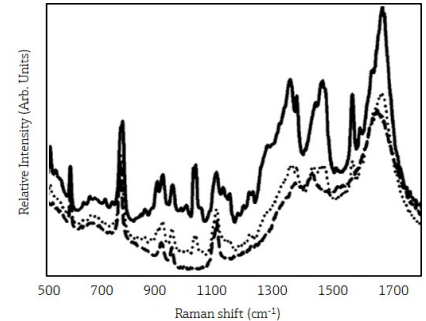
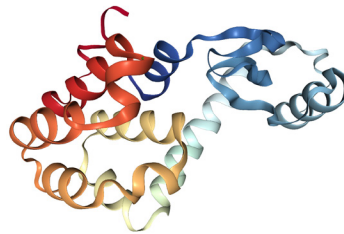


タンパク質結晶化の インラインラマン監視



特長

- 米国食品医薬品局(FDA)のプロセス分析技術(PAT)イニシアチブに準拠する特異的な情報および定量的なプロセス情報
- プロセス条件によるタンパク質結晶構造への影響
- タンパク質結晶形成のラマン非破壊測定
- タンパク質結晶化条件の迅速な最適化

図1: リゾチームの構造 (左) は結晶化条件の影響を受けます。リゾチームのラマンスペクトル (右) により、タンパク質の構造変化が測定されます。許可を得て参考資料1より転載 © 2008 Springer

概要

結晶化条件の最適化は、製品品質の確保に役立ちます。結晶化プロセスのリアルタイムでのプロセス内分析により、結晶の形成を確認し、不純物を特定します。ラマン分光法は、非破壊で化学組成と分子構造の両方を測定できるため、結晶化の分析ツールとして定評があります。オンラインのラマン分光法は、温度、pH、攪拌速度、溶媒などの条件が結晶化プロセスにどのように影響するかを迅速に理解するために役立ちます。

本研究の目的は、リゾチームをモデルタンパク質として、タンパク質結晶化のプロセス理解を深める上でラマン分光法の有用性を実証することでした。温度、沈殿剤濃度、結晶化時間、およびこれらの要因間で可能な相互作用の影響を調べるために *in situ* ラマン分光法が使用されました。

ラマンの利点

タンパク質のラマンスペクトルには、タンパク質の主鎖と側鎖からのスペクトル寄与が含まれます。 1240 cm^{-1} 付近のアミドIII包絡線と 1650 cm^{-1} 付近のアミドI包絡線から、 α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイルの有無などの高次構造情報が得られます。Mercado *et al* の例では、 750 、 760 、 2950 cm^{-1} のバンドで生じた有用なタンパク質構造情報、トリプトファン (750 、 760 cm^{-1}) および脂肪酸残基の CH_3 基 (2940 cm^{-1}) の化学的環境について報告されています。¹ これらのバンドの強度、および $760:750\text{-cm}^{-1}$ バンド面積比は、NaCl 濃度、温度、リゾチーム結晶化の時間の影響を受けやすいものでした。

本研究では、タンパク質結晶化プロセスを最適化するためのクオリティ・バイ・デザイン (QbD) アプローチにおけるラマン分光法の使用について報告されています。リゾチームがモデルタンパク質として選ばれたのは、その結晶化が広く研究されており、プロセス監視アプローチの検証が容易であるためです。

① このアプリケーションノートに記載されているラマン分光計とプローブはすべて、Kaiserラマンテクノロジーを搭載したEndress+Hauser製品です。

実験

沈殿剤 (NaCl) の濃度、温度、時間という3つの要因に基づく最適実験計画法が採用されました。ラマン分光計を使用してプロセスの監視が行われました。各サンプルに対して、9時間にわたって15~45 °Cの温度が適用されました。10分間の熱平衡状態の後、10秒間の露光を20回繰り返して、スペクトルは収集されました。固体リゾチームのスペクトルは10×非接触式オプティックを使用して、水溶液からのスペクトルは¼” 浸漬プローブを使用して取得されました。

結果

図1は、酢酸濃度の変化がリゾチームのラマンスペクトルに及ぼす影響を示しています。酢酸濃度: 90 mg/mL (実線)、30 mg/mL (点線)、0 mg/mL (破線)。定量分析に有用なピークが、2940、760、750、155 cm^{-1} で確認されました。

図2は、溶媒中のリゾチーム濃度と沈殿剤としてのNaCl濃度の関係を示しています。150と2940 cm^{-1} のリゾチームバンドはNaCl濃度に比例して変化しますが、重なり合う750と760 cm^{-1} 領域の形状はより複雑で、一方が増加するともう一方が減少します。本研究では、2940 cm^{-1} バンドが定量的なプロセス監視に最も有用でしたが、760/750 cm^{-1} 比も高い妥当性を示しました。

結論

ラマン分光法は、多くの定量的なプロセス情報をもたらし、タンパク質結晶化プロセスの高速多変量監視を可能にして、スケールアップされたプロセスのリアルタイム制御に大きな将来性を示すことが確認されました。バイオ医薬品ラボやプロセス開発環境にはRaman Rxn2アナライザプラットフォームを使用し、製造環境の場合はRaman Rxn4アナライザプラットフォームを使用することで、この技術の拡張が実現します。

参考資料

1. Mercado, J. et al. "Design and In-Line Raman Spectroscopic Monitoring of a Protein Batch Crystallization Process." *J. Pharma. Innov.* **2008**; 271-279.

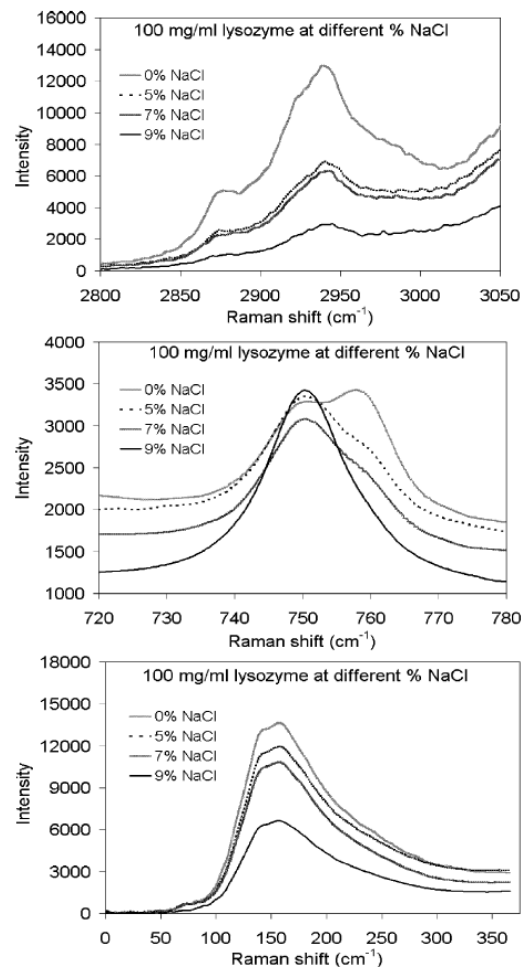


図2: リゾチームのラマンスペクトルは、塩化ナトリウムを添加すると変化し、タンパク質の結晶化が進んでいることを示します。