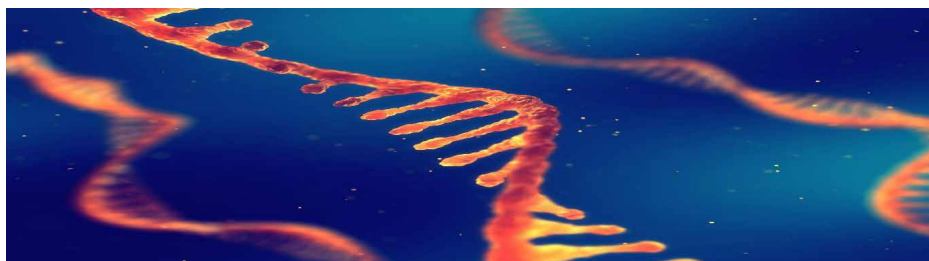


市販のオリゴヌクレオチド原材料の 容器越しの直接同定



著者

Frederic Pulliere and
Christopher Welsby
Agilent Technologies, Inc.

概要

ハンドヘルドラマン分光装置は、オリゴヌクレオチド原材料（別名ホスホロアミダイト）を直接褐色瓶越しにかつ選択的に同定できます。このアプリケーションノートでは、空間オフセット型ラマン分光（Spatially Offset Raman Spectroscopy: SORS）に基づいた Agilent ハンドヘルドラマンシステムの理論と、適正製造基準（GMP）環境下のホスホロアミダイトの化学同定検証への導入について説明します。

はじめに

COVID-19 パンデミックにおいて、科学に明るくない人々がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などのよく知られた診断メソッドに取り組んで、SARS-CoV-2 の存在を迅速に検出する方法を理解しようとしていました。PCR 試験で使用するヌクレオチドまたは短鎖 RNA/DNA 分子は、ホスホロアミダイトと呼ばれる保護ヌクレオシドを構成要素として合成されます。これらの構成要素の配置、化学修飾、数は、ターゲットの RNA/DNA 配列に固有の結合親和性を与え、疾患のスクリーニング、生化学研究、科学犯罪捜査で用いられています。オリゴヌクレオチドを必要とするアプリケーションの数がここ数年間で大幅に増大しているため、サプライチェーンは需要と品質要件への対応に追われています。受け入れ時の原材料同定など、現行の GMP (cGMP) の必須試験は、品質標準を維持します。この標準は、オリゴヌクレオチド製造プロセスにおいて、不適切な原材料、基準に満たない原材料、偽和物が混入した原材料の流入を防止するための第一線として機能しています。

このアプリケーションノートでは、ハンドヘルドラマン分光装置である Agilent Vaya ラマン原材料同定検証システムを用いて、オリゴヌクレオチドの合成で使用される複数の市販ホスホロアミダイトを分析しました。医薬品規制調和国際会議（ICH）のガイドライン Q11 に記載されているように、これらのオリゴヌクレオチドは原材料として使用できます。今回の分析の目的は、cGMP 製造環境での透明および不透明容器越しのバイオ医薬品材料の同定/識別において、ラマン分光法が有効なソリューションであることを実証することでした。

同定試験において大半の薬局方に準拠した分光分析手法であるラマン分光法

ラマン分光法は、特定成分の単色入射光の非弾性散乱を記録して分析する光学技術です。これは、大半の薬局方で詳細に説明されています。特に、米国薬局方の USP <858> Raman Spectroscopy（ラマン分光法）および USP <1858> Raman Spectroscopy – Theory and Practice（ラマン分光法 - 理論と実践）の各章、欧州薬局方 EP 2.2.48 章、中国薬局方一般規則セクション 0421、日本薬局方（追補 II、JP XVII）セクション 2.26 です。これらの薬局方は、その理論、主な手法、機器の性能要件、関連アプリケーションについて説明し、製薬会社の品質管理作業をサポートしています。これらの薬局方の各章では、原材料の同定試験と、それに続く製造への投入において、ラマンを中赤外線のような分子分光分析と同等の許容できる手法として説明しています。^{1~4} メソッドの堅牢性を確保するために、定性メソッド開発とバリデーションに関する推奨事項も提供されています。⁵

同定試験におけるラマン分光法の薬局方準拠のサブセットである SORS

従来のラマン分光法（Conventional Raman Spectroscopy: CRS）とも呼ばれるハンドヘルド後方散乱ラマン分光法による同定試験は、多くの医薬品倉庫で一般的に実施されています。この試験では、ポリエチレンライナやガラス瓶のような透明容器越しに原材料を迅速に同定できます。しかし、CRS 分析には、透明な仕切り越しでしか実施できないという限界があるため、原材料を不透明容器越しに直接分析する手法として薬局方で認可された SORS が出現しました。このような容器として、多層紙袋、白色のポリエチレン容器、青色のドラムがあります。容器越しの原材料の同定では通常、容器の表面で SORS により 2 回のラマン測定を実行します。1 回目の測定は「ゼロ」と呼ばれ、励起領域が検出領域と一致しています。2 回目の測定は「オフセット」の位置で実施し、通常は数 mm 離れた位置です。ここでは、励起領域は検出領域に一致していません。取り込んだ容器の情報が豊富なゼロスペクトルを、取り込んだ原材料の情報が豊富なオフセットスペクトルからスカラ量として差し引きします。これにより容器の影響がない原材料のスペクトルが得られ、これを既知のスペクトルのライブラリと比較します。例えば、多層紙袋中のラクトース水和物は、紙の材料や相対信号寄与が不明でも同定できます。

原材料同定用の高速かつ特異的な SORS

アジレントは、cGMP 環境で用いる初のハンドヘルド SORS 分光装置を発表しました。Vaya は、医薬品原材料の受け入れ時の同定を効率化・高速化します。Vaya は SORS 技術をベースにしており、賦形剤、医薬品有効成分、その他の原材料を、透明および不透明の容器越しに直接化学同定する倉庫作業員を支援します（図 1）。容器を開ける作業、サンプリング、容器の無駄な移動、サンプリング室は必要ありません。SORS により、異なる振動モードの分析対象物を測定して一意の化学的指紋を取得し、その同定を確認します。さらに、ジアステレオマー、位置異性体、多形のような類似物質の成分を、高い信頼性で偽陽性なしに識別します。倉庫作業員や品質管理グループは Vaya を使用することにより、約数時間で受け入れ容器を迅速に検証して、製造ラインに引き渡せます。一方、Mid-IR、NIRS、または CRS を使用した場合、このプロセスは数日を要します。



図 1. Agilent Vaya ラマンシステムでは、オリゴヌクレオチド原材料の同定を褐色瓶越しに直接検証できます。

Vaya の簡単な導入

目的に適したハンドヘルドソリューションの需要が高まり、現在では Mid-IR や NIRS などの従来の分子分光分析から移行して、Vaya のような代替の同定ソリューションが導入されています。新しい代替の同定手法への移行では、単純な規制手順に従います。多くの地域では、製造変更要求を提出し、年次報告書（米国）または 30 日以内に回答のある電子ファイリング（欧州）を通して、代替の手法を追加することになります。ファイリングで提出する証拠は一般的なものです。例えば、試験結果、以前の同定手法と比較可能なプロトコル（任意）、バリデーションの比較データなどがあります。ファイリング要件、証拠開発、その後の導入をサポートするために、Vaya には連邦規制法（CFR）第 21 条第 11 章および GMP の要求事項に対応する機能が組み込まれています。上級ユーザーは、Vaya のウィザードベースの同定メソッド開発およびバリデーションモジュールを使用して、USP <1225> または ICH Q2（R1）に適合する堅牢なメソッドを開発できます。

バリデーションモジュールでは、開発中のメソッドを稼働中の既存の他のメソッドに対してクロスチェックすることにより、同定の相違がないことを検証できます（図 2）。

さらに、陽性および陰性負荷試験を実施することにより、メソッドの堅牢性と妥当性を試験できます（図 3）。Vaya では、異なるロットの試験、容器中の正しい原材料の異なるサンプリング点での陽性負荷試験、倉庫に持ち込まれる可能性のある密接に関連する構造の陰性負荷試験を実施できます。バリデーションユニットには、cGMP および監査の目的で、レポートの自動作成と監査証拠トレーサビリティの機能が含まれています。

A

Method Assessment			
21 Sep 21, 11:14			
DMT DABZ PHOSPHORAMIDITE V1			
Method	Result	LMC Score	R ² Score
⚠ DMT 20 METHYL RABZ PH ₁	Pass	0.914	0.910

B

Method Assessment			
21 Sep 21, 12:46			
DMT DABZ PHOSPHORAMIDITE V2			
Method	Result	LMC Score	R ² Score
No similar methods detected			

図 2. メソッド評価：DMT-dA(bz) ホスホロアミダイトでの稼働中のメソッドに対するクロスチェック。(A) 類似したサンプルの追加前、(B) 類似したサンプルの追加後（この場合、DMT-2' O-メチル-rA(bz) ホスホロアミダイト）

A

Validation Scan Results	
21 Sep 21, 12:23	
Spectra	Result
✓ Validation Pass Status: Enabled Method: DMT 20 METHYL RABZ PHOSPHORAMID... Sample ID: 2021_09_21_1107_1 Date/Time: 21 Sep 21, 11:07 Expected Result: Pass Actual Result: Pass	
Add Comment	Disable Finish

B

Validation Scan Results	
28 Oct 21, 08:41	
Spectra	Result
✓ Validation Pass Status: Enabled Method: DMT 20 METHYL RABZ PHOSPHORAMID... Sample ID: 2021_09_21_1224_3 Date/Time: 21 Sep 21, 12:24 Expected Result: Fail Actual Result: Fail	
Add Comment	Disable Finish

図 3. DMT-2' O-メチル-rA(bz) ホスホロアミダイトでの (A) 陽性負荷試験および (B) 陰性負荷試験のスクリーン

導入後、ハードウェア/ソフトウェアとメソッドの通常の性能適格性評価 (PQ) により、使用に適合していることを十分に実証できます。Vaya にはシステムチェックが組み込まれており (図 4)、測光および波長精度に対する機器の性能、測光精度、および USP <858>、EP 2.2.48 で規定されているレーザー出力要件を数十秒間で検証します。

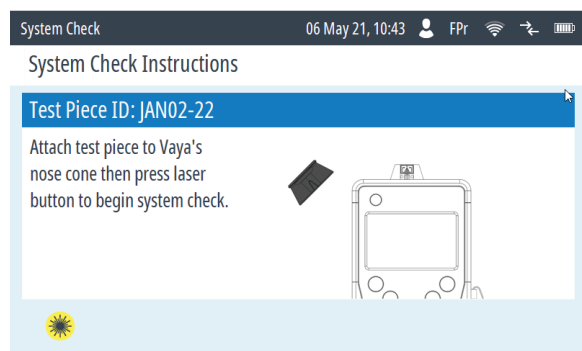


図 4. システムチェックモジュールを使用することで、Agilent Vaya ラマンシステムの性能を USP および EP の要件に照らして簡単に確認できます。

メソッドは、既存の保持物または標準を使用した単純な同定試験を実施することにより、簡単に再適格性評価できます。SORS ラマンスペクトル/信号は、例えば、分析対象物の物理的特性にも影響を受ける NIR とは異なり、分析対象物の化学的組成にのみ依存するため、メソッドのメンテナンスは不要です。

倉庫において Vaya でさまざまな作業を実施する場合、トレーニングはほぼ必要ありません。「バッチスキャン」と呼ばれる同定検証試験では (図 5)、厳格な専用ワークフローにより実用的な回答が提供されるため、専門技能を持たないユーザーでも倉庫内で簡単に分析を実施できます。

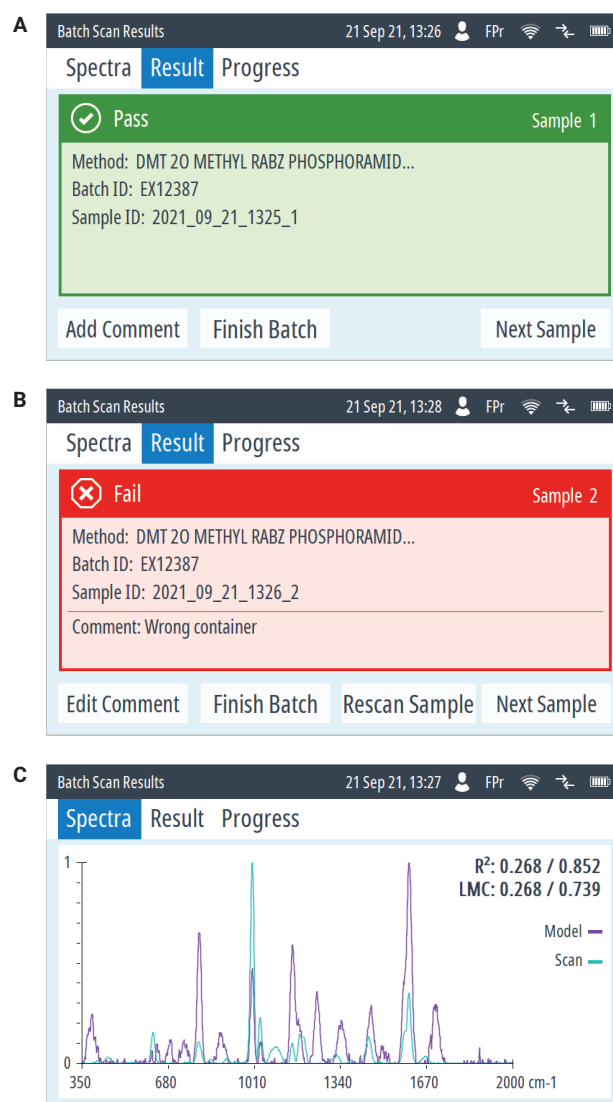


図 5. Agilent Vaya ラマンシステムは、原材料同定の検証において合格 (A) または不合格 (B) を示す色分けされた 2 値の回答を示します。分析対象物のスペクトルは、詳細な確認のためにリファレンスモデルに対して表示できます (C)。

実験方法

オリゴホスホロアミダイト構成要素はすべて Sigma Aldrich から入手しました。オリゴ構成要素材料ごとに、同定検証メソッドを作成しました。これらのメソッドは、メーカー提供の褐色瓶越しの同定検証向けに開発しました。試験した一部のオリゴではスペクトルが非常に類似していたため、この手法の優れた選択性を示す実例を用意しました。各メソッドは、容器中の材料を 10 回スキャンした平均値から作成しており、最も類似している材料を類似サンプルとして各メソッドに分光的に追加し、選択性を拡張しました。次に、予期される合格スキャン（容器中の分析対象材料）および予期される不合格スキャン（容器中の別の類似した材料）の観点から、開発のバリデーション段階で得られたモデルを試験しました。最後に、各モデルの選択性を確認するために、モデルごとに各オリゴを 3 回試験しました。

オリゴサンプルは次のとおりでした。

- DMT-2' O-メチル-rA(bz) ホスホロアミダイト
- DMT-dA(bz)-CPG
- DMT-dG(ib) ホスホロアミダイト
- DMT-dT ホスホロアミダイト
- DMT-dA(bz) ホスホロアミダイト

結果と考察

図 6 に、褐色瓶容器越しに得られた、ホスホロアミダイト材料のスペクトルデータを示します。DMT-dG(ib) ホスホロアミダイトと DMT-dA(bz)-CPG のスペクトルは $1,000\text{ cm}^{-1}$ と $1,500\text{ cm}^{-1}$ の領域で十分な差が認められ、4 種類のその他のオリゴ材料すべてから簡単に識別可能です。しかし、スペクトルの重ね表示から、3 種類のオリゴ（DMT-2' O-メチル-rA(bz) ホスホロアミダイト、DMT-dT ホスホロアミダイト、および DMT-dA(bz) ホスホロアミダイト）はスペクトルが非常に類似していることがわかり、これは同定用の選択的かつ堅牢なメソッドの開発に課題があることを示しています。これらの構成要素は、複数のモデルに対して同定二決定基準のスレッシュホールドを超えたスコアを持つと考えられ、偽陽性の同定結果を生成してしまいます。

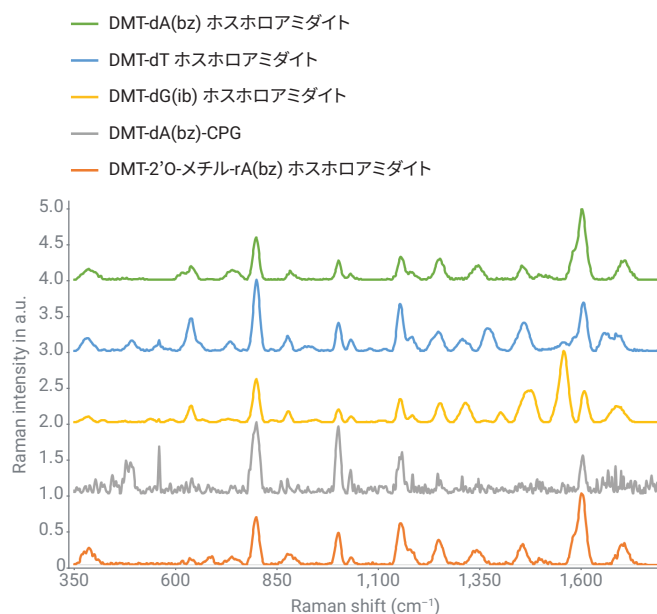


図 6. 褐色瓶越しに取り込んだ、ホスホロアミダイトのラマンスペクトルの重ね表示

図 7 の負荷試験マトリックスは、類似したサンプルをメソッドに追加せずに、Vaya がどのようにしてオリゴスペクトルを識別したのかを図で示しています。負荷試験マトリックスでは、同じクラスの成分ごとに開発した同定検証メソッドを使用して、クラス内の各成分の同定試験を実施しています。理想的な負荷試験マトリックスでは、マトリックスの対角に沿った緑色で示されているセルでのみ「合格率スコア」が得られる必要があります。これは、メソッドが対応する材料を完璧に認識していることを示しています。また、対角から外れたセルでのみ、赤色の不合格率スコアが得られる必要があります。これは、メソッドにより、該当外の材料が不合格として正しく判定されていることを示しています。この例ではマトリックスは完璧ではなく、3 種類の最も類似した材料については偽陽性で一致していることがわかっています。このような場合、サンプルの化学作用と得られたスペクトルが非常に類似しているため分離が不十分になりますが、Vaya では類似したサンプルのスペクトルをメソッド作成に追加できます。これらのデータを追加することにより、機器のアルゴリズムでスキャンスコアのスレッショールドが自動的に調整され、偽陽性のない完璧な同定を実現できます。

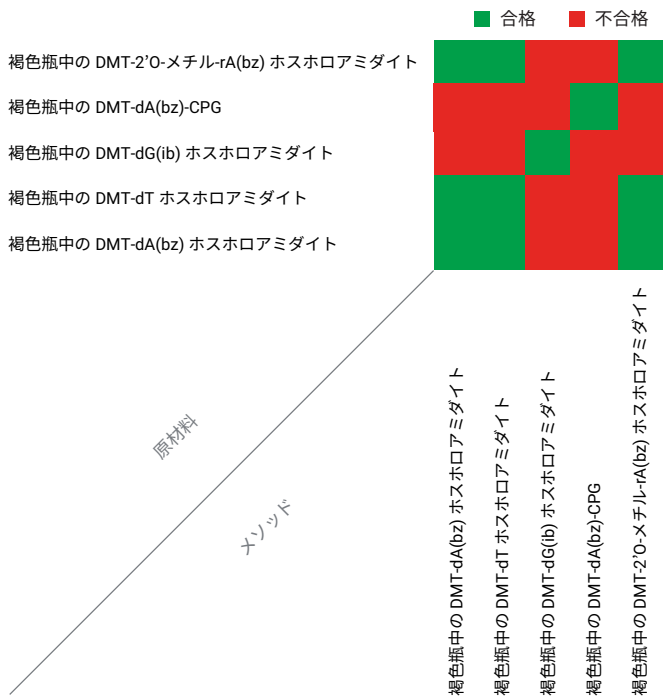


図 7. 類似したサンプルをモデルに追加しない、ホスホロアミダイトの負荷試験マトリックス

理想的なマトリックスは、1 グループのメソッドでは偽陽性が非常に低いレベルで、倉庫環境に導入可能であることを示しています。図 8 に、オリゴ構成要素の負荷試験マトリックスを示します。ここでは、それぞれの類似したサンプルを追加して選択性を強化するようにメソッドを最適化しています。これは、Vaya が褐色瓶越しにすべてのホスホロアミダイトを簡単に識別できることを示しています。

Vaya による合否結果の判別

前のセクションで実証された Vaya の選択性能力をもたらした要因の 1 つは、相関係数 (R^2) と線形モデル係数 (Linear Model Coefficient: LMC) に基づく 2 スコア決定エンジンの使用です。 R^2 は、メソッド内の未知のサンプルスペクトルとモデルスペクトルの類似度合いを判別するために、ラマン分光法で一般的に使用される定量的メトリックであるため、2 スコアシステムは有利です。LMC は、決定エンジンの特異性を拡張するための追加の確認手段です。これは、負荷試験材料 (つまり、成分スペクトル) のような追加のスペクトルをモデルに組み込み、LMC スコアを通してその影響を観察することをベースにしています。

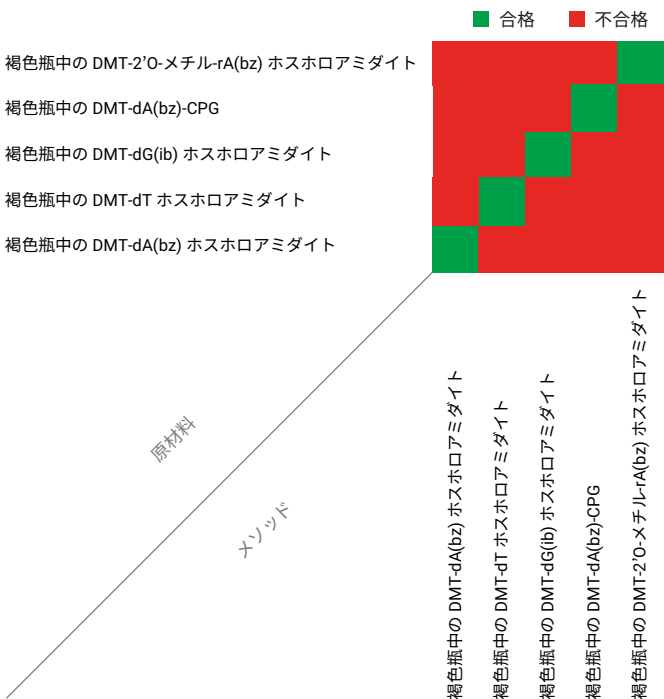


図 8. 類似したサンプルをメソッドに追加した、ホスホロアミダイトの負荷試験マトリックス

結論

Agilent Vaya ラマンシステムにより、ホスホロアミダイトのようなオリゴ材料を必要に応じて、容器を開けずに検証することが可能です。密接に関係のある低コストの類似物質が存在する場合でも、原材料を即座に評価して誤出荷または意図的な置き換えを検出できます。Vaya を使用すると、オリゴなどのバイオ医薬品原材料を数秒間で検証できます。

参考文献

1. USP <1858> Raman Spectroscopy- Theory and Practice: Quote from Page 2/8 Section Qualitative and Quantitative Raman Measurements/ Qualitative Raman Measurements: 定性ラマン測定により、サンプルの分子構造に関するスペクトル情報が得られます。ラマンスペクトルは特定の化合物に対して固有であるため、公定同定試験として定性ラマン測定を使用できます。分光分析同定試験 (Spectroscopic Identification Tests) <197> を参照してください。
2. European Pharmacopeia Chapter: EP 2.2.48 Raman Spectroscopy: サンプルのラマンスペクトルと同定した物質の参照標準を比較して、両方のスペクトルが同じラマンシフトで類似した散乱強度を示している場合は、これらの物質の同定を確認できます。
3. Chinese Pharmacopeia General Rule Section 0421: ラマンスペクトルは、サンプル中に存在する振動バンドに関する正確なスペクトル情報を提供できます。同じ測定条件で採取された試験サンプルと標準サンプルのスペクトルを比較する必要があります。2 つのスペクトルが構成および強度の点で一致している場合、2 つのサンプルは立体異性体を除いて一致している可能性があります。

4. Japanese Pharmacopeia (Supplement II, JP XVII) section 2.26/ 5.1: サンプルのラマンスペクトルと同定した物質の参照標準を比較して、両方のスペクトルが同じラマンシフトで類似した散乱強度を示している場合は、これらの物質の同定を確認できます。
5. European Pharmacopeia Chapter: EP 2.2.48: 代表的な違い (メーカー、バッチ、粒子サイズ、不純物プロファイルなど) を示す最適な数の材料のスペクトルを記録し、モノグラフまたは規定された仕様の要件に従います。データベース内のサンプルの数または選択性は、特定のアプリケーションに応じて異なります。ラマンスペクトルに適した数学的前処理により、スペクトルの定性的な比較を実施できます (例えば、ベースライン補正、標準化、微分、宇宙線の除去)。指定した材料の同定およびデータベース内の他の材料からの適切な識別を実施できるデータベースの選択性は、バリデーションプロセス時に確認します。検査した材料のスペクトルは、計量化学メソッド (例えば、類似性と距離の測定、分類メソッド) を使用して、スペクトルリファレンスライブラリと比較できます。これらのメソッドには、分析者による設定、評価、および計量化学モデルのバリデーションが含まれています。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE44483.199756944

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, December 14, 2021

5994-4239JAJP