



BioTech



Pharma

## Contrôle en ligne de la production de protéines à l'aide de techniques avancées de mesure spectroscopique UV-Vis



### ■ Introduction

La spectroscopie UV-visible (UV-Vis) est un outil indispensable en biotechnologie, particulièrement essentielle pour le contrôle des différentes étapes des procédés en *downstream*, notamment pour la quantification de produits tels que les protéines ou les oligonucléotides présents à diverses concentrations dans différents milieux.

Sa polyvalence permet une large gamme d'applications, allant des solutions très concentrées aux solutions plus diluées. Fréquemment mentionnée dans les monographies de la Pharmacopée pour le contrôle de la qualité de nombreux produits, la spectroscopie UV-Vis est conforme aux normes et aux bonnes pratiques rigoureusement décrites dans l'USP 857.

Malgré son immense potentiel, cette technique requiert une optimisation et une personnalisation précises. Un aspect crucial de ce processus est le choix de la méthode de mesure la plus adaptée, en particulier pour l'analyse en ligne.





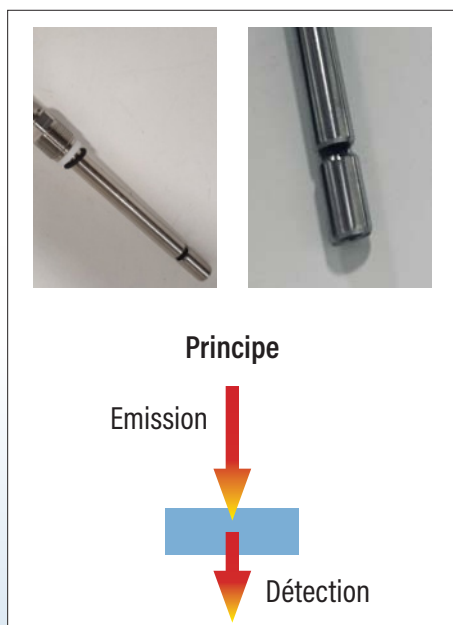
## ▪ Mesure en ligne de la concentration de protéines à l'aide de sondes

### 1-Sonde en Transmission/Transflexion

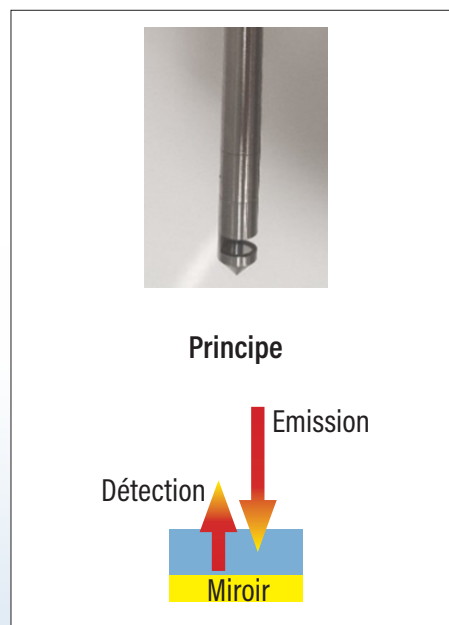
Les sondes en transmission et en transflexion fonctionnent selon des principes différents. Une sonde en transmission dirige un faisceau lumineux à travers un échantillon, mesurant la quantité de lumière qui passe à travers et émerge de l'autre côté. Cette méthode est efficace pour les échantillons transparents ou translucides, permettant une détermination précise de l'absorbance et de la concentration en fonction de la quantité de lumière absorbée par l'échantillon.

En revanche, une sonde en transflexion dirige également la lumière à travers l'échantillon initialement, mais inclut une surface réfléchissante à l'extrémité de la sonde. Cette surface redirige une partie de la lumière transmise à travers l'échantillon, augmentant la longueur du trajet optique et améliorant la sensibilité de la détection. Ce design est particulièrement utile pour les échantillons opaques ou fortement diffusants, où les mesures de transmission directe peuvent être moins efficaces.

Sonde en transmission



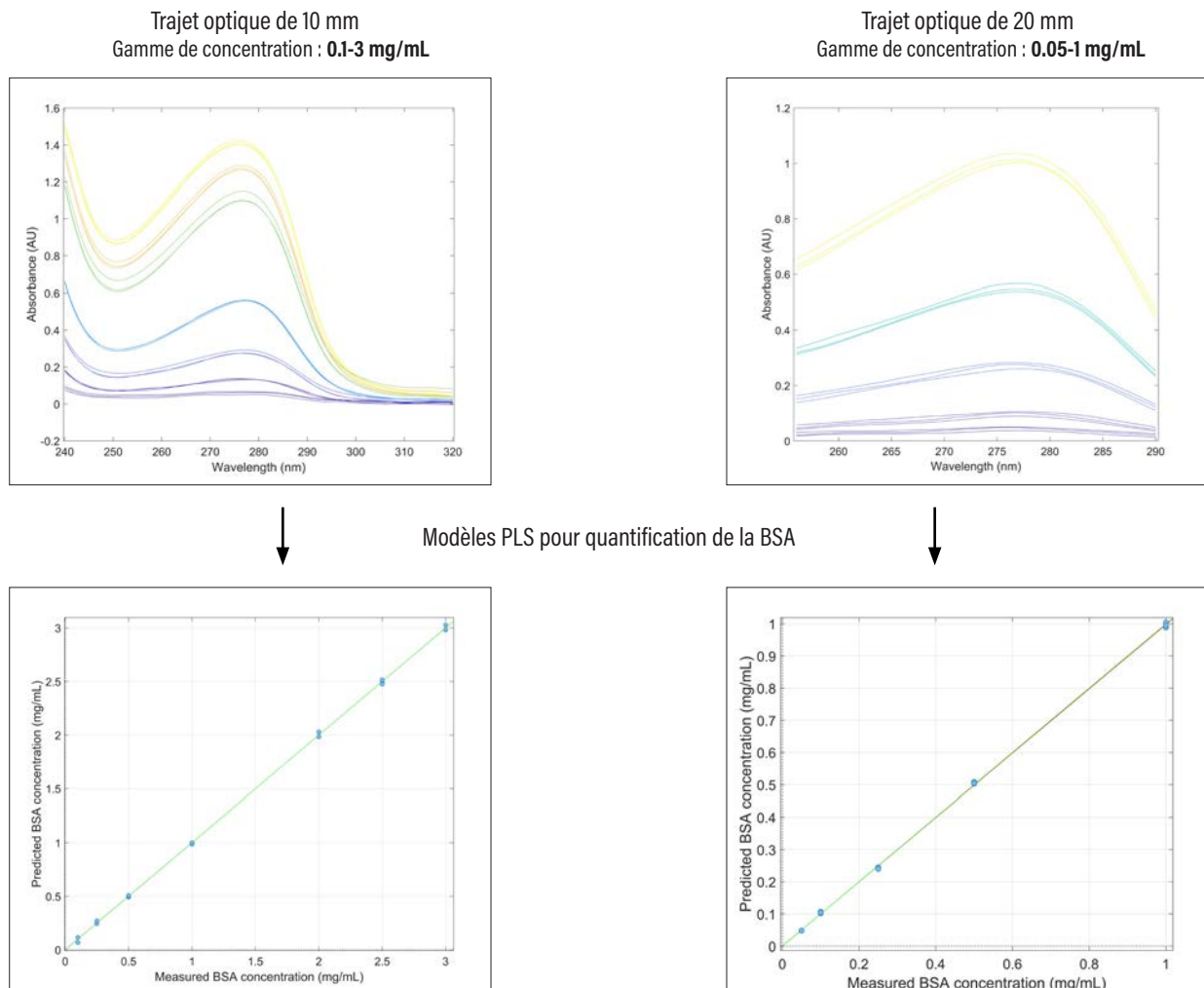
Sonde en transflexion



Pour les solutions à concentration standard préparées dans des cuves ou des réacteurs, les sondes de mesure en transmission ou par transflexion sont privilégiées en raison de leur précision, robustesse et flexibilité. La possibilité d'ajuster la longueur du trajet optique de ces sondes permet une adaptation à différentes gammes de concentrations, offrant une flexibilité appréciable dans les applications biotechnologiques.

## Case study 1 : quantification de la BSA

Des échantillons d'albumine de sérum bovin (BSA) ont été préparés à diverses concentrations allant de 0.05 mg/mL à 3 mg/mL et ont été mesurés à l'aide d'une sonde en transflexion avec deux trajets optiques de 10 mm et 20 mm. Ensuite, un modèle de quantification PLS (*Partial Least Squares*) a été construit pour chaque trajet optique utilisé.



## Case study 2: Suivi de l'agrégation des protéines IgG

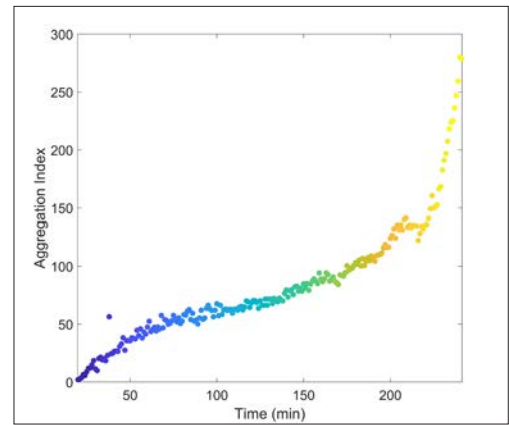
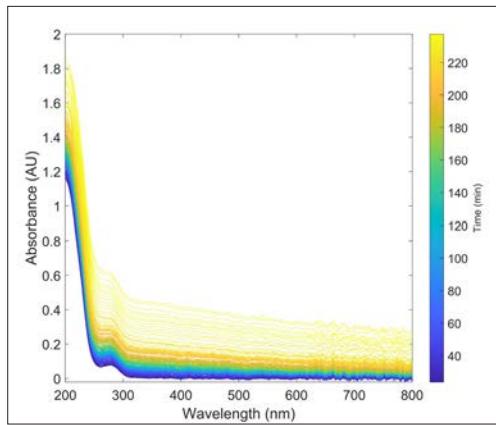
Afin d'assurer la stabilité et la sécurité des biomédicaments, il est essentiel de produire les protéines sous leur forme native. L'agrégation des protéines constitue donc l'un des paramètres les plus importants à maîtriser lors des procédés. La mesure en ligne est un outil indispensable pour détecter les conditions susceptibles de favoriser cette agrégation.

Dans le cadre de cette étude, nous suivons l'évolution d'une solution d'immunoglobuline G (IgG) à une concentration de 0.5 mg/mL sur une période de 3 heures et 40 minutes, en augmentant la température de 5 °C toutes les 15 minutes jusqu'à 75 °C.

Les spectres ont été acquis avec une sonde en transflexion équipée d'un trajet optique de 2 mm.

L'indice d'agrégation (AI) est calculé à partir des spectres d'absorbance en utilisant la formule :

$$AI = \left( \frac{A_{350}}{A_{280} - A_{350}} \right) \times 100$$



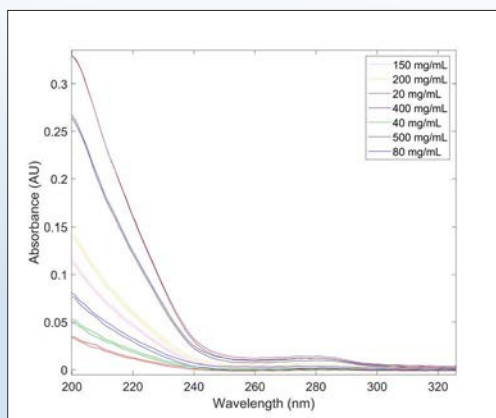
Cet indice est un indicateur semi-quantitatif du taux d'agrégation des protéines. Un indice d'agrégation inférieur à 10, comme au début de l'expérience, correspond à des solutions avec un nombre insignifiant d'agrégats. En fonction du stress thermique induit, on observe ensuite une augmentation de l'indice d'agrégation, indiquant la formation des agrégats.

## 2- Sonde ATR (Réflectance Totale Atténuée)

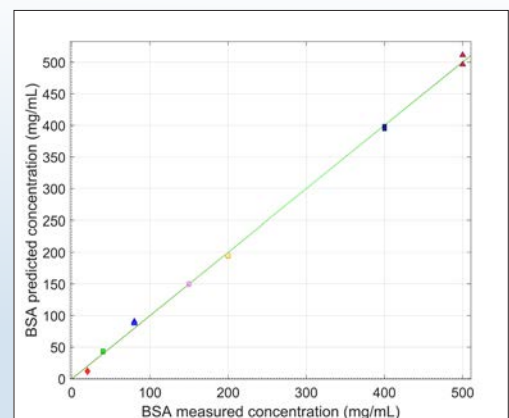
Les milieux hautement concentrés sont critiques pour plusieurs raisons. La préoccupation principale est le coût élevé par volume, rendant la valeur du produit significative. De plus, les milieux concentrés peuvent générer des agrégats, une cristallisation ou une instabilité. Dans la gamme UV, ces milieux présentent une très forte absorbance, et une configuration de transmission standard ne parvient généralement pas à fournir des informations de concentration précises. Une bonne solution consiste à utiliser des sondes ATR (*Attenuated Total Reflectance*).

Le principe de mesure de l'ATR repose sur l'utilisation d'un cristal à haut indice de réfraction, placé en contact avec l'échantillon. Lorsque la lumière traverse le cristal et atteint la surface de contact, elle subit une réflexion interne totale. Une petite partie de cette lumière pénètre légèrement dans l'échantillon, appelée «onde évanescente», interagissant avec celui-ci.

Ces sondes peuvent mesurer une longueur de chemin optique de seulement quelques microns grâce à la pénétration de la lumière évanescente au point de réflexion. Un exemple de ceci est montré ci-dessous pour des concentrations élevées de BSA (20 mg/mL à 500 mg/mL).



Modèle PLS



# Mesure en ligne de la concentration de protéines à l'aide d'une cellule de flux

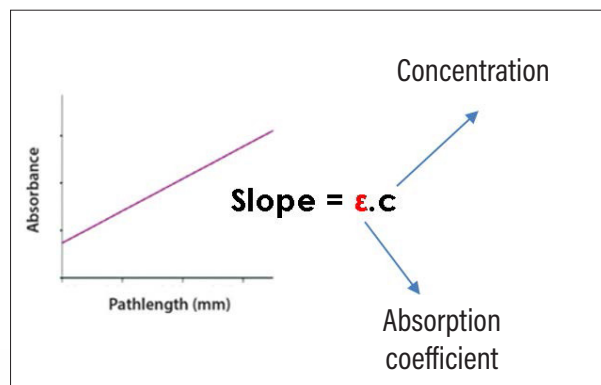
Dans les procédés nécessitant des mesures en flux continu, l'utilisation d'une cellule de flux au lieu de sondes traditionnelles est une solution efficace. Ces cellules de flux ont des longueurs de trajet optique ajustables pour optimiser le rapport signal/bruit et pour fournir de la flexibilité par rapport à la gamme de concentrations à analyser, garantissant ainsi des mesures fiables même dans des environnements dynamiques. Pour la validation du nettoyage, une plus grande longueur de trajet optique est bénéfique pour atteindre des niveaux de détection en ppm pour les protéines ou les agents de nettoyage. Dans certaines applications, plusieurs longueurs de trajet optique (*Multi-path length ou MPL*) peuvent être combinées, comme en spectroscopie de pente (*slope spectroscopy*) ou dans des procédés avec de grandes variations de concentration.



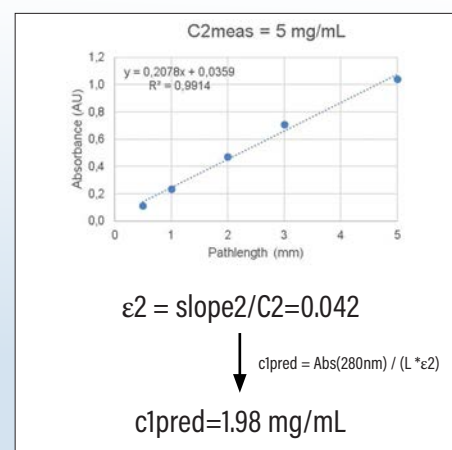
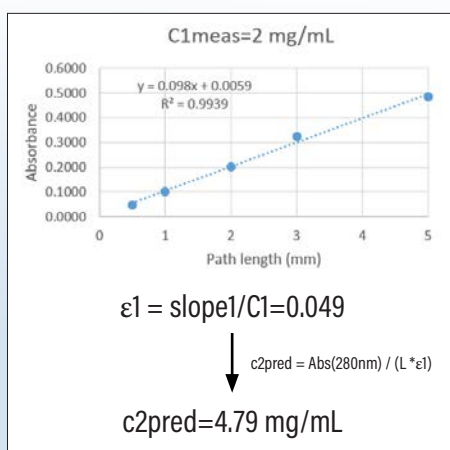
Pour générer des mesures robustes conformes aux directives BPF (GMP), de nouvelles cellules de flux ont été développées, capables de mesurer trois longueurs de trajets optiques différentes simultanément. Dans certains cas, un canal peut même intégrer une mesure proche infra-rouge (NIR), permettant à l'analyseur de capturer à la fois des informations électroniques et vibrationnelles.

## Case study 1 : Approche sans étalonnage pour la quantification des protéines

Nous faisons varier la longueur du trajet optique (L) et traçons ensuite  $Abs = f(L)$ . La pente de la ligne est égale à C (connu). À partir de cela, nous déterminons le coefficient de détermination  $\epsilon$ , qui sera ensuite utilisé pour quantifier de nouveaux échantillons de concentration inconnue via  $C = Abs / (L * \epsilon)$ . Cette méthode permet une quantification plus précise de la concentration (avec un  $\epsilon$  bien calculé et plusieurs points de données), plutôt que de se fier à un seul point de données utilisant l'absorbance absolue.



Pour déterminer le coefficient d'extinction ( $\epsilon$ ) pour la BSA et prédire sa concentration, des mesures ont été prises à deux concentrations de BSA ( $C1 = 2 \text{ mg/mL}$  et  $C2 = 5 \text{ mg/mL}$ ) en utilisant 5 trajets optiques avec la cellule de flux MPL d'Indatech, allant de 0.5 mm à 5 mm.

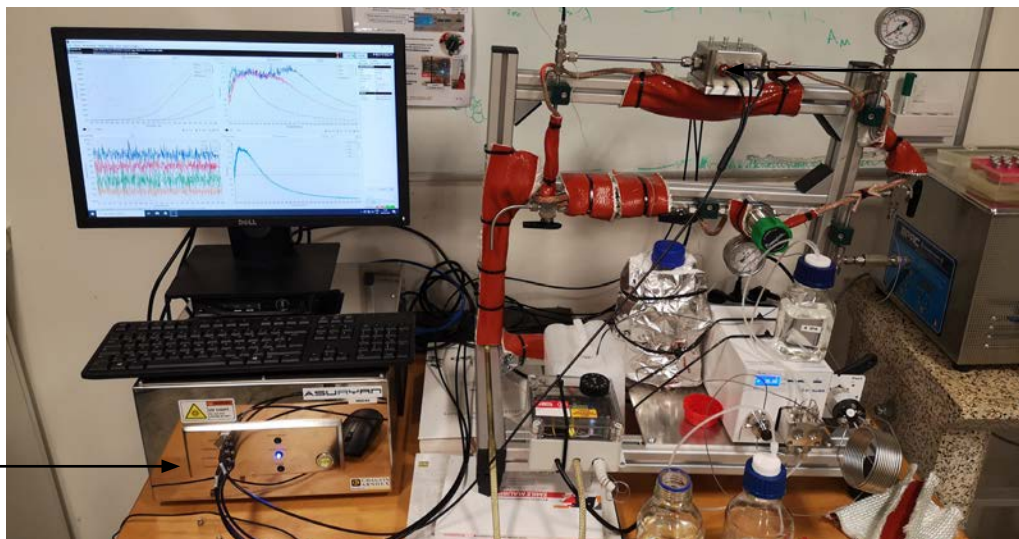


## Case study 2: Approche MPL pour une large gamme de concentrations de protéines

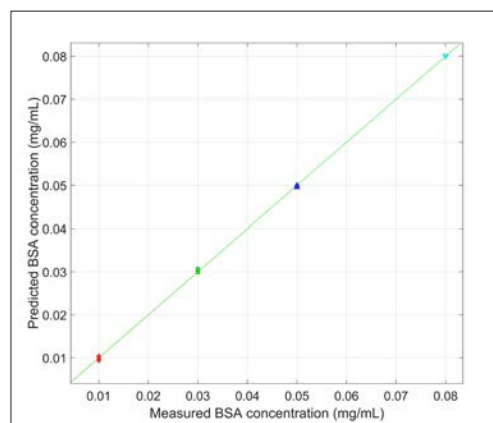
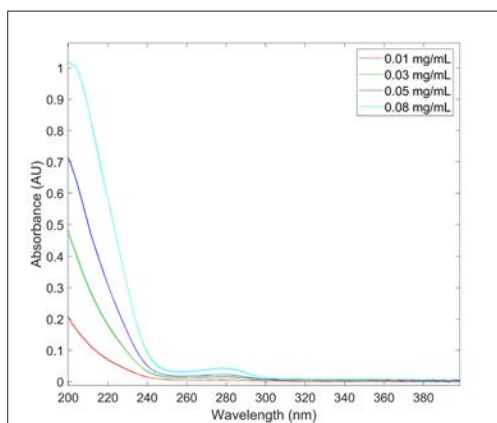
Divers échantillons de BSA à différentes concentrations, allant de 0.01 à 100 mg/mL, ont été mesurés à l'aide d'une unité de flux (25 mL/min, 10 bar) avec une cellule de flux MPL connectée au système UV-Vis Asuryan. Trois trajets optiques différents ont été utilisés : 10 mm, 3 mm et 0.5 mm.

Cellule de flux  
connectée à l'unité  
de flux

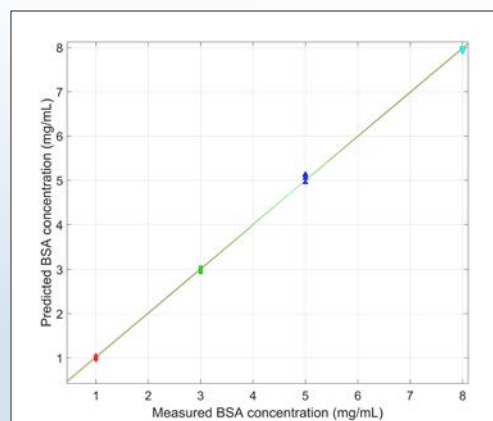
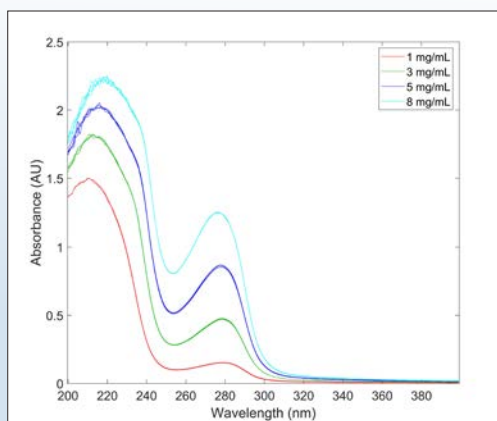
Spectromètre  
Asuryan UV-Vis



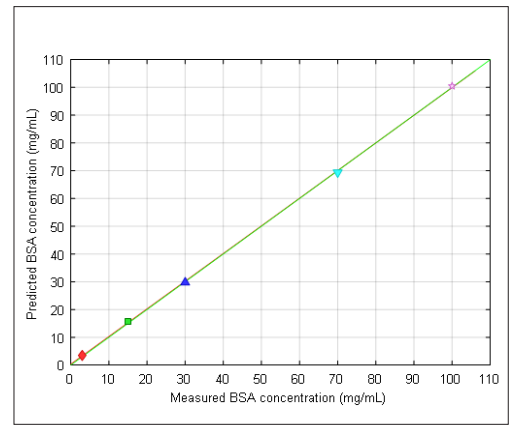
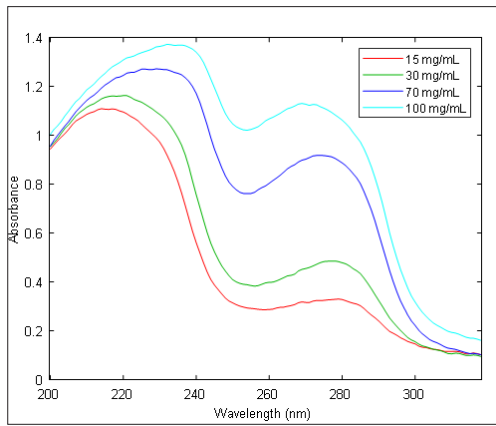
Canal 1 de la cellule de flux MPL : trajet optique 10 mm  
Gamme de concentration : 0.01 à 0.08 mg/mL



Canal 2 de la cellule de flux MPL : trajet optique de 3 mm  
Gamme de concentration : 1 à 8 mg/mL



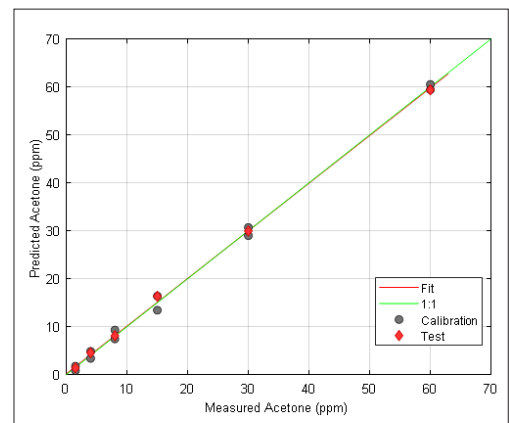
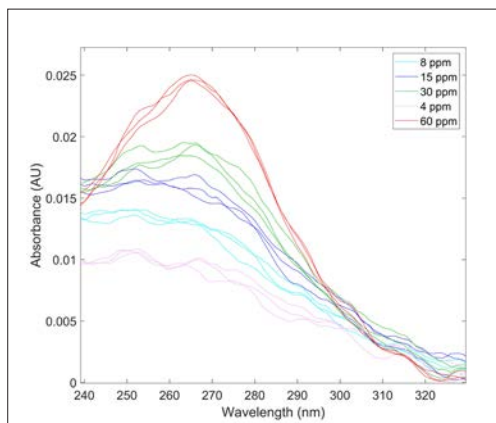
Canal 3 de la cellule de flux : trajet optique de 0.5 mm  
Gamme de concentration : 15 à 100 mg/mL



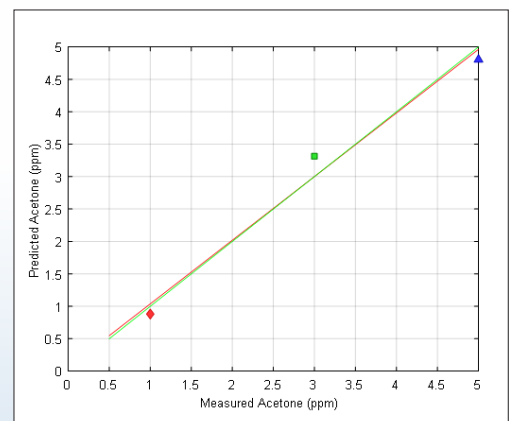
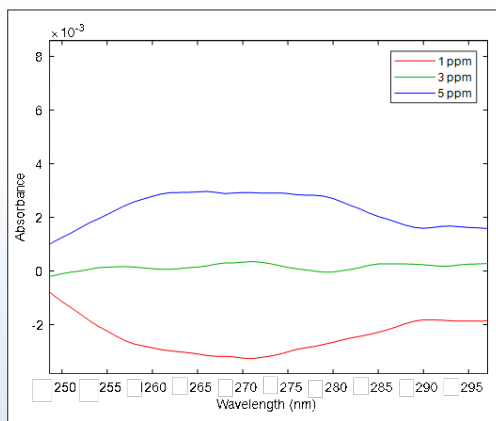
### Case study 3: Détection des traces d'acétone comme agent de nettoyage

Dans cette preuve de concept, nous visons à déterminer l'efficacité d'un procédé de Nettoyage en Place (NIP) en quantifiant la concentration résiduelle d'acétone dans l'eau. Après avoir mesuré la protéine, de l'acétone a été utilisée pour nettoyer l'unité de flux. En utilisant deux trajets optiques de la cellule de flux, 10 mm et 20 mm (avec une option maximale de 60 mm pour détecter des traces très faibles), les résidus d'acétone seront mesurés avec précision afin de garantir que le procédé NIP respecte les normes de propreté requises.

Canal 1 de la cellule de flux MPL : trajet optique de 10 mm  
Gamme de concentration : 4-60 ppm



Canal 2 et 3 de la cellule de flux MPL : trajet optique de 20 mm (2x10)  
Gamme de concentration : 1-5 ppm



L'augmentation du trajet optique permet la détection de concentrations très basses. Ainsi, des traces aussi faibles que 1 ppm peuvent être facilement quantifiées en ligne à l'aide de la cellule de flux MPL.



## ▪ Conclusion

L'étude a examiné diverses méthodes pour quantifier et qualifier les protéines ainsi que pour détecter les contaminants en traces à l'aide de la spectroscopie UV-visible, en étudiant à la fois les techniques traditionnelles avec des sondes en immersion et les approches innovantes avec des cellules de flux.

La sonde transmission/transflexion et la sonde ATR se sont révélées efficaces sur différentes plages de concentration de solutions protéiques, soulignant leur polyvalence dans les applications biotechnologiques. En particulier, la sonde ATR s'est distinguée dans les milieux hautement concentrés où les configurations de transmission standard rencontrent souvent des difficultés en raison de fortes caractéristiques d'absorption des protéines.

La cellule de flux MPL est apparue comme un outil robuste pour les mesures en ligne dans les procédés à flux continu.

Cette cellule offre des longueurs de trajet optique ajustables, optimisant les rapports signal/bruit et garantissant des mesures fiables dans des environnements dynamiques. En utilisant plusieurs trajets optiques, la cellule de flux a permis une quantification précise sur une large gamme de concentrations, allant des niveaux de traces aux concentrations élevées de BSA et d'acétone. Cette capacité est essentielle pour répondre aux exigences réglementaires strictes et valider les procédés de nettoyage dans l'industrie biotechnologique.

En conclusion, la spectroscopie UV-visible continue de jouer un rôle central dans l'industrie biotechnologique pour la quantification précise des protéines et la détection sensible des contaminants. Ses applications diversifiées et ses méthodologies évolutives assurent une haute qualité de produit et une efficacité des procédés dans les opérations biotechnologiques.

