

バイオプロセスにおける主要バッファの濃度測定方法として有効な浸透圧試験



Kristeena Wright, Ph.D., Linda Buck, Mark Hunter, Meredith Pesta

Introduction

生物製剤の製造は、タンパク質を回収し、汚染物質を精製して最終的に医薬品を生成する、複雑でコストのかかるプロセスで成り立っています。これは、一連のろ過とクロマトグラフィープロセスによって達成されます。望ましい製品の品質と純度を達成し、維持するには、プロセスパラメーターの最適化と、これらのパラメーターの正確な制御が必要です。

バイオ医薬品産業が発展するにつれ、下流プロセスの評価において、より正確で信頼性の高い測定を提供する堅牢な分析法の開発がより重視されるようになりました。これには、精製条件を維持し、タンパク質を安定化させるバッファの厳密なモニタリングが不可欠です¹。バッファコンポーネントの試験を標準化することで、プロセスの一貫性が保証され、バッチ不良のリスクが減少し、製造の全体的な成功率が向上します。Table 1は、生物製剤の下流プロセスで使用される一般的なバッファおよびバッファ成分の一覧です。バッファの調製と評価が適正に行われていない場合、ろ過やクロマトグラフィーステップで好ましくない結果（プロセス性能の低下や規格外の結果など）が生じる恐れがあります^{2,3}。

下流プロセスにおけるバッファの試験とリリースには、従来、pHと導電率の測定が用いられてきました。現在、バッファ成分濃度は、プロセス管理（例：標準操作手順（SOP））と、pHと導電率の組み合わせによる間接的な測定によって確保されています。

pHも導電率も相互に関連し⁴、分子特異的であり、その条件下における分子の解離度合いに依存しています。

このような測定は、タンパク質の安定性やクロマトグラフィ樹脂との適切な相互作用を保証するために非常に貴重である一方、イオン化に大きく依存します^{5,6}。このため、解離の弱いバッファの濃度測定としては信頼性に問題が生じます。さらに、pHメーターも導電率メーターも温度の影響を受ける可能性があります^{5,6}。F室温以下で調製され保存されるバッファの場合、これらの方法はさらなる計算と予防措置を必要とする可能性があります。

Buffer component	Applications in Downstream Bioprocessing
Tris	pH Neutralization, Chromatography
Tris-HCl	Chromatography
Phosphate Buffer	Chromatography, UF/DF
Citrate Buffer	Chromatography, UF/DF
Acetic Acid	pH Acidification, Protein A Chromatography Elution
Citric Acid	pH Acidification, Chromatography, UF/DF
Phosphoric Acid	pH Acidification, Chromatography

Table 1. Common buffers in downstream bioprocessing and their applications. These buffers were tested for osmolality, conductivity and pH.

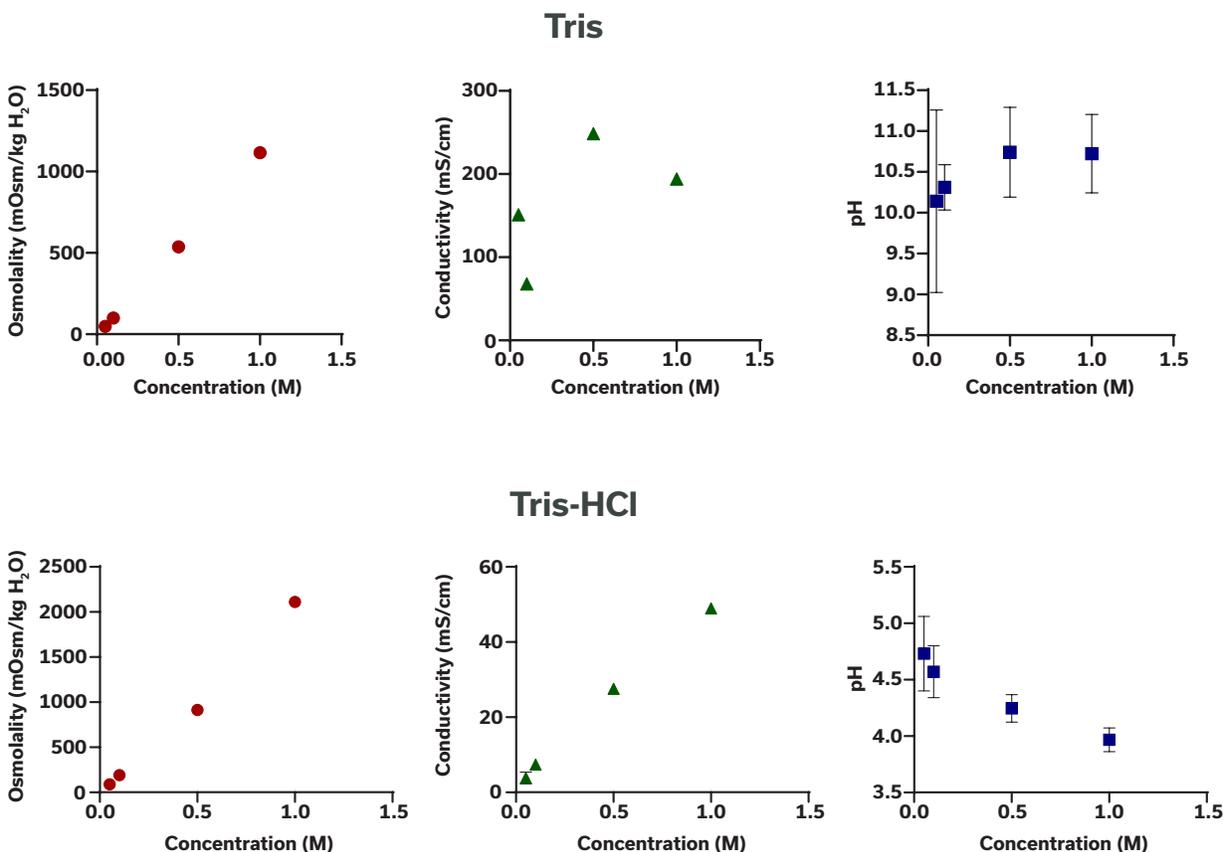
浸透圧は、バイオプロセスの一貫性を高め、制御戦略を改善する可能性のあるオーソゴナル測定として、本研究で評価されました。浸透圧は水1kgあたりの溶質のモル数の測定値であるため、分子の種類、イオン化の程度、pHの影響を比較的受けないと考えられています。この研究は、浸透圧が濃度測定としてどのように機能するのか、またpHや導電率測定と比較してどうなのかを理解するために行ったものです。

Materials and Methods

Table 1 のバッファーは、重量法を用いて個別に調製しました。すべてのバッファーは 0.05M、0.1M、0.5M、1M、1.25M、1.5M、1.75M、2M で調製し、調製後24時間以内に試験を行いました。低濃度（0.05Mから1M）のものは、バイオプロセスでの利用に最適なものです。インラインで希釈する前に濃縮バッファーを調べるという、バイオプロセスにおけるトレンドの高まりに対応するため、1Mを超える濃度のソリューションも、装置の能力に応じて組み込みました²。浸透圧は、凝固点降下法を採用したAdvanced Instruments OsmoTECH® シングルサンプル微量浸透圧計を用いて測定しました。導電率は Hanna Instruments HI5321 Laboratory Research Grade Benchtop Conductivity/Resistivity /TDS/Salinity/Temperature Meterで測定しました。pHは、Thermo Scientific Orion® 8157BNUMD Ross™ Ultra Refillable Triode™ と Orion Star™ A211 pH Benchtop Meterを組み合わせて測定しました。測定はすべて、各濃度で10回行いました。それぞれの濃度についてデータを記録し、平均値と変動係数 (%CV) を算出しました。

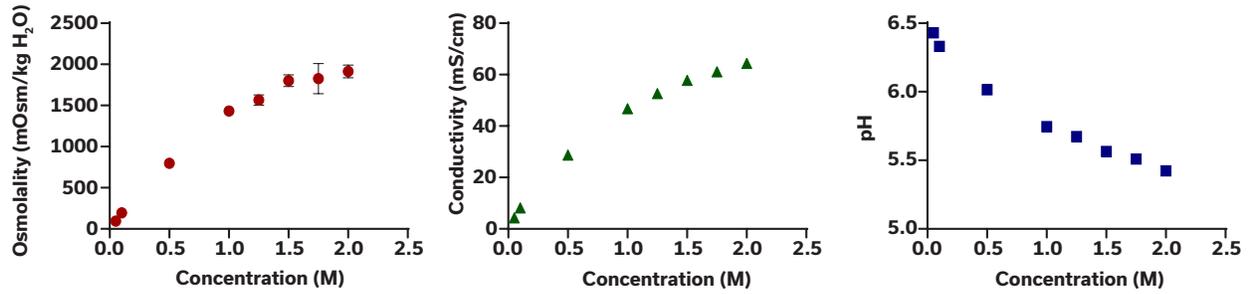
Results

以下の7組のグラフは、各溶液の3つの物性値の平均値と%CV（エラーバーで表す）を示します。極端に小さいCVを表すエラーバーは見えていません。各グラフの軸は、その傾向を強調するために調整しています。

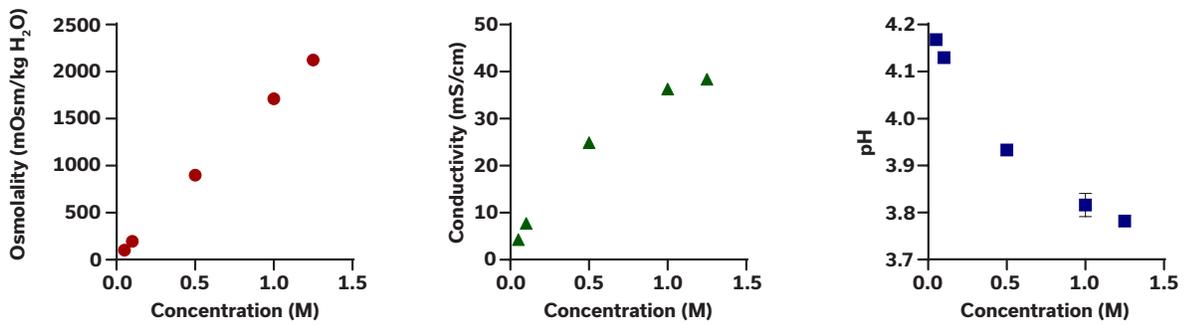


Results continued

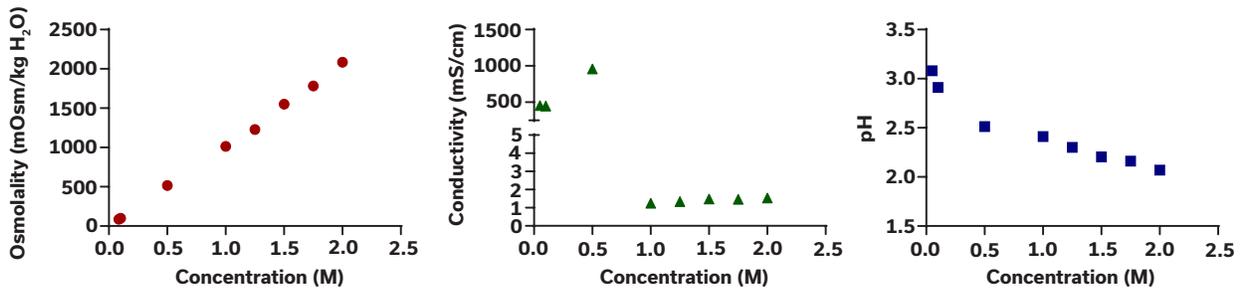
Phosphate Buffer



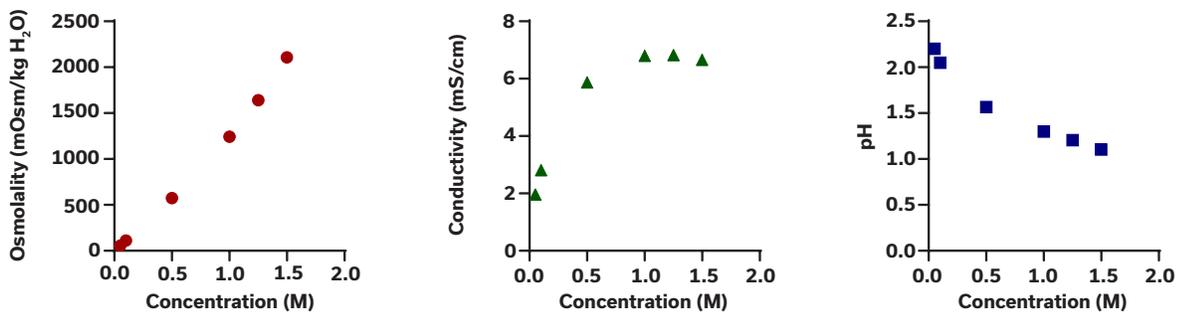
Citrate Buffer



Acetic Acid

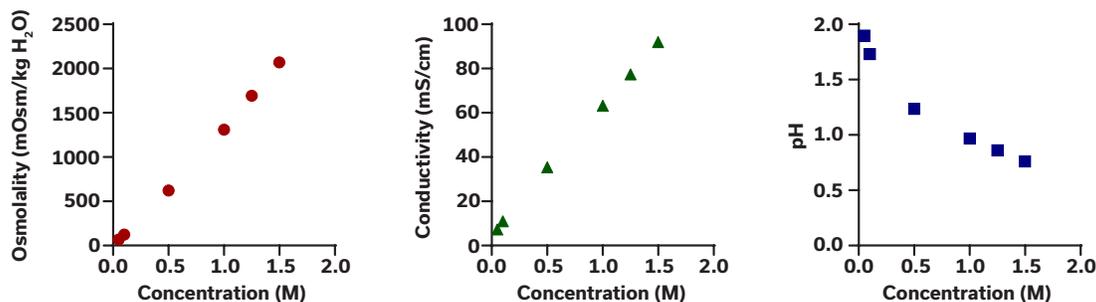


Citric Acid



Results continued

Phosphoric Acid



Discussion

データは、pHと導電率が、トリス、酢酸、クエン酸、クエン酸塩のようなバッファーに対して、濃度の最良の測定値を提示していないことを明らかにしています。一方、浸透圧は、広い濃度範囲にわたって、これらのバッファーのそれぞれについて強力かつプロポーショナルな測定を示しています。導電率とpHは下流のバイオプロセスにおいて明確な利用価値がありますが、浸透圧はバッファ濃度に関する追加情報を提供することができます。pHの測定は、下流のバイオプロセスにおいて重要ですが、バッファー濃度のスケール全体においてレンジがほとんど変化しないため、感度に欠けます。例えば、クエン酸バッファーのpH曲線 (Figure 1) は0.5のレンジに収まりますが、浸透圧曲線は約500 mOsm/kg H₂Oに及びます。

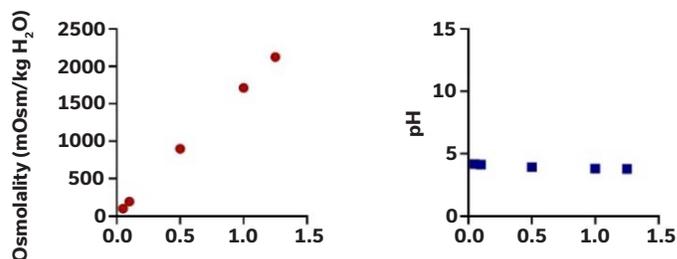


Figure 1. Comparison of osmolality and pH on a citrate buffer concentration curve. The y-axis expands the full pH range to highlight the relatively small change across concentrations of citrate buffer. The sensitivity of the osmometer was much greater than on the pH probe, as shown by the low slope of the pH concentration curve.

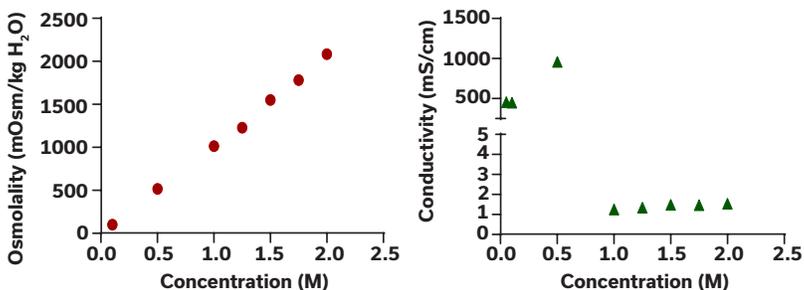


Figure 2. Conductivity of acetic acid, a weakly ionic solution, drops drastically at 1 M concentration and remains constant as the concentration increases.

これはバッファー全体に共通する傾向であり、浸透圧がpH単独よりもダイナミックレンジが広く、感度が高いことを示しています。導電率は、イオン溶液の濃度を知ることができるため、下流でのバッファーや試薬の測定において一般的なものですが、酢酸のような非イオン性溶液や弱イオン性溶液ではあまり信頼できるものではありません。濃度が1Mを超えると、酢酸の導電率は1mS/cm前後にとどまりますが(Figure 2)、こうした影響は浸透圧測定にはまったく現れません。

この研究は、一般的な下流でのバッファーの濃度の尺度としての浸透圧の感度を実証しています。これらのデータは、浸透圧が導電率やpHと直交する貴重なプロパティであることを裏付けるものです。浸透圧は感度が高いため、バッファーの濃度や配合に関する潜在的な問題を検出するのに役立つ理想的な方法です。測定の簡便さと付加価値を考慮すると、下流のワークフローにおける浸透圧試験は、下流のバッファーとプロセスのより完全で包括的な全体像を明らかにするために導入されるべきもの、と考えられます。

References

1. Bratt, Jennifer, et al. Buffers in Biologics Manufacturing. BioProcess International 15.2(2017).
2. Challenger, Cynthia. Behind the Scenes with Buffers. BioPharm International 28.2(2015).
3. Gronemeyer, Petra, et al. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. Bioengineering 1.4(2014).
4. Leveling, Tony. The relationship between pH and Conductivity in a Lithium Contaminated, Deionized Water System. Pbar Note 675: The relationship between pH and Conductivity. Fermilab 2002.
5. West, Jonathan, et al. "PH Measurement." Visual Encyclopedia of Chemical Engineering, University of Michigan College of Engineering, 2018, encyclopedia.che.engin.umich.edu/Pages/ProcessParameters/pHMeasurement/pHMeasurement.html.
6. Manns, Reinhard and Jurgen Schleicher. Information on Conductivity Measurement. JUMO GmbH & Co. KG FAS 624 04.07(2007).

輸入販売元



本 社 大阪府箕面市船場西三丁目10番3号
〒562-0036 TEL 072(730)6790 FAX 072(730)6795
東 京 支 社 神奈川県川崎市中原区新丸子東三丁目1200番地 KDX武蔵小杉ビル
〒211-0004 TEL 044(430)3245 FAX 044(433)4390

<https://www.kiko-tech.co.jp/>

