

Agilent NanoDis 시스템 분석법 개발 가이드

저자

Dr. Emre Türeli
MyBiotech

Dr. Karen Krauel-Göllner
Agilent Technologies, Inc.

서론

현대 신약 개발의 주요한 어려움 중 하나는 많은 의약품 후보물질의 수용성 용해도가 낮다는 것입니다. 나노입자 제제는 수용성 용해도가 낮은 약물의 생체 이용률을 높이는 매력적인 솔루션입니다. 용출 연구는 *in vitro* 조건에서 예상되는 *in vivo* 생체 이용률의 특성을 규명하는 데 사용되는 가장 중요한 분석법 중 하나입니다. 따라서 기대하는 높은 생체 이용률을 가진 최종 제제를 보다 쉽게 선택하기 위해서는 나노입자 개발 과정에서의 효율적인 용출 분석법이 필요합니다. 또한 보다 이후의 제품 수명주기 단계에서 품질 관리 목적으로도 중요한 역할을 합니다. 따라서, 용출된 약물과 용출되지 않는 약물의 분리는 모든 용출 연구에서 가장 중요한 요소 중 하나입니다.

나노입자는 용출되지 않는 물질로 간주되어 용출 매질에서 분리되어야 합니다. 현재의 용출 분석법들은 용출 연구에 사용되는 장비와 관계 없이 용출 매질에서 나노입자를 분리하는 효율이 낮은 문제 때문에 어려움을 겪고 있습니다. 또한, 기존 제제 시 사용되는 표준 여과 분석법이 샘플링 과정 중 용출 매질에서 나노입자를 분리하는 데 충분한 효과를 보이지 못합니다. 용출되지 않는 API를 분리하는 데에는 멤브레인 형태의 필터를 통한 여과가 매우 일반적으로 이용됩니다. 0.22 또는 0.45 μm 의 공극 크기를 가진 시린지 필터가 사용되지만 이 또한 문제점을 가지고 있습니다. 이 방법의 단점은 평균 입자 크기 500nm 미만의 입자가 필터를 막아 파열시키거나, 그대로 통과하여 용출 값을 지나치게 높인다는 것입니다. 0.02 μm 와 같이 더 작은 공극 크기를 갖는 필터를 이용할 수도 있지만, 이러한 필터는 샘플링 과정에서, 특히 매질의 나노입자 농도가 높은 경우에 빠르게 막히는 경향이 있습니다. 나노입자를 효율적으로 분리시키지 못하면 분리 과정 후 용출 매질에 나노입자가 남아있게 되어 결과적으로 용출 프로파일 분석에서 판독값이 부정확하게 높은 수치를 나타낼 수 있습니다. 요약하면, 개발 실험실에서 사용되는 현재의 용출 프로세스는 부적절한 여과 방법으로 인해 나노 제제의 *in vivo* 성능을 예측하기에 충분하지 않습니다.

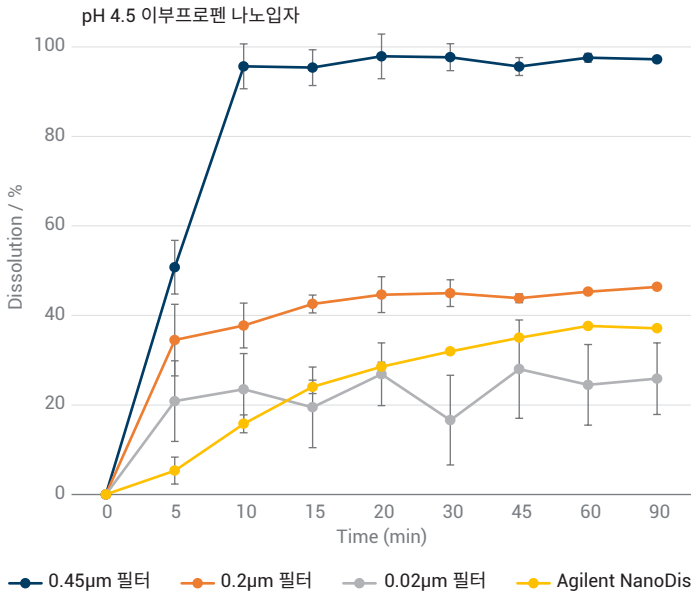


그림 1. 다양한 시린지 필터(0.45µm, 0.2µm 및 0.02µm)와 Agilent NanoDis 시스템을 사용한 아세트산 완충액 900mL(pH 4.5) 내 이부프로펜 나노입자 200mg의 용출 프로파일

Agilent NanoDis 시스템을 이용한 용출

Agilent NanoDis 시스템의 여과 원리는 종래의 용출 장치와 결합한 십자류 여과(Cross Flow Filtration, CFF)를 기반으로 하며 여과 과정을 자동화하는 데 목적을 두고 있습니다. NanoDis 시스템은 CFF의 장점을 활용하여 용출 매질에서 나노입자를 분리합니다. CFF는 개방형 여과 시스템이기 때문에 필터 케이크의

형성을 방지하고, 나노입자가 필터에 강제로 들어가지 않아 전량 여과(dead-end filtration)에서와 같이 필터가 자주 막히는 현상이 나타나지 않습니다. 또한, CFF 필터의 멤브레인 크기를 제제에 포함된 나노입자의 입자 크기에 따라 선택할 수 있습니다. NanoDis 시스템에서는 나노입자를 포함한 용출 매질을 펌핑을 통해 CFF 필터를 지나고, 여기서 입자가 없어진 여과액은 Agilent 850-DS 용출 샘플링 스테이션을 통해 수집됩니다. 여과 효율 및 여과액을 수집하는 데 필요한 시간은 매질에 존재하는 나노입자의 농도와 제제에 따라 달라집니다. 그러나, 까다로운 제제에서 여과 속도가 매우 낮다고 해도 NanoDis 시스템 사용 시 10mL/분 보다 높기 때문에, 용출 시료의 정량 분석에 충분한 시료 부피를 생성하고 매우 짧은 시점 간격을 실현할 수 있습니다.

필터 멤브레인 크기 및 유형 선택

용출 연구에 사용되는 십자류 필터의 필터 유형과 공극 크기는 나노입자 크기와 유형에 따라, 그리고 완전한 분리를 보장하도록 선택됩니다. 이러한 사양이 충족되어야 용출되지 않는 나노입자로 인한 간섭 없이 용출된 약물을 측정할 수 있습니다.

다양한 케미스트리로 사용할 수 있는 많은 종류의 CFF 멤브레인이 있습니다. 필터에 대한 나노입자와 API의 흡착을 방지하는 올바른 멤브레인 케미스트리를 선택하려면 필터 밸리데이션 테스트가 필요합니다. 필터 밸리데이션은 CFF 멤브레인고 동일한 화학적 성질을 갖는 표준 시린지 필터를 이용해 수행할 수 있습니다. 이와 대조적으로, API 필터 밸리데이션의 경우는 알고 있는 농도의 API를 용출 매질에서 용출시키고 0.45µm 등과 같은 공극 크기를 가진 시린지 필터를 통해 여과한 후 분석합니다. 나노입자 제제의 필터 밸리데이션을 위해 더 큰 공극 크기의 시린지 필터가 필요할 수 있습니다.

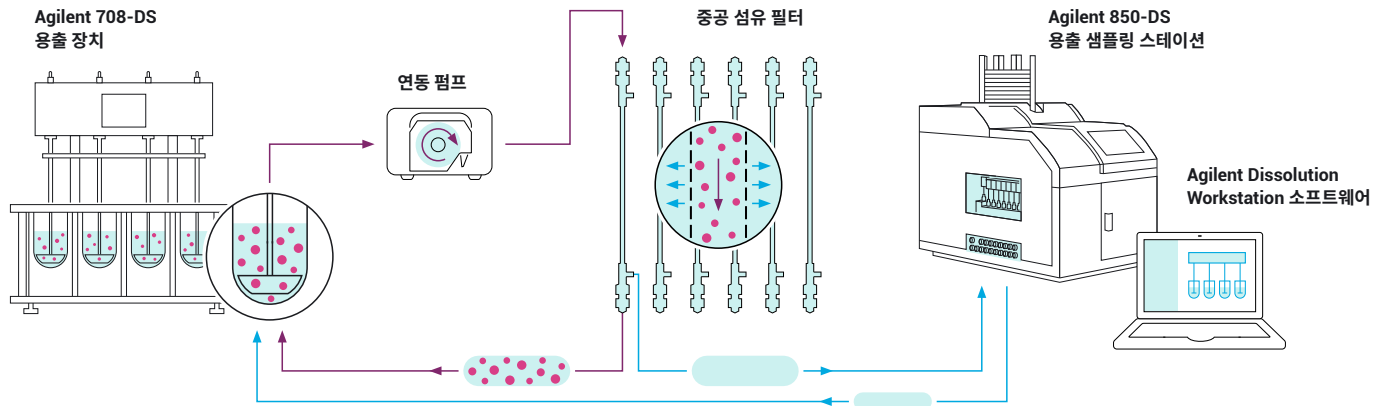


그림 2. NanoDis 시스템 도식도(용출된 API와 분산된 나노입자의 흐름 방향 및 분리와 함께 표시). USP 규제를 준수하는 Agilent 708-DS 용출 장치와 850-DS 용출 샘플링 스테이션을 사용했으며, Agilent Dissolution Workstation 소프트웨어(DWS)를 이용해 운용 및 전자 문서 작성

나노입자 제제를 알고 있는 농도로 용출 매질에 분산시키고 나노입자가 필터를 확실하게 통과하도록 적절한 공극 크기를 가진 시린지 필터에 통과시킵니다. 필터에서 발생할 수 있는 나노입자의 흡착을 계산하기 위해 여과 전, 후의 API를 사용할 수 있습니다.

약물 제제의 평균 입자 크기가 일차적인 고려사항이지만 입자 크기 분포 및 용출 매질에서의 입자 크기 분포 또한 고려해야 할 중요한 파라미터입니다. 비균질 입자 제제에서는 시료에 존재하는 가장 작은 입자의 입자 크기가 평균 입자 크기보다 훨씬 작을 수 있고, 또는 그 반대의 경우가 발생할 수 있습니다(즉, 시료에 존재하는 가장 큰 입자의 크기가 평균 입자 크기보다 훨씬 클 수 있음). 이 외에도 입자가 FeSSIF 및 FaSSIF와 같은 *in vivo* 관련 매질에 분산된 경우에 특히, 입자 표면 주위에 코로나가 형성되어 평균 입자 크기가 증가할 수 있습니다.

일반적으로, 올바른 멤브레인 공극 크기를 선택할 때 표 1을 참고할 수 있습니다.

표 1. 멤브레인 공극 크기 선택.

평균 입자 크기(nm)	멤브레인 공극 크기(kDa)
<10	10
10 ~ 25	50
25 ~ 50	100
50 ~ 150	300
>150	500

입자 크기 분포가 넓거나 시료에 더 작은 입자가 함께 존재하는 이중 분포인 경우, CFF 필터 멤브레인 크기를 그에 적절하게 조정해야 하며, 동시에 가장 작은 입자 크기에 대한 비율도 함께 고려해야 합니다. 또 다른 중요 파라미터는 용출 매질에 계면 활성제가 사용되는 경우에 형성되는 미셀(micelles)의 입자 크기입니다. 용출된 API의 미셀도 CFF 멤브레인에 남아 있을 수 있습니다. 따라서 멤브레인 크기를 선택할 때 미셀 크기도 고려해야 합니다. 필터 밸리데이션에 대한 자세한 내용은 참고문헌 섹션¹ 및 Repligen 웹사이트²에서도 확인할 수 있습니다.



그림 3. 십자류 흐름 필터(CFF)를 장착한 Agilent NanoDis 시스템

장비 및 소프트웨어 파라미터

장비 및 소프트웨어 파라미터의 최적화는 용출 매질에서 나노입자를 효율적으로 분리하기 위한 용출 분석법 개발 과정의 일부입니다.

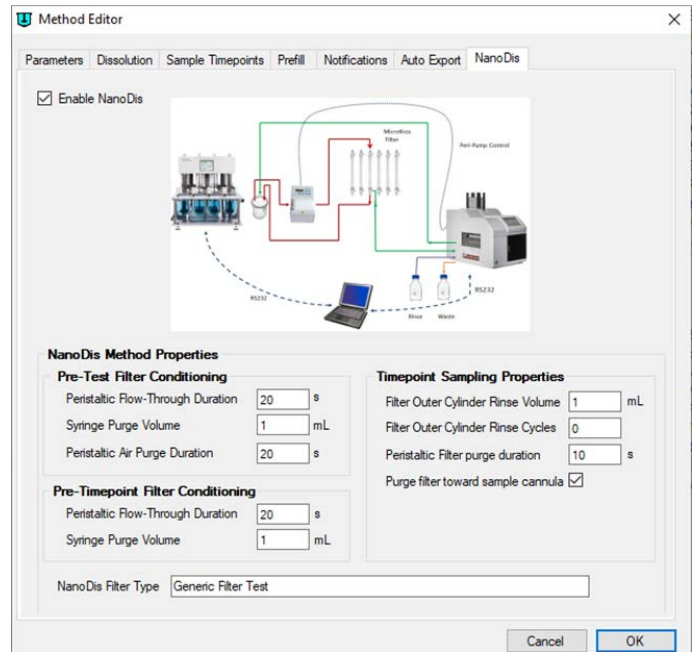


그림 4. Agilent Dissolution Workstation 소프트웨어의 NanoDis Tab을 보여주는 스크린샷

NanoDis 시스템은 Agilent Dissolution Workstation 소프트웨어 (DWS)에 의해 제어됩니다. 다음은 분석법 개발 과정에서 참고할 수 있는 중요한 파라미터 설정의 개요입니다.

NanoDis System의 분석법은 두 단계, 즉 용출 실행 시작에 앞선 필터 프리컨디셔닝 단계 및 실제 용출 실행으로 수행됩니다. 용출 실행의 각 시점 전에 추가적인 필터 프리컨디셔닝 단계가 먼저 수행됩니다. 이에 따른 일반적인 작업 순서는 다음과 같습니다.

1단계: 필터 프리컨디셔닝

펌프 속도: 펌프 속도는 연동 펌프에서 수동으로 조정합니다. CFF 멤브레인의 막간 차압(TMP)은 유속 증가에 따라 커지므로 여과액의 투과율도 같이 증가합니다. 요약하면, 유속을 증가시키면 수집되는 여과액 시료의 양을 늘릴 수 있습니다.

테스트 전 필터 컨디셔닝: 테스트 전 필터 컨디셔닝은 필터를 현재 용출 매질로 적시는 과정입니다. 이 과정은 용출 시작 전, 그리고 용출 용기에 제제를 도입하기 전에 시작됩니다. CFF 멤브레인을 통해 여과된 용출 매질은 용출 용기로 다시 보내지므로 테스트 전 필터 컨디셔닝 과정에서 용출 매질의 손실이 없습니다. 테스트 전 필터 컨디셔닝 단계가 끝나면 공기로 CFF 멤브레인을 퍼지하기 때문에 용출 매질이 완전하게 용기로 다시 보내지게 됩니다.

테스트 전 필터 컨디셔닝은 첫 번째 시점의 용출 수집부터 잘 이루어지도록 CFF 멤브레인을 준비한다는 점에서 중요합니다. 테스트 전 필터 컨디셔닝이 충분히 이루어지지 않으면 첫 시점에서 얻어지는 시료량이 감소합니다. 용출 결과(%)를 정확하게 계산하려면 정확한 시료 부피를 얻는 것이 중요합니다.

테스트 전 필터 컨디셔닝을 위해 다음과 같은 시작 파라미터를 사용할 수 있습니다.

작동	권장 설정
연동 펌프 flowthrough 시간 필터를 통과해 매질을 펌핑하는 시간(초)	240초
시린지 퍼지 볼륨 TFF(tangential flow filter, CFF와 동일)의 외부 실린더에서 용기로 다시 펌핑되는 부피(mL)	4mL
연동 펌프 에어퍼지 시간 연동 펌프를 역전시켜 필터의 중앙 코어를 비우고 다시 용기로 흘러 보냄	50초

2단계: 용출

제형을 용기에 도입하고 용출 실행을 시작합니다. NanoDis 시스템 사용 시 용출 테스트 시퀀스는 약간 변경됩니다. 각 시점 이전에 필터를 다시 컨디셔닝해야 하며, 이는 각 시점이 되기 직전에 완료됩니다.

시점 전 필터 컨디셔닝 변수

작동	권장 설정
연동 펌프 flowthrough 시간 필터를 통과해 매질을 펌핑하는 시간(초)	100초
시린지 퍼지 볼륨 TFF(tangential flow filter)의 외부 실린더에서 용기로 다시 펌핑되는 부피(mL)	2mL

시점 샘플링 특성

작동	권장 설정
프라이머 손실 부피 정확한 시점의 샘플링을 위한 샘플링 캐놀라 끝에서 니들 (850-DS)까지의 튜빙 부피	3.5mL
시료량 시료 트레이로 분주 되는 부피	1.0 ~ 5mL (분석에 따라 다름)
필터 외부 실린더 행균 부피 필터의 외부 실린더로 펌핑될 행균 매질의 부피; 총 퍼지 부피 = 퍼지 부피 + 필터 외부 실린더 행균 부피	4mL
연동 펌프 필터 퍼지 시간 샘플링 후, 필터 중앙 코어 내의 시료 매질은 다시 용기로 퍼지됨. 파라미터에 따라 연동 펌프가 중앙 코어를 퍼지하기 위해 실행되는 시간이 결정됨. 방향은 '시료 캐놀라쪽으로 필터 퍼지' 체크박스로 제어.	30초
시린지 퍼지 시린지 퍼지 사이클에 따라 필터의 외부 실린더, 그리고 필터와 시린지 유동 경로의 용기 사이의 모든 튜빙이 비워짐. 시린지 퍼지 부피 = 필터 외부 실린더 행균 부피 + 퍼지 부피	4mL
필터 외부 실린더 행균 사이클 시점이 끝나면 필터의 외부 코어를 행균 매질로 행균 수 있음. 값을 0으로 설정 시 행균 사이클이 실행되지 않음.	4mL로 1 ~ 3회

팁과 요령

멤브레인 최초 사용, 세척 및 보관

CFF 멤브레인은 공극 구조를 유지하기 위해 글리세롤에 담겨 배송됩니다. 처음 사용하기 전에는 최소 500mL의 정제수로 멤브레인을 세척하는 것이 좋습니다. 대안적으로, 용출 매질을 사용하여 멤브레인을 세척할 수 있습니다. 나노입자 제제에 따라 용출 실행 사이에 멤브레인을 세척하는 목적으로 정제수, 알코올 용액(20% 에탄올 또는 20% 이소프로판올) 또는 0.1N NaOH를 사용할 수 있습니다. 멤브레인은 실온에서 적합한 보관용 매질(예: 0.1 N NaOH)에 넣어 보관하는 것이 가장 좋습니다. 이는 미생물의 성장을 방지하고 섬유질이 건조되는 것을 막아줍니다.

멤브레인의 무결성 테스트

CFF 멤브레인의 무결성 테스트에는 원하는 평균 입자 크기를 가진 표준 나노입자가 대조 물질로 사용되며, 결과에 따라 CFF에 바람직한 멤브레인 공극 크기로 조정합니다. PLGA-Lumogen 나노입자를 이용하면 시료의 색상 유무에 따라 멤브레인의 무결성을 시각적으로 나타낼 수 있습니다.

멤브레인 막힘 테스트

CFF 멤브레인의 막힘 여부는 물로 용출 시험을 수행한 다음 여과된 시료의 양을 정량하여 결정합니다.

참고 문헌

1. Filter Validation Protocol: Agilent 850-DS Dissolution Sampling Station. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-3341EN, **2013**.
2. Repligen 'Find a Spectrum Hollow Fiber Filter' selection tool (<https://www.repligen.com/resources/configurators/selection-tools/find-hollow-fiber-filter>).

www.agilent.com/chem

DE.1479976852

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 10월 26일, 한국에서 인쇄
5994-2347KO

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

