

항체의약품 농축 및 제제화를 위한 한외여과 및 정용여과 공정

이 지 은 · 이 지 윤 · 백 영 빈[†]

성신여자대학교 바이오생명공학과

(2020년 10월 23일 접수, 2020년 11월 24일 수정, 2020년 11월 24일 채택)

Ultrafiltration and Diafiltration Processes for Concentration and Formulation of Antibody-based Therapeutics

Jieun Lee, Jiyeon Lee, and Youngbin Baek[†]

Department of Biotechnology, Sungshin Women's University, Seoul 01133, Republic of Korea

(Received October 23, 2020, Revised November 24, 2020, Accepted November 24, 2020)

요 약: 바이오의약품 중에서도 항체의약품의 수요가 증가함에 따라 항체를 상업용으로 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 항체의약품의 제조공정 중 downstream 공정은 의약품 성능에 직접적으로 영향을 미치기 때문에 중요하게 다뤄지며, 본 총설은 그 중에서도 농축 및 제제화를 목적으로 행해지는 한외여과 및 정용여과 공정에서 사용되는 한외여과막의 주요 제품 및 공정 특성을 살펴보고, 최근 연구 동향에 대해 소개하고자 한다.

Abstract: Antibody-based therapeutics have been receiving great attention as a representative biopharmaceutical, in which many researches are also carried out for its commercialization. The downstream process is considered an important part of the manufacturing processes of antibody-based therapeutics since it directly affects the performance and stability of products. Ultrafiltration/diafiltration (UF/DF), mostly performed in final step during downstream process, are used for the final concentration and formulation of antibody-based therapeutics. This paper reviewed the major products of the UF membrane, process characteristics, and recent research trends in UF/DF.

Keywords: ultrafiltration, diafiltration, concentration, formulation, antibody-based therapeutics

1. 서 론

항체의약품은 바이오의약품의 한 종류로 단일클론항체(monoclonal antibody, mAb), 항체-약물 결합체 등을 이용하여 주로 암이나 류마티스성 관절염, 크론병 등 자가면역질환의 치료제로 주로 사용한다[1-3]. 항체의약품은 표적치료를 기반으로 하기 때문에 일반적으로 부작용을 덜 일으키며, 잠재적인 부작용을 줄이기 위해 표적에 효율적으로 약물이 전달되도록 다른 의약품과 결합될 수 있는 장점이 있다[4]. 바이오의약품 시장은 2018년 기준 2,430억 달러로 전체 의약품 시장의 약 30%를 차지하고 있으며 2024년에는 3,880억 달러로 지

속적으로 성장할 것으로 전망되고 있다[5]. 이 중에서도 항체의약품은 바이오의약품 시장의 상위 10위 의약품 중 7개를 차지하고 있으며[6], 항체를 상업용으로 개발하기 위한 연구 또한 활발히 진행하고 있는 추세로 최근에는 코로나 19 치료제로 글로벌 제약사인 Eli Lilly, GSK 등과 국내기업인 셀트리온에서 항체 치료제를 개발하고 있다. 치료 대상의 범위와 효과를 높이기 위해 이중표적항체, 항체-약물 결합체 등 차세대 항체 의약품들이 활발히 개발되고 있다[7].

항체의약품은 생물반응기에서 원하는 의약품을 생산할 수 있는 세포를 키우는 것에서 시작하여, 여러 downstream 공정을 거쳐 분리/정제되어 생산한다(Fig. 1). 분

[†]Corresponding author(e-mail: ybbaek@sungshin.ac.kr, <http://orcid.org/0000-0002-7250-9944>)

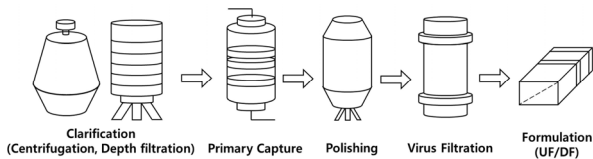


Fig. 1. Schematic of downstream processes for antibody-based therapeutics production.

리/정제 공정은 의약품 개발과정에서 의약품 효능 및 안정성에 직접적으로 영향을 미치기 때문에 상당히 중요하게 다뤄지며, 항체의약품 제조공정의 총 생산비용 중 많게는 70% 수준까지 차지한다[8]. 항체의약품의 분리/정제 공정은 생물반응기에서 원심분리 혹은 심층여과(depth filter) 기술을 이용하여 세포를 수확하고 필요에 따라 세포를 용해한 후에 친화성 크로마토그래피 공정을 거쳐 1차적으로 항체를 회수하고, 이온교환 혹은 소수성 크로마토그래피 공정 등을 이용하여 정제하고, 바이러스 제거 공정을 거친 후에 마지막으로 한외여과/정용여과(ultrafiltration/diafiltration, UF/DF) 공정을 통해 농축 및 제제화하여 생산한다[9]. 이 중에서 분리막 기술은 멸균 공정을 달성하기 위해 공정에 추가적으로 유입되는 용액에 사용되는 제균 필터, 바이러스 제거를 위한 바이러스 필터와 마지막 UF/DF 공정에 사용되는 한외여과막이 있다. 제균 필터는 생물반응기에서 기질이 추가로 유입되는 라인과, 완충용액의 교환을 위한 제제화 완충용액이 추가 유입되는 라인 등에서 사용하며, UF/DF 공정 이후에도 최종 멸균을 목적으로 사용한다. 그리고 바이러스 제거 공정은 공정 안정성을 확보하기 위해 임의의 바이러스를 제거하는 필수적인 단계로, 바이러스 필터는 일반적으로 20~70 nm의 공극크기를 가지며 다양한 제품이 존재한다. 최근 총설에서 바이러스 필터에 관한 자세한 내용을 다뤘다[10].

UF/DF 공정은 항체의약품 최종농도에 따라 농축-제제(UF-DF) 혹은 농축-제제-후농축(UF-DF-UF) 공정으로 수행한다. 예를 들어, 암환자의 경우에는 정맥주사를 통하여 의약품이 투약되기 때문에 상대적으로 저농도(< 100 mg/mL) 의약품이 필요하기 때문에 UF-DF 공정을 통하여 생산한다. 반면에, 류마티스 관절염 환자는 정맥주사보다는 피하주사를 통하여 투약되기 때문에 투약량의 한계가 존재하여 고농도(> 100 mg/mL) 의약품 생산을 위해 UF-DF-UF 공정으로 제조한다. 또한 한외여과막의 종류에 따라 UF/DF 공정에서 투과수량, 항체의약품의 최대획득농도 등이 달라질 수 있다. 이러한 UF/DF



Fig. 2. Commercial ultrafiltration cassettes of tangential flow filtration (TFF) system. Pellicon3[®] cassettes from Merck Corporation (left) and T-sereis Centramate[™] cassettes from Pall Corporation (right)[11,12].

공정에서 사용되는 한외여과막은 기존 수처리 공정에 사용하는 한외여과막과 달리 생성물을 잔류 시키며 항체의약품을 농축시키거나 완충용액을 교환하여 제제화하는 목적으로 사용한다. 또한, 항체의약품의 손실을 방지하고자 단백질 흡착능이 낮은 재질과 상대적으로 작은 분획분자량(molecular weight cut-off, MWCO)을 지닌 한외여과막을 사용한다. 본 총설은 UF/DF 공정에 사용되는 한외여과막의 주요 제품, UF/DF 공정 개요 및 최근 연구 동향에 대해 살펴보고자 한다.

2. 항체의약품 생산에 사용되는 한외여과막 현황

2.1. 한외여과막 모듈 및 시스템

항체의약품 생산뿐만 아니라, 실제 생물공정에 사용되는 한외여과막 모듈은 주로 카세트 타입이며(Fig. 2), 용액이 유입수 스크린으로 주입되면 양쪽의 분리막을 통하여 불순물이 포함된 유출수가 투과하도록 구성되어 있다. 카세트 타입의 분리막은 높은 밀집도, 물질전달율과 쉽게 대규모화 할 수 있다는 장점을 지니고 있기 때문에 UF/DF 공정에 효율적인 설계라고 할 수 있다[11].

앞서 설명한 분리막 기술이 도입된 생물분리공정 중 제균공정과 바이러스 제거 공정은 의약품 용액 전량을 다음 공정으로 보내어 의약품 손실을 줄여야 되기 때문에 전량여과 방식으로 운전되며, 이는 normal flow filtration (NFF) 시스템으로 명칭된다. 반면에 UF/DF 공정은 농축과 제제화를 목적으로 사용되기에 막오염 및 농도분극 현상을 최소화하여 공정의 효율이 높은 측면여과 방식으로 운전되며, tangential flow filtration (TFF) 시스템으로 명칭된다.

2.2. 한외여과막 주요 제품

항체의약품 UF/DF 공정에 사용되는 한외여과막은 일정한 투수율과 분리성능을 지니고 있어야 한다. 투수율을 측정하기 위해서는 주사용수(water for injection, WFI) 혹은 증류수를 이용하여 막 간 차압(transmembrane pressure, TMP)에 따른 유량(filtrate flux, J_v)을 측정한 후, 식 (1)을 이용하여 투수율(water permeability, L_p)을 계산한다. 분리성능은 다양한 분자량을 지닌 고분자(e.g. dextran)를 이용하여 투과하였을 때, 90% 제거성능을 보이는 분자량을 분획분자량(MWCO)으로 나타낸다.

$$L_p = \frac{J_v}{TMP} \quad (1)$$

한외여과막 제조사는 Merck, Pall, Repligen 및 Sartorius 등이 있으며 국내 대다수의 제약사에 공급하고 있다. UF/DF 공정에서 사용되는 분리막은 고효율의 항체 회수를 위하여 단백질 흡착능이 낮은 것으로 알려진 regenerated cellulose (RC) 혹은 polyethersulfone (PES) 재질을 사용한다. 일반적으로 항체의 분자량은 면역글로불린 G (Immunoglobulin G, IgG) 기준으로 약 150 kDa 수준으로 100% 회수를 목적으로 30 kDa MWCO를 지닌 한외여과막을 주로 사용하며, 항체 크기와 공정 성능에 따라 더 낮거나 높은 MWCO를 지닌 한외여과막을 사용하기도 한다. 본 연구에서는 항체의약품 공정에 주로 사용되는 30 kDa MWCO 기준으로 설명할 것이다. Table 1에 상업적으로 판매가 되고 있는 한외여과막의 주요 제품의 특성을 나타내었다.

Merck Corporation은 RC 재질의 Ultracel[®] 모델과 PES 재질의 Biomax[®] 모델이 있다. Table 1에서 나타내듯이 Ultracel[®] 모델은 지지층 재질에 따라 초고분자량 폴리에틸렌이면 Ultracel PLC, 폴리프로필렌 부직포이면 Ultracel PL로 구분되며, 평균 두께와 투수율[단위: L/m²/h/psi (LMH/psi)]에도 차이가 있다. Ultracel PLC는 막 두께가 130 μm로 얇은 반면에 Ultracel PL는 230 μm로 상대적으로 더 두껍다. MWCO 30 kDa 기준으로 Ultracel PLC는 21.5 LMH/psi, Ultracel PL은 25.0 LMH/psi로 다른 값을 가진다. PES 재질로 이루어진 Biomax PB는 지지층이 폴리올레핀 부직포로 이루어져 있으며, 막 두께는 280 μm로 Merck 제품 중에 가장 두껍고 투수율은 MWCO 30 kD 기준으로 37.5 LMH/psi로 가장 높다. Merck 카세트는 주로 Pellicon2[®]과 Pellicon3[®]

을 사용하며 이는 유효여과면적으로 구분한다. Pellicon2[®]는 대규모화가 용이하도록 개발되어 0.1~2.5 m²의 유효여과면적을 제공하며, Pellicon3[®]은 까다로운 운전조건(e.g. 압력, 온도 및 세척방식)에 적합하도록 개발된 제품으로 0.0088~1.14 m²의 유효여과면적을 제공하며 실험실 또는 대규모 생산 환경에서 적합한 제품이다.

Pall Corporation은 RC 재질의 Delta[®] 모델과 PES 재질의 Omega[®] 모델이 있다. Delta[®] 모델은 10, 30 kDa의 MWCO를 지니며 지지층 재질은 폴리프로필렌이며, Omega[®] 모델은 1~300 kDa의 MWCO를 지니며 폴리올레핀 지지층으로 구성되어 있다. 동일한 MWCO를 지닌 두 모델의 투수율을 비교해보면, 30 kDa MWCO에서 PES 재질의 Omega[®]의 투수율은 16.0 LMH/psi로 RC 재질의 Delta[®]의 투수율인 10.5 LMH/psi보다 높다. 카세트 종류는 형태에 따라 Centramate[™], Centrasette[™], Centrasette II[™], Maximate[™], Maxisette[™]로 구분되며, 이 중에서도 항체의약품 공정에서 대표적으로 사용되는 제품은 Centramate[™]과 Centrasette[™]이다. Centramate[™]는 유효여과면적이 0.02에서 0.5 m²으로 대규모화가 용이하여 공정 개발 및 0.1~125 L의 소규모 생산에 적합한 제품이며, Centrasette[™]은 Centramate[™]와 결합하여 수 백 m²의 유효여과면적으로 수 천 L 규모의 생산을 위한 제품이다.

Sartorius Corporation에도 마찬가지로 RC 재질의 Hydrosart[®] 모델과 PES 재질의 PESU[®] 모델이 있다. Hydrosart[®] 모델은 2~300 kDa, PESU[®] 모델은 1~300 kDa의 MWCO를 지닌다. 30 kDa MWCO를 지닌 두 모델의 투수율을 비교해보면, RC 재질의 Hydrosart[®] 모델이 4.7 LMH/psi로 낮은 반면에 PES 재질의 PESU[®] 모델은 21.0 LMH/psi로 상대적으로 높다. Merck와 Pall에서 제공하는 데이터와 비교해 보았을 때는 PES 재질의 UF막이 RC 재질의 UF막보다 투수율이 높은 것을 알 수 있다. Sartorius에서 UF/DF에 사용되는 카세트는 Sartocoon[®]이 있으며 유효여과면적이 0.005~3 m²이다.

Repligen Corporation에서 제공하는 한외여과막은 모두 PES 재질이며 분리막 표면을 개질하여 단백질 흡착능을 줄인 Prostream[®] 모델과 높은 친수성을 지닌 Hystream[®] 모델이 있다. 지지층 재질은 두 모델 모두 폴리프로필렌 부직포이다. ProStream[®] 모델은 0.65~300 kDa, Hystream[®] 모델은 5~300 kDa의 MWCO를 지닌 한외여과막이 판매된다. Prostream 모델의 단백질 흡착능은 0.25 mg/mL의 IgG와 Cytochrome-C를 사용하여 실험한

Table 1. Characteristics of Commercial Ultrafiltration Membranes[13-20]

Manufacturer	Model	Material		MWCO	Water permeability (LMH/psi)	
		Membrane	Support			
Merck	Ultrasel PLC	Regenerated cellulose	UHMW Polyethylene	5	1.0	
				8	3.5	
				10	4.2	
				20	9.0	
				30	21.5	
	Ultrasel PL	Regenerated cellulose	Polypropylene nonwoven	1	0.5	
				3	1.0	
				5	1.5	
				10	7.5	
	Biomax PB	Polyether sulfone	Polyolefin nonwoven	30	25.0	
				5	3.5	
				8	10.0	
				10	27.0	
	Pall	Delta	Regenerated cellulose	Polypropylene	30	37.5
					10	5.5
Omega		Omega polyethersulfone	Polyolefin	30	10.5	
				1	0.3	
				3	0.9	
				5	1.6	
				10	7.1	
				30	16.0	
Sartorius		Hydrosart	Regenerated cellulose	N.A.	2	0.3
					5	0.6
	10				1.7	
	30				4.7	
	PESU	Polyether sulfone	N.A.	1	0.5	
				5	1.5	
				8	7.6	
				10	10.3	
Repligen*	ProStream	Modified polyethersulfone	Polypropylene/polyethylene	30	21.0	
				1	1.2	
				3	2.7	
				5	4.2	
				10	16.3	
	HyStream	Modified polyethersulfone	Polypropylene/polyethylene	30	32.5	
				1	1.2	
				3	2.7	
				5	4.2	
				10	16.3	
				30	32.5	

* Average values of water permeability were used from the ranged water permeability, provided the manufacturer.

결과, 3.0, 1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 표면 개질 되지 않은 동일한 재질의 분리막(흡착능: 11.3, 36.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)에 비해 확연히 낮은 것이 확인되었다. Hystream[®] 모델은 접촉각이 4°로 Prostream[®] (접촉각: 22°)에 비해 표면이 더 친수적인 것이 특징이다. Repligen의 카세트의 명칭은 TangenXTM이며, 일회용 카세트인 TangenXTM, SIUSTM과 재사용 가능한 카세트인 TangenXTM PRO로 구분한다. 소규모 및 중간 규모의 운영에서는 TangenXTM, SIUSTM가, 대규모

운영에서는 TangenXTM PRO 제품이 권장된다.

Fig. 3은 제조사 별로 MWCO에 따른 투수율을 비교하기 위해 Table 1에 나타난 투수율 값을 사용하여 도식화 하였다. RC 재질의 경우 Ultrasel PL 모델이 가장 투수율이 높으며, PES 재질의 경우 5 kDa까지는 Prostream[®]/Hystream[®] 모델이 투수율이 가장 높지만 8 kDa 부터는 Biomax[®]가 가장 높은 값을 가진다. 또한 30 kDa 을 기준으로 봤을 때 RC 재질의 경우 Ultrasel PL, Ul-

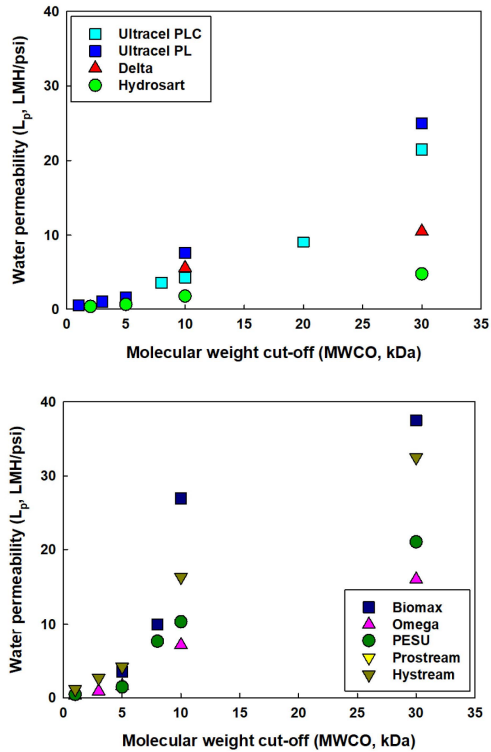


Fig. 3. Water permeability data of regenerated cellulose (RC) UF membranes (top) and polyethersulfone (PES) UF membranes (bottom) from the manufacturers[13-20].

tracel PLC, Delta®, Hydrosart® 순으로, PES 재질의 경우 Biomax®, Prostream®/Hystream®, PESU®, Omega® 순으로 투수율이 높다.

2.3. 스크린 타입

카세트 형태에서 스크린은 의약품 용액이 흐르는 채널로 존재하며, 유체흐름에 난류를 형성하고 농도분극 현상을 감소시켜 더 높은 투수율을 유지시켜준다. 스크린의 구성 형태는 fine, medium, coarse, open, suspended로 구분할 수 있는데, 이는 스크린을 구성하고 있는 망사의 밀도와 스크린과 분리막 사이의 간격 등의 차이로 구분된다(Fig. 4). Fine 스크린이 가장 촘촘한 망사 구조를 가지며 스크린과 분리막 사이의 간격이 좁고, suspended 스크린으로 갈수록 망사의 밀도는 낮아지며 스크린과 분리막 사이의 간격은 넓어진다. 따라서 스크린의 형태가 개방될수록 유속이 빨라지고, 고점도 용액에 적합한 형태가 되며, fine 타입 스크린으로 갈수록 높은 압력 손실과 물질전달율을 지닌다. 이외에도 스크린 종류에 따라 지체부피(hold-up volume)에도 차이가 생기게

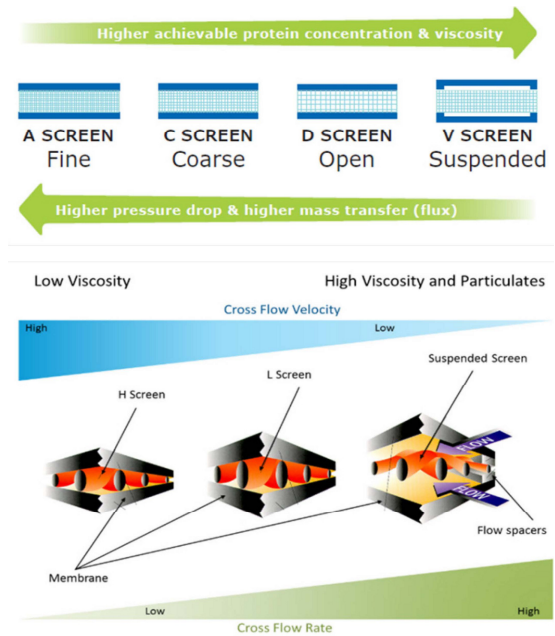


Fig. 4. Screen types in ultrafiltration cassettes from Merck (top)[11] and Repligen (bottom)[21].

되는데, 개방된 형태일수록 지체부피가 커진다. 따라서 실험 조건에 따라 원하는 타입의 카세트를 선별하여 사용할 수 있다.

Merck는 A (fine), C (coarse), D (open), V (suspended)로 4종류의 스크린이 카세트 타입의 한외여과막에 사용된다. 특히 D 스크린은 압력 손실을 줄이고, 더 높은 최종 의약품 농도를 얻기 위해 개방되어 고농축이 필요한 항체의약품 생산에 주로 사용한다. Pall은 fine, medium, suspended로 세 종류의 스크린을 가지는데, fine와 medium 타입은 지체부피에 차이가 없으나 suspended 타입은 fine와 medium 스크린에 비해 약 2배정도 높은 지체부피를 가진다. Sartorius는 E-스크린과 Eco-스크린이 존재하며 단백질의 농도가 20% 이상이거나 점도가 3 cP보다 높을 때는 E-스크린을, 그 반대의 경우에는 Eco-스크린을 사용할 것을 권장하고 있다. Repligen은 TangenX™, SIUS™의 경우 LP (medium), EP (coarser), J (open)의 스크린 타입, TangenX™ PRO의 경우 H (fine), L (medium), S (suspended)의 스크린이 존재한다.

항체의약품 UF/DF 공정에서 높은 투수율과 낮은 단백질 흡착능 이외에도 의약품의 성능에 영향을 미칠 수 있는 집합체(aggregate) 형성을 줄이는 것 또한 중요하다. 이러한 집합체는 공정 상 유체의 난류로 인하여 기

인할 수 있고 공정의 유속과 더불어 카세트의 스크린타입이 핵심적인 역할을 한다고 알려져 있다[22]. 해당 연구결과에 따르면, D 스크린을 지닌 카세트가 다른 카세트들과 비교하여 최종 단백질 농도가 높고, 낮은 집합체 생성율을 보였다. 또한, 물질전달계수 값은 medium 스크린보다 22% 정도로 약간 더 낮은 값을 갖지만 open 스크린보다는 260% 높은 값을 가지며, 의약품 용액이 흐르는 경로에 기인한 전단응력은 가장 낮았다. 이러한 결과들은 안정된 공정 운전과 의약품 품질향상에 기여하지만 용액의 특성 및 항체 종류에 따라 UF/DF 공정의 특성이 상이하기 때문에 이를 보완할 수 있는 추가적인 연구가 필요하다.

2.4. 한외여과막 검증

한외여과막 카세트를 검증하기 위해 주로 완전성 검증(integrity test), 적합성 검증(compatibility test)과 침출물 검증(extractables test)을 수행한다[9,23,24]. 완전성 검증을 통해 분리막, 모듈 및 시스템의 결함을 확인하고, 적합성 검증으로 특정 물질에 대한 분리막의 손상 여부나 사용 가능한 용매의 종류 혹은 농도 등을 확인할 수 있다. 또한 침출물 검증을 통해 최종 항체 생산품에 UF/DF 공정에서 침출될 수 있는 물질의 종류와 특성을 파악할 수 있다.

완전성 검증은 운송, 저장, 설치 중에 발생할 수 있는 분리막 카세트의 손상으로 인한 시스템 내 결함 혹은 누출 여부를 파악한다. 완전성 검증은 주로 버블포인트(bubble-point), 압력유지(pressure-hold), 그리고 기체확산(gas diffusion)을 측정하여 수행한다[24]. 버블포인트는 완전히 젖은 분리막에 점진적으로 압력을 가하여 기체유량을 측정하는 방식으로 주로 정밀여과막에 사용되며, 한외여과막은 작은 기공크기로 인해 버블포인트가 분리막의 내압성보다 높기 때문에 측정에 한계가 있다[24]. 압력유지 방법은 젖은 분리막을 가지고 일정 시간 동안 유실되는 기압을 측정하는 방식이며, 유량계를 사용하여 기체유량을 측정할 필요가 없기에 쉽게 측정 가능하다는 장점을 지닌다. 다만, 압력유지 측정 후에는 배압(back-pressure)으로 인해 발생할 수 있는 분리막의 비가역적 손상을 방지해야 한다. 마지막으로 기체확산 측정방법은 한외여과막 완전성 검증에 가장 일반적으로 사용되며, 예상 버블포인트의 약 80% 정도의 압력 하에서 젖은 분리막을 통해 통과하는 기체유량을 측정하여 제조업체에서 제공하는 기준치로 결함성을 평가한다[9].

완전성 검증의 결과는 항체의약품 회수율과 직접적인 상관관계는 없지만, UF/DF 시스템의 누출을 평가하는데 용이하게 사용된다.

적합성 검증은 UF/DF 공정 전후에 분리막을 살균하거나 세척할 때 사용되는 용액(e.g. NaOH, H₃PO₄, ethanol)이나 생물공정에 사용될 수 있는 유기용매(e.g. DMAc, DMSO, acetone, acetonitrile)를 사용하여 분리막의 완전성, 정규화된 투수율(normalized water permeability, NWP)과 압력 손실을 처리 전후로 비교하여 평가한다[20,23]. 또한 여러 종류의 용액(e.g. NaOH, NaOCl, ethanol, acetic acid)을 사용하여 분리막을 제외한 카세트 구성물질의 손상 여부를 평가할 수 있다. 각 구성품들을 45°C 혹은 실온에서 해당 용액에 1,200시간 침지 시킨 후 질량과 경도를 처리 전후로 비교하여 평가하며, 색(e.g. 반투명, 노란 착색, 흐려짐 등) 혹은 물리적(e.g. 구부러짐) 변화가 있는지 또한 평가한다[23,25].

침출물 검증은 분리막 카세트에서 항체의약품 생산품에 침출될 수 있는 잔류 물질의 종류와 농도를 확인하고 추가적으로는 실험용 쥐 혹은 토끼에 주입하여 일정기간동안 증상을 관찰하여 생물학적 안정성을 평가한다[9]. 분리막 카세트를 다양한 용매(e.g. 물, 25% ethanol, NaOH, HCl 등)에 일정 온도에서 24시간 이상 노출시킨 후에 남은 용매를 주로 핵자기 공명 분광법을 이용하여 침출물의 종류와 농도를 측정한다. 일반적인 침출물의 허용기준 농도는 10 µg/mL 미만이다[9]. 이외에도 고성능 액체 크로마토그래피와 푸리에 변환 적외선 분광법 기기로 분석하거나, 총유기탄소량, 잔류 비휘발성의 양을 측정하여 평가하는 방법도 있다[23].

3. 한외여과 및 정용여과(UF/DF) 공정

항체의약품 생산공정에서 UF/DF 공정은 항체의약품 최종농도를 달성하기 위한 농축과 완충용액 교환을 통해 항체의약품의 안정성을 최대화할 수 있는 제제화를 목적으로 수행한다[9]. 2.1에서 설명한 바와 같이, UF/DF 공정은 생물공정에 사용하는 다른 분리막 공정과 달리 TFF 시스템으로 운전하며 모식도와 실험실 설치된 사진을 Fig. 5에 나타내었다. UF 공정은 항체의약품 용액(feed)에서 TFF 시스템의 한외여과막을 거치면서 완충용액은 통과하고 항체는 잔류액(retentate)으로 원수 용액에 회수되며 농축되는 공정이다. Fig. 5에서 좌측 정용여과용 완충용액과 펌프를 통해 원수 탱크로 들어가는

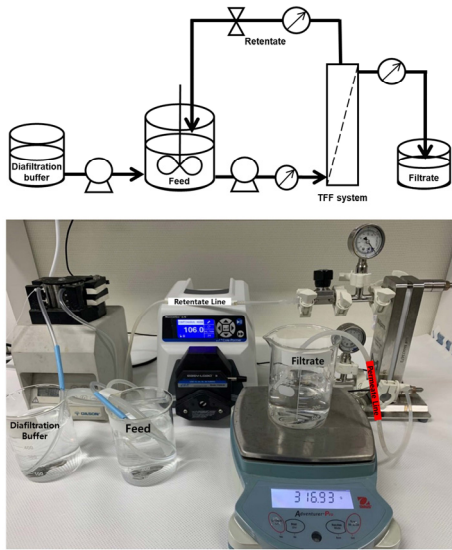


Fig. 5. Schematics of ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) process (top) and lab-scale set-up (bottom).

부분을 제외한다. DF 공정은 투석(dialysis)과 여과(filtration) 공정이 합쳐진 형태로서, UF 공정에서 투과수량만큼 교환하고자 하는 정용여과 완충용액(diafiltration buffer)을 원수에 주입하여 항체의약품 안정성을 확보할 수 있도록 제제화하는 공정이다. 일반적으로 DF 공정은 투과되는 유량만큼 정용여과 완충용액을 유입하여 의약품 용액의 부피를 일정하게 유지하는 일정 부피 정용여과(constant volume diafiltration) 공정으로 운전한다.

일반적으로 항체의약품은 UF-DF-UF 순서로 농축, 제제화 그리고 후농축 공정으로 생산한다(Fig. 6)[26]. 정맥주사 주입과 같이 고농도의 의약품이 필요하지 않은 경우에는 UF-DF 공정으로 수행되는 경우도 있다. Fig. 6은 기존 문헌에서 Pellicon 3 시스템을 이용하여 20 mM 인산 완충용액(phosphate buffer)에 10 g/L의 단일항체 용액을 60 g/L까지 농축하고(UF-1), 20 mM 히스티딘 완충용액(histidine buffer)으로 교환(DF)한 다음에 최종적으로 ~180 g/L까지 농축하면서(UF-2) 측정된 유량 및 단백질 농도의 변화를 나타낸다. 그림에서 보는 바와 같이, 유량은 항체의약품의 농축 중에 주로 감소하며 이는 항체 용액의 농도가 증가함에 따라 삼투압이 증가하고 용액의 점도가 증가하기 때문이다[27].

3.1. 한외여과(UF) 공정

일반적으로 UF 공정은 잘 알려져 있기 때문에 본 총설에서는 항체의약품 생산공정 혹은 생물공정에서 주

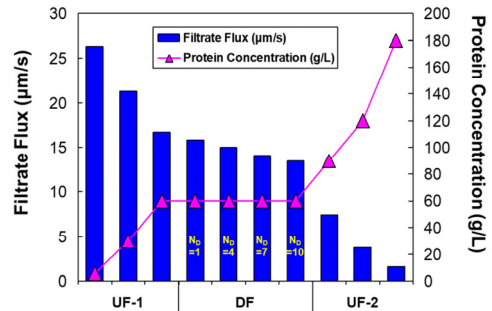


Fig. 6. Filtrate flux and protein concentration profiles during UF/DF process. Filtrate flux behavior during UF/DF. Feed: 10 g/L mAb in 20 mM phosphate buffer with 58 mM NaCl at pH 7. DF buffer was 20 mM histidine with 250 mM sucrose at pH 6.5. Process involved an initial UF that concentrated the mAb to 60 g/L (UF-1), followed by a 10-diavolume DF, and then a final UF to 180 g/L (UF-2)[26].

로 사용하는 운전인자와 특징만 간단히 언급하겠다. 항체의약품 생산공정에 사용되는 분리막의 특징은 멸균 상태를 유지하며 주로 일회용이라는 점이다. 특히, 제균 필터와 바이러스 필터는 사용 전 고압멸균 해야 하며 한번 사용하고 폐기한다. 반면에 한외여과막은 재질 특성상 고압멸균이 불가능하여 TFF 시스템에 설치하고 항체의약품 용액을 유입하기 전에 보존액 제거 및 멸균을 목적으로 살균 공정이 필수적이다. 살균은 일반적으로 살균제(e.g. NaOH, NaOCl)를 TFF 시스템에 30분간 흘려 보내준 후 증류수로 30분간 3회 정도 충분히 흘려주어 수행한다. 주로 사용되는 용액은 NaOH이며 RC 재질의 경우 0.1 혹은 0.25 N, PES 재질의 경우 0.5 N을 사용한다[28,29].

그리고 UF/DF 공정은 동일한 항체의 pharm을 생산하고 세척 후에 정규화된 투수율이 초기 값의 80% 이상 수준이면 추가적으로 사용이 가능하다. 세척은 일반적으로 증류수, 효소세제, NaOH 용액을 TFF 시스템에 흘려보내주어 수행한다[12,30]. 하지만, 공정 상의 오염 등의 문제로 실제 공정에서 빈번하게 단일 사용되기 때문에 최근에는 Merck Corporation, Repligen Corporation 등에서는 일회용 카세트를 판매하는 추세이다[31].

3.2. 정용여과(DF) 공정

DF 공정은 UF 공정으로 항체의 pharm을 적정 농도까지 농축시킨 뒤, 완충용액의 교환을 목적으로 수행한다. 일반적으로 DF 공정은 투수율과 항체의 pharm 원수로 들어가는 DF 완충용액의 유입량을 동일하게 맞춰주어 항체

의약품의 부피와 농도를 일정하게 유지시키는 일정 부피 정용여과 방식으로 운전한다[9]. 이때 원수의 부피 대비 분리막을 통과하여 빠져나간 용액의 부피(= 원수의 부피만큼 추가로 유입된 DF 완충용액의 부피)를 diavolume (DV)이라고 하며, 원수의 부피가 1 L라고 가정하였을 때, 투수량이 1 L 혹은 추가로 유입된 DF 완충용액의 양이 1 L가 되었을 때를 1 DV로 정의한다. 일정부피 DF 공정에서 UF 완충용액이 DF 완충용액으로 변화함에 따라 감소하는 농도를 식 (2)을 통해 구할 수 있다.

$$C = C_0 e^{-SN} \quad (2)$$

여기서 C 는 N 번만큼 DF 공정이 수행되었을 때의 UF 완충용액의 농도, C_0 는 UF 완충용액의 초기 농도, S 는 투과공율(sieving coefficient), N 은 수행된 diavolume의 수이다. UF 또는 DF 완충용액의 분자량은 한외여과막의 MWCO 대비 상당히 작기 때문에 S 는 주로 1이 된다. 따라서 식 (2)를 이용하여 diavolume의 수에 따른 완충용액의 농도를 계산해 보면, 1 DV를 수행했을 때 원수 내 DF 완충용액의 조성이 63% 정도, 7 DV를 수행했을 때에는 99.9%에 도달하기 때문에 실제 DF 공정에서는 주로 7~8 DV 정도로 운전한다.

또한 용액 내 항체의 농도(bulk protein concentration, C_b)값이 커지면 필요한 DF 완충용액의 양이 줄어들기 때문에 필요한 막 면적이 감소하지만, 유량 감소에 따른 오랜 운전 시간이 필요하다. 반대로 C_b 값이 작아지면 유량이 증가하지만 필요한 DF 완충용액의 양이 늘어남과 더불어 필요 막 면적이 증가한다. 따라서 DF 공정은 일반적으로 최적의 항체 농도에 해당하는 40~80 g/L 범위에서 운전하며 이를 예측하기 위한 관련된 식은 다음과 같다[9,32].

$$C_b^* = \frac{C_w}{e} \quad (3)$$

여기서 C_b^* 는 공정시간 혹은 분리막의 면적을 최소화하기 위한 최적의 항체 농도, C_w 는 분리막 표면에서의 항체의 농도, e 는 자연로그 함수이다.

4. 최근 기술 동향

4.1. UF를 이용한 고농축

항체의약품 용액의 정맥 투여는 시간이 많이 걸리고 의사의 감독을 필요로 하기 때문에, 환자들이 선호하게 되는 주입경로(구강 투여 혹은 피하주입)로 변경하고자 하는 연구를 활발하게 진행하고 있다. 예를 들어, 국내 셀트리온에서 램시마SC를 개발하였는데 이는 TNF-알파 억제제인 기존 인플릭시맙의 제형을 정맥주사에서 피하주사로 변경한 제품이다[33]. 피하주사의 경우 부피가 1~2 mL로 제한되기 때문에 권장 투여량을 위해 150 mg/mL 이상의 농도로 농축되며 이에 따라 점도가 원하는 범위의 값을 초과할 수 있다. 피하주사를 위해 투여되는 주사액의 적절한 점도 값은 20 cP이며, 일반적으로 50 cP가 한계치로 이를 초과하는 주사액을 사용하게 되면 환자의 고통을 수반하고 때에 따라서 부작용을 초래할 수도 있다[34]. 따라서 피하주사 제형을 위한 고농축 항체의약품 개발하기 위해서 용액의 점도를 낮추는 전략이 필요하다.

최근에는 의약품 용액에 유기성 용질을 첨가하여 단백질 간의 내분자적 상호작용을 감소시켜 점도를 낮추려는 연구들이 있었다[35-40]. 특히, arginine hydrochloride (ArgHCl)는 단백질 집합체 억제제로 사용되며 항체의약품 용액의 점도를 낮추는 것을 확인하였다[38]. 해당 연구에서 고농도의 arginine glutamate (Arg·Glu) 또는 Arg·HCl이 ~250 mg/mL의 mAb 용액의 점도를 최대 6배까지 낮추는 것이 확인되었다. 228 mg/mL의 mAb 용액의 점도는 110 cP로 아주 높았으나, 450 mM Arg과 485 mM Glu를 첨가한 263 mg/mL의 mAb 용액의 점도는 30 cP로 대폭 감소하였다.

다른 연구에서도 250 mg/mL의 bovine gamma globulin (BGG) 용액의 점도는 60 cP로 피하주사하기에 매우 높았으나 1000 mM ArgHCl을 첨가했을 때 허용수준(50 cP) 아래인 41 cP로 감소하였다[40]. 또한 human gamma globulin (HGG)용액의 경우, 1000 mM ArgHCl을 첨가했을 때 피하주사 가능한 최대 농도가 275 mg/mL에서 292 mg/mL로 증가하였다. 하지만 해당 연구에서는 ArgHCl의 첨가가 항체용액(e.g. BGG, HGG)의 점도를 줄이는 것에 효과적이었으나, 구형 단백질(e.g. α -amylase, α -chymotrypsin)의 경우에는 효과가 없었다고 보고하였다. 이렇듯이 유기성 용질이 점도에 미치

는 영향이 항체 혹은 단백질의 종류에 따라 상이하기 때문에 이를 명확히 밝히기 위한 메커니즘 규명이 추가적으로 필요하다.

그리고 항체의약품 용액의 특성을 이용하여 UF 공정을 예측하는 연구도 있었다[41]. 해당 연구에서는 두 종류의 단일항체와 fragment crystallizable (Fc)-융합 단백질을 사용하여 구연산/인산 완충용액과 히스티딘 완충용액 조건에서의 삼투압, 점도 그리고 UF 공정으로 인한 투수율의 감소량을 측정하였다. 그 결과, UF 공정을 통해 얻을 수 있는 항체의 최대농도 값은 점도에 반비례하고, 투수율은 비리얼 상수(virial coefficient)와 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 따라서 항체의약품 용액의 점도와 비리얼 상수를 고려하는 것 또한 한외여과를 이용한 고농축 전략 중 하나가 될 수 있다.

4.2. DF 공정에서 최종 buffer 조성 변화

일반적으로 7 DV 이상 정용여과를 수행하면 정제된 약물이 완전하게 새로운 완충용액으로 교환될 것으로 예상되지만 이와 달리 제제화된 최종 용액과 정용여과 완충용액 간의 조성과 pH에 상당한 차이가 있을 수 있다는 연구들이 있었다. 예를 들어, 제제화 된 pegylated soluble tumor necrosis factor receptor 용액의 히스티딘 농도가 완충용액보다 40% 낮게 나타났으며[42], 정용여과 후 단일클론항체와 Fc-융합 단백질의 전하량에 따른 상당한 pH의 변화가 있었다[43]. 이러한 현상을 설명하기 위해 Poisson-Boltzmann 방정식에 기초한 비교적 단순한 수학적 모델이 구축되었다[44]. 해당 연구는 최종 용액의 첨가제(c.g. 히스티딘, 소르비톨, 수크로스)의 농도가 정용여과 완충용액보다 낮게 나타난 이유를 전하를 띠는 히스티딘과 전하를 띠지 않는 소르비톨과 수크로스 나뉘 설명하였다. 전하를 띠는 첨가제의 경우 동일한 전하를 띠는 단백질 분자와의 정전기적 척력의 영향이 우세하며 부피배제(volume exclusion) 현상은 부차적인 것으로 나타났다. 반면에 전하를 띠지 않는 첨가제의 경우 부피배제 현상으로 인해 단백질 농도의 증가에 따른 최종 용액 첨가제 농도의 선형적 감소가 나타났다. 이러한 상호작용을 바탕으로 구축된 모델은 정용여과 후의 최종용액의 히스티딘의 농도를 성공적으로 예측하였다.

추가적으로 기존의 Poisson-Boltzmann과 부피배제 모델에 Henderson-Haselbalch 방정식을 함께 적용하여 pH의 변화를 예측할 수 있는 확장된 모델이 구축되었다[45].

해당연구는 전하를 띠는 히스티딘의 짝산과 짝염기의 상대적인 양을 통해 정용여과 시 나타날 수 있는 pH의 변화를 설명하였고, 개발된 모델을 통해 최종 용액의 히스티딘의 농도와 pH를 예측하였다. 그 결과, 히스티딘의 농도는 단백질 농도가 100 g/L인 부근에서 결과 값과 잘 일치하였고, pH의 경우 정확한 예측은 어려웠으나 어느 정도의 예측은 가능하였다.

최근에는 정용여과 시 나타나는 복잡한 pH와 농도의 변화를 설명하기 위해 순간 물질수지식에 기초한 새로운 모델이 구축되었다[46]. 해당연구는 단백질의 전하를 측정하여 Donnan 평형과 pH 변화에 관한 결과를 설명하며, 운전 pH 조건에서 양전하를 띠는 항체, 음전하를 띠는 항체를 사용하여 실험값이 성공적으로 예측됨을 확인하였다.

4.3. Single-pass TFF

일반적으로 250~500 LMH의 높은 원수주입속도에서 잔류액을 원수로 회수시키며 농축하는 기존의 TFF 공정과 달리 여러 개의 카세트를 통한 단계적 흐름 경로를 사용하여 한 번의 모듈 통과로 원하는 농도로의 농축을 가능하게 하는 single-pass TFF (SPTFF) 공정이 개발되었다[47,48]. 이는 연속 공정을 목적으로 개발되었기 때문에 다른 downstream 공정(e.g. 바이러스 제거, 크로마토그래피)과 결합하여 전반적인 처리량을 높이고 비용을 절감시킬 수 있다[47].

SPTFF 공정은 모듈 내에서의 잔류 시간을 증가시키기 위해 낮은 원수주입량에서 운전되기 때문에 기존의 시스템보다 더 작고 비용이 덜 드는 펌프와 튜브를 사용할 수 있어 공간의 제약을 줄일 수 있으며, 기존 공정과 달리 원수가 펌프를 한 번만 통과하기 때문에 유체의 흐름으로 인한 생체분자들의 손상 위험을 줄일 수 있으며, 지체부피가 작고, 회수율이 높다는 장점을 지닌다. 이와 관련하여 SPTFF와 기존 TFF 시스템의 IgG 용액의 농축 성능을 비교한 연구가 있었다[47]. 해당연구에서 5 g/L IgG 용액을 6~7배 농축하기 위해 기존의 TFF 시스템은 16.5분이 걸린 반면 SPTFF 시스템은 원하는 농도를 즉시 달성하고 운전과정 동안 안정적으로 유지되었다. 이 과정 동안 SPTFF 공정은 기존의 TFF 공정에 비해 5.8배 낮은 원수주입량과 1.6배 낮은 TMP에서 운전하였으며, 패스당 변환율은 18배 높았다.

4.4. 초소규모(ultra scale-down) 평가 시스템

일반적으로 분리막 공정은 산업 규모로 넘어가기 전 재료비의 절감을 위해 실험실 규모 혹은 파일럿 규모에서 실험이 진행되는데, 이러한 규모에서도 생각보다 많은 비용이 요구되기 때문에 최근에는 이보다 더 소규모 시스템으로 실험하고자 하는 연구가 있었다[49]. 해당 연구에서는 실험당 최소 1.7 mL 용액부피만으로도 운전 가능하도록 개발된 초소규모(ultra scale-down, USD) 평가 시스템을 사용하여 mAb 용액을 농축 및 제제화 하여 이를 통해 500배 큰 규모인 파일럿 규모의 실험 결과와 비교하였다. 원수의 농도 및 TMP에 따른 유량은 예측값과 실험값이 일치했으나 집합체 생성의 경우에는 USD 시스템이 파일럿 규모에 비해 50~100배 높게 측정되는 차이점을 보였다. 따라서 이러한 변수를 고려한 추가적인 연구가 필요하다.

5. 결 론

항체의약품의 수요가 증가함에 따라 항체를 상업용으로 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며 이에 따라 제조공정 중 의약품의 성능에 직접적으로 영향을 미치는 downstream 공정이 중요하게 다뤄진다. 그 중에서도 한외여과 및 정용여과(UF/DF)는 의약품의 농축 및 제제화를 목적으로 수행되어 최종적으로 제품을 생산하는 공정이다. 항체의약품 공정에 사용되는 한외여과막은 주로 분리막과 스크린으로 이루어진 카세트 타입이며, 이는 높은 밀집도, 물질전달율을 가지고 있으며 쉽게 대규모화가 가능한 매우 효율적인 설계이다. 각 제조사 별로 스크린의 형태에 따른 다양한 분리막이 존재하며, 원하는 조건에 따른 타입의 카세트를 선별하여 사용할 수 있다.

최근 동향으로는 UF 공정을 통한 항체의약품 고농축 전략과 DF 공정에서 완충용액의 조성 변화에 대한 연구들을 진행하고 있으며 항체의약품의 분리/정제 공정을 연속공정으로 운전하기 위한 여러 가지 시도들 또한 진행하고 있다. 또한 UF/DF 공정은 항체의약품 생산공정뿐만 아니라 다른 생물공정에서도 널리 사용되기 때문에 다양한 제품을 안정적으로 생산하기 위해서는 제품의 특성에 맞는 분리막 개발과 더불어 공정시스템의 지속적인 개선을 위한 연구가 필요하다.

감 사

이 논문은 2018년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원(2018-2-85-003)에 의하여 연구되었습니다.

Reference

1. A. M. Scott, J. D. Wolchok, and L. J. Old, "Antibody therapy of cancer", *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 278 (2012).
2. A. L. Nelson, E. Dhimolea, and J. M. Reichert, "Development trends for human monoclonal antibody therapeutics", *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 767 (2010).
3. L. M. Weiner, R. Surana, and S. Wang, "Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy", *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 317 (2010).
4. W. Wang, S. Singh, D. L. Zeng, K. King, and S. Nema, "Antibody structure, instability, and formulation", *J. Pharm. Sci.*, **96**, 1 (2007).
5. www.evaluate.com/PharmaWorldPreview2019, September 11 (2020).
6. 한국수출입은행 해외경제연구소, "세계 바이오의약품산업 동향 및 전망" (2019).
7. Lg경제연구원, "차세대 바이오 의약품, 세포치료제 시장 현황과 전망" (2017).
8. A. Mehta, "Downstream Processing for Biopharmaceuticals Recovery", pp. 163-190, Springer, Berlin (2019).
9. R. van Reis and A. Zydney, "Bioprocess membrane technology", *J. Memb. Sci.*, **297**, 16 (2007).
10. T. H. Choi and H. B. Park, "Membrane and virus filter trends in the processes of biopharmaceutical production", *Membr. J.*, **30**, 9 (2020).
11. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/2/pellicon3_30kd_cleanability_techbrief-tb1241en-mk.pdf (2017).
12. https://www.pall.com/content/dam/pall/biopharm/lit-library/non-gated/procedures/09.3090_USTR2433b_T_Series_Cassettes_Omega_IFU_EN.pdf, December 9 (2009).

13. https://www.emdmillipore.com/Web-CA-Site/en_CA/-/CAD/ShowDocument-Pronet?id=201501.131, March (2018).
14. <http://tangensex.com/wp-content/uploads/2015/01/TX-ProStream-HD.pdf>, January (2015).
15. <https://www.zind-vt.com/pdfs/HyStream.pdf>, January (2015).
16. <https://www.sartorius.com/shop/medias/-datasheet-en-Data-Hydrosart-Ultraf-White-Silicone-SPC2063-e.pdf> (2019).
17. www.sartorius-stedim.com, September 11 (2020).
18. <https://shop.pall.com/us/en/biotech/tangential-flow-filtration/cassettes/zidgri78m0j>, September 11 (2020).
19. <https://shop.pall.com/us/en/biotech/tangential-flow-filtration/cassettes/zidgri78lp2>, September 11 (2020).
20. <https://shop.pall.com/us/en/biotech/tangential-flow-filtration/cassettes/zidgri78m0j>, September 11 (2020).
21. <https://www.repligen.com/technologies/tangensex-tff/pro-reusable>, September 11 (2020).
22. A. Arunkumar, N. Singh, E. G. Schutsky, M. Peck, R. K. Swanson, M. C. Borys, and Z. J. Li, "Effect of channel-induced shear on biologics during ultrafiltration/diafiltration (UF/DF)", *J. Memb. Sci.*, **514**, 671 (2016).
23. https://www.emdmillipore.com/Web-CA-Site/en_CA/-/CAD/ShowDocument-Pronet?id=201306.4194, December (2018).
24. <https://bioprocessintl.com/downstream-processing/filtration/integrity-testing-of-ultrafiltration-systems-for-biopharmaceutical-applications-335646/>, August 31 (2020).
25. https://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201306.11634, May (2017).
26. Y. Baek, D. Yang, and A. L. Zydney, "Development of a hydrodynamic cleaning cycle for ultrafiltration/diafiltration processes used for monoclonal antibody formulation", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **57**, 16110 (2018).
27. Y. Baek and A. L. Zydney, "Intermolecular interactions in highly concentrated formulations of recombinant therapeutic proteins", *Current Opinion in Biotechnology*, **53**, 59 (2018).
28. https://www.emdmillipore.com/Web-PR-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MM_NF-C9947&DocumentId=201306.4192.ProNet&DocumentType=UG&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP, February (2019).
29. https://www.pall.com/content/dam/pall/biopharm/lit-library/non-gated/procedures/09.3100_USTR2453b_T_Series_Cassettes_Omega_Delta_IFU_EN.pdf, December 9 (2009).
30. [https://www.pall.com/content/dam/pall/biopharm/lit-library/non-gated/procedures/11.7322_USTR2662\(3\)_T_Series_Cassettes_Delta_IFU_EN.pdf](https://www.pall.com/content/dam/pall/biopharm/lit-library/non-gated/procedures/11.7322_USTR2662(3)_T_Series_Cassettes_Delta_IFU_EN.pdf), August 11 (2011).
31. <https://www.repligen.com/technologies/tangensex-tff/sius-single-use>, September 21 (2020).
32. P. Ng, J. Lundblad, and G. Mitra, "Note: optimization of solute separation by diafiltration", *Separation Science*, **11**, 499 (1976).
33. K. McKeage, "A review of CT-P13: An infliximab biosimilar", *BioDrugs*, **28**, 313 (2014).
34. W. Du and A. M. Klibanov, "Hydrophobic salts markedly diminish viscosity of concentrated protein solutions", *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 632 (2011).
35. T. M. Scherer, "Cosolute effects on the chemical potential and interactions of an IgG1 monoclonal antibody at high concentrations", *J. Phys. Chem. B*, **117**, 2254 (2013).
36. K. P. Johnston, J. A. Maynard, T. M. Truskett, A. U. Borwankar, M. A. Miller, B. K. Wilson, A. K. Dinin, T. A. Khan, and K. J. Kaczorowski, "Concentrated dispersions of equilibrium protein nanoclusters that reversibly dissociate into active monomers", *ACS Nano*, **6**, 1357 (2012).
37. A. U. Borwankar, A. K. Dinin, J. R. Laber, A. Twu, B. K. Wilson, J. A. Maynard, T. M. Truskett, and K. P. Johnston, "Tunable equilibrium nanocluster dispersions at high protein concentrations", *Soft Matter*, **9**, 1766 (2013).
38. N. Inoue, E. Takai, T. Arakawa, and K. Shiraki, "Specific decrease in solution viscosity of antibodies by arginine for therapeutic formulations", *Mol. Pharm.*, **11**, 1889 (2014).

39. Z. Guo, A. Chen, R. A. Nassar, B. Helk, C. Mueller, Y. Tang, K. Gupta, and A. M. Klivanov, "Structure-activity relationship for hydrophobic salts as viscosity-lowering excipients for concentrated solutions of monoclonal antibodies", *Pharm. Res.*, **29**, 3102 (2012).
40. A. U. Borwankar, B. J. Dear, A. Twu, J. J. Hung, A. K. Dinin, B. K. Wilson, J. Yue, J. A. Maynard, T. M. Truskett, and K. P. Johnston, "Viscosity reduction of a concentrated monoclonal antibody with arginine · HCl and arginine · glutamate", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **55**, 11225 (2016).
41. Y. Baek, N. Singh, A. Arunkumar, M. Borys, Z. J. Li, and A. L. Zydney, "Ultrafiltration behavior of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins: Effects of physical properties", *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 2057 (2017).
42. M. R. Stoner, N. Fischer, L. Nixon, S. Buckel, M. Benke, F. Austin, T. W. Randolph, and B. S. Kendrick, "Protein-solute interactions affect the outcome of ultrafiltration/diafiltration operations", *J. Pharm. Sci.*, **93**, 2332 (2004).
43. G. R. Bolton, A. W. Boesch, J. Basha, D. P. LaCasse, B. D. Kelley, and H. Acharya, "Effect of protein and solution properties on the donnan effect during the ultrafiltration of proteins", *Biotechnol. Prog.*, **27**, 140 (2011).
44. F. Miao, A. Velayudhan, E. DiBella, J. Shervin, M. Felo, M. Teeters, and P. Alred, "Theoretical analysis of excipient concentrations during the final ultrafiltration/diafiltration step of therapeutic antibody", *Biotechnol. Prog.*, **25**, 964 (2009).
45. M. Teeters, D. Bezila, T. Benner, P. Alfonso, and P. Alred, "Predicting diafiltration solution compositions for final ultrafiltration/diafiltration steps of monoclonal antibodies", *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 1338 (2011).
46. Y. Baek, N. Singh, A. Arunkumar, A. Borwankar, and A. L. Zydney, "Mass balance model with donnan equilibrium accurately describes unusual pH and excipient profiles during diafiltration of monoclonal antibodies", *Biotechnol. J.*, **14**, 1800517 (2019).
47. C. Casey, T. Gallos, Y. Alekseev, E. Ayturk, and S. Pearl, "Protein concentration with single-pass tangential flow filtration (SPTFF)", *J. Memb. Sci.*, **384**, 82 (2011).
48. J. Dizon-Maspat, J. Bourret, A. D'Agostini, and F. Li, "Single pass tangential flow filtration to debottleneck downstream processing for therapeutic antibody production", *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 962 (2012).
49. L. Fernandez-Cerezo, A. C. M. E. Rayat, A. Chatel, J. M. Pollard, G. J. Lye, and M. Hoare, "The prediction of the operating conditions on the permeate flux and on protein aggregation during membrane processing of monoclonal antibodies", *J. Memb. Sci.*, **596**, 117606 (2020).