

# Unagi のご紹介: 完全ハンズフリーのベンチトップ型バッファ交換装置

## はじめに

生物学的製剤や遺伝子治療サンプルのバッファ交換と濃縮は、極めて重要で、多くの場合時間のかかる手作業のプロセスです。タンパク質やmAbの場合、立体構造の安定性、化学的安定性およびコロイドの安定性を保つため、最終的な処方バッファへの効率的な交換が必要です。また、バッファ塩、pH、イオン強度、添加剤および界面活性剤を変化させることで、分子の安定性が増加したり、低下したりすることがあります。

既存のバッファ交換法にはさまざまな制約があり、多くの場合、手作業の時間が必要で、サンプルの回収率は高くありません。自動バッファ交換ソリューションにより、サンプルをより均一に取扱うことができ、手作業の方法では不可能なレベルのプロセスコントロールが可能になります。Unagiは、生体分子サンプルのバッファ交換・濃縮における乖離に対処するために開発されました(図1)。

Unagiは、加圧限外過/透析ろ過(UF/DF)法によりバッファを除去します。交換・濃縮の各サイクル中、各サンプルは穏やかに混合されるので、タンパク質が膜表面に蓄積することはなく、デッドエンドろ過法に比べて流れが均一かつ高速に保たれます。Unagiはバッファ交換プロセスを自動化し、96%以上という高いサンプル回収率を可能にし、手作業の時間を減らします。また、交換後に新しい目標値へのサンプル濃縮も可能です。

Unagiのバッファ交換はカスタマイズが可能で、1回の実験で独自の生体分子サンプルを最大8個、バッファ交換することができます。Unchained Labsは、このプロセスで使用できる専用の使い捨てサンプル容器、Unaを開発しました。Unaには10 kDaの再生セルロース膜が装填されており、バッファ交換プロセス中の60 psiの加圧に耐えられるように設計されています(図2)。1回の処理で、容量0.5-8 mLのUnaにセットされたサンプルを最大8サンプル処理することができます。濃縮を行う場合は48 mLまで処理可能です。

Unagiの自動加圧UF/DFバッファ交換技術は、他では予測不可能なプロセスによってサンプル回収率を最大限に高められるように設計されました(図3)。交換率は、サンプル濃度、処方、容量および温度の関数である溶液の粘度に大



図1: Unagiはベンチトップ型の自動バッファ交換ソリューションです。

きく依存します。異なる濃度のサンプルや処方は異なる速度で交換されることが予想されます。均一な流れを維持するため、処理開始時およびバッファ交換・濃縮サイクルのたびに超音波センサーで各サンプルの量を測定します。この測定値を用いて、除去する量と、次サイクルの前に追加する新しいバッファの量を計算します。各Unaから除去された実際の量をユーザー定義の目標値と比較し、加圧時間を調節してバッファ交換をリアルタイムで最適化します。

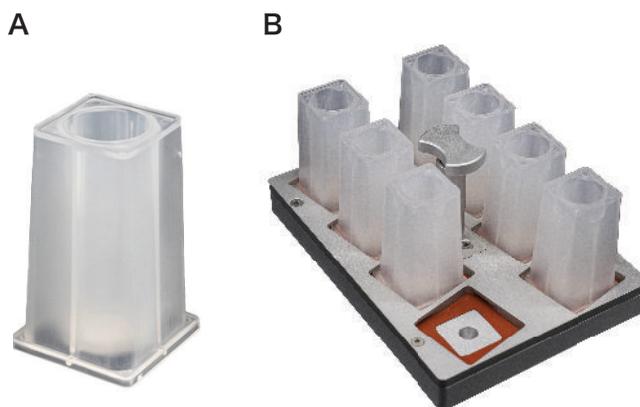


図2: A) Unagiは、最大8個のUna、Unaでサンプルを処理します。Unaの各容量は0.5-8 mLです。(B) Unagiとのサンプルの受渡しに使用するサンプルラックには、1~8個のUnaをセットできます。サンプルラックはUnagiのバッファ交換チャンバーに固定されます。

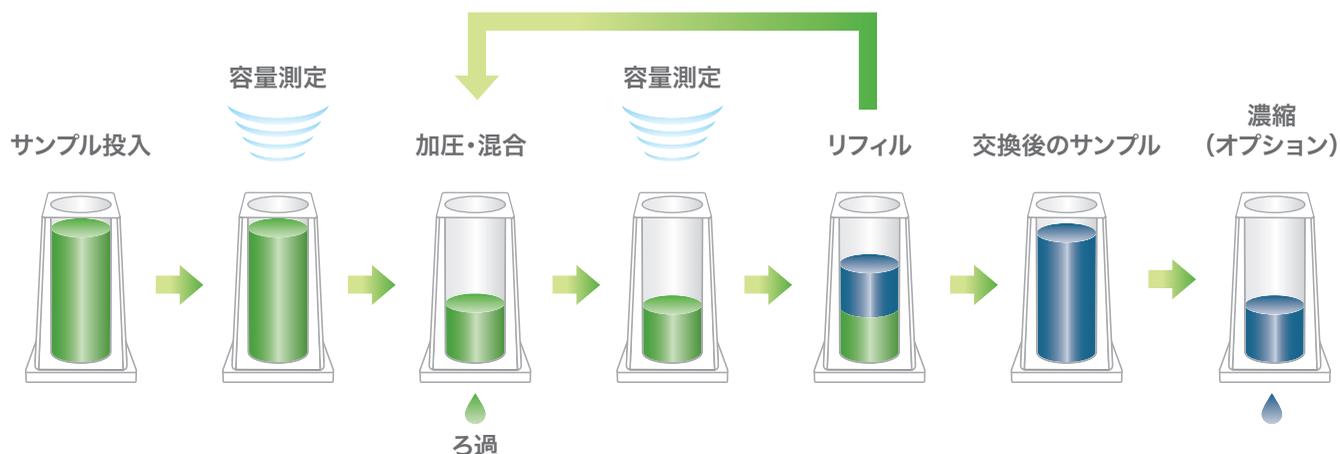


図3: Unagiの自動加圧UF/DF技術は、超音波による各サンプルの容量測定によって流量をモニターし、それに応じて加圧サイクル時間を調節します。

Unagiのサンプル容量測定には、手作業の手法では不可能なレベルのコントロールを可能にするというメリットもあります。1サイクルあたりの交換の程度、すなわちバッファ除去率によって、交換中にタンパク質が過剰濃縮されないようにし、他の凝集イベントを引き起こしかねない処方急激な変化を防ぐことができます。ユーザーは、自身のアプリケーションニーズに基づいて交換レベルをコントロールできます。タンパク質濃度が低い場合、または類似のバッファに交換する場合は、1サイクルあたりの除去率を高く設定して交換をより早く完了させることができます。タンパク質濃度が高い場合、凝集しやすいタンパク質の場合、または処方が大きく変化する場合は、より低い除去率を用いることができます。これにより交換時間は長くなりますが、高品質のタンパク質とプロセス終了時の回収を保証することができます。

また、Unagiは手作業の時間を自動化し、最小限に抑えます。処理前に、交換したいタンパク質をUnagiに満たして交換チャンバーにセットし、新しいバッファをFalconチューブに入れてバッファラックにセットします。処理中、Unagiはる過と容量測定と新たなバッファ添加を交互に行います(図3)。

Unagiには、より大容量のサンプル濃縮のためにサンプルを減量するアプリケーションがあります(図4)。この濃縮アプリケーションでは、最大48 mLのサンプルを8 mLまで濃縮することができ、その次の濃縮実験では0.5 mLの最終容量まで濃縮することができます。開始時のサンプル量が8 mLを超える場合は、サンプルをFalconチューブに入れてUnagiのデッキ上のバッファラックにセットします。同じUF/DF技術を用いて最大8サンプルを並行して濃縮します

が、サンプル損失に対する保証は周期的な容量測定の場合と同じです。

本アプリケーションノートでは、Unagiの概念実証実験を行い、手作業の方法では不可能なレベルの正確な目標値および回収率値までバッファ交換とサンプル濃縮を行えることを示しました。

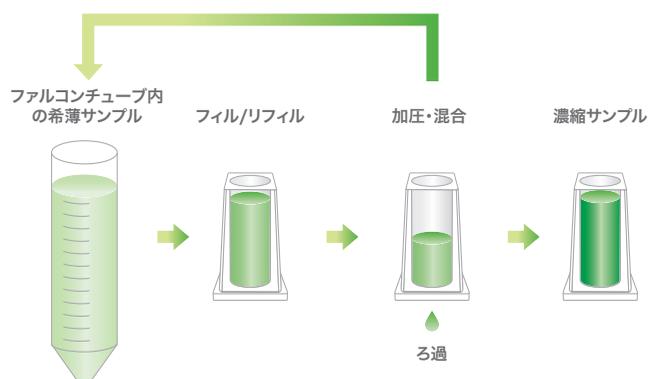


図4: Unagiのサンプル減量アプリケーションは、デッキ上のFalconチューブを用いて、1回の処理で最大48 mLの高容量サンプルを8 mLまで濃縮します

## 方法

### タンパク質およびバッファの調製

pH 6.8のPBSを用いて、ヒトIgG(hIgG)を10または100 mg/mLの名目濃度に調製しました。各バッファ交換を開始する前に、タンパク質を10 kDaのUnaに手作業でピペティングしました。タンパク質をpH 6.8のPBSにバッファ交換しました。

### タンパク質濃度

Lunaticを用いて、バッファ交換前後の全サンプルの濃度を分析しました。LunaticのA280アプリケーションで、hIgGに特異的なE1%を用いてタンパク質濃度を測定しました。各Unaの最終濃度を測定し、全Unaの平均濃度±標準偏差として報告しました。

### バッファ交換機能

Unagiでは、全交換率を99%まで設定することができます。本アプリケーションノートでは、すべての実験で交換率を全体で96%に設定しました。Unagiでは、1サイクルあたりの容量除去率を選択することができます。すべての実験で、1サイクルあたり66%の除去率を使用しました。

バッファ交換法のその他の設定については、それぞれの実験で説明します。実験の設計と実行にはUnagiのソフトウェアを用いました。結果を記録し、さらなる濃度分析はオフラインで行いました。

## 結果

### バッファ交換

hIgG原液(10.5 mg/mL)をpH 6.8のPBSにバッファ交換し、そのうち4 mLを各Unaに手作業で移しました。1サイクル約20分の3サイクルで、それぞれの目標交換率である96%に達しました。平均交換率は96.5%でした(表1)。Unaで8つのタンパク質を1種類のバッファに交換するために要した総処理時間は2.3時間でした。

1ウェルあたりの最終充填量は、開始時の1ウェルあたりの充填量とほぼ同じ4.04±0.03 mLで、一貫性が認められ、1容器あたりの開始時の充填量と最終的な充填量との間に大きな差は認められませんでした。バッファ交換後の各Una中の各サンプルの平均濃度は53.4±1.0 mg/mLでした(表1)。

### バッファ交換と8倍濃縮

この実験では、タンパク質をバッファ交換し、その後8倍に濃縮しました。hIgG原液(9.9 mg/mL)をpH 6.8のPBSにバッファ交換し、そのうち8 mLを各Unaに手作業で移しました。1サイクル約16分の4サイクルで目標交換率である96%に達しました。各サイクルの時間は自動調整され、1サイクルあたりの平均除去量は、1サイクルあたりの目標交換率である約66%とほぼ同じでした。各Una中のサンプルの平均交換率は97.5%でした(表2)。

目標最終濃度を79.2 mg/mLとし、バッファ交換後にヒトIgGを8倍濃縮しました。バッファ交換後、タンパク質を79.2 mg/mLの目標値まで濃縮するためには1回の濃縮サイクルが必要でした。濃縮サイクルの時間は約1分でした。

全サンプルの最終平均濃度は79.3±1.6 mg/mLで、目標値をわずかに上回っていました。8倍濃縮ステップのため、1ウェルあたりの最終充填量は1 mLを目標としまし

変数	開始時	最終目標値	最終実測値
濃度 (mg/mL)	52.3	52.3	53.4 ± 1.0
容器充填量 (mL)	4.0	4.0	4.04 ± 0.03
交換率	-	>96	96.5 ± 0.5
回収率	-	-	96.2 ± 0.5

表1: UnagiでヒトIgGを1容器あたり4 mLとしてPBSにバッファ交換しました。

変数	開始時	最終目標値	最終実測値
濃度 (mg/mL)	9.9	79.2	79.3 ± 1.6
容器充填量 (mL)	8,000	1,000	989.3 ± 10.8
交換率	-	>96	97.5 ± 0.2
回収率	-	-	96.7 ± 0.7

表2: UnagiでヒトIgGを1容器あたり8 mLとしてPBSにバッファー交換し、濃縮しました。

た。1容器あたりの最終充填量は989.3±10.8  $\mu$ Lで目標値とほぼ同じでした(表2)。

8個のサンプルを1種類のバッファーに交換し、その後Unagiで8倍濃縮ステップを行った場合の総処理時間は3.3時間でした。

## サンプル減量

サンプル減量は、サンプルを濃縮するという意味では濃縮アプリケーションと同じですが、最大48 mLという、より高容量のサンプルから開始できる機能が追加されています。

hIgG原液(0.25 mg/mL)を6倍濃縮しました(表3)。そのうち8 mLを各Unaに手作業で移し、追加の40 mLをFalconチューブに移しました。6倍の目標濃縮倍率は、目標最終濃度である1.47 mg/mLから決定しました。

1ウェルあたりの最終充填量は8.15±0.02 mLで目標値とほぼ同じでした。サンプルを減量した後のUna中のサンプルの平均実測濃度は1.4±0.01 mg/mLと目標通りで、サンプル回収率は95.5±0.4%でした(表3)。

## 結論

Unagiは1回の実験で0.5-8 mLのサンプルを最大8個、自動でバッファー交換することができます。

Unagiは、最小限の手作業の時間で自動バッファー交換を行うことができ、オプションでサンプル濃縮を並行して、または別途処理することができます。望ましい交換率、1サイクルあたりの除去量、バッファー交換法および最終濃度をユーザーが選択できますので、柔軟なバッファー交換手順が可能です。濃度、サンプル量、交換率といった開始時および最終的なタンパク質の条件は、ここに示した3つの実験すべてにおいて、10 kDaのUna全体を通じて一貫性を示しました。

変数	開始時	最終目標値	最終実測値
濃度(mg/mL)	0.25	1.47	1.4 ± 0.01
容器充填量(mL)	48	8	8.15 ± 0.02
回収率	-	-	95.5 ± 0.4

表3: Unagiのサンプル減量アプリケーションを用いて48 mLのヒトIgGを6倍濃縮しました。



Unchained Labs  
6870 Koll Center Parkway  
Pleasanton, CA 94566  
Phone: 1.925.587.9800  
Toll-free: 1.800.815.6384  
Email: [info@unchainedlabs.com](mailto:info@unchainedlabs.com)

© 2022 Unchained Labs. All rights reserved. Unagi is Unchained Labs  
の商標であり、Unchained LabsはUnchained Labsの登録商標で  
す。掲載されているその他すべてのブランドや製品名は、各社が  
所有する商標です。

Rev B