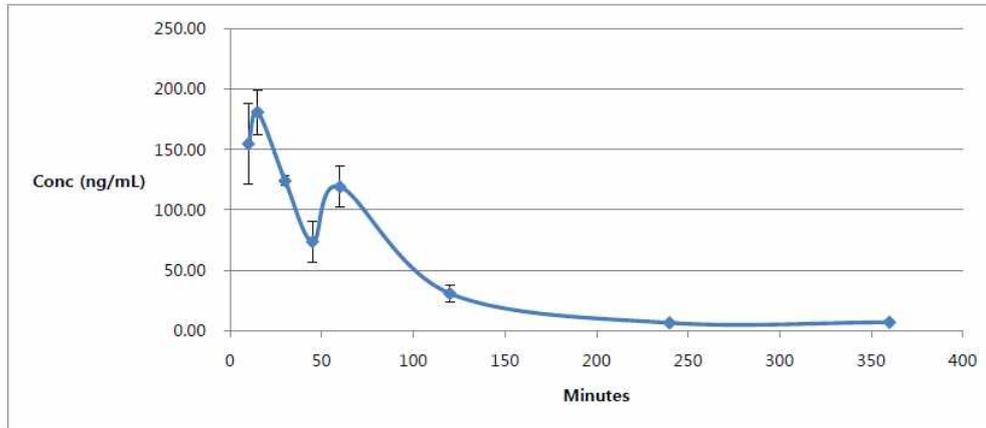


그림 34. SN38 concentration-time profile

-EMA에서 incurred sample reanalysis 권고기준을 충족하기 위해, 15 min replicate 1, 2, 3 및 240 min replicate 1, 2, 3 시료들을(전체 샘플 개수의 22 %) 재분석 하였음. 사용된 검량선 및 품질관리시료들은 모두 EMA 가이드라인의 통과기준을 충족시켰으며, 분석 결과 (표 12) 6개의 샘플 중 5개 (83.3 %)의 variability가 20 % 이하였음 (EMA는 전체 재분석되는 시료 중 67 %의 variability가 20 % 미만이 되는 것을 요구하고 있음). 이를 통하여 개발되고 validation 된 상위 분석법이 재현성이 우수한, 신뢰성이 있는 분석법이라는 것이 입증 되었다.

표 17. incurred sample reanalysis

Date of analysis: Oct. 6, 2012

CPT11	Original (ng/mL)	Repeat (ng/mL)	Mean (btw original and repeat, ng/mL)	Variability (%)
15 min replicate 1 (ng/mL)	168.77	178.20	173.49	5.4%
15 min replicate 2 (ng/mL)	302.62	314.63	308.63	3.9%
15 min replicate 3 (ng/mL)	284.88	357.17	321.03	22.5%
240 min replicate 1 (ng/mL)	5.07	5.79	5.43	13.3%
240 min replicate 2 (ng/mL)	8.17	9.60	8.89	16.1%
240 min replicate 3 (ng/mL)	8.11	9.25	8.68	13.1%

SN38	Original	Repeat	Mean (btw original and repeat, ng/mL)	Variability (%)
15 min replicate 1 (ng/mL)	198.48	199.65	199.07	0.6%
15 min replicate 2 (ng/mL)	161.48	160.58	161.03	-0.6%
15 min replicate 3 (ng/mL)	182.75	218.21	200.48	17.7%
240 min replicate 1 (ng/mL)	6.29	7.06	6.68	11.5%
240 min replicate 2 (ng/mL)	6.81	7.19	7.00	5.4%
240 min replicate 3 (ng/mL)	6.68	7.46	7.07	11.0%

3-4-2. NanoLC를 이용한 분석법 확립

-Trough level에서의 정량을 위한 nano LC-triple quadrupole 분석법의 경우, HPLC를 이용한 분석법과 달리 의학적으로 의미가 더 큰 SN38 active metabolite 만 분석하였음. 표준원액은 상위와 동일한 용매에 (dimethyl sulfoxide) 동일한 농도로 (1 mg/mL) 조제되었으나 하위 표준작업용액들은 0.1 % formic acid/acetonitrile 80:20 (v/v)을 사용하여 희석하였음. Internal standard의 경우 상위와 동일하게 camptothecin을 사용하도록 하였으나 methanol 대신 acetonitrile로 희석하여 사용하였음 (2.5 ng/mL).

-HPLC-triple quadrupole과 비슷한 방법으로 질량분석기 최적화를 진행한 결과, 다음 조건상에서 nano LC에서 중요한 요소 중 하나인 spray/plume의 모양 및 감도등의 조건들이 최적인 것으로 나타났음.

ESI polarity: positive mode

Dry gas temperature: 150 °C

Dry gas flow: 11 L/min (air compressor에서 4 L/min 동시 공급)

Capillary voltage: 1940 V

-HPLC-Chip은 Agilent Technologies사의 UHC Chip (II)이며, 이 chip은 150 mm x 75 µm의 capillary column과 25 mm/500 nL의 trap column이 장착되어 있음. Nano LC는 상위에 언급된 carryover 현상에 매우 민감함으로 carryover를 만족시키며, 동시에 nano LC의 단점 중 하나인 긴 분석시간을 최대한 줄이고, 이와 더불어 peptide 분석과는 달리 물이 많은 이동상에서의 solubility issue를 고려해야 함. 여러 가지 test 결과 0.1 % formic acid in water/0.1 % formic acid in acetonitrile 80:20 (v/v)에서 출발하여 5분동안 linear gradient elution을 수행, 0.1 % formic acid in water/0.1 % formic acid in acetonitrile 5:95 (v/v)에 도달한 뒤, 4분동안 동일한 비율로 hold하다 9분에 초기 조건으로 돌아가는 LC 분석조건이 최적인 것을 발견하였음 (총 분석시간: 15분). 동시에 시료들을 loading하는 line도 cleaning을 위하여 시료 loading에 사용되는 capillary pump에도 gradient를 적용하였음 (초기조건: 0.1 % formic acid in water/0.1 % formic acid in acetonitrile 97:3 (v/v), 1.1분: 0.1 % formic acid in water/0.1 % formic acid in acetonitrile 5:95 (v/v) - 2분동안 hold, 3분: 0.1 % formic acid in water/0.1 % formic acid in acetonitrile 97:3 (v/v)).

-상위 HPLC 분석방법과 유사한 방법으로 carryover 및 직선성 테스트 결과 고농도를 이후의 carryover가 미미함을 확인하였으며 (최저정량한계 농도의 20 % 이하) 100 pg/mL-5000 ng/mL 농도 범위에서 좋은 직선성을 확인하였으며

(weight: $1/x^2$, 6개의 calibration standards들로 구성되어 있음). noise를 감안한 최저정량한계가 100 pg/mL인 것을 확인하였음.

-validation은 EMA 대신 FDA에서 요구하는 validation 기준들을 충족하기로 하였으며, 분석법 개발이 끝난 후 2013년 1월 9일서부터 진행중. 2013년 1월 17일 현재 정확성 및 정밀성 테스트가 4번 이루어졌으며, 검량선 validation도 동시에 이루어지고 있음. 정확성 및 정밀성은 3가지 농도 (LQC, MQC, HQC)에서 이루어지며, 4개의 batch들은 모두 일내/일간 FDA의 validation 통과기준들을 충족하였으며 (정확성: 85 - 115 %, 정밀성: CV <15 %, Table 13, Table 14) 검량선들도 기준에 부합하며 (각 point 당 정확성이 85 - 115 %, 최저정량한계에선 80 - 120 %) 2013년 1월 말-2월 초에 실제 study sample 테스트가 예정되어 있음.

표 18. SN38 일내 정확성 및 정밀성 (nano LC)

Batch 2 (2013.01.10)	LQC 300 pg/mL		MQC 1200 g/mL		HQC 4000 pg/mL	
	Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
Replicate 1	284.67	94.9%	1224.73	102.1%	3909.04	97.7%
Replicate 2	283.75	94.6%	1206.42	100.5%	3915.78	97.9%
Replicate 3	308.04	102.7%	1196.72	99.7%	4020.86	100.5%
Replicate 4	294.91	98.3%	1134.24	94.5%	4153.61	103.8%
Replicate 5	301.39	100.5%	1177.04	98.1%	4026.79	100.7%
Mean (ng/mL)	294.55		1187.83		4005.22	
Mean accuracy (%)	98.2%		99.0%		100.1%	
Standard deviation (ng/mL)	10.53		34.55		99.97	
Coefficient of variation (%)	3.57%		2.91%		2.50%	

표 19. SN38 일간 정확성 및 정밀성 (nano LC)

Batch	Parameters	LQC 300 pg/mL	MQC 1200 pg/mL	HQC 4000 pg/mL
1 (2013.01.09)	Mean (ng/mL)	297.14	1280.98	4059.66
	Mean accuracy (%)	99.0%	106.7%	101.5%
	Standard deviation (ng/mL)	5.15	26.39	105.89
	Coefficient of variation (%)	1.73%	2.06%	2.61%
2 (2013.01.10)	Mean (ng/mL)	294.55	1187.33	4005.22
	Mean accuracy (%)	98.2%	99.0%	100.1%
	Standard deviation (ng/mL)	10.53	34.55	99.97
	Coefficient of variation (%)	3.57%	2.91%	2.50%
3 (2013.01.15)	Mean (ng/mL)	294.30	1271.98	4510.72
	Mean accuracy (%)	98.1%	106.0%	112.8%
	Standard deviation (ng/mL)	8.17	57.98	133.85
	Coefficient of variation (%)	2.78%	4.56%	2.97%
4 (2013.01.16)	Mean (ng/mL)	276.32	1088.74	3887.87
	Mean accuracy (%)	92.1%	90.7%	97.2%
	Standard deviation (ng/mL)	17.35	17.96	150.54
	Coefficient of variation (%)	6.28%	1.65%	3.87%
5	Mean (ng/mL)			
	Mean accuracy (%)			
	Standard deviation (ng/mL)			
	Coefficient of variation (%)			
	Average of means (ng/mL)	290.58	1207.26	4115.87
	Inter-batch accuracy (%)	96.9%	100.6%	102.9%
	Standard deviation (ng/mL)	9.59	89.57	272.82
	Inter-batch precision (%)	3.30%	7.42%	6.63%

3. 연구결과 고찰 및 결론

3-1 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료제

-유전자치료는 DNA 형태의 유전자를 종양에 전달함으로써 세포내에서 DNA에 의해서 발현되는 RNA 또는 단백질로 종양의 성장을 억제하려는 시도으로써 유전자를 전달하는 전달체를 벡터(vector)라고 하며, 유전자 치료제의 개발에 있어서 핵심적인 기술임.

-유전자 전달 방법의 상당한 발전과 더불어 암을 일으키는 많은 원인 유전자가 밝혀지고, 암세포에서 발현되는 유전자들이 분석되고 발현을 조절하는 기작들이 알려지며 다양한 치료유전자가 개발되고 있음

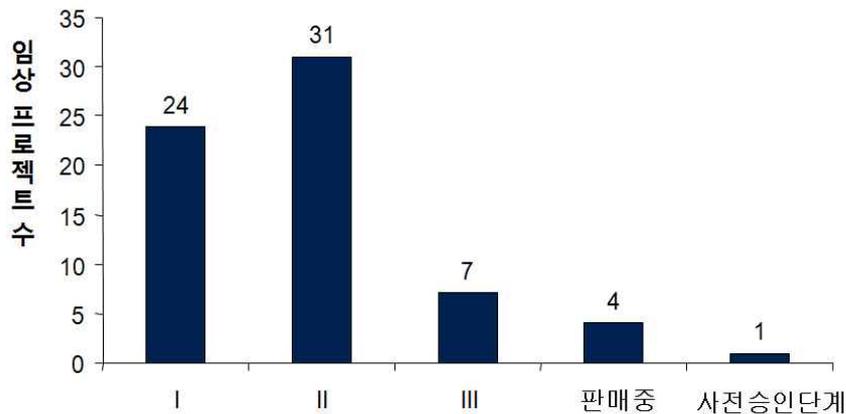
-최근 유전자치료는 세포치료 또는 분자표적치료와 결합한 형태의 유전자 치료요법이 연구의 주류를 형성하고 있으며, 그러한 치료 모델리티가 몇몇 종양에서는 좋은 결과를 얻고 있으므로 개발된 유전자치료제를 환자에게 적용하는 복합적인 프로토콜의 개발도 활발히 진행되고 있음

-유전자치료제가 통상적인 암을 치료하는 방법으로 자리매김하기 위해서는 종양세포에 선택적으로 유전자를 전달하며 효과적으로 정상세포와 암세포를 구분하여 유전자를 발현시키는 조절장치에 관한 기술도 필요하며, 이는 성공적인 유전자 치료제 개발을 위한 핵심 기술임

-전 세계적으로 행해지는 유전자치료 임상실험의 약 70%가 여러 암을 사멸하는 치료요법으로 개발되고 있으며 아데노바이러스는 안전성(safety)과 세포내 전달효율(transduction efficiency)이 크게 앞서므로 임상실험의 25% 이상이 아데노바이러스를 이용하여 치료유전자를 암세포에 전달함. 이러한 통계수치는 유전자치료요법이 다른 질병보다는 암을 치료하는데 그리고 아데노바이러스가 가장 긍정적인 효과를 보이고 있음을 반영하고 있음 유전자 치료제는 다음과 같은 질병을 대상으로 활발한 연구가 시행되고 있음

-63개의 유전자 치료 임상 프로젝트가 개발 중에 있으며, 임상 3상에 있는 7개의 프로젝트 중 4개 프로젝트는‘암’을 타겟으로 함

-현재 유통되는 유전자 치료제(Gendicine, FexinG)은 여러 질환에 적용되도록 하고 있어, 총 4개의 임상프로젝트가 상용화 되었다고 할 수 있음



I = 임상 1상, II = 임상 2상, III = 임상 3상

원출처 : Datamonitor research; MedTRACK, 2009.10, Copyright Datamonitor,
Thomson Pharma 2009.10, Copyright Thomson Scientific; www.clinicaltrials.gov
생명공학정책연구센터 재가공

그림 35. 유전자 치료제 파이프라인('09년)

3-2 연구결과가 국내외 기술개발에서 차지하는 위치

- 본 과제에서 개발한 암 유전자치료제는 “치료효능개선”과 “암 선택성증대(안전성 확보)”의 두 가지 기술 혁신이 이루어진 치료제 임. 암세포만을 선택적으로 사멸하고 정상세포에는 영향을 주지 않는 유전자치료제로 발전할 것으로 예상됨.

- 본 과제에서 개발한 유전자 치료제는 치료 정도를 생체내에서 모니터링하여 치료효과를 실시간으로 판별하고 치료의 방향을 수정할 수 있는 치료 및 예방법 개발이 필요함.

- Ad5CMV.Rz.HSVtk는 hTERT를 표적하는 ribozyme을 이용하여 치료대상 부위만을 선택적으로 표적화할 수 있는 표적지향적 유전자치료제로, 암세포에서 선택적으로 유전자 발현을 제어함으로써 치료효과를 극대화하고 동시에 정상세포에서의 비특이적 유전자 발현에 의해 초래될 수 있는 부작용을 최소화할 수 있는 암 표적지향성 유전자치료제 임.

3-3 나노와 아데노바이러스 복합체를 이용한 임상시험

-선행연구에서 아데노바이러스와 나노의 복합체를 형성하기 위한 나노의 양은 100 μ M을 사용하였음. 그러나, 나노 NCC-K1에 의한 세포 독성을 최소화하기 위하여 최적의 나노 농도를 10 μ M로 크게 낮춤으로써 세포 내로 바이러스를 전달하는 효율을 높이고 세포 독성을 낮춤으로써 향후 실험에 유용한 자료가 될 것으로 여겨짐.

-나노와 아데노바이러스 복합체를 이용한 두경부암 치료제 개발을 위한 임상시험은 전임상 비용과 식약청에서의 허가를 이유로 과제를 진행할 수가 없었음. 전임상을

수행 할 수 있는 CRO의 전임상 프로토콜은 나노의 독성시험, 나노와 복합체의 독성시험을 별도로 진행해야하므로 비용이 예산 범위를 크게 초과하였음. 또한, 본 연구진이 개발한 나노 NCC-K1의 임상시험 허가를 위한 식약청에서 요구하고 있는 실험의 양과 기간을 본 과제를 수행하는 일년 동안 완료할 수 없으므로 과제의 내용과 목표를 수정하였음.

-본 과제의 최종 목표인 나노와 아데노바이러스 복합체를 이용한 두경부암 치료를 위한 전임상 시험은 과제의 내용을 수정하여 pre-clinical 연구를 위해 적합한 나노의 양을 최적화하는 실험을 수행하였으며, 아데노바이러스 Ad5CMV.Rz.HSVtk를 이용한 뇌암 치료를 위한 전임상 프로토콜을 작성하고 독성시험과 biodistribution을 결정하는 실험을 수행하고 있음.

3-4 HGF 항체치료제

- HGF 항체는 현재 Amgen, AVEO 두 개의 제약회사에서 고형암에 대한 임상 시험 진행 중임. Amgen의 경우, glioblastoma, metastatic gastric cancer에 대해 임상 2상, 3상 진행 중이며 AVEO의 경우 NSCLC에 대해 임상2상 진행 중임.

- 본 연구의 HGF 항체는 glioblastoma, NSCLC, leiomyosarcoma에서 종양성장 억제 효과를 보였으며 타사 항체와 유사한 효능을 보임.

- HGF의 수용체 결합 부위 중 강한 결합에 관여하는 N-terminal 부분에 HGF항체가 결합함을 확인하였으며 이를 통해 HGF와 그 수용체 c-Met과의 결합을 효과적으로 억제할 것으로 예상됨.

- 40계대의 안정성이 확보된 항체 생산 세포주를 개발하였으며 GMP 기관에서의 banking과 identity, 외래성 바이러스 확인 등을 통해 임상 시료 생산에 적합한 세포주를 확보함.

- 배양 공정과 정제 공정의 scale-up을 통해 비임상 GLP 독성 시험 시료 생산 공정을 확립하였으며 이를 통해 시료의 대량 생산이 가능하며 나아가 GMP 기관에서의 임상 시료 생산이 가능함.

- 항체의 pre-formulation study를 통해 solubility, 온도, 환경 등에 대한 안정성을 확보하여 비임상 GLP 독성 시험에 대한 기초 자료를 확보함.

- 항체 치료제 개발을 위한 기준 및 시험법을 확립하였으며 이에 따라 비임상 시료를 분석한 결과 기준에 적합함을 확인하였음.

3-5 항암제 임상 0/1 상 시험을 위한 고민감도 고재현성 약동력학 분석 시스템 개발

본 연구를 통하여 0상 임상 시험 수행에 필요한 민감도를 달성하는 방법론을 확립할 수 있었으며, 상기 방법론을 ICR mice에 irinotecan을 투여한 후 채취한 검체에서 validate한 결과, 분석샘플 83.3 % 에서 variability가 20 % 이하로, 전체 재분석 시료 67 %의 variability가 20 % 미만이 되는 것을 요구하고 있는 EMA 의 까다로운 기준도 통과할 수 있는, 재현성이 우수한, 신뢰성이 있는 분석법임을 입증하였음. 한편 nanoLC를 성공적으로 pharmacokinetics 에 접목시키는 방법론을 개발하여 어떤 약제로 0상 임상 시험을 수행하더라도 trough level을 민감하게 짚 수 있는 infrastructure를 구축하였고, 이는 국제적으로도 최초의 성과라고 여겨짐

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동

2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

3) 지원과제번호(Acknowledgement)

- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역1)	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허				
발명특허				

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

구분	최종목표	달성내용	달성도 (%)	
			연차	최종
유전자치료제 (전임상)	아데노바이러스 Ad5.CMV.Rz.HSVtk와 나노(NCC-K1) 복합체를 이용한 두경부암 유전자 치료제의 전임상 시험 및 Ad5.CMV.Rz.HSVtk 단독의 뇌암 임상시험을 위한 전임상 시험	-바이러스/나노 복합체 전임상(독성, Bio-distribution) 프로토콜 확립	100	100
		- GMP 시설에서의 바이러스와 나노 생산	100	100
		-바이러스/나노 복합체를 이용한 두경부암 치료를 위한 효능 시험	90	90
		-아데노바이러스/나노 복합체 전임상시험	0	0
		-뇌암치료제의 임상시험을 위한 아데노바이러스의 전임상 시험	80	80
		-바이러스/나노 복합체 두경부암 임상시험 대상자 선정 및 임상시험의 프로토콜 완성 -뇌암의 임상시험의 대상자 선정 및 프로토콜 완성 - IND 신청 준비	30	30
HGF 중화 항체의 전임상 시험 완료		-NSCLC, sarcoma mouse xenograft model을 이용하여 항체 효능시험을 진행한 결과 종양성장억제 효과를 확인함.	100	100
		-전임상 시험을 위한 항체의 대량 생산 및 제형 선정을 완료하고 분석 진행함.	100	100
		-항체 안정성 시험, monkey에서 PK/PD, 면역원성 (immunogenicity) 시험, 단회 독 성 시험 진행. Distribution 연구 진행	100	100
		-임상시험 대상자 군의 기준 마련 IND 신청 준비 진행	0	0
고민감도 고재현성약력학방 법론 확립 고재현성 약동력		sensitivity (100 pg/mL of SN38)	90	90
		variability < 20% (in >80% incurred	90	90

학 분석 시스템 개발	samples)		
-------------	----------	--	--

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

구분	평가의 착안점	자체평가
유전자치료제 (전임상 시험)	-바이러스/나노 복합체 전임상 프로토콜을 확립되었는가?	나노와 나노/바이러스 복합체의 독성 및 bio-distribution 프로토콜이 완성되었음
	- GMP 시설에서의 바이러스와 나노 생산 하였는가?	GMP 시설에서 나노와 바이러스를 생산 완료 하였음
	-바이러스/나노 복합체를 이용한 두경부암 치료를 위한 효능 시험 진행하였는가?	세 가지의 두경부암 세포주에서 항암 효능을 검증하였음
	-아데노바이러스/나노 복합체 전임상시험 완료하였는가?	전임상의 비용이 과다하여 본 과제의 연구비 규모에서 전임상 시험을 진행 할 수가 없었음
	-뇌암치료제의 임상시험을 위한 아데노바이러스의 전임상 시험을 진행하였는가?	현재 MPI research에서 전임상이 진행되고 있음
	-바이러스/나노 복합체 두경부암 임상시험 대상자 선정 및 임상시험의 프로토콜 완성이 되었는가? -뇌암의 임상시험의 대상자 선정 및 프로토콜이 완성되었는가?	임상시험을 위한 프로토콜이 준비되어 있지 않음
항체치료제 (전임상시험)	-두 가지 이상의 동물 모델에서 HGF 중화항체의 치료효능을 검증하였는가?	중화 항체의 치료 효능이 검증 완료 되었음
	-전임상 시료 생산 여부	항체의 대량 생산이 완료되었음
	-안정성 시험, PK/PD, 면역원성시험, GLP 독성(단회독성 완료), distribution 연구 진입 및 완료여부	반복투여를 제외한 모든 독성시험이 완료 되었음
	-임상시험 대상자 군의 기준을 마련 및 프로토콜 작성 여부, IND 신청 준비 상태 (반복독성 완료시 바로 신청 가능 상태)	INF filing을 위한 임상시험 프로토콜 작성을 진행하고 있음
약동력학 분석 시스템 개발	고민감도 고재현성 약력학 방법론 개발	국제적으로 최초의 nanoLC를 이용하여 약력학측정법 확립을 통해 0상 임상시험을 지원할 수 있는 LC-MS 약력학방법론 확립

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	IF >5
산업재산권 등록		
기 타	1	기술이전 1건

(2) 연구성과의 활용계획

- 확립된 나노와 아데노바이러스 복합체 구성의 최적 조건을 아데노바이러스의 기초 연구에 활용할 수 있을 것으로 여겨짐
- 아데노바이러스 Ad5CMV.Rz.HSVtk의 전임상 시험을 완료하고 식약청 허가를 획득하여 뇌암 치료제 임상시험 phase 1을 진행하고자 함.
- 아데노바이러스 Ad5CMV.Rz.HSVtk를 catheter를 이용하여 간암으로 직접 주사하는 식약청 허가를 획득하여 임상시험을 진행하고자 함.
- 아데노바이러스 Ad5CMV.Rz.HSVtk를 정맥주사로 주사하여 간으로 전이되는 암을 대상으로 하는 식약청 허가를 획득하여 임상시험을 진행하고자 함.
- 대량 생산된 항체는 1년 이내에 비임상 GLP 반복독성 시험에 이용되며 내부 표준품으로 활용할 예정임. 또한, 이를 이용하여 장기 보존 안정성 시험을 진행할 계획임.
- 대량 생산에 필요한 배양공정, 정제공정, 기준 및 시험법은 1년 이내에 tech transfer를 통해 GMP 시설에서의 임상 시료 생산에 활용될 계획임.
- 비임상 GLP 반복독성 시험, PK시험, 세포주 개발 및 안정성 시험, 기준 및 시험법, 안정성 시험 결과, 동물 효력 시험 자료 등은 1-2년 이내의 IND filing과 임상 시험에 활용될 예정임.
- 동물효력 시험 결과는 임상에서의 적응증 선정에 활용될 예정이며 적응증 확대를 위해 지속적으로 단독 투여, 병용 투여에 의한 효력 시험이 필요함.
- 약동력학 분석 시스템 개발을 통하여 임상0상 시험 수행 지원

6. 참고문헌

7.첨부서류