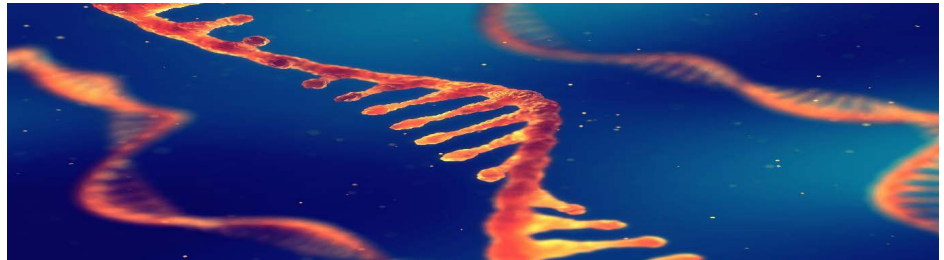


시판 올리고뉴클레오타이드 출발물질의 포장재 투과 식별



저자

Frederic Pulliere, Christopher
Welsby
Agilent Technologies, Inc.

개요

핸드헬드 Raman 분광기는 phosphoramidite로도 알려진 올리고뉴클레오타이드 출발물질을 불투명 포장재를 투과해 선택적으로 식별할 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 공간 오프셋 라만 분광법(SORS)에 기반을 둔 애질런트 핸드헬드 Raman 시스템을 사용해 의약품 제조 및 품질 관리기준(GMP)에 따라 phosphoramidite의 화학적 ID를 식별하는 원리 및 실행 방법에 대해 서술합니다.

서론

코로나19 팬데믹 기간 동안 과학자가 아닌 이들도 SARS-CoV-2의 빠른 검출에 대한 관심으로 인해 잘 알려진 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 진단법에 익숙해지게 되었습니다. PCR 테스트는 phosphoramidite라 불리는 보호된 뉴클레오사이드를 구성 요소로 사용해 합성된 뉴클레오타이드 또는 짧은 RNA/DNA 분자를 활용합니다. 이 구성 요소의 배열, 화학적 변형, 수는 질병 스크리닝, 생체역학 연구, 범죄 법과학 등의 응용 분야에서 표적 RNA/DNA 시퀀스에 대한 특수한 결합력을 좌우합니다. 지난 몇 년간 올리고뉴클레오타이드 응용 연구에 대한 수요가 급증하면서, 이와 같은 수요 및 품질 요건을 충족시키기 위한 공급망 확충이 절실해지고 있습니다. 현재 GMP (cGMP)에서는 수신 시 원료 식별, 품질 기준 유지 등과 같은 테스트를 의무로 하고 있습니다. 이와 같은 테스트는 올리고뉴클레오타이드 생산 절차에 잘못되거나, 기준에 미치지 못하거나, 변조된 원료의 유입을 막는 1차 방어선의 역할을 합니다.

이 응용 자료에서는 핸드헬드 Raman 분광기인 Agilent Vaya Raman 원료 ID 확인 시스템을 사용해 올리고뉴클레오타이드 합성에 사용되는 여러 종류의 시판 phosphoramidite를 분석하였습니다. 올리고뉴클레오타이드는 국제의약품규제조화위원회(ICH) 가이드라인 Q11에 서술된 바와 같이 출발 물질로서 사용할 수 있습니다. 이 분석의 목적은 Raman 분광법이 cGMP 생산 환경에서 불투명 포장재를 투과해 바이오의약품 재료를 식별 및 구분하는 효과적인 솔루션임을 시연하는 것입니다.

Raman 분광법은 대부분의 약전에서 ID 테스트를 위해 사용할 수 있는 분광 기법입니다.

Raman 분광법은 특정 분석물질의 단색 입사광이 비탄력적으로 산란되는 것을 기록 및 분석하는 것에 기초한 광학 기법입니다. 이는 대부분의 약전에 구체적으로 명시되어 있습니다. 해당 부분은 미국 약전 챕터 USP <858> Raman 분광법 및 USP <1858> Raman 분광법 - 이론 및 실행, 유럽 약전 챕터 EP 2.2.48, 중국 약전 일반 규칙 섹션 0421, 일본 약전(Supplement II, JP XVII) 섹션 2.26입니다. 이 약전에서는 기법의 이론, 메인 기법, 기기 성능 요건, 제약 기관의 품질 관리 작업을 지원하기 위한 관련 응용 등에 대해 서술하고 있습니다. 이 약전 챕터에서는 Raman을 원료의 식별 테스트 및 생산 투입을 위해 Mid-IR과 같은 분자 분광법과 동등한 기술로 설명됩니다.¹⁻⁴ 또한 분석법 견고성을 보장하기 위한 정량법 개발 및 인증에 대한 권장 사항을 제시합니다.⁵

약전 준수 ID 테스트를 위한 Raman 분광법의 일종인 SORS

기존 방식의 Raman 분광법(CRS)으로 불리는 핸드헬드 후면 산란 Raman 분광법을 이용한 식별 테스트는 다수의 제약 참고에서 많이 쓰이는 방법입니다. 이 방법은 폴리에틸렌 포장재 또는 유리병과 같은 투명 용기 속 원료 식별을 빠르게 수행합니다. 그러나 투명 재질만을 투과할 수 있는 CRS 분석의 한계는 불투명 포장재를 투과해 원료를 직접 분석할 수 있는 약전 준수 방법론인 SORS에 대한 필요를 가져왔습니다. 불투명 포장재의 예로는 여러 겹의 종이 봉지, 백색 폴리에틸렌 용기, 푸른색 통 등이 있습니다. SORS에서는 포장재를 투과하는 원료의 식별을 위해 일반적으로 포장재의 표면을 2회 Raman 측정합니다. 그 중 하나는 “zero”라 불리며, 여기 영역과 검출 영역이 일치합니다. 다른 하나는 “offset” 포지션(예: 여기 영역이 더 이상 검출 영역과 일치하지 않은 곳)에서 보통 몇 mm 정도 떨어져 수행됩니다. 포장재 정보가 주로 포함된 제로 스펙트럼을 스칼라로 차감하여 재료 내용물 정보가 주로 포함된 오프셋 스펙트럼을 얻습니다. 이렇게 포장재 정보가 포함되지 않은 스펙트럼을 얻을 수 있으며, 이는 알려진 스펙트럼 라이브러리와 대조하는 데 사용됩니다. 예를 들어 여러 겹의 종이 봉지 내에 들어있는 lactose monohydrate는 종이 재료 또는 관련 신호 정보 없이도 식별이 가능합니다.

빠르고 특이성 높은 원료 ID를 위한 SORS

애질런트는 cGMP 환경에서 사용할 수 있는 최초의 핸드헬드 SORS 분광기를 출시했습니다. Vaya는 의약품 원료를 입고 즉시 적절하고 빠르게 식별합니다. SORS 기술을 기초로 만들어진 Vaya는 투명 및 불투명 포장재를 직접 투과해 부형제, 원료의약품(API), 기타 원재료의 화학적 ID를 수행하는 참고 인력을 지원합니다(그림 1). 포장재를 열 필요가 없으며, 샘플링이나 용기의 불필요한 이동도 할 필요가 없어 샘플링 부스 역시 없어도 됩니다. Vaya는 SORS 기술을 이용해 분석물질의 여러 진동 모드를 조사하고, 고유의 화학적 지문을 얻어 물질의 정체체를 확인합니다. 또한 이 기기는 부분입체이성질체, 위치이성질체, 동질이상 등의 유사 물질과 분석물질을 높은 확실성으로 구별하여 위양성(false positive)을 방지합니다. 참고 인력 및 품질 관리 인력은 Vaya를 이용해 수신하는 용기를 빠르게 확인한 후 몇 시간 만에 이를 생산 공정에 투입할 수 있습니다. 이와 달리 Mid-IR, NIRS, CRS를 사용하면 이 과정에 수일이 소요될 수 있습니다.

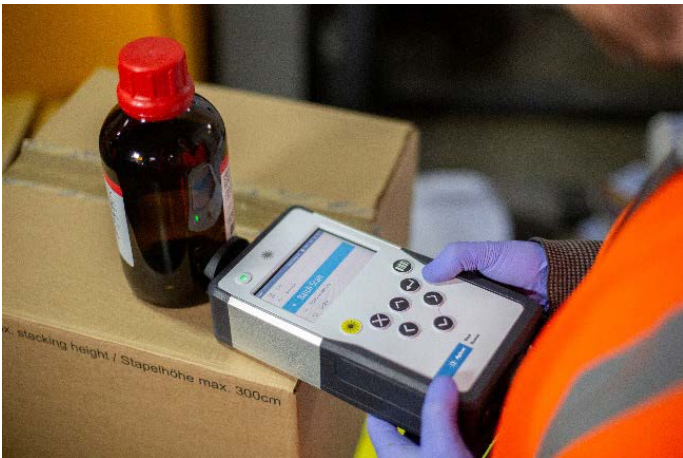


그림 1. Agilent Vaya Raman은 갈색 병을 직접 투과해 올리고뉴클레오타이드 출발 물질을 식별할 수 있습니다.

Vaya의 쉬운 배치

용도에 적합한 핸드헬드 솔루션에 대한 인기가 증가하면서 Mid-IR 및 NIRS와 같은 전통적인 분자 분광법에 대한 인기는 떨어지고 Vaya와 같은 기기가 ID 솔루션의 대체 기기로 확산되고 있습니다. 새로운 대체 ID 기법으로의 전환에 따른 규제 관련 처리는 간단합니다. 대부분의 지역에서 연간 보고서를 통해 대체 분석법을 추가함으로써 제조 과정 변경 요청이 가능하며 (미국), 또는 전자 보고 및 30일 이내의 응답(유럽)으로 규제를 충족시킬 수 있습니다. 보고에 필요한 증거는 일반적으로 테스트 결과, 기존 ID 기법과의 비교 가능 프로토콜(옵션) 및/또는 비교 인증 데이터입니다. Vaya는 보고 요건, 증거 준비, 뒤이은 배치 지원을 위해 21 미국연방규정집(CFR) Part 11 및 GMP 요건 지원 기능을 포함하고 있습니다. Vaya의 마법사 기반 ID 분석법 개발 및 밸리데이션 모듈은 고급 사용자들이 USP <1225> 또는 ICH Q2 (R1)을 충족시키는 강력한 분석법을 개발할 수 있도록 합니다.

이 밸리데이션 모듈에서 개발 중인 분석법은 생산에 적용되고 있는 다른 기존 분석법과의 비교 확인을 통해 식별 충돌 여부 확인이 가능합니다(그림 2).

또한, 분석법 개발자가 양성 및 음성 챌린지를 실행하여 분석법의 견고성과 유효성을 테스트할 수 있습니다(그림 3). Vaya는 사용자가 여러 다른 로트를 테스트할 수 있도록 합니다. 양성 테스트를 위해서는 포장재 내 원료의 여러 지점을 샘플링할 수 있고, 음성 테스트를 위해서는 창고에서 통과될 수 있는 관련 구조를 테스트할 수 있습니다. cGMP 및 감사 목적을 위해 검증 모듈에는 자동화된 보고 및 감사 추적 기능이 포함됩니다.

A

Method Assessment 21 Sep 21, 11:14 FPr

DMT DABZ PHOSPHORAMIDITE V1

Method	Result	LMC Score	R ² Score
⚠ DMT 2O METHYL RABZ PHI Pass		0.914	0.910

B

Method Assessment 21 Sep 21, 12:46 FPr

DMT DABZ PHOSPHORAMIDITE V2

Method	Result	LMC Score	R ² Score
No similar methods detected			

그림 2. 분석법 평가: DMT-dA(bz) Phosphoramidite의 제조 과정에서 분석법 교차 확인, (A) 유사 시료 첨가 전, (B) 유사 시료 첨가 후(예: DMT-2'O-Methyl-rA(bz) Phosphoramidite).

A

Validation Scan Results 21 Sep 21, 12:23 FPr

Spectra Result

✓ Validation Pass Status: Enabled

Method: DMT 2O METHYL RABZ PHOSPHORAMID...
 Sample ID: 2021_09_21_1107_1 Expected Result: Pass
 Date/Time: 21 Sep 21, 11:07 Actual Result: Pass

Add Comment Disable Finish

B

Validation Scan Results 28 Oct 21, 08:41 FPr

Spectra Result

✓ Validation Pass Status: Enabled

Method: DMT 2O METHYL RABZ PHOSPHORAMID...
 Sample ID: 2021_09_21_1224_3 Expected Result: Fail
 Date/Time: 21 Sep 21, 12:24 Actual Result: Fail

Add Comment Disable Finish

그림 3. DMT-2'O-Methyl-rA(bz) Phosphoramidite의 (A) 양성 챌린지 스캔, (B) 음성 챌린지 스캔.

배치 후에는 하드웨어/소프트웨어 및 분석법에 대한 정기적인 성능 적격성 평가(PQ)로 용도 적합성을 증명할 수 있습니다. Vaya에는 시스템 확인(그림 4) 기능이 포함되어 있으며, 이 기능은 수 초만에 기기 성능을 USP <858>, EP 2.2.48에서 규정한 광도 및 파장 정확도, 광도 정밀도, 레이저 출력 요건과 비교할 수 있습니다.

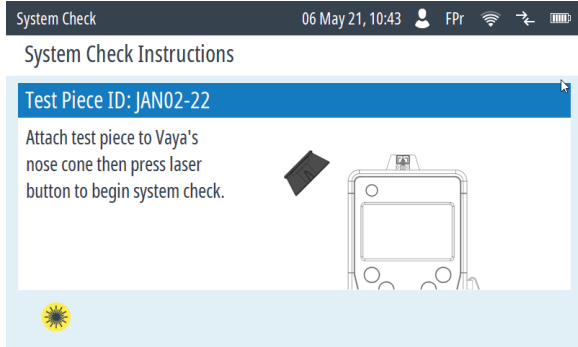


그림 4. Agilent Vaya Raman의 성능이 USP 및 EP 요건에 맞는지는 시스템 확인 모듈을 사용해 쉽게 확인할 수 있습니다.

분석법은 기존에 남은 물질이나 표준물질을 사용해 간단한 ID 테스트를 수행함으로써 쉽게 다시 적격성을 인증받을 수 있습니다. SORS Raman 스펙트럼/신호는 분석물질의 화학적 보완에 의존하고 있으므로 분석법 유지보수는 불필요하며, 이는 분석물질의 물리적 특성에 의해서도 영향을 받는 NIR 등의 사례와 대조됩니다.

참고에서 Vaya를 이용한 여러 작업을 수행하는 것에는 특별한 교육 과정이 필요하지 않습니다. 'Batch Scan'(그림 5)으로도 알려진 ID 검증 테스트는 철저한 전문 워크플로를 사용하며 의사 결정에 도움이 되는 해답을 제공함으로써, 기술자가 아닌 사용자도 쉽게 참고에서 분석을 수행할 수 있도록 합니다.

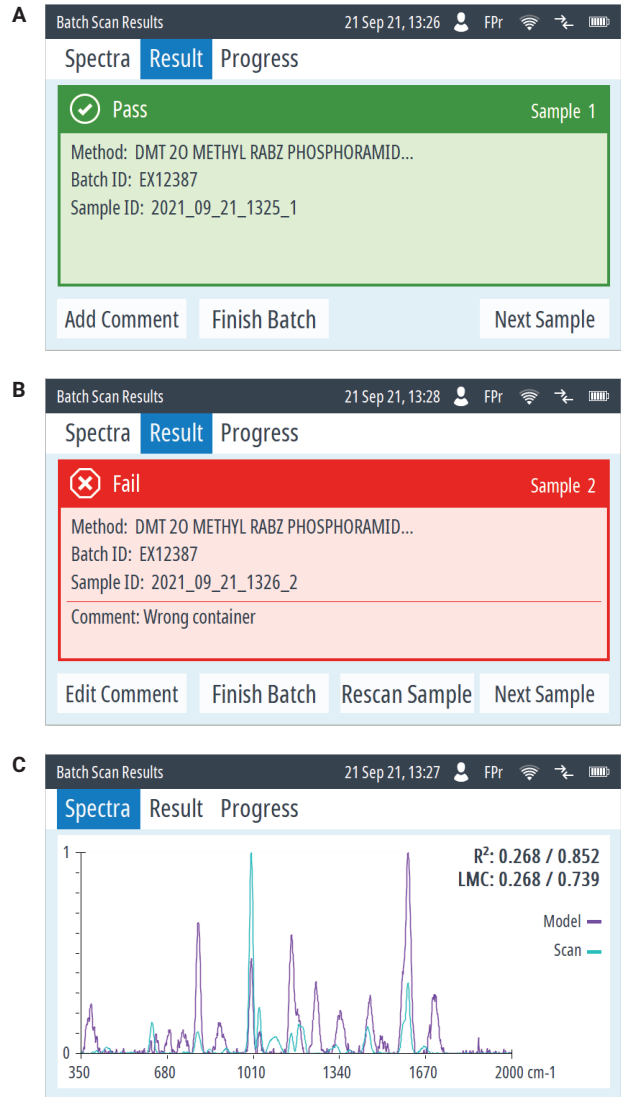


그림 5. Agilent Vaya Raman은 색상으로 표시된 이진법 결론을 제공하며, 이는 원료 ID 확인 시 통과(A) 또는 실패(B)를 나타냅니다. 분석물질의 스펙트럼은 추가 확인을 위한 레퍼런스 모델과 비교해 표시할 수 있습니다(C).

실험

모든 oligophosphoramidite 구성 요소는 Sigma Aldrich의 제품을 사용했습니다. ID 확인 방법은 각 올리고 구성 요소 재료에 따라 생성하였습니다. 이는 제조업체가 제공하는 갈색 병을 투과하기 위한 ID 확인법으로 개발되었습니다. 테스트한 여러 올리고 물질은 매우 유사한 스펙트럼을 보였기 때문에 이 기법의 뛰어난 선택성을 보여주기에 적합했습니다. 각 방법은 용기 내 물질의 10회 스캔 평균값으로부터 생성되었으며, 선택성 강화를 위한 시료 유사물질로서는 가장 유사한 재료의 분광 정보가 각 방법에 추가되었습니다. 그 후 결과 예상 통과 스캔(용기 내 물질) 및 예상 실패 스캔(용기 내 물질과 다른 유사물질)을 기준으로 모델이 개발 밸리데이션 단계에서 테스트되었습니다. 최종적으로 각 모델의 선택성을 확인하기 위해 각 올리고 물질을 모든 모델에 대해 3회 테스트하였습니다.

사용된 올리고 시료는 다음과 같습니다.

- DMT-2'O-Methyl-rA(bz) Phosphoramidite
- DMT-dA(bz)-CPG
- DMT-dG(ib) Phosphoramidite
- DMT-dT Phosphoramidite
- DMT-dA(bz) Phosphoramidite

결과 및 토의

그림 6은 갈색 유리병을 투과해 얻은 phosphoramidite 물질의 스펙트럼 데이터입니다. DMT-dG(ib) Phosphoramidite 및 DMT-dA(bz)-CPG 스펙트럼은 $1,000\text{cm}^{-1}$ 및 $1,500\text{cm}^{-1}$ 영역 내의 충분한 스펙트럼 차이를 보여주며, 이는 다른 네 가지 올리고 물질과 쉽게 구별이 가능합니다. 그러나 스펙트럼 오버레이는 또한 3개의 올리고 물질(DMT-2'O-Methyl-rA(bz) Phosphoramidite, DMT-dT Phosphoramidite, DMT-dA(bz) Phosphoramidite)이 서로 매우 유사한 스펙트럼을 가지고 있어 선택성이 높으면서 강력한 식별 방법을 개발하는 데 어려움이 있음을 보여줍니다. 이러한 구성 요소는 1개 이상의 모델에 대해 ID 2개의 결정 기준 임계값을 넘는 점수를 획득하여, 위양성(false positive) 식별 결과를 초래할 수 있습니다.

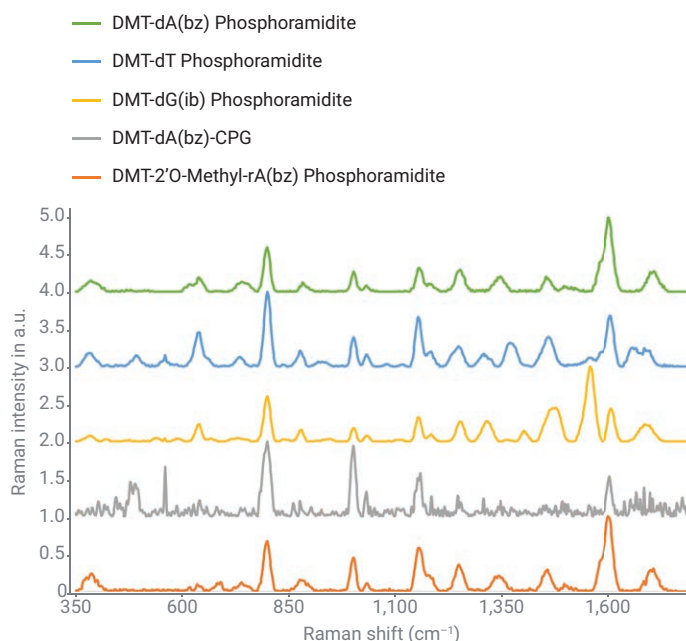


그림 6. 갈색 유리병 투과해 얻은 phosphoramidite의 Raman 스펙트럼 오버레이.

그림 7의 챌린지 매트릭스는 Vaya가 어떻게 분석법에 유사물질 시료 첨가 없이 올리고 스펙트럼을 식별할 수 있는지를 시각적으로 보여줍니다. 챌린지 매트릭스에서는 동일한 부류의 각 분석물질에 대해 개발된 ID 확인 분석법을 사용하여 부류의 각 분석물질에 대해 ID 테스트를 수행합니다. 이상적인 챌린지 매트릭스는 매트릭스 대각선을 따라 녹색으로 표시되는 “합격률”만을 가져야 하며, 이는 분석법이 해당 재료를 완벽히 인식함을 나타냅니다. 이상적인 매트릭스는 대각선에서 벗어난 부분에서는 불합격을 표시해야 하며, 이는 분석법이 잘못된 분석물질을 올바르게 거부함을 나타냅니다. 이 사례에서 매트릭스는 완벽하지 않으며, 3개의 가장 유사한 재료에서 명백한 위양성(false positive) 결과를 보입니다. 시료의 화학 및 결과 스펙트럼이 매우 유사해 분리가 불완전한 상황에서 Vaya는 분석법 수립에 유사 물질 시료 스펙트럼을 추가할 수 있는 기능을 갖추고 있습니다. 기기 알고리즘은 이 추가 데이터 입력을 통해 자동으로 스캔 스코어 임계점을 조정하고 위양성(false positive) 없이 완벽한 식별을 수행할 수 있습니다.

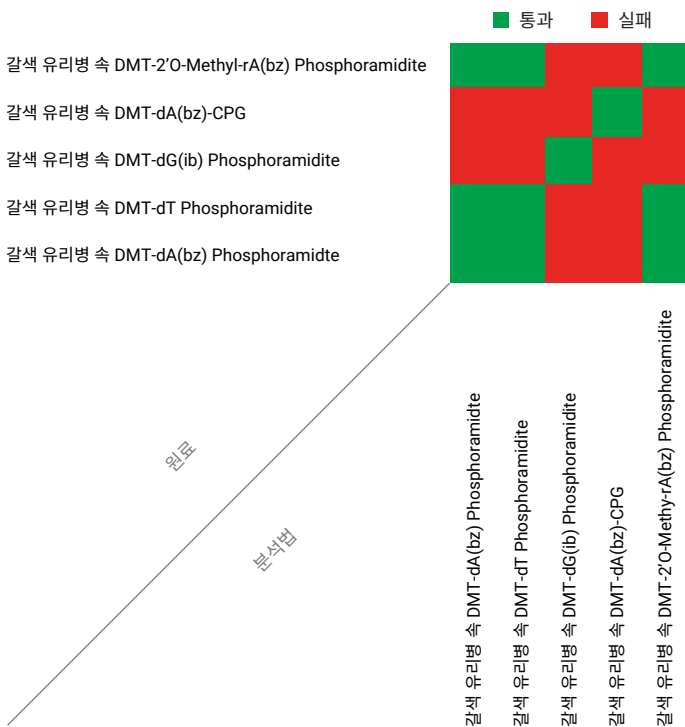


그림 7. 모델에 유사 시료를 첨가하지 않은 phosphoramidite의 챌린지 매트릭스.

이상적인 매트릭스는 분석법 그룹이 매우 낮은 위양성(false positive)을 보이고 참고 환경에 배치할 수 있음을 보여줍니다. 그림 8은 분석법이 선택성 강화를 위한 각 유사물질 시료의 첨가로 최적화된 올리고 구성 요소 챌린지 매트릭스를 보여줍니다. 이는 Vaya가 쉽게 갈색 유리병을 투과해 모든 phosphoramidite를 식별할 수 있음을 나타냅니다.

Vaya를 이용한 통과 또는 실패 결과 결정

이전 섹션에서 설명한 Vaya의 선택성은 상관 계수(R²)와 선형 모델 계수(LMC)를 기반으로 한 2개의 스코어 결정 엔진을 사용하여 도출됩니다. R²는 미지의 시료 스펙트럼이 분석법의 모델 스펙트럼과 충분히 유사한지 확인하기 위해 Raman 분광법에서 일반적으로 사용하는 정량 지표이기 때문에, 2개 스코어 시스템은 이점을 가집니다. LMC는 결정 엔진의 특이성을 향상시키기 위한 추가 검사를 제공합니다. LMC는 챌린지(예: 분석물질 스펙트럼)와 같은 더 많은 스펙트럼을 모델에 통합하고 LMC 점수에 미치는 영향을 관찰합니다.

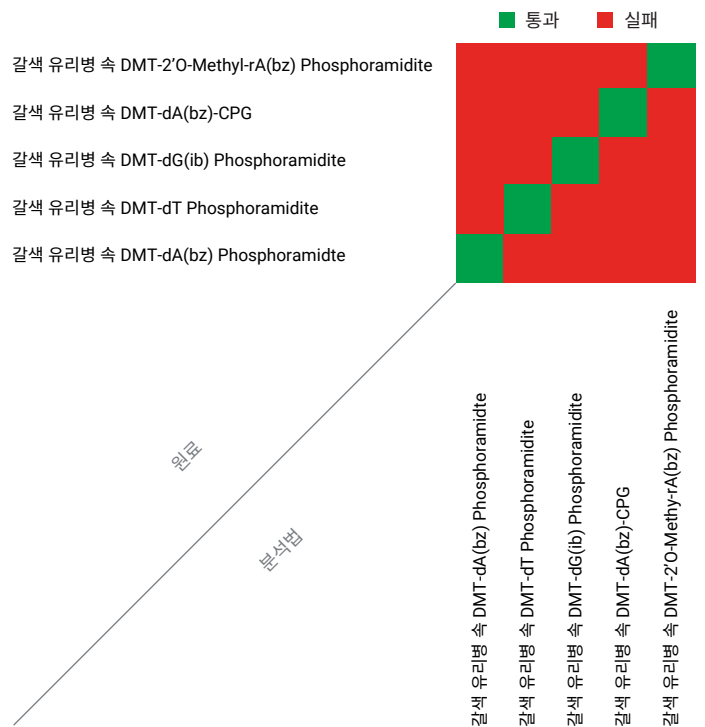


그림 8. 모델에 유사 시료를 첨가한 phosphoramidite의 챌린지 매트릭스.

결론

이제 Agilent Vaya Raman 시스템을 이용하면 phosphoramidite와 같은 올리고 물질을 포장재 개봉 없이 확인하는 것이 가능합니다. Vaya는 원료를 신속하게 식별하고 밀접하게 관련된 저가 유사체의 경우에도 입고 오류 또는 고의적인 대체를 감지할 수 있습니다. Vaya를 사용하면 올리고 물질 및 기타 바이오의약품 원료를 수 초 내에 확인할 수 있습니다.

참고 문헌

1. USP <1858> Raman Spectroscopy- Theory and Practice: Quote from Page 2/8 Section Qualitative and Quantitative Raman Measurements/ Qualitative Raman Measurements: Qualitative Raman measurements yield spectral information about the molecular structure of the sample. Because the Raman spectrum is specific for a given compound, qualitative Raman measurements can be used as a compendial identification test. See Spectroscopic Identification Tests<197>.
2. European Pharmacopeia Chapter: EP 2.2.48 Raman Spectroscopy: When the Raman spectra of a sample and the Reference Standard of a substance to be identified are compared and both spectra exhibit similar scattering intensities at the same Raman shifts, the identity of those can be confirmed.
3. Chinese Pharmacopeia General Rule Section 0421: Raman spectrum can give accurate spectral information about the vibrational bands present in the sample. The contrast of the spectrum of the test sample with the standard sample collected in the same measurement conditions should be carried out, if the two spectra match in configurations and intensities, the two samples may be identical except stereoisomers.
4. Japanese Pharmacopeia (Supplement II, JP XVII) section 2.26/ 5.1: When the Raman spectra of a sample and the Reference Standard of a substance to be identified are compared and both spectra exhibit similar scattering intensities at the same Raman shifts, the identity of those can be confirmed.
5. European Pharmacopeia Chapter: EP 2.2.48: Record the spectra of a suitable number of materials which present typical variation (manufacturer, batch, particle size, impurity profile, etc.) and comply with the requirements of the monograph or established specifications. The number and selection of samples in the database depends on the specific application. Suitable mathematical pre-treatments of the Raman spectrum may facilitate qualitative comparison of spectra (e.g., baseline correction, normalization, derivatives, cosmic ray removal). The selectivity of the database that makes it possible to identify a given material and distinguish it adequately from other materials in the database is to be confirmed during the validation procedure. The spectra of the material to be examined can be compared with the spectral reference library using chemometric methods (e.g., similarity and distance measures, classification methods); these methods involve the set-up, assessment, and validation of chemometric model by the analyst.

www.agilent.com/chem/raman-vaya

DE44483.199756944

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 12월 14일, 한국에서 인쇄
5994-4239KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com