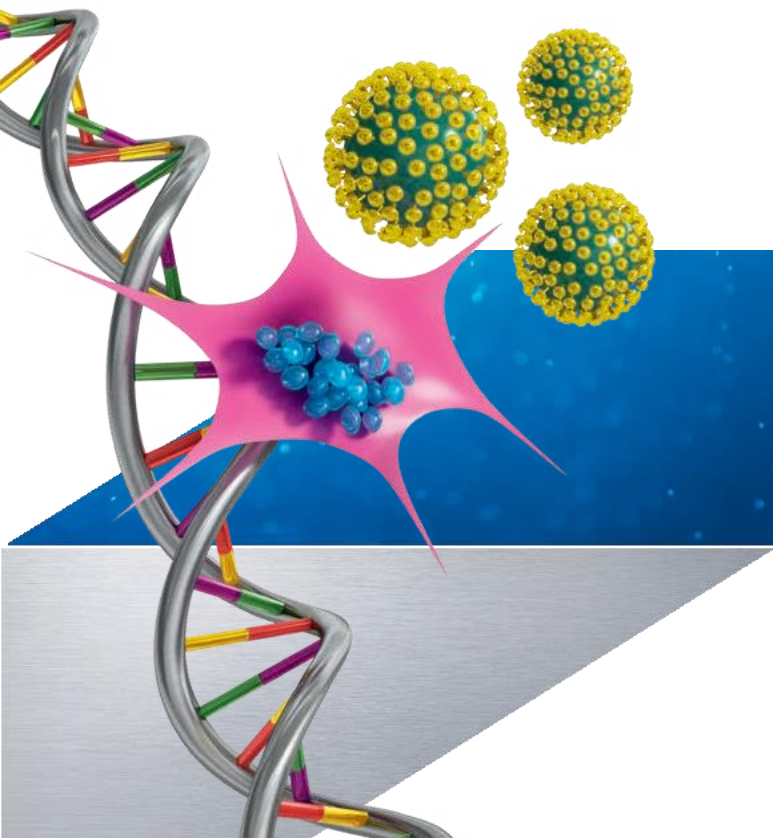


Mycoplasma 컨퍼런스 요약

질병 치료 방식의 빠른 변화에 적절한대비를 위한 논의

2019년 11월 11일 뒤셀도르프, PharmaLab 컨퍼런스 시작 전에 있었던 이벤트로 'qPCR을 이용한 Mycoplasma 테스트 사용자'의 날에 논의된 내용의 요약본입니다.



Introduction

의학이 단백질, 유전자 그리고 세포 치료제로 진화가 되어 감에 따라 새로운 치료법들이 등장하게 되었다. 생산 과정은 더욱 복잡해졌지만 더 짧은 시간 안에 생산을 마쳐야 한다는 과제에 직면하게 되었다. 이에 전문가들은 이러한 어려운 조건에서 제품의 안정성을 보장하기 위해 핵산 증폭법을 올바른 솔루션으로 보고 있으며 Mycoplasma의 테스트도 예외는 아니다.

- 핵산 증폭법을 도입하기 위해서 실질적으로 고려해야 하는 사항은 무엇인가?
- 어디에 구체적인 권장 사항들이 필요한가?
- 어떻게 하면 현재의 가이드라인이 새롭게 개발되는 의약품들에 유용할 수 있을까?

이러한 질문들은 2019년 11월 11일 PharmaLab 컨퍼런스 전날에 열린 qPCR을 이용한 Mycoplasma의 테스트 워크샵에서 논의가 되었다.

For use in quality control/manufacturing process only.

새로운 의약품들은 Mycoplasma 테스트에 있어서 새로운 과제를 던져 주었다.

유전자 및 세포 치료제와 같은 새로운 의약품들은 헬스케어에 있어서 혁명적인 것들로 치료의 포커스를 작은 분자 단위에서 단백질(Biologics), 세포 그리고 조직으로 이동 시켰다. 그러나 이러한 이동은 품질과 제품의 안정성에 대한 새로운 도전 과제를 던져 주기도 한다. 혼한 세포배양 오염원이지만 너무 작아서 눈에 잘 보이지 않는, Mycoplasma의 검출이 특히 그러하다.

이러한 과제들은 PharmaLab 컨퍼런스 전날에 열린 'qPCR을 이용한 Mycoplasma의 검출'이라는 워크샵에서 공통적으로 발의가 된 위험 요소였다. 학계와 산업체의 여러 전문가들이 모인 이번 회의는 Paul-Ehrlich-Institut의 Jan-Oliver Karo가 Mycoplasma 검출에 있어서 위험과 전망이라는 제목의 연설로 시작하였는데 이는 유럽 약전 267장 개정에 대한 내용이었다. 이번 워크샵에서는 솔루션을 찾기 위한 여러 연구 기관들의 열띤 논의가 이루어 졌으며 연구 결과에 대한 많은 발표도 이어 졌다.

새로운 것들, 그리고 미래에 대한 준비

바이오 의약품에서 Mycoplasma를 검출하기 위해 걸리는 전반적인 실험 시간은 매우 중요한 문제다. 실험 시간이 길어지면 결국 생산의 지연으로 연결되어 많은 비용을 발생 시키며, 응급한 약품이 제때 공급이 이루어 지지 않을 수도 있기 때문이다. 유전자와 세포 그리고 조직에 이르는 첨단 의약품 (Advanced therapy medicinal product, ATMP)이 도래하면서 전반적인 실험에 걸리는 시간 (turnaround time, TAT)의 문제는 더욱 중요해지기 시작했는데 그 이유는 이들 약품은 주로 응급환자에게 적용이 되며 각 약품의 유효기간도 매우 짧기 때문이다.

빠른 Mycoplasma의 검출 방법이 필요해짐에 따라 핵산 증폭 법 (NAT)에 많은 이들의 이목이 집중되고 있다. 전통적인 cell culture 방식과 비교하여 Mycoplasma의 DNA를 PCR을 통해서 검출하는 핵산 증폭법은 검출에 걸리는 시간을 몇일에서 몇 시간으로 단축 시킬 수 있게 하였다.

그러나 TAT에 대한 고려는 사실 빙산의 일각에 불과하다. 핵산 증폭법을 도입하기 위해서는 다른 중요한 사항들을 고려해야만 하는데 그것이 바로 '제품의 안정성'이라는 측면이다. Karo는 가장 어려운 과제로 ATMP(최첨단 의약품)의 다양성을 지적했는데, 의약품의 origin에서부터 최종적인 biological matrix까지 그 다양성은 매우 넓으며 이러한 다양성은 시간이 지나 새로운 혁신을 거듭하면서 그 스펙트럼과 응용분야는 무한히 증식할 것이 자명하다고 할 수 있다.

- 전체 프로세스 중 어떤 포인트에서 검출을 해야 적합할까?
- 어떤 샘플 타입이 검출에 적합할까?
- 규제 당국의 요구 사항을 만족시키기 위해서 밸리데이션 방식을 어떻게 디자인 해야 할까?

이들 질문에 대한 대답들은 가이드라인의 개정에 있어서 핵심적인 사항들이라고 할 수 있다.

세포내 감염 (Intracellular infection)이 검출의 포커스

여러 경험에 따르면 바이오 의약품이나 ATMP의 생산에서 모든 시점에서 mycoplasma를 검출에 적합하다고 하기는 어렵다. 더불어, culture의 상층액이나 세포가 없는 기질들은 검출에 충분하지 않은데 그 이유는 mycoplasma가 일반적으로 세포에 부착하거나 혹은 세포 내로 침입을 하는 경우도 많이 있기 때문이다. 명백하게, 샘플의 선택은 효력이 있는 검출을 하기 위해 중요한 요소라고 할 수 있다. **“그러므로 세포가 없는 기질 (Cell-free matrix)들은 반드시 사용을 피해야 하며 이들을 사용하는 경우는 납득할 수 있는 이유를 설명 할 수 있어야 합니다.”**라고 Karo는 언급 했다. 사실 대부분의 상업적인 키트의 개발자들은 cellular matrix를 사용하는 쪽으로 전환하고 있으며 cell count가 높은 경우와 같이 기술적인 문제점을 극복하기 위해서 노력하고 있다.

밸리데이션의 관점에서 볼 때, 손쉬운 샘플에서만 검출이 이루어지는 것은 아니므로, 복잡하고 어려운 여러 경우의 수를 반드시 고려해야 한다. Christiana Schnitzler는 프리젠테이션에서 “최악의 조건에 있는 제품”이라는 방식으로 이를 표현 하였는데, 그는 베링거 잉겔하임에서 팀을 이끌며 Roche의 MycoTool Mycoplasma Real time PCR Kit에 대한 포괄적인 밸리데이션을 진행한 바 있다. 이 키트는 일반적인 샘플을 위해 디자인이 된 것이지만 Schnitzler는 PCR inhibitor가 있거나 DNA 추출 과정 혹은 시약과 샘플 조작의 여러 변수가 있는 경우에도 assay가 견고 한지에 대해서 테스트를 진행 했다. 최종적으로 그의 목표는 assay의 민감도가 적어도 전통적인 방식과 비교하여 동등 한지의 여부를 증명하는 것이다. 여전히 그 팀은 detection limit에 대한 데이터를 수집하고 있지만 현재까지 10개의 다른 mycoplasma 종을 이용한 실험에서 규제 당국에서 요구 하는 수준의 민감도 ($\leq 10\text{CFU/mL}$)를 보임을 확인할 수 있었다.

전통적인 검출법의 새로운 역할

Schnitzler의 도입 방식은 비교 동등성 실험을 assay 밸리데이션에 결부시키는 것으로 전통적인 Cell culture 방식이나 Indicator Cell culture 방식에서의 민감도, 특이성 그리고 견고함이 PCR 방식에서도 동일하게 나타나는 지를 테스트 하는 것이다. 즉, 노동력과 샘플이 더 많이 들고 시간이 더 많이 걸리는 골드 스탠다드 방식을 핵산 증폭 방식으로 치환을 하기 위해서는 반드시 그 동등성이 증명이 되어야 한다는 것이다.

아직까지는 핵산 증폭법을 검출의 첫번째 단계로 사용하고 전통적인 culture 방식으로 그 결과를 재입증 해 내는 양상으로 핵산 증폭법을 도입하고 있는 경우가 많다.

Roche Pharma는 MycoTool Mycoplasma Real Time PCR 법을 생산에서 도입하여 여러 해 사용해 오고 있으며 Culture 방식은 결과의 입증을 위한 목적으로 사용하고 있다. “현재까지의 우리 경험에 의하면 이런 방식이 규제 당국으로 부터 환영을 받고 있고 그 결과로 손쉽게 승인을 얻을 수 있었습니다.” 라고 Roche Pharma의 Alexander Barter는 밝혔다.

여러 기술들의 올바른 조합은 빠르면서 포괄적인 검출 전략으로 활용이 될 수 있다. 한 예로, Schnitzler는 결과를 증명 하기 위해서 다른 방식을 선택하고 있는데 “우리는 상당히 운이 좋다고 할 수 있습니다. Sequencing 실험실이 바로 옆에 있어서 Sequencing을 통해서 모든 종들을 재확인 할 수 있었기 때문입니다.”라고 설명했다.

밸리데이션에서 워크플로우 통합까지, 디테일에 관한 논의

핵산 증폭을 기본으로 하는 상업적인 Mycoplasma 검출 키트는 최적화된 assay로 여러 편리성을 제공하는데, 많은 수의 종을 커버 하면서 높은 민감도를 제공하고 더불어 high throughput 및 자동화의 옵션까지 선택할 수 있게 한다. 여러 발표자들은 이들 제품을 평가한 결과를 공유하고 핵산 증폭법을 보다 쉽게 도입할 수 있도록 제품을 평가하면서 터득한 사실들을 공유했다.

Ljubljana 대학의 의학부내 미생물 면역학 연구실의 Andrej Steyer는 잘 정립이 된 밸리데이션 기준의 필요성과 함께 CFU ration 대비 낮은 유전자 copy 수 (GC: CFU)에 대해서 역설했다.

Steyer는 SYBR Green을 이용한 Mycoplasma 검출법과 probe를 이용한 검출법을 비교 실험하였는데 Probe를 이용한 키트를 최종적으로 선택한 이유는 CT값에 있어서 더 나은 민감도를 보이고, CT값의 변동 또한 적기 때문이라고 밝혔다.

Steyer는 두개의 다른 PCR 기기와 자동화된 DNA 추출 기기를 이용해서 실험을 진행했다. 이 연구에 두가지의 Mycoplasma reference standard를 GC:CFU ratio가 열 배씩 차이가 나도록 하여 사용하였으며 이를 PCR 결과와 Sequencing 데이터와 함께 분석하였다. Steyer는 "Mycoplasma reference standard의 품질 때문에 발생 할 수 있는 여러 문제에 대해서도 명심해야 한다." 고 조언하였다.

내용 한 눈에 보기

- 핵산 증폭법은 몇 시간 내에 Mycoplasma의 존재 여부를 검출할 수 있어 전반적인 TAT (Turnaround Time)를 개선할 수 있게 한다. 이에 바이오 의약품과 첨단 치료 의약품 (ATMP) 생산의 차질을 줄일 수 있게 하여 공급 부족을 막는데 도움을 줄 수 있다.
- 핵산 증폭법을 이용하여 Mycoplasma를 검출하기 위해서는 포괄적인 밸리데이션이 시행되어야 하며 고전적인 방법과 비교하여 동등한 수준의 검출능이 있음을 증명해야만 한다.
- Mycoplasma qPCR Testing에 관한 올해의 PharmaLab Pre-Conference Workshop에서 전문가들은 유럽 약전 2.6.7 장의 개정에 대해 논의하였다. 그들은 개발 중인 새로운 의약품의 다양성을 어우를 수 있는 "하나의 마이코플라스마 제어 개념"을 만들 것을 제안했다.
- 워크샵의 참석자들은 몇가지 점에서 공통적으로 강조하는 내용이 있었다. 이는 Mycoplasma의 검출 시에 Host cell을 제거하고 실험을 수행해서는 안된다는 점. 그리고, 핵산 증폭법을 도입하기 위해서는 우선적으로 핵산 증폭법으로 Mycoplasma의 검출 시험을 하고 그 뒤 고전적인 Cell culture 방식으로 이를 검수하는 식으로 진행하는 것을 권고 한다는 것이었다.

기준에 만들어 놓은 자동화 실험실에 상업적인 키트를 통합하는 것은 다른 발표자가 집중한 부분이었다. Mycoplasma Experience Ltd. 의 Christie English는 MagNA pure Compact 기기를 이용해 자동적으로 DNA 추출하여 MycoTool Mycoplasma Real Time PCR kit를 사용하기 위해서 샘플의 사용량을 어떻게 조절 했는지에 대해서 설명 했다.

이 적용은 성공적이었는데, 이미 실험실에서 사용이 되고 있던 Mycoplasma 검출법을 이용하여 비교 실험을 해 봤더니 자동화 설비에 통합하는 것은 다양한 이점이 있는 것으로 결론이 났다고 English는 말했다.

요구 사항에 대한 균형과 예측

워크샵에서 논의된 각 주제에서 핵산 증폭법의 도입을 위한 밸리데이션 방안과 이에 대한 자세한 가이드라인의 필요성에 대해서 매우 강조되었다. 그러나 구체적인 권장 사항이 향후 제품과 관련된 가이드라인을 작성하는데 방해가 되지 않도록 하는 것이 중요하다고 하였다. 핵산 증폭법을 검증하기 위해 사용 되는 시험 유기체와 일상적인 검출에서 양성 대조군으로 사용이 되는 Mycoplasma reference 종을 변경하는 것이 이러한 예가 될 수 있다고 하였다.

기존의 PCR 기반의 Mycoplasma 검출 방식은 매우 포괄적으로 여러 종을 커버 한다. 예를 들면, MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR 키트는 약 150 개의 배양 가능하거나, 배양이 불가능한 균주를 검출해 낼 수 있다. 이 광범위한 적용 범위는 일반 검출에 PCR 법을 쉽게 활용할 수 있게 할 것이다.

비엔나 수의과대학 미생물학 연구소의 Renate Rosengarten 교수와 Micosafe Consulting의 이사는 핵산 증폭 방식의 검출법이 활용되기 위해서는 각 핵산 증폭법을 이용하여 검출할 수 있는 Mycoplasma 종의 목록이 좀 더 늘어 나야 한다고 지적했다. Karo는 이 제안에 동의하고 이것이 가이드라인의 개정 범위 내에 있음을 강조했다. 같은 맥락에서, 핵산 증폭법에 대한 밸리데이션을 진행할 때는, 잠재적으로 제품을 오염시킬 수 있는 특정 범위의 Mycoplasma가 해당 검출법을 이용하면 검출될 수 있다는 것을 증명해야 한다고 했다. Karo는 "우리는 검증된 핵산 증폭법의 사용을 권장 합니다. 그러나 일반적인 검증 뿐만 아니라 각 의약품에 대한 철저한 위험 평가를 수행한 뒤 각 제품에 대한 특이적인 개별 검증도 반드시 필요함을 강조하고 싶습니다." 하고 말했다.

이번 워크샵에서 여러 경험들을 자유 롭게 나눈 것은 유럽 약전 267 장의 개정 프로세스를 좀 더 원활히 하는 데 많은 도움이 되었으며, 여러 커뮤니티의 전문 지식과 전문가들이 경험들은 미래의 ATPMP의 광범위한 다양성과 이에 대한 기준 사이의 균형을 맞추게 했다. Karo는 이번 워크샵의 모든 참가자의 의견들을 개정 단계에 수렴하며, 이렇게 업데이트 된 규제 문서를 현재의 지식 상태와 다양한 의약품 및 그 프로세스에 부합하는 “하나의 mycoplasma 제어 개념”이라고 표현 하였다.

문제점을 극복하기 위한대화

워크샵에서 많은 발표자들이 핵산 증폭법의 밸리데이션과 관련하여 다양한 고려 사항들을 논의 하였다. 여기에는 검사를 위한 올바른 검체 및 올바른 reference standard의 사용, 이미 세팅 되어 있는 자동화 실험실로의 통합 솔루션 등이 논의 되었다.

Karo는 “내 경험에 비추어 보자면, 이 이슈는 안정성에 대한 문제를 어디 까지 확대 해석 할 것인가 하는 질문으로 귀결이 되는 것 같습니다. 그리고 대부분의 회사들은 이것이 매우 필요함에도 불구하고 여기에 대해서 조언을 구하지 않지요”하고 지적 하였다.

그러나 다행스럽게 여러 연구자들은 Mycoplasma 검사에 있어서 핵산 증폭법의 현 상황에 대해서 평가를 하고 문제점을 극복하여 새롭고 안전한 의약품을 만들어 낼 수 있도록 지속적인 대화를 하고 있다.

Roche CustomBiotech에 대하여

Roche CustomBiotech 은 Roche Pharma와 Roche Diagnostic 사업부를 통해 생산이 되는 고품질의 원료를 제약 및 진단 기업에 공급하는 사업부 입니다.

Roche Pharma는 Mycoplasma 검출을 위한 핵산 증폭법을 개발한 최초의 대형 제약사 중 하나였으며 이제는 최적화 된 솔루션으로 임상 혹은 시판을 위한 제품의 출시에 적용하고 있습니다.

현재 Roche Pharma는 MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR 솔루션을 이용하여 5 개의 시판 제품, 그리고 15개 이상의 임상 제품에 대해 FDA의 승인을 받았으며 MycoTool Mycoplasma Real Time PCR kit는 시판되고 있습니다.

Visit <http://go.roche.com/mycotool>
for more information.

Regulatory disclaimer

For use in quality control/manufacturing process only.

한국로슈진단(주)



서울특별시 강남구 테헤란로 108길 22 (06174)
TEL : 02-550-3300 Fax : 02-550-1218
E-mail : korea.diagnostics@roche.com
Homepage : <http://custombiotech.roche.com>