

다품목 공용 제약설비인 바이알 충전기에 대한 세척공정 밸리데이션

양호준 · 김영란 · 성준호 · 황마로 · 김종오 · 용철순[#] · 최한곤[†]

영남대학교 약학대학

(2009년 8월 1일 접수 · 2009년 8월 6일 수정 · 2009년 8월 7일 승인)

Cleaning Validation Studies for Multi-Purpose Facility : Vial Filling Machine

Ho-Joon Yang, Young Ran Kim, Jun Ho Sung, Ma Ro Hwang, Jong Oh Kim, Chul Soon Yong[#] and Han-Gon Choi[†]

College of Pharmacy, Yeungnam University, 214-1, Dae-Dong, Gyeongsan 712-749, South Korea

(Received August 1, 2009 · Revised August 6, 2009 · Accepted August 7, 2009)

ABSTRACT – The purpose of this study is to evaluate the efficacy of stipulated cleaning process, and the prohibition of cross-contamination and microbiological contamination, which inadequate cleaning in multi-production could occur, through cleaning validation of multi-purpose facility used to produce five biopharmaceutical products as sterile injection. After production of five biopharmaceutical products such as hGH, rhGCSF, rhEPO, rhFSH and rhIFN using vial filling machine, the cleaning validation such as residual analysis of active ingredients or human serum albumin, measurement of total organic carbon (TOC), residual analysis of detergent and microbiological contamination were carried out. In the case of rhGH and rhGCSF clean validations, drug residues were not detected. Furthermore, in the case of rhEPO, rhFSH and rhIFN clean validations, human serum albumin residues were not detected. At TOC (total organic carbon) analysis, all clean validations gave the TOC of about average 137.93%, not more than 150% of acceptance criteria. At sodium analysis for the checking of residues of cleaning agent, sodium residues were not detected. In sterility test, they showed no microbiological contamination of bacteria and fungi. Thus, this cleaning validation was determined as successful in protection of cross-contamination and induction of safety in multi-purpose facility.

Key words – Clean validation, human serum albumin, total organic carbon, sterility, sodium analysis

세척공정 밸리데이션(cleaning validation)은 작업공정에서 기계 및 설비 등을 세척 작업을 할 경우 작업 의약품 및 세척제 등 세척 잔류물이 적절하게 세척되었는지를 검증하고 문서화하는 과정을 나타내며, 일반적으로 세척공정은 오염이나 물질의 전이로 인하여 의약품의 품질에 큰 영향을 미칠 가능성이 있는 공정 단계나 상황에 대해 실시하여야 한다.^{1,2)} 또한, 세척공정을 수행하기 전에 세척공정에 대하여 세부적으로 기술한 표준작업지침서(standard operating procedures, SOP)를 갖추고 있어야 하며, 이 규정된 절차에 따라 세척하였을 때 잔류물들이 적절하게 세척 및 제거되었는지 검증하는 것도 세척공정에 포함되어야 한다.^{3,4)} 특히, 다종의 제품 생산에 사용되는 전용설비에서의 불완전한 세척 공정에서는 다른 제품이나 약물의 잔류로 인한 오염, 세척제 잔류에 의한 오염 및 분해산물이나 미생물 또는 세척제 잔

류 등에 의한 오염이 발생할 수 있기 때문에 이 물질에 대한 검증이 필요하다.⁵⁻⁷⁾ 본 연구에서는 생산부에서 생물학적 의약품을 함유한 다종의 의약품 무균 주사제 제품들을 생산하는 바이알 충전기의 세척 공정 밸리데이션에 대한 정보를 제공하고자 한다. 즉, 본 연구의 바이알 충전기(model: FFV2010, BAUSCH+STRÖBEL, 독일)은 rhGH(recombinant human growth hormone),⁸⁾ rhGCSF(recombinant human granulocyte colony stimulating factor, filgrastim),⁹⁾ rhEPO (recombinant human erythropoietin),¹⁰⁾ rhFSH(recombinant human follicle stimulating hormone)¹¹⁾ 및 rhIFN(recombinant human interferon- α 2a)¹²⁾ 등 5종의 생물 의약품 무균 주사제 생산에 공용으로 사용되는 다품목 공용 제약설비(multi-purpose filling machine)로 충전 설비의 세척 불량으로 인해 결과적으로는 동일한 설비로 생산을 하게 되는 제품들은 교차 오염이 일어날 가능성을 가지고 있다. 따라서 발생할 수 있는 제품의 오염을 막기 위해 적절성과 유효성이 검증된 세척공정이 필수적으로 요구된다.¹³⁾ 특히, 약액이나 제품과 직접 접촉하는 부위는 잔류물 및 오염원 등에 의해 교차오염

본 연구에 대한 문의는 이 주저자[†] 및 공동 주저자[#]에게로
Tel : 053)810-2813, E-mail : hangon@yu.ac.kr
Tel : 053)810-2812, E-mail : csyong@yu.ac.kr

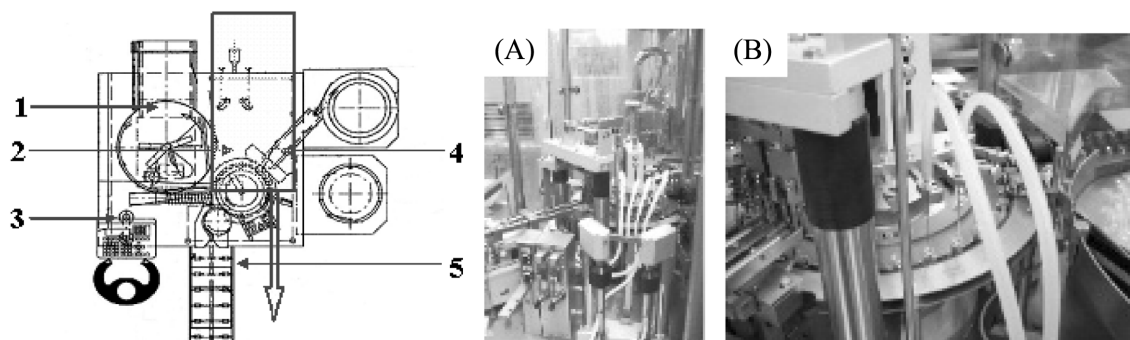


Figure 1—Automated vial filling machine; (1), infeed part; (2), filling part-critical point; (3), stoppering part; (4), outfeed part; (5), operational panel. Filling part consists of rotary piston pump (A) and tubing-nozzle set (B).

Table 1—Filling unit and filter set of automated vial filling machine

	Tools	Maker	Remarks
Filling unit	rotary piston pump	BAUSCH+STRÖBE L (Germany)	#4487/#4495
	filling nozzle		Ø 2.0 mm
	tubing #1	NALGENE Labware (USA)	Ø 3.2 mm
	tubing #2		Ø 4.8 mm
Filter set	sterilizing liquid filter	Sartorius Stedim (Germany)	0.2
	flex boy bioprocessing bag		Disposable
	tubing #3	NALGENE Labware (USA)	Ø 8.0 mm
	tubing #4		Ø 9.6 mm

이 일어날 가능성이 가장 농후하다. 따라서 본 연구에서는 바이알 충전기의 오염 핵심인 충전부위(filling unit, Figure 1)를 세척공정 밸리데이션 대상으로 선정하였다. 즉, 제품 생산 후 세척 및 멸균되어 무균 충전실로 반입된 충전부위 (Table 1)는 교체되는 후속 제품을 생산하기 위해 충전기에 조립되며 조립된 후에는 주사용수를 사용하여 최종 세정 및 충전 용량의 보정을 실시하게 된다. 이 때 충전부위의 튜브, 펌프 및 노즐 등 제품이 직접 접촉하게 되는 부위를 통과하여 나온 주사용수를 시료로 채취하여 세척제, 오염원 및 미생물 잔류 확인 그리고 생물 의약품 5종이 잔류하는지의 여부를 확인함으로써 세척공정 밸리데이션을 수행하였다.¹³⁾

실험 방법

원료 및 기기

인산, 2-프로판올 및 아세트니트릴은 Merck사(독일)에서 구입하였다. Human serum albumin 및 sodium standard solution은 Grifols(스페인) 및 Kanto사(일본)에서 각각 구입

하였다. 세척제는 Extran[®] MA03(phosphate-free 및 chlorine-free의 alkaline liquid concentrate)(No. 1.07550, Merck사, 독일) 을 사용하였다.

세척공정

rhGH, rhGCSF, rhEPO, rhFSH 및 rhIFN 함유 5가지 제품을 바이알 충전기로 생산한 후의 세척 공정을 Table 2 와 같이 case #1-#5로 분류하였다. 바이알 충전기(model: FFV 2010, BAUSCH+STRÖBEL, Ilshofen, 독일)의 충전부위의 튜브(tubing)들은 먼저 30초간 상수로 불순물을 씻어내고 스펀지에 희석된 세척제를 50 mL 가량 적셔 튜브 외부를 3회 이상 골고루 세척하였다. 튜브 내용량의 70%에 해당하는 양의 희석된 세척제를 튜브 내부에 넣고 튜브의 양 끝을 잡고 30회 이상 양쪽으로 흔들어 주면서 내부를 세척한 후 세척제를 버리고 상수로 튜브의 내, 외부를 30초씩 거품이 나오지 않을 때까지 세정하였다. 다시 튜브 내용량의 30%에 해당하는 상수를 채우고 양끝을 잡고 흔들어 거품이 발생하지 않음을 확인하였고 정제수로 20초간 튜브 외부

Table 2—Compositions of case #1-#5

Case	Product	Components
#1	rhGH	rhGH API, sodium phosphate dibasic, glycine, sodium phosphate monobasic
#2	rhGCSF	rhGCSF API, d-mannitol, acetic acid, tween 80, sodium hydroxide
#3	rhEPO	rhEPO API, HSA, sodium chloride, sodium phosphate monobasic, d-mannitol, sodium hydroxide
#4	rhFSH	rhFSH API, HSA, sodium chloride, sodium phosphate monobasic, d-mannitol, sodium hydroxide
#5	rhIFN	rhIFN API, HSA, d-mannitol, sodium phosphate dibasic, phosphoric acid

세정하고 마지막으로 20초간 주사용수로 튜브 내, 외부로 최종 세정하여 세척공정을 완료하였다. 또한 펌프(pump) 및 노즐(nozzle)의 세척은 20초간 상수를 기구 내, 외부로 흘러 묻어 있는 불순물을 씻어내고 초음파세척기(ultrasonic cleaner, model: 8210R-DTH, Branson Ultrasonic Co., 미국)에 펌프, 노즐 및 세척제 3 L를 넣고 10분간 가동하여 초음파로 세척한 후 기구를 꺼내고 초음파세척기의 세척제를 버리고 정제수로 기계의 내부를 세정한 다음 5 L의 정제수와 함께 펌프 및 노즐을 다시 넣고 5분간 초음파세척기를 가동하였다. 정제수로 30초간 펌프 및 노즐의 내, 외부를 세정하고 마지막으로 20초간 주사용수로 최종 세정하여 세척공정을 완료하였다.¹⁴⁾

시료채취

세척이 완료된 충전세트(Table 1)를 autoclave(model: DLOV, DE LAMA, 이태리)를 통해 멸균 및 건조시키고 무균 충전실로 반입하였으며 바이알 충전기에 조립하여 장착시킨 후 주사용수를 사용하여 튜브, 펌프 및 노즐을 최종 세정하고 배출되는 주사용수를 직접 멸균용기 (cat. no. : #430897, Corning® 50 mL pp self-standing screw cap conical tube, Corning Life Science, 미국)에서 채취하였다.¹³⁾ 특히, 총유기탄소시험에 사용되는 샘플은 별도의 용기(cat. no. : CHMI 90606, 40 mL certified TOC vial, pre-cleaned glass vial with teflon-lined septa, GE Analytical Instruments, 미국)에 채취하고 즉시 밀봉하였다.¹³⁾

주성분 rhGH의 잔류 시험

주성분 rhGH의 잔류 시험은 겔컬럼 (TSK-GEL G3000 SWXL column, 300×7.8 mm, Tosoh, 일본)과 HPLC (model: LC2000 Series, JASCO, 일본)을 가지고 이동상은 2-propanol/0.063 M 인산염 완충액 (pH 7.0) (30:70, w/w%) 혼합액으로 214 nm의 파장에서 0.6 mL/min의 유속 조건으로 시료를 분석하여 rhGH 단백질의 피크 검출여부를 확인하였다.⁸⁾

주성분 rhGCSF의 잔류 시험

주성분 rhGCSF의 잔류 시험은 Hi-Pore Reversed Phase column (RP-304, 250×4.6 mm, BIO-RAD, 미국)과 HPLC (model: LC2000 Series, JASCO, 일본)를 가지고 이동상은 주사용수:acetonitrile: trifluoroacetic acid (900:100:1, v/v%) 혼합액 A와 주사용수:acetonitrile:trifluoroacetic acid (200:800:1, v/v%) 완충액 B를 농도구배를 주어 0.5 mL/min의 유속 조건으로 280 nm의 파장에서 시료를 분석하여 rhGCSF 단백

질의 피크 검출여부를 확인하였다.⁹⁾

Human serum albumin 잔류 시험

Human serum albumin 잔류 시험은 겔컬럼 (TSK-GEL G3000 SWXL column, 300×7.8 mm, Tosoh, 일본)과 HPLC (model: LC2000 Series, JASCO, 일본)을 가지고 이동상은 85% phosphoric acid 6.74 mL와 sodium sulfate 14.2 g을 주사용수 900 mL에 용해한 완충액 (pH 6.8)으로 214 nm의 파장에서 1.0 mL/min의 유속 조건으로 시료를 분석하여 human serum albumin의 피크 검출여부를 확인하였다.¹⁵⁾

총 유기탄소 측정시험

총 유기탄소(total organic carbon, TOC)는 용액을 산화반응을 시켜서 발생하는 이산화 탄소량을 측정하여 총 탄소량(TC, total carbon)에서 무기탄소량(IC, inorganic carbon)을 감한 측정치로 계산하였다.⁷⁾ TOC analyzer (model: Sievers 820, GE Analytical Instruments, 미국)를 사용하여 최종 세정에 사용된 주사용수의 사용 전 및 사용 후의 TOC 수치를 각각 비교 측정하였다.⁷⁾

세척제의 나트륨 측정시험

세척제의 성분 중 sodium 성분은 원자흡광도계(AAS, atomic absorption spectrometer, model: 3300, Perkin Elmer, 미국)를 가지고 파장은 589.0 nm, slit width는 0.2 nm로 HCl-Na lamp와 C₂H₂/air flame gas를 사용하여 분석하여 세척제의 잔류여부를 측정하였다.¹⁶⁾

무균시험

대한약전 8개정 일반시험법 중 무균시험법의 멤브레인 필터법에 따라 시험하였다. 즉, 최종 세척수를 clean bench내에서 여과하여 사용한 멤브레인 필터를 fluid thioglycolate medium에 넣어 30-35°C에서 14일간 배양하여 세균의 발육 여부를 확인하였으며 tryptic soy broth에 넣은 것은 20-25°C에서 14일간 배양하여 진균의 발육 유무를 확인하였다.¹⁷⁾

결과 및 고찰

rhGH, rhGCSF, rhEPO, rhFSH 및 rhIFN 함유 5가지 제품을 바이알 충전기로 생산한 후의 세척 공정을 case #1-#5로 분류하여 충전 후 세척공정이 완료된 충전세트에 대한 세척 유효성을 확인하고자 제품의 주성분 잔류여부를 확인하였고 세척제의 성분 중에서 sodium으로 세제의 잔류여부

를 TOC (total organic carbon)로 세척 후에 주성분과 세제 뿐만 아니라 첨가제나 유기물의 잔류 여부를 무균시험으로 세척과 멸균 후에 미생물에 의한 오염 여부를 조사하였다 (Table II). 또한 Table II의 각 제품별 원료 약품의 구성을 보면 case #3-#5의 제품에는 주성분 단백질 이외에 human serum albumin을 안정제로 사용하였다. 따라서, case #1-#2에서는 주성분인 단백질의 잔류 분석을 실시하였지만 case #3-#5에서는 주성분의 잔류 확인분석에서 주성분인 단백질보다 많은 양의 human serum albumin이 첨가되기 때문에 HPLC 분석으로 주성분의 peak를 특이적으로 확인할 수 없으므로 최종 세척수 내에 human serum albumin의 peak 검출 여부를 별도로 확인함으로써 주성분 단백질에 대한 세척공정의 유효성을 검증하였다.

Table IV은 각 측정에 대한 허용한계(acceptance criteria)를 나타낸 것으로⁶⁾ case #1-#5의 최종 세정에 사용된 주사용수에서 의약품의 주성분(API) 또는 human serum albumin 잔류량이 LOD (limit of detection) 아래의 결과로 검출되지 않아야 한다.⁸⁻⁹⁾ 또한, TOC 측정시험에서는 사용 전 및 후의 주사용수에 대한 TOC 수치를 비교하여 주사용수의 수질기준은 500 ppb 이하이나 자연노출에 인한 증가요인과 시험오차를 감안하여 사용 전 주사용수의 TOC 수치 대비 150% 이하이어야 한다.⁷⁾ 세척제의 잔류 확인 시험에서는 나트륨 잔류량이 LOD 아래의 결과로 검출되지 않아야

하며, 14일간의 미생물 시험에서는 균의 발육이 관찰되지 않아야 한다.¹⁷⁾

Case #1 및 #2에서 rhGH 또는 rhGCSF 충전 후 정해진 방법대로 충전세트의 세척 공정을 완료하였고 멸균 후 다음 제품 충전을 위해 충전기에 조립하여 최종 세정한 주사용수를 채취하여 세척 공정의 유효성을 확인한 결과, 단백질 표준품에서는 단백질 피크가 정상 검출되었지만 최종 세척수에서는 residual rhGH 및 rhGCSF API의 피크는 검출되지 않았다(HPLC data 표시하지 않음). 따라서 세척제를 사용한 세척공정은 rhGH와 rhGCSF 제품 생산 후 잔류 가능성이 있는 주성분 단백질을 충전세트에서 모두 제거함으로써 규정된 세척 공정이 유효함을 알 수 있었다. 마찬가지로 case #3, #4 및 #5에서도 HSA 표준품에서는 정상적으로 단백질 피크가 검출되었지만 최종 세척수에서는 HSA의 검출 한계인 LOD(0.9766 mg/L) 이하의 결과를 나타내어 피크 불검출을 보인 것으로 보아 세척 공정이 유효하다고 판단하였다 (HPLC data 표시하지 않음).

최종 세척수에 대한 사용 전, 사용 후의 TOC 수치를 비교 측정한 결과 case #1은 136.25%, case #2는 145.45%, case #3은 129.61%, case #4는 138.06%, case #5는 140.28%로 모두 허용한계인 사용 전 주사용수 TOC의 150% 미만의 수치가 측정되어 기준을 만족하였다(Table III). 최종 세정에 사용되기 직전의 주사용수 보다는 TOC의 수치가 증가하였지만 50% 미만으로 유기탄소량 성분에 대하여도 세척 유효성을 확인할 수 있었다.⁷⁾ 그리고 세척제의 나트륨 잔류를 측정 한 결과 모든 case에서 허용한계인 0.15625 mg/L 미만의 결과로 불검출되어 기준을 만족하였으므로 세척제가 정제수와 주사용수를 이용한 세정 과정에서 효과적으로 제거되어 세척공정 완료 후에 잔류하지 않음을 알 수 있었다(AAS data (HPLC data 표시하지 않음)).¹⁶⁾ 또한, 세척공정 완료 후 멸균을 통해 무균 충전실로 반입된 충전 부위에 대한 미생물 오염의 여부를 확인하기 위한 최종 세척수의 14일간

Table III-Results of TOC

Case	Before use (ppb)	After use (ppb)	TOC (%)
#1	160	218	136.25
#2	132	192	145.45
#3	152	197	129.61
#4	134	185	138.06
#5	144	202	140.28

Table IV-Results of all test

Test	Acceptance Criteria	Case				
		#1 (rhGH)	#2 (rhGCSF)	#3 (rhEPO)	#4 (rhFSH)	#5 (rhIFN)
residual API (mg/L)	< LOD	ND	ND	-	-	-
residual HSA (mg/L)	< LOD	-	-	ND	ND	ND
TOC (%)	< 150%	136.25	145.45	129.61	138.06	140.28
residual detergents (mg/L)	< LOD	ND	ND	ND	ND	ND
sterility	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected

무균시험에서 세균 오염 및 진균 오염 확인 시험에서 균의 발육이 관찰되지 않았기 때문에 세척공정이 미생물 오염원 제거에도 유효함을 확인할 수 있었다.¹⁸⁾

따라서, 충전세트를 세정한 최종 세척수에 대한 단백질 또는 human serum albumin, TOC, 세척제의 나트륨 성분 잔류량은 검출되지 않거나 허용한도내에 잔류하였으며 무균시험에서는 세균, 진균 모두 관찰되지 않는 것으로 보아(Table IV) 본 세척공정이 유효하다고 결론지을 수 있었다.

결 론

rhGH, rhGCSE, rhEPO, rhFSH 및 rhIFN 함유 5가지 제품을 바이알 충전기로 생산한 후의 세척 공정의 유효성을 확인해본 결과, 주성분과 human serum albumin의 잔류는 HPLC 분석에서 검출되지 않았으며 TOC도 허용기준 내로 적합하게 측정되었다. 그리고 나트륨 성분도 검출되지 않아 세척제가 잔류하지 않음이 확인되었으며 무균시험에서 균 발육도 발생하지 않았다. 결론적으로 본 세척공정 밸리데이션 (cleaning validation)을 통해 세척제 및 세척공정의 유효성이 확인되었으며, 미리 규정된 세척 공정이 일관되게 유지되면 공용 설비인 vial filling machine을 사용하는 품목 간에 교차오염이 방지되어 제품 안전성을 확보할 수 있다고 판단되어진다.

감사의 말씀

이 논문은 2008학년도 영남대학교 포항 나노집적센터 연구비에 의한 것이며 이에 감사를 드립니다. (This work was supported by the National Center for Nanomaterials Technology through Yeungnam University in 2008.)

참고문헌

- 1) J. Agalloco, Points to Consider in the Validation of Equipment Cleaning Procedures, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **46** (5), 163-168 (1992).
- 2) R. Sharnez, J. Lathia, D. Kahlenberg and S. Prabhu, M. Dekleva, In situ monitoring of soil dissolution dynamics: a rapid and simple method for determining worst-case soils for cleaning validation, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **58** (4), 203-214 (2004).
- 3) K.M., Jenkins and A.J. Vanderwielen, 1994. Cleaning Validation: An Overall Perspective, *Pharmaceutical Technology*, **18** (4), 60-73.
- 4) 식품의약품안전청 고시 제2008-5호 (2008.1.16), 의약품등 밸리데이션 실시에 관한 규정 (2008).
- 5) W. Resto, D. Hernández, R. Rey, H. Colón and J. Zayas, Cleaning validation 2: development and validation of an ion chromatographic method for the detection of traces of CIP-100 detergent, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44** (1), 265-269 (2007).
- 6) G.L. Fourman and M.V. Mullen, Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations, *Pharmaceutical Technology International*, **17** (4), 46-60 (1993).
- 7) C. Glover, Validation of the total organic carbon (TOC) swab sampling and test method, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **60** (5), 284-290 (2006).
- 8) D. Loutradis, P. Drakakis, A. Vlismas and A. Antsaklis, Corifollitropin alfa, a long-acting follicle-stimulating hormone agonist for the treatment of infertility, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **10** (4), 372-380 (2009).
- 9) N. Kubota, Orita, T. and K. Hattori, Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors, *J. Biochem.*, **107** (3), 486-492 (1990).
- 10) J.L. Mehta, Erythropoietin in cardioprotection: does it have a future or is it all in the past? *Cardiovasc. Res.*, **79** (4), 549-50 (2008).
- 11) I. Luga, S. Febraro, H. Lecuelle, O. Papisoulitis, Q. Ho-Nguyena and M. Buraglio, Bioequivalence of liquid and freeze-dried recombinant human follicle-stimulating hormone, *Curr. Med. Res. Opin.*, **21** (1), 121-125 (2005).
- 12) L.G. De Leede, J.E. Humphries, A.C. Bechet, E.J. Van Hoogdalem, R. Verrijck and D.G. Spencer, Novel controlled-release Lemna-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial, *J. Interferon Cytokine Res.*, **28** (2), 113-122 (2008).
- 13) LeBlanc, D.A., Rinse Sampling for Cleaning Validation Studies, *Pharmaceutical Technology*, **22** (5), 66-74 (1998).
- 14) R. Turci and C. Minoia, Residual hazard assessment related to handling of antineoplastic drugs: safety system evolution and quality assurance of analytical measurement, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1076**, 649-656 (2006).
- 15) H.J. Kim, C.H. Shin and C.W. Kim, Stabilization of glycoprotein liquid formulation using arginine: a study with lactoferrin as a model protein, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** (1), 61-66 (2009).
- 16) S. Rzepka, B. Neidhart, Transport processes through track-etch membrane filters in a reagent delivery cell, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366** (4), 336-340 (2000).
- 17) E.C. Tidswell, Bacterial adhesion: considerations within a risk-based approach to cleaning validation, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **59** (1), 10-32 (2005).