

## Techniques de mesures spectrales en lignes pour l'analyse des protéines

F. Chauchard  
fchauchard@indatech.eu



Polypeptides

Folding

Antigène

STEAK ??

Proteines  
recombinants

Collagènes

Expression  
génétique

Enzymes

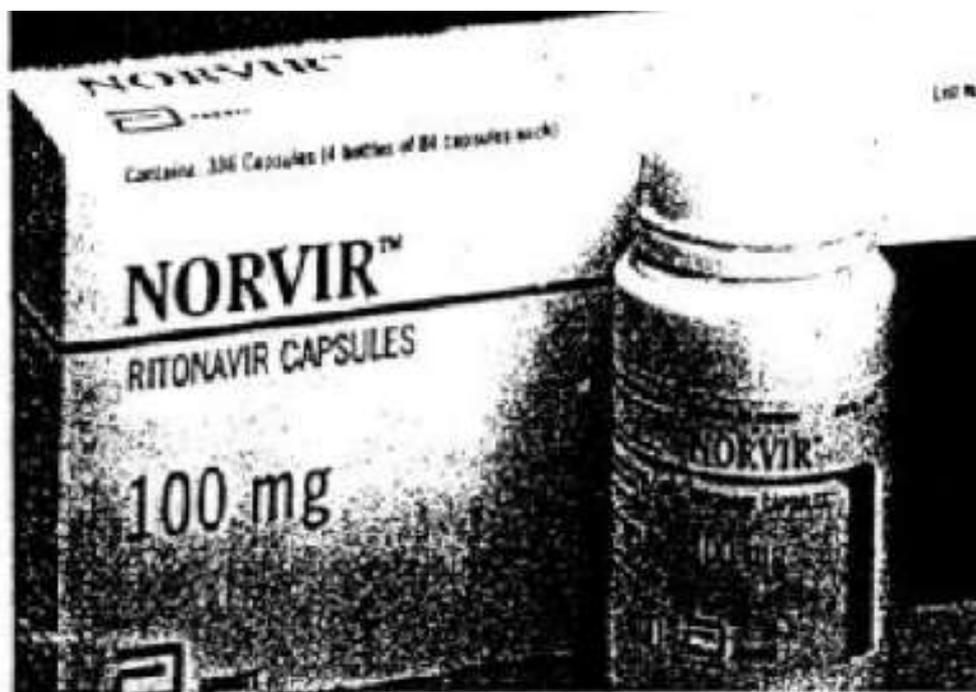
Signalisation  
cellulaire

Anticorps



## Intérêt de la mesure in situ

Capsules of Abbott Laboratories' protease inhibitor Norvir (ritonavir) are likely to become unavailable by the middle of August. The company has a problem with the manufacture of the anti-HIV capsules which it cannot resolve at present.



*Capsules unlikely to be available from mid-August*

The problem relates to "undesirable" crystal formation. Abbott says that a series of recent production batches of Norvir capsules failed the approved test for dissolution, and were not released for marketing. Investigation of the reason for the failure showed the presence of a new crystalline form of ritonavir which affects the way it dissolves, and possibly its absorption. Retained sam-

ples from a number of marketed batches of capsules were examined and there was no evidence of the unwanted crystalline form.

Mr Mark Haywood (managing director, Abbott Laboratories) said that teams were working round the clock to try to resolve the issue, but at present the company had no idea why the problem was occurring.

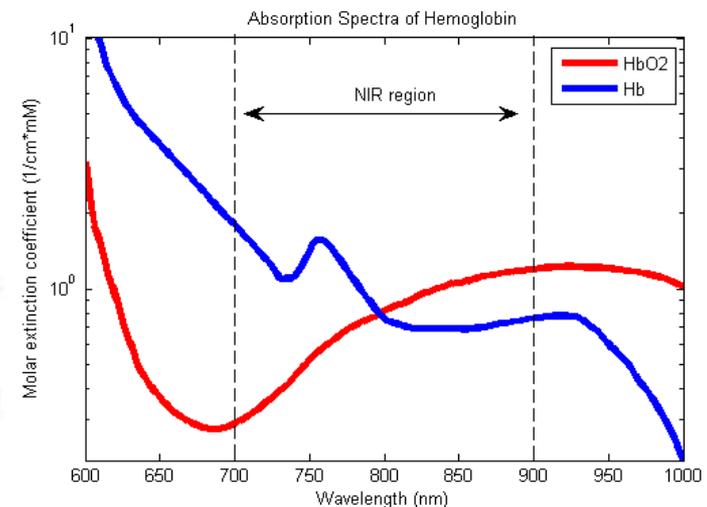
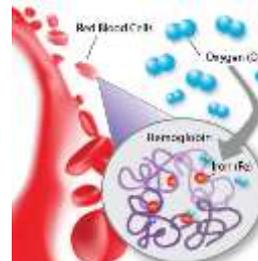
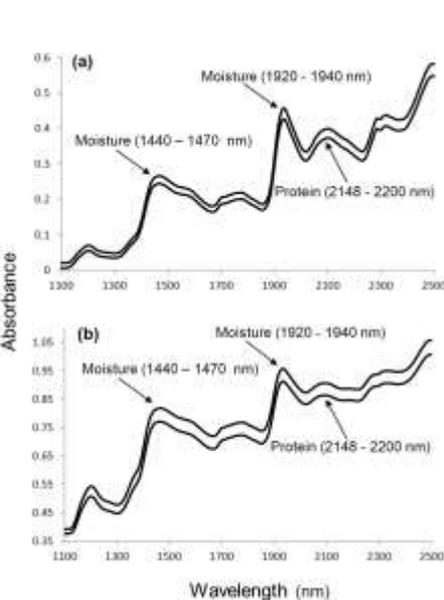
# Augmenter la maîtrise et la compréhension

- **Qbd** = concevoir et développer la production pendant la phase de développement afin d'assurer de manière stable la qualité finale des produits." ICH Q10, FDA 2006 > expérimentations / compréhension / analyse
- **PAT** : Analyser et contrôler la fabrication, Faire des mesures régulières dans le temps, déterminer les paramètres critiques pour la performance et la qualité  
Caractériser les matières premières et les matières en cours de transformation, Caractériser le procédé
- > **Techniques d'analyse at-line et online** sont un pilier du **PAT**

## La mesure en ligne des protéines par technique spectroscopique

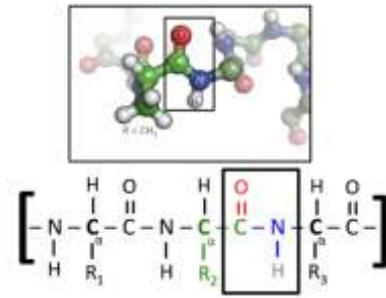
# Rappel des différentes technologie pour l'analyse de solutions avec des protéines

- Les protéines présentent de fortes interactions avec la lumière
- Ex Visible > hémoglobine Oxygénée/ désoxygénée
- Dans le NIR > système d'analyse du lait ou des graines de soja
- Dans l'UV > analyse sur chromatogramme



# Protéines

- Des structures très variables et complexes



- Liaisons Peptidiques -CO-NH-
- Rn résidus des chaines latérales d'acides aminés
- Parfois structure avec fluorescence

- Des formes différentes qui vont jouer sur l'interaction lumière matière:

- Liquides (clair /turbides)
- Tissus Structurés (ex protéines fibraires, collagène, etc..)
- Solides (ex : Lyophilisats)

La mesure in-situe demande de mesurer le produit sans le modifier il va donc falloir prendre en compte les deux points !

## Culture Cellulaire, Fermentation, animaux transgénique



Extraction (cassage cellulaire, lyse..)



Séparation et précipitation



Concentration/ stabilisation



Purification



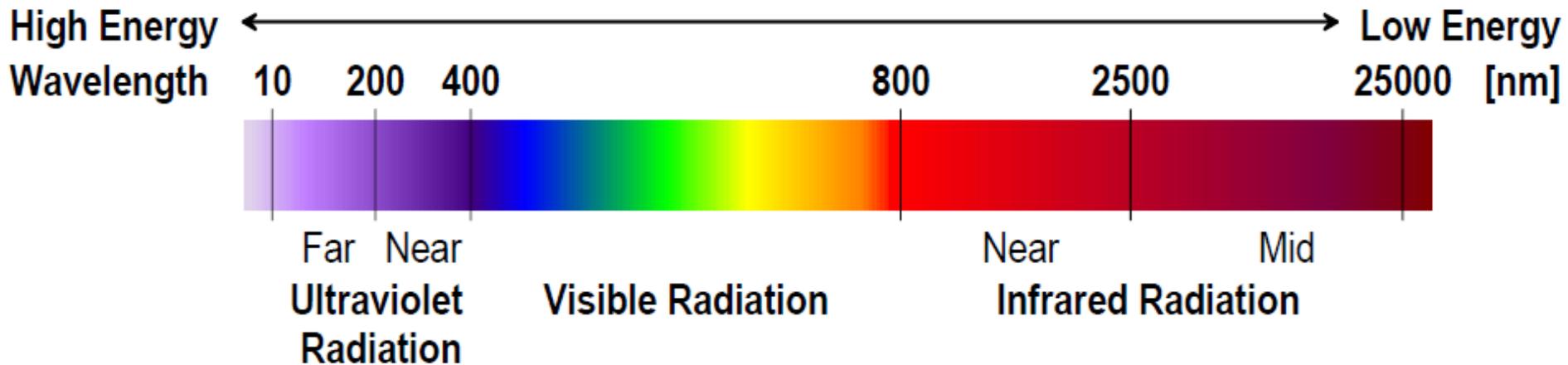
Polissage



Lyophilisation  
Injectable

<u>Aspect</u>	<u>Remarque</u>
turbide	(turbidité = Information)
turbide	(risque de fluorescence)
Clair	
Clair	(Sensibilité haute)
Clair	(Sensibilité très haute)
Réfléchissant Clair Turbide	(R. = information)

## Exemples des technologies et de mise en œuvre



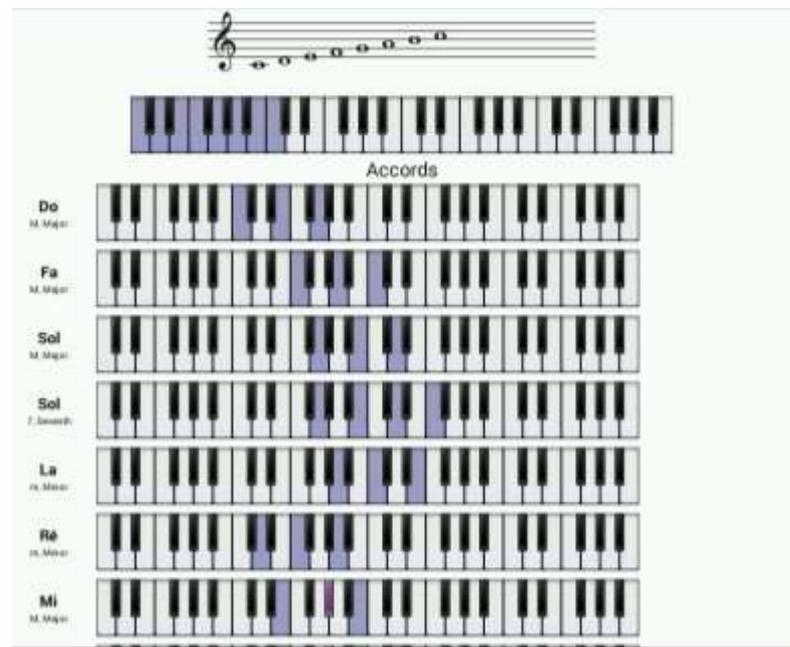
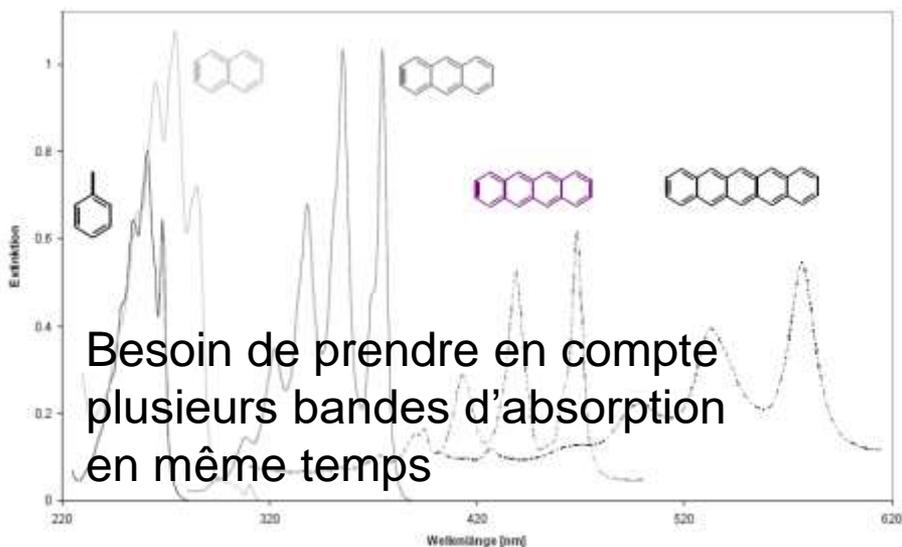
Fluorescence	UV / Vis - sNIR	NIR / MIR	Raman
Excitation / Absorption: $\lambda \approx 200 - 600 \text{ nm}$ Fluorescence: $\lambda \approx 200 - 900 \text{ nm}$	$\lambda = 200 - 400 \text{ nm}$ (UV) $\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$ (Vis) $\lambda = 700 - 1100 \text{ nm}$ (NIR)	MIR: $\lambda = 2500 - 25000 \text{ nm}$ $\tilde{\nu} = 4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ NIR: $\lambda = 1000 - 2500 \text{ nm}$ $\tilde{\nu} = 10000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_0 = 633 \text{ nm}$ $\Leftrightarrow \lambda = 633 - 813 \text{ nm}$ $\Delta\tilde{\nu} = 3500 - 0 \text{ cm}^{-1}$
Excitation of Electrons	Excitation of Electrons (UV / Vis) and Overtones (NIR)	Excitation of Vibrations, Rotations and Overtones	Excitation of Vibrations Complementary to MIR

Si-Technology InGas and MCT-Technology

Reutlingen University©



Ma grand mère me disait  
que la spectroscopie était  
comme un joli morceau de  
piano



# UV pour le suivi de Purification ou remplissage

- Maximum 3 mètres de fibres optiques
- Optique spécifique résistant à l'UV
- Trajet optique faible car forte absorption
- Eviter la zone 200-240nm qui évolue dans le temps à cause de la solarisation des fibres



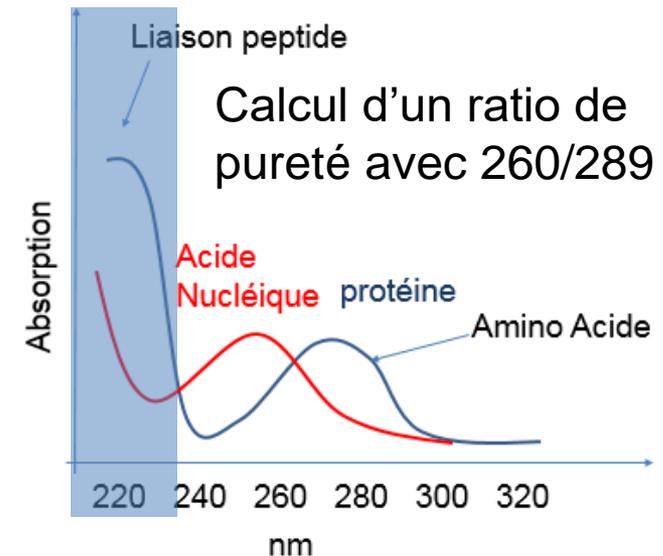
Spectromètre UV-Vis  
Indatech 200-1000nm



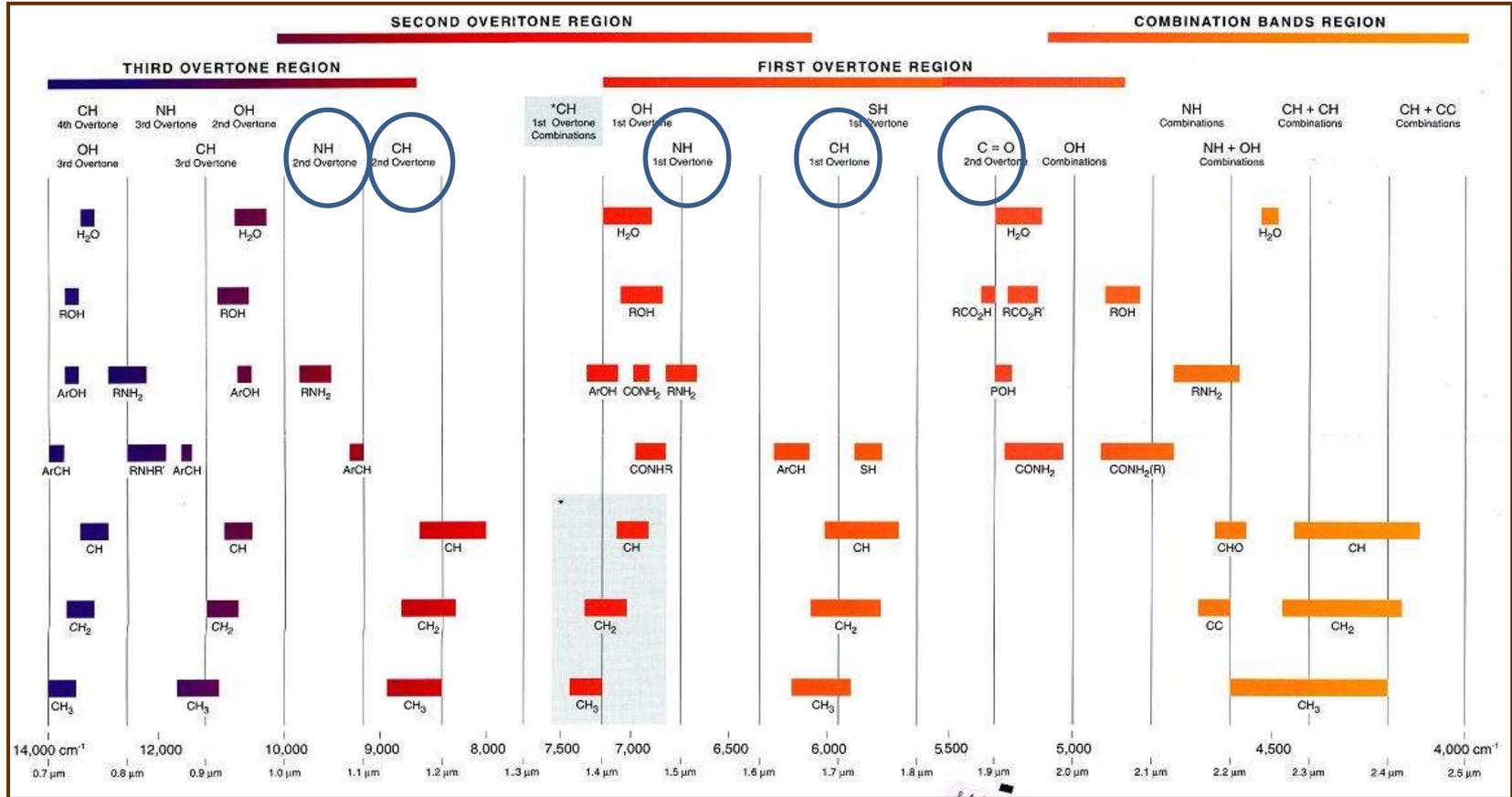
En flux sur faible diamètre :  
1/8 flow cell (Hellma)  
1mm trajet optique



Dans un contenant :  
technique cristal ATR



# Bande d'absorption VIS NIR

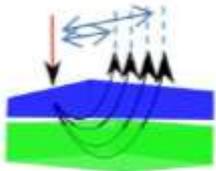


Central Queensland University

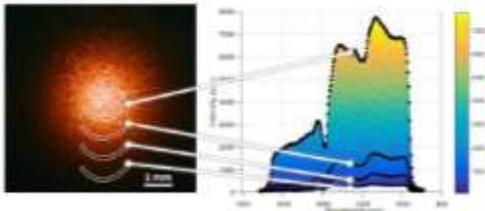
# Technique de mesure spectrale multipoint SRS Sam-spec®



## ▪ Spatially Resolved Spectroscopy



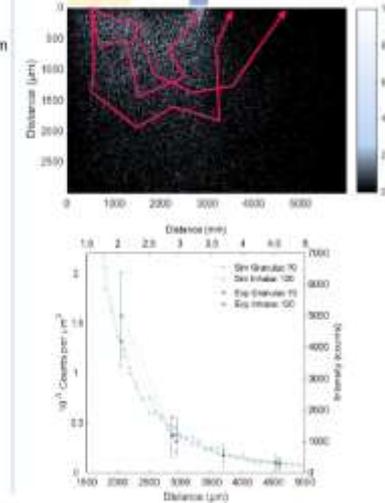
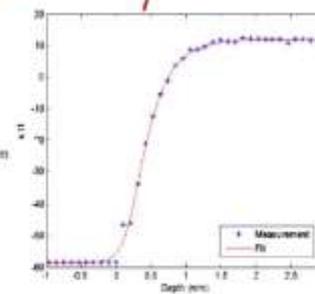
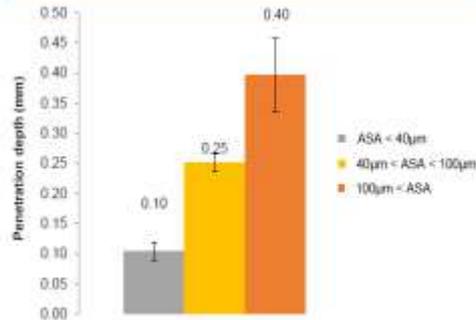
<http://www.indatech.eu/en/products/probes/sam-spec.html>



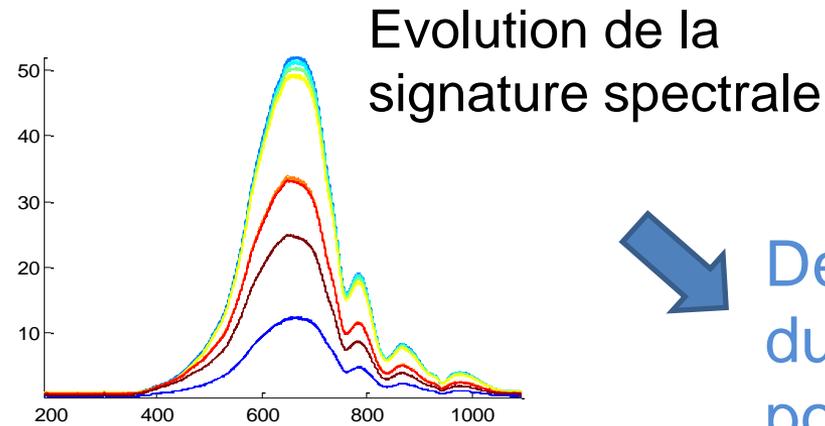
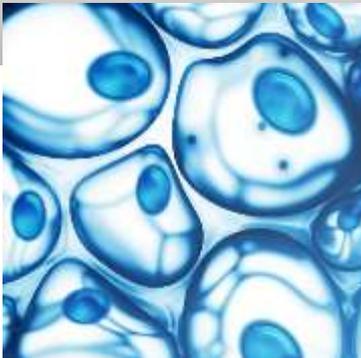
- Penetration depth is dependent on the sample and the sampling geometry.
- There is no single „depth“, in reflection the signal is coming with exponential contribution from the layers.



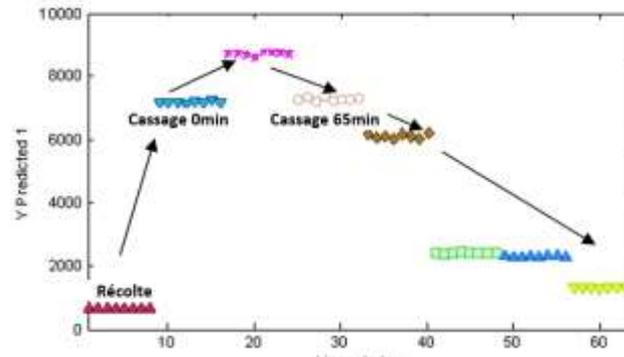
3.1mm



- Cassage Cellulaire : l'évolution du signal aux différentes positions permet de voir le changement physique (turbidité) en plus du spectre au cours du procédé



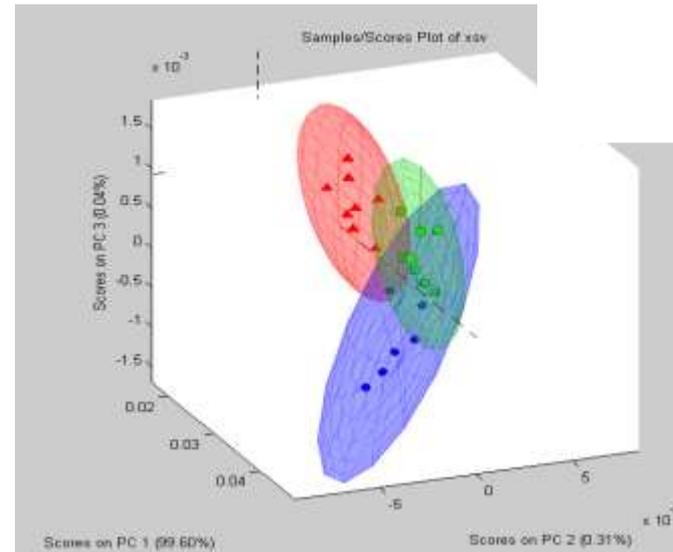
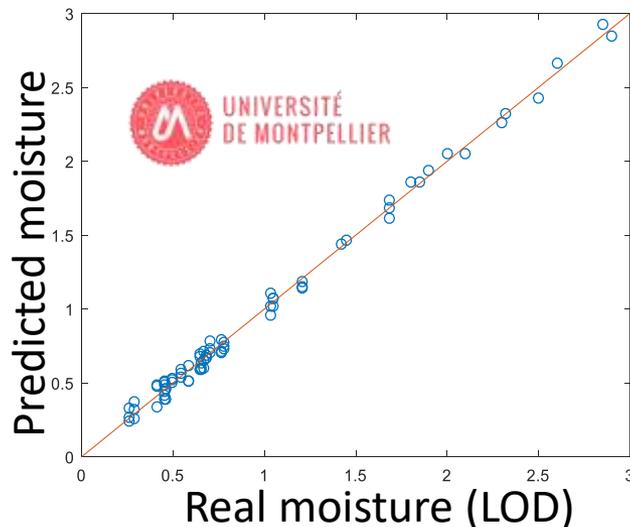
→ Décision de fin du process pour optimiser la qualité



Evolution de la turbidité

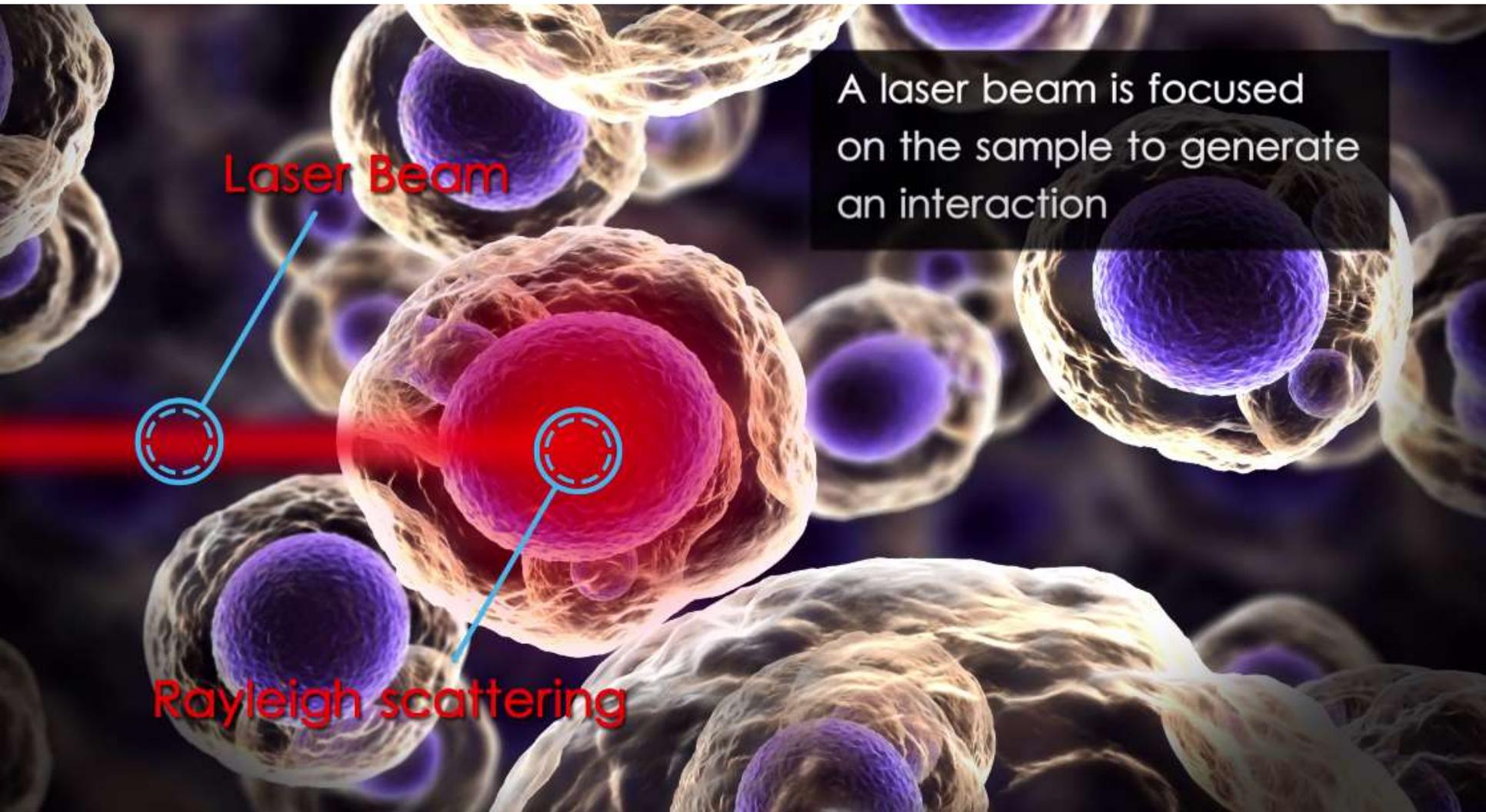
## Analyse de Lyophilisat par technique SRS NIR

- Evaluation de la structure du cake et de la concentration en eau (stabilité des protéines dans le temps)
- SRS : l'échantillon est mesuré en plusieurs zone pour évaluer ses propriétés (3ms de temps de mesure)
- Analyse de la qualité des protéines (dégradation ?)
  - Erreur de prédiction <math><0.1\%</math> sur la plage 0.2-3%



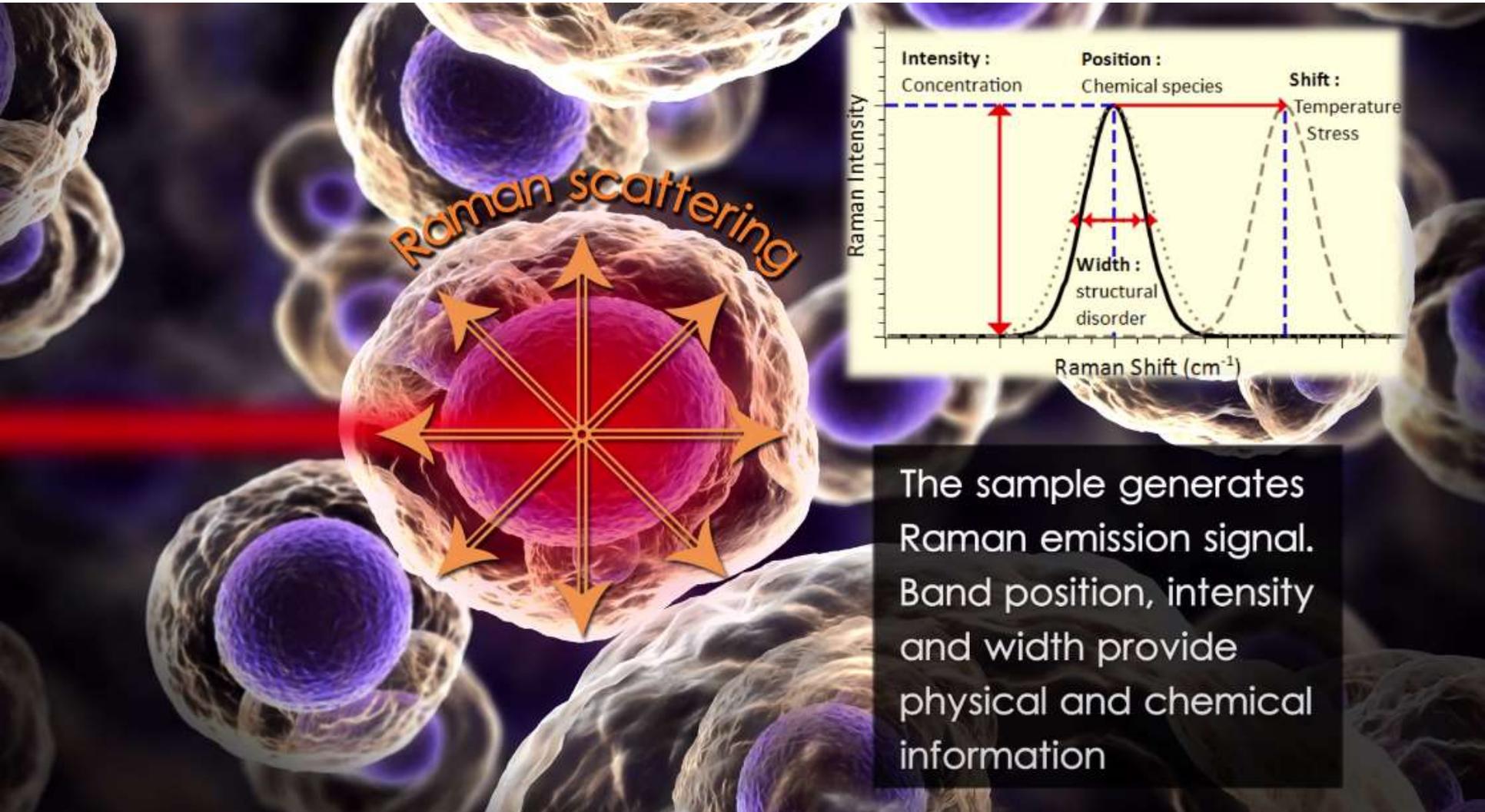
Différentes densité de cake peuvent être détectée + changement de nature des protéines  
 Vert = bon  
 Rouge : dénaturation  
 Bleu cake non conforme

# La spectroscopie raman



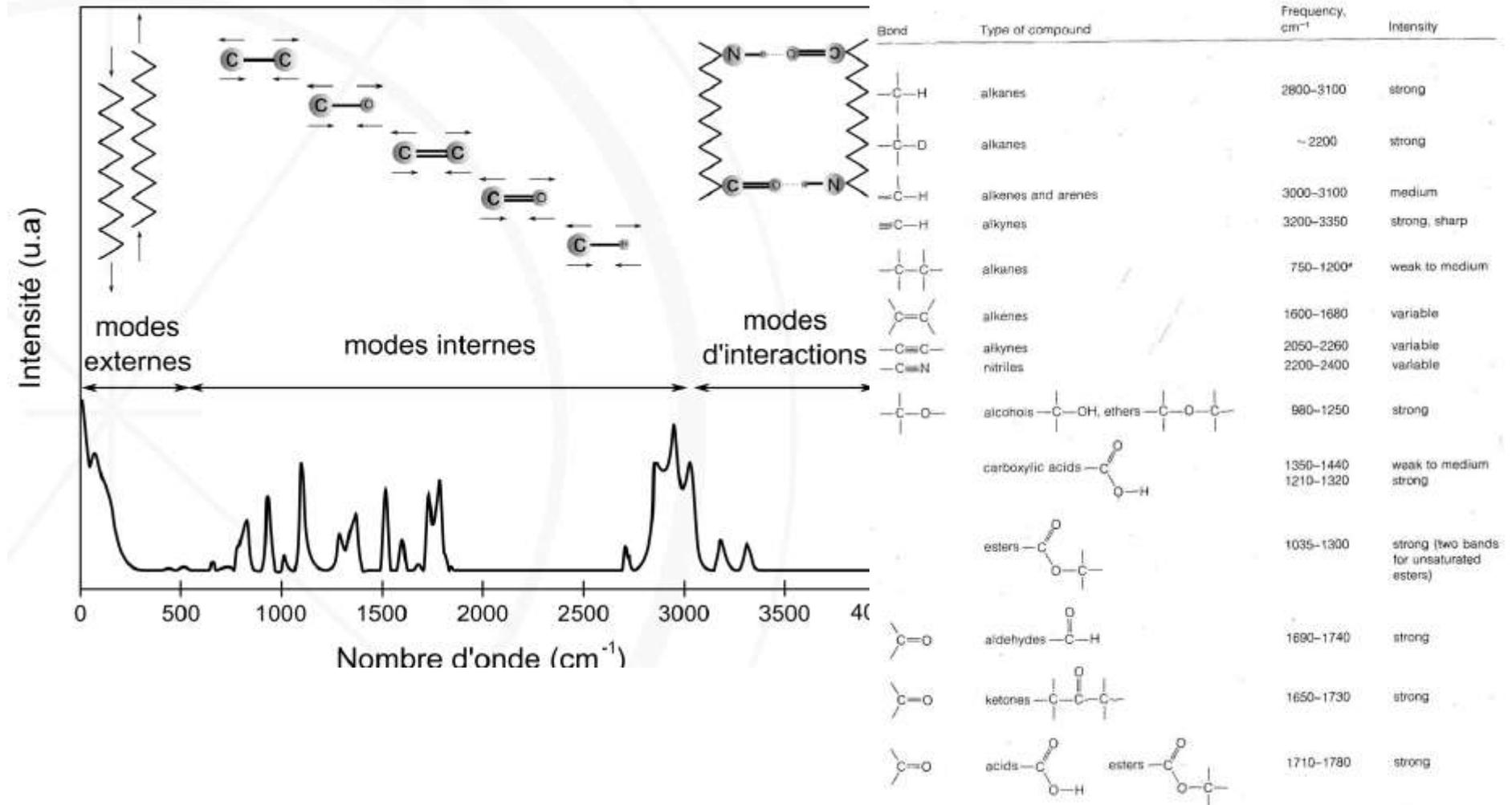
Vidéo explicative sur <https://www.youtube.com/watch?v=dJUsGWZyEys>

# La spectroscopie raman



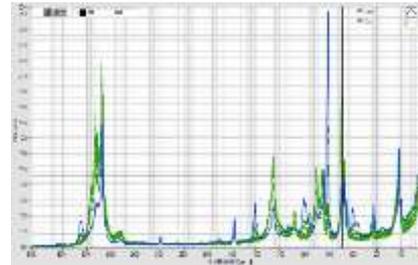
Vidéo explicative sur <https://www.youtube.com/watch?v=dJUsGWZyEys>

# Signature spectrale des groupes

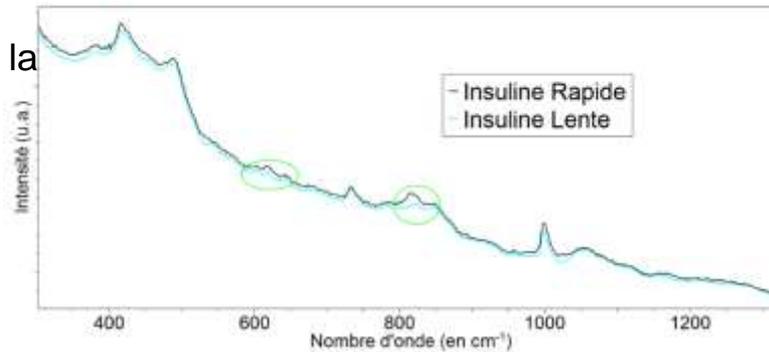


# La spectroscopie raman

Systeme Raman  
Viserion<sup>®</sup>, Indatech



Le raman fournit des informations sur la structure de la molécule et sa composition (Asparte versus gIARGine)



Calcul de la concentration en enzymes sur des détergents



INDATECH

Conclusion

- La diversité des protéines est immense aussi bien du point de vue chimique que structurel. L'étude in-situ et non-destructive requiert donc l'utilisation de différentes méthodes suivant les cas.
- Le gain de la mesure en ligne est parfois énorme (surtout sur des produits à très fortes valeur ajoutée ou avec de grands volumes)
- La mise en œuvre doit prendre en compte :
  - La réponse spécifique de la/ des protéines
  - La réponse du milieu dans le quel se trouve la protéine
  - L'environnement de production
  - La sensibilité nécessaire
  - La facilité à construire la base d'apprentissage

Merci pour votre attention !  
Question ?

