

바이오횰약품 제조공정에서 분리막의 역할과 바이러스 필터 동향

최 태 환 · 박 호 범[†]

한양대학교 에너지공학과

(2020년 2월 27일 접수, 2020년 2월 28일 수정, 2020년 2월 28일 채택)

Membrane and Virus Filter Trends in the Processes of Biopharmaceutical Production

Tae Hwan Choi and Ho Bum Park[†]

Department of Energy Engineering, Hanyang University, Seoul 04763, Korea

(Received February 27, 2020, Revised February 28, 2020, Accepted February 28, 2020)

요 약: 바이오 의약품 생산과정의 대부분 공정에서 분리막이 사용되고 있다. 분리막 공정은 다른 공정의 전처리, 공정 자체의 불순물 분리, 바이러스 제거, 목표 생성물 농도 조절 및 완충 용액 교환 등에 사용된다. 인체에 사용하는 바이오 의약품의 바이러스 오염은 심각한 임상 결과와 직결되는 민감한 문제이기 때문에 바이러스 필터는 제품의 효능과 안정성을 보장하기 위해 중요한 역할을 한다. 바이러스 필터는 일반적으로 표면 개질된 PVDF, PES, CRC 등 다양한 고분자로 만들어진 복합 다층 구조를 가지고 있다. 제조업체에 따라 대칭(symmetric) 또는 비대칭(asymmetric) 등 다른 기공 구조와 형태를 가지고 있으며, 주름막, 평판 시트 또는 중공사 형태로 사용된다. 바이러스 필터는 Asahi Kasei 를 비롯해 Millipore, Pall, Sartorius 등 몇몇 해외 업체들이 독점적으로 국내에 공급하고 있다. 바이러스 필터를 대체하려면 검증작업을 통해 규제기관의 승인을 받는 등 상당한 시간과 비용이 소요된다. 최근 일본의 수출규제로 국산화가 중요해진 만큼 제거 성능 고도화 등 선제적으로 기술자립도를 높여가야 한다.

Abstract: Membranes are used in most processes of biopharmaceutical production. It is used for pretreatment of other processes, separation of impurities in the process, virus removal, control of products concentration and buffer solution exchange. Virus filters play an important role in ensuring product efficacy and stability because viral contamination of biopharmaceuticals for humans is a sensitive issue that is directly related to serious clinical outcomes. Virus filters typically have complex multilayer structures made of various polymers such as surface-modified PVDF, PES, CRC. Depending on the manufacturer, filters have different pore structures and shapes, such as symmetric or asymmetric, and is used in the form of pleated membrane, flat sheets or hollow fibers. Virus filters are exclusively supplied by few foreign companies such as Asahi Kasei, Millipore, Pall and Sartorius. Replacing virus filters can be time consuming and expensive, including approval from regulatory agencies through validation. As localization has become important due to Japan's recent export regulations, it is necessary to increase the degree of technical independence.

Keywords: virus filter, virus removal, bioprocess membrane separation, down-stream, biopharmaceutical production

1. 서 론

바이오횰약품은 사람이나 다른 생물체에서 유래된 것을 원료 또는 재료로 제조한 의약품으로서 보건위생상 특별한 주의가 필요한 의약품을 말한다[1]. 바이오횰약품은 보통 합성의약품에 비해 복잡한 고분자 구조를 가

지고 있고, 크기가 크며, 생물체를 원료로 하여 복잡한 제조공정을 거쳐야 되기 때문에 변화에 민감한 편이다. 또한, 합성의약품은 화학물질의 비율을 알면 쉽게 합성 및 복제가 가능한 반면에 바이오횰약품은 배양기술과 환경, 방법에 따라 전혀 다른 물질이 나올 수 있어 복제가 쉽지 않은 특징이 있다[2-4]. 특히, 인체에 사용하는

[†]Corresponding author(e-mail: badtzhh@hanyang.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-8003-9698>)

Table 1. Biopharmaceuticals Manufacturing Processes[10]

Up-stream		Down-stream	
Cell culture	Harvest	Purification	
Cell line thawing	Centrifugation	Chromatograph	Formulation
		Ultrafiltration	Sterile filtration
Seed culture	Depth filtration/ microfiltration	Precipitation/reaction	Filling
		Virus inactivation	Freeze drying
Production culture		Virus filtration	Freeze drying
		Bulk filtration	Freeze drying
		Bulk formulation/filling	Inspection/packageing

바이오의약품의 제조에서 바이러스 오염의 위험은 심각한 임상 결과와 직결되는 민감한 문제이다. 그래서 바이오의약품의 효능과 안전성을 보장하기 위해 바이러스 제거 성능을 고도화하는 것은 매우 중요하다[5-7].

바이오의약품 제조에서 바이러스 오염은 생산과정에서 의도치 않게 유입된 외래성 바이러스와 원료가 되는 세포 자체에서 유래된 내인성 바이러스로 원인을 나누어 볼 수 있다. 외래성 바이러스는 오염된 시약, 완충용액 또는 장비 등을 통해서 치료용 단백질 제조 공정에 유입될 수 있다. 그리고 내인성 바이러스는 감염된 동물로부터 추출된 세포, 세포를 추출하기 위한 바이러스의 사용, 동물성 혈청과 같은 오염된 생물학적 시약 또는 세포 취급 중 오염 등 다양한 경로로 세포 내로 유입될 수 있다[7,8].

이러한 오염 사고는 의약품의 안정성과 효능에 심각한 지장을 줄 뿐만 아니라, 생산 제품 자체의 손실, 예상 판매량 손실, 오염 제거 및 규제 비용에서 경제적으로 상당한 손해를 초래한다. 일반적으로 오염을 제거하기 위한 비용은 10,000 L 규모의 세포 배양에 6~8백만 달러에 이르는 것으로 추정된다[9].

이를 방지하기 위해 바이오의약품 산업의 분리·정제 공정에서 분리막은 단백질 추출, 바이러스 제거, 버퍼 치환 등 다양한 부분에서 중요한 역할을 한다. 특히, 바이러스 필터는 의약품 생산 시 바이러스를 제거하는 핵심 소모품 중 하나이다. 그러나 국내에서 바이러스 필터의 90%가 일본산이 점유하고 있고, 최근 일본의 수출규제로 ‘화이트리스트 제외’ 품목 1,194개 중 바이오 제약 산업 관련해서 바이러스 필터가 포함되면서 국산화에 대한 필요성이 높아지고 있다. 이에 본 총설은 바이오의약품 공정에서의 분리막의 역할과 바이러스 필

터의 종류, 주요 제품, 최근 연구동향에 대해 살펴보고자 한다.

2. 바이오의약품 생산 공정

바이오의약품의 생산 공정은 크게 상류(upstream) 공정과 하류(downstream) 공정으로 나뉘며 생산된 최종원액은 완제공정을 통해 제품화가 된다(Table 1). 상류 공정은 세포배양과 회수 단계를 포함하고 있으며, 배양공정은 크게 ‘균주·세포주 해동 단계’, 플라스크 및 증식용 배양기가 사용되는 ‘중배양 단계’, 대용량 생산용 배양기가 사용되는 ‘본배양 단계’로 구성된다. 회수공정은 균·세포의 배양액에서 물리적·화학적·생화학적 방법을 이용하여 균체나 상등액 등을 회수하는 공정이다. 일반적으로 원심분리, 침출여과/정밀여과 방법 등을 이용한다. 하류 공정은 회수 이후 첫 단계부터 시작되며 얻고자 하는 품질의 제품 생산까지 이어진다. 중간 제품의 농축 및 불순물 제거, 정제절차 또는 단백질 수율 증가를 위한 잠재적 변형을 포함하며 다양한 크로마토그래피와 여과 방법이 사용된다. 정제공정은 회수 단계를 거친 공정액에 포함되어 있는 여러 가지 불순물을 제거하는 공정이다. 불순물은 크게 다중체(agggregation), 산화·환원제, 분해물 등과 같은 제품 유래 불순물과 숙주유래단백질(host cell protein: HCP), 숙주유래 DNA, 외래성 바이러스 등 공정유래 불순물로 나눌 수 있다. 일반적인 제거 방법으로는 크로마토그래피, 한외여과, 침전·반응, 바이러스 여과·불활화 등이 있으며, 전체 불순물을 원하는 수준까지 제거하는 데는 여러 단계의 단위 공정을 거쳐야 가능하다. 완제공정은 원액주성분, 흡착제, 버퍼 등을 혼합하는 조제공정과 최종원액을 바

	Components retained by membrane		Components passed through membrane
Microfiltration	Intact cells, Cell debris, Bacteria	➔	Colloids, Viruses, Proteins, Salts
Virus filtration	Viruses	➔	Proteins, Buffers components
Ultrafiltration	Proteins	Membrane	Amino acids, Antifoam, Proteins, Buffers components
Nanofiltration	Divalent ions, Amino acids, Antibiotics	➔	Salts, Water
Reverse Osmosis	Amino acids, Sugars, Salts	➔	Water

Fig. 1. Removal characteristics of different membrane processes in Bioprocess[14].

이알이나 프리필드 등에 충전하기 직전에 무균여과 하는 무균여과공정, 바이알이나 프리필드 시린지(prefilled syringe) 등에 약액을 담고 밀봉하는 충전공정, 동결건조, 밀봉·캡핑 등을 거쳐 제품화가 된다[10].

3. 바이오의약품 공정에서 분리막의 역할

앞서 살펴본 것과 같이 바이오의약품 생산과정의 거의 모든 공정 단계에서 분리막 공정이 사용되고 있다. 추출, 침전, 크로마토그래피 등과 같은 다른 하류 공정에 비해 분리막 기반 공정은 상대적으로 조건이 까다롭거나 가혹하지 않고, 다른 화학물질들을 추가할 필요가 없어서 특히 바이오 공정에 적합한 장점이 있다[11,12]. 분리막 공정은 다른 공정의 전처리(예: 크로마토그래피 컬럼 보호필터), 공정 자체에서의 불순물 분리(예: 바이러스 제거 및 멸균), 목표 생성물 농도 조절 및 완충 용액의 교환 등에 사용된다[13]. 한외여과막은 기공의 크기가 1~20 nm이며, 단백질 및 거대 분자를 잘 여과하도록 설계되었다. 그리고 교차흐름여과 공정을 사용하여 단백질을 정제하는데 사용하기도 한다. 정밀여과막의 기공 크기는 0.05~10 μm이며, 세포와 세포잔해물을 여과하면서 단백질과 작은 용질이 통과되도록 설계되었다. 그리고 바이러스 여과를 위해 특별히 설계된 막은 앞서 설명한 두 막의 사이에 있으며, 기공크기는 20~70 nm이다. 그리고 나노 여과는 용매, 1가 염 및 작은 유기물을 2가 이온과 더 큰 물질로부터 분리하는 공정이다 (Fig. 1)[14].

4. 바이러스 제거

4.1. 바이오의약품 공정에서의 순도 조건

단백질의약품에 대한 순도 요구조건은 숙주세포 단백질, 제품의 변형, DNA, 바이러스, 내독소, 수지 및 분리막의 침출물 그리고 발효 및 정제공정에 사용되는 다양한 미세분자들에 중점을 두고 있다[15]. 그 중에서 재조합 DNA 기반 단백질 생성물은 규제기관 가이드에 따라 바이러스 제거 기준을 충족해야 한다. 또한, 3가지 이상의 다른 메커니즘을 통해 바이러스 비활성화 및 제거되는 것을 입증해야 한다. 허용 가능한 숙주세포의 수준은 규제기관의 검토를 거쳐 독성 및 임상 시험에서의 공정 능력 및 안전성 테스트에 기초하여 결정된다. 단일클론 항체 생성물은 일반적으로 ppm 범위(항체 생성물 1 g 당 숙주세포 단백질 μg)에 있다[16].

4.2. 바이오의약품 공정에서의 바이러스 제거 지침

바이오의약품의 안전성과 효능을 보장하기 위해서 규제·관리 기관에서는 제조업체를 위한 바이러스 제거 지침을 제정하였다(Table 2). 해외에서는 대표적으로 의약품국제조화회의(The International Conference on Harmonization, ICH, The Food and Drug Administration, FDA(미 식약청)), 유럽의약품기구(The European Medicines Evaluation Agency, EMEA)에서 관련 지침을 제정하였으며[8], 국내에서는 식품의약품안전처에서 관련 가이드를 제정하였다[17].

Table 2. Regulatory Documents for Virus Safety in Manufacture of Biopharmaceuticals[10,17]

Agency	Regulatory document
ICH	Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A (1999)
FDA	Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1996)
EMA	Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products (2006)
MFDS	Guideline on assessing virus stability of biotechnology products from cell lines (2002)

4.3. 바이러스 제거 방법

생물학적 제제의 바이러스 안전성을 보장하기 위해서는 모든 원료 물질 및 세포주를 선별하고 하류 정제 공정 내에서 바이러스를 제거 또는 불활화 하는 단계를 구현해야 한다. 이러한 규제 기관의 규정을 준수하기 위해서 제조업체에서는 하류 공정 중 활성 바이러스의 농도를 줄이기 위해서 여러 가지 방법을 개발하였다. 전체적으로는 바이러스 입자를 비활성화하거나 물리적으로 제거하는 방법을 조합하여 이용한다.

불활성화 방법에는 일반적으로 낮은 pH[18], 열[18-20], 방사선[20] 또는 화학적 처리[20-28]가 있으며 각 방법은 대상 바이러스의 특성과 제품 안정성에 따라 선택할 수 있다. 예를 들어, 낮은 pH 불활성화 및 세정제 처리는 내인성 레트로 바이러스(endogenous RV: ERV - 프로바이러스의 상태로 숙주세포의 염색체에 삽입되어 숙주세포 유전자의 일부분으로서 다른 숙주세포 유전자들과 함께 다음 세대로 유전되는 바이러스)를 포함하여 큰 외피 바이러스(enveloped virus)의 제거에 효과적이다[6].

비활성화된 바이러스와 그 유전체는 비활성화 이후에도 의약품 용액에 남아 있다. 따라서 목표 단백질로부터 이러한 오염물질을 제거하기 위해서는 물질적인 제거 기술이 필요하다. 멸균 여과(박테리아 제거용)는 수십 년 동안 사용되어온 바이오 공정에서 잘 정립된 방법이다. 그러나 박테리아는 일반적으로 목표 단백질보다 10배 이상 크기 때문에 0.2 μm 기공의 분리막을 사용하는 공정에서 상대적으로 제거하기가 쉽다. 그러나 바이러스는 목표 단백질보다 약간 크기 때문에 제거하기가 훨씬 어렵다.

바이러스 제거를 위해서 물리적인 제거법에는 일반적으로 크로마토그래피 또는 분리막을 사용한다. 그러나 크로마토그래피는 다양한 의약품 특성에 따른 칼럼 수지 및 공정 조건 등으로 인해 바이러스 제거율을 예측하기가 매우 어려운 반면에, 분리막 여과는 바이러스

제거가 예측 가능하고 공정 변수의 변화에 크게 영향을 받지 않기 때문에 강력한 공정으로 여겨진다[29]. 그래서 대부분의 하류 정제 공정에는 바이러스 여과 단계가 포함된다.

5. 바이러스 필터

5.1. 바이러스 유형에 따른 여과 특성

바이러스는 캡시드(capsid)라는 단백질 껍질 내에 유전 물질(DNA or RNA)로 구성되어 있으며, 단백질, 탄수화물, 지질(지방)로 둘러싸여 있다. 바이러스의 크기는 종류에 따라 20 nm에서 200 nm 사이에 있다. 바이러스 필터는 일반적으로 80~100 nm의 큰 레트로 바이러스(retro virus)와 18~26 nm의 작은 파르보 바이러스(parvo virus) 두 가지 유형을 대상으로 한다.

바이러스 여과는 광범위한 바이러스를 제거하기 위한 크기에 기반하여 제거하는 방법이다. 레트로 바이러스 필터는 더 큰 바이러스(약 50 nm 이상)를 제거하도록 설계되었으며, 파르보 바이러스 필터는 20 nm 정도로 작은 바이러스를 크게 제거하도록 설계되었다. 기공 크기 분포는 바이러스 여과막의 성능을 결정하는 중요한 요소이다. 기공 크기는 전체 바이러스 제거율을 결정하고 막 투과성과 여과액의 투과유량에 큰 영향을 미친다. 단백질 투과 속도를 제어하여 전체 단백질 수율, 농도 분극 및 삼투압 효과에 영향을 준다.

바이러스 제거율은 LRV (log reduction value)로 나타내는데, 피드의 바이러스 농도와 여과액의 바이러스 농도의 비율이 log로 정의된다.

$$\text{LRV} = -\log_{10} \left(\frac{C_{\text{outlet}}}{C_{\text{inlet}}} \right) \quad (1)$$

C_{outlet} 과 C_{inlet} 은 각각 입구의 바이러스 농도와 여과액

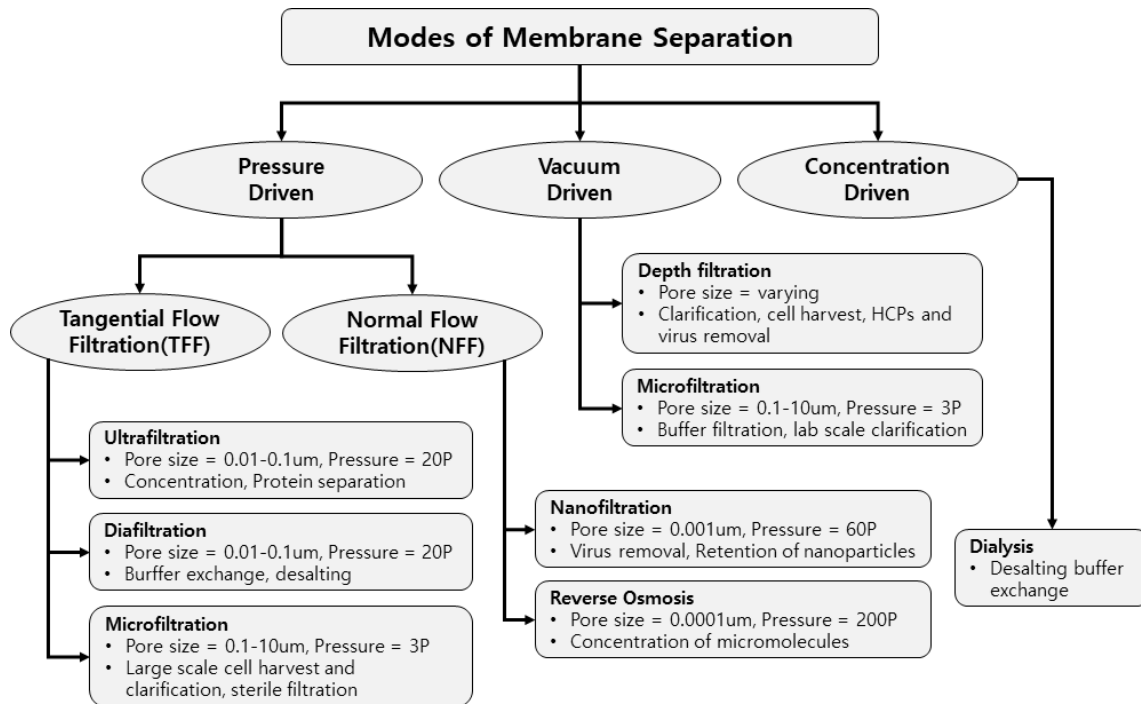


Fig. 2. Different modes of membrane separations in Bioprocess[13].

의 바이러스 농도이다. 요구되는 LRV는 초기 물질의 바이러스 오염 가능성 및 성질에 따라 달라진다. 레트로 바이러스를 포함하는 세포주에서 생산된 생물학적 제제에서는 일반적으로 더 높은 LRV를 요구한다. 바이러스 여과 단계에서는 일반적으로 최소 4 logs 바이러스 제거하도록 설계된다. 바이러스 필터는 목표 단백질의 우수한 투과량(단위 막 면적당 처리할 수 있는 공급량)을 보장하면서도 높은 바이러스 제거율을 나타내야 한다. 바이러스 여과는 투과액에서 단백질 생성물의 95% 이상을 회수하면서 바이러스의 99.9% 이상을 제거해야 한다. 파르보 바이러스의 크기는 대부분 치료 단백질보다 약간 큰 수준이기 때문에 높은 여과 성능을 구현하는 것은 상당히 도전적인 과제이다[8].

5.2. 바이러스 필터 유형

바이러스 필터는 전형적으로 표면 개질된 polyvinylidene fluoride (PVDF), polyethersulfone (PES), cuprammonium regenerated cellulose (CRC) 등 다양한 고분자로 만들어진 복합 다층 구조를 가지고 있다. 모든 필터가 유사한 수준의 바이러스 제거율을 나타내지만, 대칭(symmetric) 또는 비대칭(asymmetric) 등 다른 기공 구조와 형태를 가지고 있다. 그리고 제조업체에 따라 분

리막은 주름막, 평판 시트 또는 중공사 형태로 사용되어 왔다. 바이러스 여과를 위해 작은 기공을 가지는 한 외여과막을 사용한 연구들이 있었지만 적은 수라 할지라도 곳곳에 큰 기공들이 있어서 대부분 성공하지는 못했다[30,31]. 바이러스 제거용으로 설계된 상업 분리막은 큰 기공이나 다른 결함(defect)을 피하기 위해 정밀 여과막(microfiltration membrane, MF) 위에 한외여과막(ultrafiltration membrane, UF)을 직접 주조하는 등 특수하게 제조되었다.

또한 분리막은 구동력과 막 표면에 대한 유동방향에 따라 분류할 수도 있다. Fig. 2는 바이오 공정에 사용되는 다양한 종류의 분리막을 보여준다[13]. 바이러스 여과는 교차흐름여과[tangential (cross) flow filtration]와 정상흐름여과[normal (dead-end) flow filtration, NFF] 두 가지 형태로 운전된다. 교차흐름여과는 일반적으로 중공사 모듈 또는 평판 카세트를 사용한다. 그리고 정상흐름여과는 일반적으로 카트리지 형태의 주름막을 사용한다[14].

5.3. 바이러스 필터 주요 제조사 및 제품

바이러스 필터는 바이오의약품/혈액제제 제조 시 바이러스를 걸러주는 핵심 소모품 중 하나로 Asahi Kasei를

Table 3. Commercial Virus Filtration Membranes[8]

Filter vendor	Membrane filter	Operation mode	Target virus	No. of layers/pore structure	Material
Asahi Kasei	Planova [®] 15N	TFF/NFF	Parvovirus	HFa/Asymmetric	Hydrophilic CRC ^b
	Planova [®] 20N	TFF/NFF	Parvovirus	HF/Asymmetric	Hydrophilic CRC
	Planova [®] 35N	TFF/NFF	Retrovirus	HF/Asymmetric	Hydrophilic CRC
	Planova [®] BioEX	TFF/NFF	Parvovirus	HF/Asymmetric	Modified PVDF ^c
Pall	Ultipor [®] DV20	NFF	Parvovirus	2d/Symmetric	Hydrophilic PVDF
	Ultipor [®] DV50	NFF	Retrovirus	3/Symmetric	Hydrophilic PVDF
	Pegasus [®] LV6	NFF	Retrovirus	2/Symmetric	Hydrophilic PVDF
	Pegasus [®] SV4	NFF	Parvovirus	2/Symmetric	Hydrophilic PVDF
Milipore	Viresolve [®] 180	TFF	Retrovirus	1/Asymmetric	Hydrophilic PVDF
	Viresolve [®] NFP	NFF	Parvovirus	3/Asymmetric	Hydrophilic PVDF
	Viresolve [®] NFR	NFF	Retrovirus	3/Asymmetric	Hydrophilic PES ^e
	Viresolve [®] Pro	NFF	Parvovirus	2/Asymmetric	Hydrophilic PES
Sartorius	Virosart [®] CPV	NFF	Parvovirus	2/Symmetric	Hydrophilic PES

^a HF: Hollow fiber, ^b CRC: cuprammonium regenerated cellulose, ^c PVDF: polyvinylidene fluoride, ^d No. of layers, ^e PES: polyethersulfone.

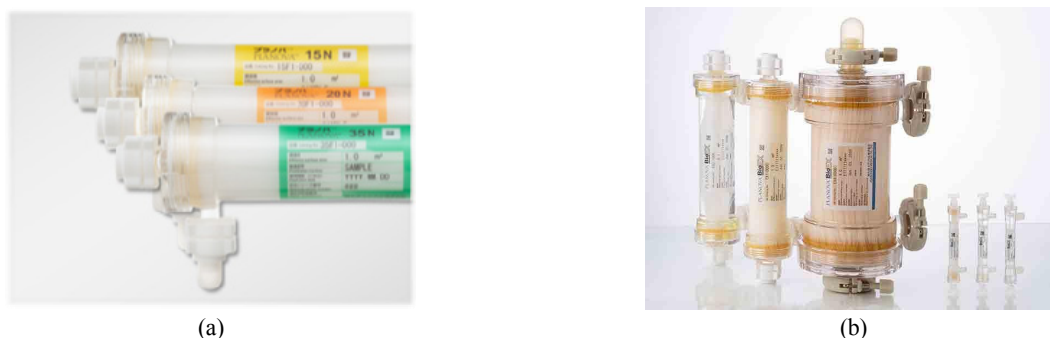


Fig. 3. Asahi Kasei virus filter: (a) Planova[®]15N, 20N, 35N; (b) Planova[®]BioEX[37].

비롯해 Millipore, Pall, Sartorius 등이 국내에 공급하고 있다. 특히 셀트리온, 삼성바이오로직스, 녹십자, SK케미칼 등 다수의 기업이 아사히 제품을 사용하고 있다. Table 3은 상업적으로 판매가 되고 있는 주요 바이러스 필터(2011년 기준) 현황이다[8].

5.3.1. Asahi Kasei Corporation

Asahi Kasei Corporation (일본)은 15N, 20N 및 35N Planova[®] 바이러스 필터를 제조하며(Fig. 3), 천연 친수성 cuprammonium regenerated cellulose (CRC)로 만들어진 dead-end 중공사로 구성되어 있다. 모델명 15N은 15 nm보다 더 큰 바이러스 종을 걸러내도록 설계된 막을 의미한다. 또한 Asahi Kasei는 최근 개발된 PVDF (polyvinylidene fluoride)으로 만든 Planova[®]BioEX 파

라보 바이러스 필터를 출시하였다. Planova[®] 필터는 높은 바이러스 제거율을 위해서 대부분의 한외여과막의 두께(35 nm)보다 훨씬 두꺼운 편이다. Planova[®] 필터는 바이러스 여과를 위해 특별하게 설계된 초창기 분리막 중 하나이며, 바이러스 여과를 위한 막의 거동 및 그에 대한 수많은 연구가 진행되었다[32-36].

5.3.2. Pall Corporation

Pall Corporation은 친수성 개질 PVDF으로 만들어진 Ultipor[®]DV20 및 DV50 분리막을 개발하였으며(Fig. 4) [38-42], DV20은 별개의 2개 층으로, DV50은 3개 층으로 구성되어 있다. 각 층은 비교적 균일한 기공 구조를 가지고 있다. 상업용 스케일의 Ultipor[®] 필터는 dead-end 형태에 주름막이 장착되어 있다. DV50 및 DV20은 각

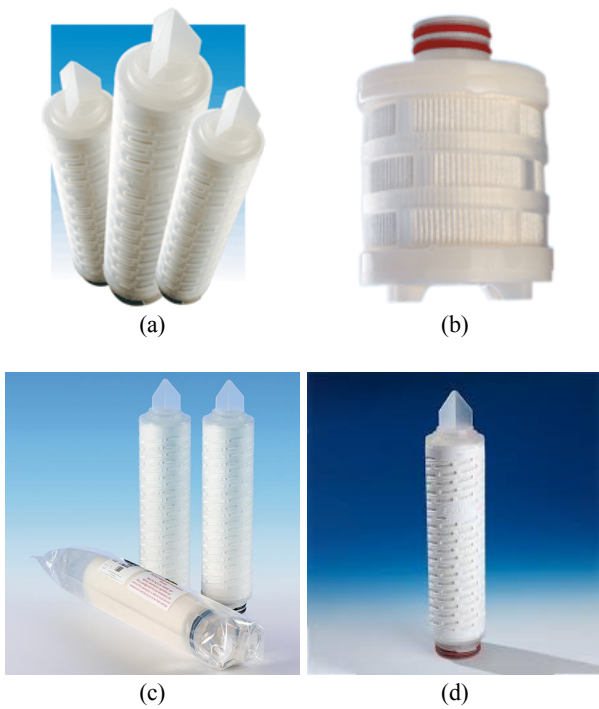


Fig. 4. Pall virus filter: (a) Ultipor[®]DV20, (b) Ultipor[®]DV20, (c) Pegasus[®]LV6, (d) Pegasus[®]SV4[44].

각 50 nm보다 큰 레트로 바이러스 및 20 nm 보다 큰 파르보 바이러스를 효과적으로 제거하면서 높은 단백질 투과율을 나타낸다. 또한 큰 바이러스를 효과적으로 제거하도록 설계된 Pegasus[™] Grade LV6 바이러스 필터가 있으며, Pegasus[™] Grade SV4는 작은 파르보 바이러스를 제거하기 위한 고안된 차세대 필터로서 친수성 개질 PVDF 막이다[43].

5.3.3. Millipore Corporation

Millipore Corporation은 거대 공극의 형성을 피하기 위해 특별히 제조된 다층 복합 막들을 개발하였다. 그 중 Viresolve[®]180 필터는 친수성 표면을 갖는 PVDF로 만들어졌으며, 180 kDa 분자량을 갖는 단백질을 통과시키도록 설계되었다(Fig. 5)[45-48]. 이 필터들의 복합 구조는 정밀여과막에 한외여과층을 얇고 비대칭적으로 캐스팅한 것이 특징이다. 한외여과층 표면에서는 바이러스 및 유사 입자를 배제하고 두꺼운 정밀여과층은 지지층 역할을 한다. 그리고 Viresolve[®]180 필터는 교차흐름 여과장치에 사용된다. 또한 Millipore는 정상 흐름 여과용으로 설계된 Viresolve[®]NFP[49-51] 및 NFR 필터 [52]를 출시하였다. Viresolve[®]NFP 필터는 Viresolve[®]

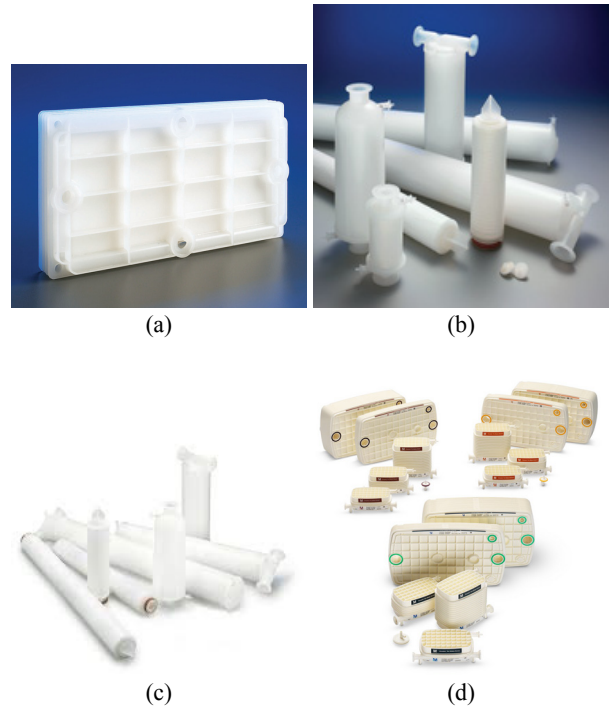


Fig. 5. Millipore virus filter: (a) Viresolve[®]180, (b) Viresolve[®]NFP, (c) Viresolve[®]NFR, (d) Viresolve[®]Pro[53].

180 필터와 같은 PVDF로 만들어지지만 단백질 용액에서 파르보 바이러스 및 기타 작은 바이러스를 제거하도록 설계되었다. Viresolve[®]NFR 필터는 레트로 바이러스 제거용으로 설계되었으며 가장 밀도가 높은 층이 외부 표면이 아닌 막 내부에 있는 친수성 PES 구조로 만들어져 있다. NFP 및 NFR 필터는 모두 3개의 개별 막으로 서로 바로 위에 배치된 다층 구조이다. 그리고 Millipore는 최근 작은 parvovirus 제거를 위해 이중층 PES로 설계된 Viresolve[®]Pro 필터를 출시하였다. Pre-filter인 “Shield”와 함께 사용하여 공정 안정성과 생산성을 향상시키도록 설계되었다.

5.3.4. Sartorius

Sartorius는 이중층 대칭 PES 막으로 만들어진 Viro-sart[®]CPV 필터를 생산하고 있으며(Fig. 6), 이 막은 파르보 바이러스 및 기타 작은 바이러스의 제거율을 높이기 위해 설계되었다[54].



Fig. 6. Sartorius virus filter (Virosart[®]CPV)[55].

6. 바이러스 필터 검증

6.1. 완전성 검증

막에 매우 큰 기공 또는 결함이 없는지 확인하고 운송, 저장, 설치 후 바이러스 필터의 전체 완전성을 확인하기 위해 여러 비파괴 완전성 테스트가 개발되었다. 시스템이 요구수준의 성능으로 작동하는지 확인하기 위해서 완전성에 대한 검증은 모든 분리막 필터에 중요하다. 특히, 바이러스 제거 및 멸균 여과와 같은 공정에서 더욱 중요하다. 대부분의 비파괴 완전성 테스트는 어떤 유체가 기공에서 다른 유체 혹은 가스에 의해서 이동하는 변위에 기반해서 개발되었으며, 변위 속도는 분리막 특성의 측정 및 큰 결함이 있는지를 알려준다[8,14].

6.1.1. 버블포인트(bubble point)

버블포인트는 점진적으로 증가하는 압력 하에서 완전히 젖은 분리막을 통한 기체 유량에 의해 측정된다[56]. 버블포인트는 액체로 채워진 기공이 가스에 의해서 빠져나가는 압력으로 정의한다. 작은 모듈에서 버블포인트는 여과액 쪽 막을 빠져나가는 기포의 흐름을 통해 알 수 있다. 큰 모듈에서 버블포인트는 일반적으로 가장 큰 기공으로부터의 액체 변위를 나타내는 유량-압력곡선의 변곡으로 알 수 있다. 버블포인트는 주로 정밀여과 막에 사용되며, 일반적으로 습윤액으로 물을 사용할 때 0.65~0.1 μm 기공에서 0.2~8 bar 정도를 나타낸다[14].

6.1.2. 기체 확산(gas diffusion)

공기확산측정(또는 순방향 흐름 테스트, forward flow test)는 일반적으로 예상 버블포인트 압력의 약 80% 수

준의 단일압력(최대 기공 또는 가장 큰 결함의 크기에 따라)에서 수행된다. 젖은 분리막을 통과한 공기 유량은 역 눈금 실린더 또는 적절한 유량계를 사용하여 측정한다. 제조업체의 사양을 초과하는 유량은 버블포인트를 초과할 정도의 큰 결함이 있음을 나타낸다[14].

6.2. 침출물 검증

규제기관은 바이오의약품의 정제에 사용되는 필터의 침출물을 제거하도록 요구한다. 필터 제조업체는 필터의 침출 가능한 함량을 결정하고 실험용 쥐 등을 통해 안전성 테스트를 수행해야 한다. 제약회사는 또한 특정 공정에서의 필터 침출물 제거를 검증해야 한다. 여러 방법들 중에서 하나는 NMR (nuclear magnetic resonance)을 통해서 정제 공정에서 사용되는 완충용액의 다양한 조건(낮은 pH, 높은 pH, 높은 전도성 등)에서 침출물의 종류 및 특성을 파악하고 실제 공정을 거친 최종 제품용액에서 NMR을 통해 파악한 필터 침출물 스펙트럼과 비교하는 것이다. 허용 기준은 일반적으로 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 미만이다[14].

7. 최근 연구동향

바이오 공정 혁신은 시간이 걸리고, 출시 시점, 규제 리스크, 강건성(robustness)과 관련된 제약 사항에 대한 충분한 지식을 바탕으로 제약업체와 연구 그룹들은 필터 설계에 적합한 새로운 재료 및 구조, 물리화학적 특성 등을 지속적으로 연구하고 있다[57].

Michael Mass 교수 연구진(University of Bremen)은 최근 중공사막의 친수성/소수성 미묘한 변화가 필터의 바이러스 제거 처리량에 큰 영향을 미친다는 것을 발견하였다[58]. Mass 그룹은 거대 다공성(50~150 nm) 지르코니아 막에 다양한 실란처리를 시도하여 최종적으로 noctyltriopoxysilane을 통해 최대 400 L/m²/h의 처리량으로 두 종류의 매우 작은 박테리오파지를 9 logs 제거하였다. 연구진은 소수성 막이 기존 바이러스 제거 고분자막의 유량을 획기적으로 개선할 대안이라고 제시하고 있다. 20 nm 수준의 매우 작은 바이러스를 제거하기 위한 작은 기공은 막의 플렉스를 크게 제한한다. Mass 그룹의 막은 약 20 nm 정도의 바이러스보다 큰 기공을 가지고 있어서 높은 플렉스를 나타낸다. Mass 그룹은 이전부터 대부분 음으로 하전된 바이러스를 잡기 위해 양으로 하전된 리간드를 분리막에 기능화 시키는 연구

를 해오고 있었다. 이 연구결과는 효과가 우수했으며, 크기 배제 필터를 크게 개선하였다. 그러나 모든 바이러스가 음으로 하전된 것은 아니고 그 표면도 pH의 변화에 크게 의존하고 있다. 다행스럽게도 바이러스 캡시드 표면 구조는 매우 복잡하고, 하전된 도메인을 따라서 소수성을 영역을 포함하고 있었다. Mass 그룹은 이 연구를 통해 소수성 유도체화를 시도하였고, 양으로 하전된 소수성 막을 개발하였다. 이를 통해 초기 막에서 잡지 못했던 하전되지 않거나 양으로 하전된 바이러스를 배제하는 성능을 개선하였다. 또한 세라믹 matrix 강도는 고온, 고압에서도 기공 구조를 정밀하게 설계하고 유지할 수 있도록 해준다. 세라믹의 구조적인 강성으로 높은 유량 외에도 백 플래싱(back flushing)과 표면의 미세한 화학적 처리도 가능하다. Mass 그룹은 실제 바이오 공정이 아닌, 순수한 바이러스 입자로 실험을 하였기 때문에 필터 오염에 대한 관찰을 하지는 못했다. 향후 더 큰 규모나 복잡한 시료를 사용할 수 있도록 시스템을 개조하여 바이러스 표면과 막 표면 사이의 콜로이드 상호 작용에 대한 연구를 계획하고 있다[58].

필터 완전성 검증에서의 실패는 많은 경우에 필터의 결함 때문이 아니라, 젖음성 부족에서 발생하기도 한다. Sartorius社は 젖음성을 높이기 위해 최신 멸균 필터인 Sartopore Platinum 필터 표면에 높은 친수성을 가진 PES (polyethersulfone)을 적용하였고, 젖음성 뿐만 아니라 비특정(nonspecific) 흡착도 감소시켰다[57].

또한 일회용 포맷에서 가능한 많은 양을 여과하도록 하는 것도 중요한 연구 영역이다. 많은 양을 여과하기 위해서는 일반적으로 넓은 표면적과 큰 카트리지를 필요로 하는데, 스테인리스 스틸에서는 가능하지만, 완전한 일회용 포맷만으로는 어렵다. 그래서 일회용 공정에서는 여러 개의 작은 필터를 연결하여 필요한 막 표면적 사양을 맞추고 있다. Sartorius는 이러한 컨셉으로 장치 당 최대 27 m²의 면적을 가진 MaxiCaps MRplug-and-play 분리막을 도입하였다. 이 분리막은 2,000 L의 공정 유체를 여과하도록 설계되었다. 그 밖에도 일회용 여과에서는 막 여과 영역을 적절하게 조절하는 것뿐만 아니라, 플라스틱 하우징 내부의 필터를 밀봉하고 튜브 및 멸균 커넥터에 연결하는 것 등 여러 도전적인 과제들이 있다[57].

8. 결 론

여과 기술은 많이 발전되었지만, 바이오 공정의 여러 단계에서 다양한 형태와 환경이 발생하기 때문에 필터 또는 부속장치들의 설계 등 혁신은 매우 중요하다. 특히, 바이러스 여과는 세포 배양 기반 치료 단백질 제조에서 바이러스 제거전략의 핵심 부분이다. 최근 내장 프리 필터, 복합 막, 개별 막 내의 기공 크기 분포 구배, 막 패킹 밀도 개선 등으로 고 투과성 및 고용량 필터를 개발하는 데 상당한 진전이 있었지만, 여전히 바이러스 필터의 주요 제한 사항은 상대적으로 낮은 투과성, 낮은 용량 및 높은 비용이다. 일회용 필터는 다운 스트림 처리에서 원자재 비용의 상당부분을 차지한다. 향후 바이오 분리막 산업 방향은 막 기반 공정이 생명 공학 산업의 비용을 절감하면서 필요한 제품 품질, 순도, 수율 및 처리량을 제공할 수 있는지에 달려있다.

특히, 바이러스 필터는 몇몇 해외 업체들이 독점하고 있어 국산화에 대한 노력이 더욱 필요하다. 사용한 바이러스 필터 종류는 제품 생산과 승인과정에 명기될 정도로 중요한 요소이다. 바이러스 필터를 대체하려면 검증(validation) 작업을 통해서 규제기관의 승인을 받아야 한다. 제품마다 적합한 바이러스 필터가 다르기 때문에 기존 필터를 교체하기 위해서는 상당한 시간과 비용이 소요된다. 특히, 일본의 바이러스 필터 수출규제가 강화된다면 많은 기업이 제품 생산 문제로 어려움을 겪게 될 수도 있다. 최근 소재·부품·장비 분야에서 정부의 R&D 투자가 대대적으로 이루어지고 있는 만큼 기술혁신을 통한 바이오 분리막 산업의 자립도를 높여 가야 할 것이다.

Reference

1. “Regulations on Product Approval and Examination of Biological Products”, MFDS (2019).
2. “Overview of Biological Products”, FDA (CDER) (2013).
3. “Biopharmaceutical Industry Trend Report”, KoBIA (2018).
4. D. B. Yim, “Biopharmaceutical Market Opportunity and Global Competitiveness”, Samjong KPMG ERI Co., 59 (2016).
5. P. Roberts, “Virus safety in bio products”, *J. Chem.*

- Technol. Biotechnol.*, **59**(1), 110 (1994).
6. "Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use, department of health and human services", FDA (CBER) (1996).
 7. "Guidance for industry: Q5A viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin", ICH (1999).
 8. M. Bakhshayeshirad, "Performance characteristics of virus filtration membranes: Protein fouling and virus retention", Penn State Univ. (2011).
 9. S. Liu, M. Carroll, R. Iverson, C. Valera, J. Vennari, K. Turco, R. Piper, R. Kiss, and H. Lutz, "Development and qualification of a novel virus removal filter for cell culture applications", *Biotechnol. Prog.*, **16**, 425 (2000).
 10. "Guideline on validation of biopharmaceuticals manufacture processes", MFDS (2016).
 11. A. A. Shukla, M. R. Etzel, and S. Gadam, "Process Scale Bioseparation for the Biopharmaceutical Industry", Taylor & Francis, New York, NY, 297 (2007).
 12. W. P. Olson, "Separations Technology: Pharmaceutical and Biotechnology Applications", Interpharm Press, Buffalo Grove, IL, 122 (1995).
 13. A. S. Rathore and A. Shirke, "Recent developments in membrane-based separations in biotechnology processes: Review", *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **41**, 398 (2011).
 14. R. V. Reis and A. Zydney, "Bioprocess membrane technology", *J. Membr. Sci.*, **297**, 16 (2007).
 15. M. A. Serabian and A. M. Pilaro, "Safety assessment of biotechnology -derived pharmaceuticals: ICH and beyond", *Toxicol. Pathol.*, **27**, 27 (1999).
 16. A. S. Rosenberg, "Effects of protein aggregates: An immunologic perspective", *AAPS J.*, **8**, 501 (2006).
 17. "Guideline on assessing virus stability of biotechnology products from cell lines", MFDS (2002).
 18. D. Gail, "QA/QC for viral clearance", *Genetic Engineering & Biotechnology News* (www.genengnews.com), **26** (2006).
 19. S. Chandra, A. Groener, and F. Feldman, "Effectiveness of alternative treatments for reducing potential viral contaminants from plasma-derived products", *Thromb Res.*, **105**, 391 (2002).
 20. P. Roberts, "Resistance of vaccinia virus to inactivation by solvent/detergent treatment of blood products", *Biologicals*, **28**, 29 (2000).
 21. J. L. Lundblad and R. L. Seng, "Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate", *Vox Sang.*, **60**, 75 (1991).
 22. F. Brown, "An overview of the inactivation of FMDV and the implications when residual virus is present in vaccines", *Dev. Biol. Stand.*, **75**, 37 (1991).
 23. M. F. Bachmann, T. M. Kündig, C. P. Kalberer, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel, "Formalin inactivation of vesicular stomatitis virus impairs T-cell but not T-help-independent B-cell responses", *J. Virol.*, **67**, 3917 (1993).
 24. A. Scheidler, K. Rokos, T. Reuter, R. Ebermann, and G. Pauli, "Inactivation of viruses by beta-propiolactone in human cryo poor plasma and IgG concentrates", *Biologicals*, **26**, 135 (1998).
 25. W. R. Alonso, S. Trukawinski, M. Savage, R. A. Tenold, and D. J. Hammond, "Viral inactivation of intramuscular immune serum globulins", *Biologicals*, **28**, 5 (2000).
 26. S. A. Lawrence, "Beta-propiolactone: Viral inactivation in vaccines and plasma products", *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **54**, 209 (2000).
 27. M. Korneyeva, J. Hotta, W. Lebing, R. S. Rosenthal, L. Franks, and S. R. Petteway Jr, "Enveloped virus inactivation by caprylate: A robust alternative to solvent-detergent treatment in plasma derived intermediates", *Biologicals*, **30**, 153 (2002).
 28. H. Dichtelmuller, D. Rudnick, and M. Kloft, "Inactivation of lipid enveloped viruses by octanoic acid treatment of immunoglobulin solution", *Biologicals*, **30**, 135 (2002).
 29. Parenteral Drug Association (PDA), "PDA Technical Report No. 41: Virus filtration", *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **59** (2005).
 30. M. Azari, J. A. Boose, K. E. Burhop, T. Camacho,

- J. Catarello, A. Darling, A. A. Ebeling, T. N. Estep, L. Pearson, S. Guzder, J. Herren, K. Ogle, J. Paine, K. Rohn, R. Sarajari, C. S. Sun, and L. Zhang, "Evaluation and validation of virus removal by ultrafiltration during the production of diaspirin crosslinked haemoglobin (DCLHb)", *Biologicals*, **28**, 81 (2000).
31. T. Urase, K. Yamamoto, and S. Ohgaki, "Effect of pore structure of membranes and module configuration on virus retention", *J. Membr. Sci.*, **115**, 21 (1996).
32. I. Laursen, G. Houen, P. Højrup, N. Brouwer, L. B. Krogsøe, L. Blou, and P. R. Hansen, "Second-generation nanofiltered plasma-derived mannan-binding lectin product: Process and characteristics", *Vox Sang.*, **92**, 338 (2007).
33. K. Furuya, K. Murai, T. Yokoyama, H. Maeno, Y. Takeda, T. Murozuka, A. Wakisaka, M. Tanifuji and T. Tomono, "Implementation of a 20-nm pore-size filter in the plasma-derived Factor VIII manufacturing process", *Vox Sang.*, **91**, 119 (2006).
34. T. R. Kreil, A. Wieser, A. Berting, M. Spruth, C. Medek, G. Pölsler, T. Gaida, T. Hämmerle, W. Teschner, H. P. Schwarz, and P. N. Barrett, "Removal of small nonenveloped viruses by antibody-enhanced nanofiltration during the manufacture of plasma derivatives", *Transfusion*, **46**, 1143 (2006).
35. T. Burnouf and M. Radosevich, "Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products", *Hemophilia*, **9**, 24 (2003).
36. A. Johnston, A. MacGregor, S. Borovec, M. Hattarki, K. Stuckly, D. Anderson, N. H. Goss, A. Oates, and E. Uren, "Inactivation and clearance of viruses during the manufacture of high purity factor IX", *Biologicals*, **28**, 129 (2000).
37. <https://planova.ak-bio.com>, February 25 (2020).
38. K. H. Oshima, T. W. Comans, A. K. Highsmith, and E. W. Ades, "Removal of human immunodeficiency virus by an 0.04-micron membrane filter", *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, **8**, 64 (1995).
39. K. H. Oshima, "Evans-Strickfaden T. T., Highsmith A. K., Ades E. W., The use of a microporous polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane filter to separate contaminating viral particles from biologically important proteins", *Biologicals*, **24**, 137 (1996).
40. K. H. Oshima, T. T. Evans-Strickfaden, and A. K. Highsmith, "Comparison of filtration properties of hepatitis B virus, hepatitis C virus and simian virus 40 using a polyvinylidene fluoride membrane filter", *Vox Sang.*, **75**, 181 (1998).
41. H. Aranha-Creado, K. Oshima, S. Jafari, G. Howard, and H. Brandwein, "Virus retention by a hydrophilic triple-layer PVDF microporous membrane filter", *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **51**, 119 (1997).
42. H. Aranha-Creado, J. Peterson, and P. Y. Huang, "Clearance of murine leukaemia virus from monoclonal antibody solution by a hydrophilic PVDF microporous membrane filter", *Biologicals*, **26**, 167 (1998).
43. G. Miesegeaes, S. Lute, H. Aranha, and K. Brorson, "Virus retentive filters", in: M. C. Flickinger(Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, Wiley, New York, USA (2010)
44. <https://shop.pall.com/us/en/biotech/filtration>, February 25 (2020).
45. A. DiLeo, A. Allegrezza, and S. Builder, "High resolution removal of virus from protein solutions using a membrane of unique structure", *Nat. Biotechnol.*, **10**, 182 (1992).
46. A. J. DiLeo, D. A. Vacante, E, and F. Deane, "Size exclusion removal of model mammalian viruses using a unique membrane system, Part I: Membrane qualification", *Biologicals*, **21**, 275 (1993).
47. A. J. DiLeo, D. A. Vacante, E, and F. Deane, "Size exclusion removal of model mammalian viruses using a unique membrane system, Part II: Model qualification and process simulation", *Biologicals*, **21**, 287 (1993).
48. B. Hughes, A. Bradburne, A. Sheppard, and D. Young, "Evaluation of anti-viral filters", *Dev. Biol. Stand.*, **88**, 91 (1996).

49. J. Parkkinen, A. Rahola, L. von Bonsdorff, H. Tolo, and E. Torma, "A modified caprylic acid method for manufacturing immunoglobulin G from human plasma with high yield and efficient virus clearance", *Vox Sang.*, **90**, 97 (2006).
50. I. S. Kim, Y. W. Choi, Y. Kang, H. M. Sung, K. W. Sohn, and Y. S. Kim, "Improvement of virus safety of an antihemophilic factor IX by virus filtration process", *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1317 (2008).
51. J. X. Zhou, F. Solamo, T. Hong, M. Shearer, and T. Tressel, "Viral clearance using disposable systems in monoclonal antibody commercial downstream processing", *Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 488 (2008).
52. H. Brough, C. Antoniou, J. Carter, J. Jakubik, Y. Xu, and H. Lutz, "Performance of a novel virus filtration process", *Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 488 (2008).
53. <https://www.merckmillipore.com/KR/ko/>, February 25 (2020).
54. K. Tarrach, A. Meyer, J. E. Dathe, and H. Sun, "The effect of flux decay on a 20 nm nanofilter for virus retention", *Biopharm Int.*, **20**, 58 (2007).
55. <https://www.sartorius.com>, February 25 (2020).
56. S. Emory, "Principles of integrity testing hydrophilic microporous membranes", *Pharm. Technol.*, **13**, 68 (1989).
57. A. Depalma, "Making Filtration Work", *Bioprocess Int.*, **17**, 4 (2019).
58. J. Bartels, A. G. Batista, S. Kroll, M. Maas, and K. Rezwan, "Hydrophobic ceramic capillary membranes for versatile virus filtration", *J. Membr. Sci.*, **570-571**, 85 (2019).