



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Pharmaceutical aspects of subvisible particles in protein formulations

Weinbuch, D.

Citation

Weinbuch, D. (2016, December 13). *Pharmaceutical aspects of subvisible particles in protein formulations*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/44780>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/44780>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44780> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Weinbuch, D.

Title: Pharmaceutical aspects of subvisible particles in protein formulations

Issue Date: 2016-12-13

Nederlandse samenvatting

Biofarmaca worden succesvol ingezet bij het behandelen van ernstige ziekten en aandoeningen die niet te behandelen zijn met klassieke geneesmiddelen. Echter, een grote belemmering voor hedendaags onderzoek naar nieuwe biofarmaca betreft de instabiliteit van therapeutische eiwitten, wat een schadelijke invloed kan hebben op de veiligheid en werkzaamheid. Zo is de vorming van aggregaten – met name in de nanometer en micrometer schaal – in verband gebracht met immunoreacties in patiënten. Dit fenomeen staat beter bekend als ongewenste immunogeniciteit.

In **Hoofdstuk 2** wordt het formuleringsproces van therapeutische eiwitten geïntroduceerd. Dit proces vormt een essentieel onderdeel van de ontwikkeling van biofarmaca, omdat het tracht het therapeutische en commerciële succes van veelbelovende producten te waarborgen. Het verzekeren van de kwaliteit, veiligheid en werkzaamheid gedurende de houdbaarheid van het product is daarbij het hoofddoel. Omdat het formuleringsproces plaatsvindt tijdens het gehele ontwikkelingsproces van biofarmaca, bestaat het formuleringsproces uit verschillende fases. Bovendien vereist elk biofarmac on een unieke formulering om een aantal redenen: verschillende vatbaarheden voor bepaalde degradatiemechanismen, specifieke karakteristieken van het actieve bestanddeel (het therapeutische eiwit), bepaalde eisen om de therapietrouw te verhogen en diverse marketingoverwegingen. Daarnaast kan het formuleringsproces op verschillende manieren worden aangepakt. Zo kan er, gebaseerd op een rationele aanpak, gebruik worden gemaakt van wetenschappelijke kennis die verkregen is door het systematisch analyseren van eiwitten met behulp van diverse analytische technieken. Dit hoofdstuk geeft een introductie over het formuleringsproces van therapeutische eiwitten. Hierbij zullen huidige formuleringsstrategieën en uitdagingen worden behandeld.

Omdat alle therapeutische eiwitten de potentie hebben om immunogeen te zijn, zal in **Hoofdstuk 3** ongewenste immunogeniciteit en onderliggende mechanismen besproken worden. Antilichamen tegen therapeutische eiwitten kunnen namelijk de werkzaamheid verminderen, wat kan leiden tot een toename in de kosten van een therapie. In zeldzame gevallen kan het zelfs resulteren in levensbedreigende situaties. Vandaar dat het belangrijk is om therapeutische eiwitten te ontwikkelen met een minimale immunogeniciteit. Het voorspellen van immunogeniciteit speelt daarom al vroeg in het ontwikkelingsproces een belangrijke rol. Verschillende *in silico*-, *in vitro*- en *in vivo*-modellen kunnen gebruikt worden om immunogeniciteit te voorspellen. Dit biedt de mogelijkheid om immunogene eigenschappen te identificeren en om een selectie te maken van eiwitten met een lage immunogeniciteit. Hoewel dergelijke modellen volop worden gebruikt, zijn er verschillen in de voorspellende waarde. Zo is er nog onvoldoende kennis over het type immunoreactie op therapeutische eiwitten dat ongewenste

immunogeniciteit tot gevolg heeft. Daarnaast verkennen modellen verschillende componenten van het immuunsysteem en is er een gebrek aan een geïntegreerde klinische validatie. In dit hoofdstuk bespreken we welke modellen tegenwoordig in gebruik zijn en welke aspecten van immunogeniciteit deze modellen vertegenwoordigen. Daarnaast bediscussiëren we de toegevoegde waarde en beperking van elk model.

Light obscuration (LO) is tegenwoordig een standaardtechniek om subvisuele (microscopisch fijne) deeltjes te analyseren tijdens de kwaliteitscontrole van geneesmiddelen die parenteraal worden toegediend, zoals therapeutische eiwitten. In sommige gevallen hebben zulke geneesmiddelen een hoge viscositeit door een hoge eiwitconcentratie. Dit kan leiden tot foutieve LO-metingen. In **Hoofdstuk 4** wordt omschreven hoe een verhoogde viscositeit van vloeibare monsters, vanaf 9 centipoise (cP), leidde tot een onderschatting in het aantal subvisuele deeltjes. Het toepassen van een overdruk op monsters met een hoge viscositeit bleek de betrouwbaarheid van de LO-metingen te herstellen zonder dat extra monstervoorbewerkingen vereist waren. Daarnaast werd duidelijk dat huidige analytische technieken niet goed in staat zijn om viskeuze samples te analyseren. Wanneer hier geen rekening mee wordt gehouden kan dit leiden tot een onderschatting in het aantal deeltjes.

In **Hoofdstuk 5** wordt omschreven hoe *Micro-Flow Imaging* (MFI) en *Resonant Mass Measurement* (RMM) gebruikt kunnen worden om siliconenoliedruppels en eiwitdeeltjes van elkaar te onderscheiden. Het kunnen onderscheiden van dergelijke deeltjes – op nanometer- en micrometer-schaal – is essentieel voor de ontwikkeling van biofarmaca, met name bij voorgevulde injectiespuiten. In dit onderzoek werd gebruikgemaakt van kunstmatig verkregen siliconenoliedruppels en eiwitdeeltjes. Daarnaast werden deze deeltjes gemengd in verschillende verhoudingen om te onderzoeken in hoeverre de technieken in staat zijn om deze deeltjes te onderscheiden. De ingebouwde MFI-software was in staat om siliconenoliedruppels en eiwitdeeltjes van elkaar te onderscheiden wanneer de deeltjes groter waren dan 2 μm en er een mengverhouding van 70:30-30:70 werd gebruikt. Tevens werd er een MFI-softwarefilter ontwikkeld dat de prestaties aanzienlijk verbeterde; zelfs wanneer er extreme mengverhoudingen werden gebruikt van 95:5-15:85. Daarentegen bleek RMM in staat te zijn om siliconenoliedruppels en eiwitdeeltjes van 0.5 tot 2 μm van elkaar te onderscheiden, onafhankelijk van de mengverhouding die werd gebruikt. Kortom, zowel MFI als RMM waren in staat om deeltjes van elkaar te onderscheiden. Daarom adviseren we om beide technieken te gebruiken bij het analyseren van biofarmaca die mogelijk siliconenoliedruppels en/of eiwitdeeltjes bevatten.

Flow Imaging Microscopy (FIM) is een aantal jaren geleden geïntroduceerd en is sindsdien steeds belangrijker geworden voor het analyseren van eiwitdeeltjes. **Hoofdstuk 6**

omschrijft een vergelijking van vier relevante FIM-apparaten (MFI4100, MFI5200, FlowCAM VS1 en FlowCAM PV) voor het analyseren van biofarmaca. Voor deze vergelijking werden verschillende deeltjes gebruikt, namelijk polystyreen standaarddeeltjes, eiwitdeeltjes (gemaakt van monoklonale antilichamen) en siliconenoliedruppels. Naast de kwantificering en karakterisering is onderzocht hoe goed de apparaten in staat zijn om verschillende type deeltjes van elkaar te onderscheiden. Bovendien is er gekeken naar de gebruiksvriendelijkheid en kwaliteit van de verkregen afbeeldingen van de deeltjes. De FlowCAM-apparaten, met name de FlowCAM VS1, creëerden afbeeldingen in een hoge resolutie. De FlowCAM PV gaf de meest precieze kwantificering van het aantal eiwitdeeltjes, zelfs wanneer er sprake was van suboptimale omstandigheden door een verhoogde brekingsindex van de formulering. Bovendien was dit systeem het beste in staat om eiwitdeeltjes van siliconenoliedruppels te onderscheiden. Ook de MFI-apparaten konden accuraat de deeltjesgrootte- en concentratie van samples met polystyreen standaarddeeltjes vaststellen. De MFI5200 bleek hierin het best in staat. Dit apparaat was, net als de FlowCAM PV, ook in staat om eiwitdeeltjes te detecteren, zelfs wanneer er sprake was van een verhoogde brekingsindex. In vergelijking met de FlowCAM-apparaten waren de MFI-apparaten gebruiksvriendelijker en bleek het gemakkelijker om gestandaardiseerde metingen en data-analyses uit te voeren. De belangrijkste conclusie van dit onderzoek is dat de selectie van het meest geschikte FIM-systeem sterk afhankelijk is van de voornaamste output parameters met betrekking tot het doel van het onderzoek.

Hoofdstuk 7 beschrijft de hoofdoorzaak en consequentie van het interferentiesignaal (100-200 nm) dat zich manifesteert bij *Dynamic Light Scattering* (DLS) en *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) analyses van suikerhoudende oplossingen. In dit onderzoek zijn verschillende suikers met variërende zuiverheden en van diverse leveranciers geanalyseerd met DLS en NTA. Ook is het effect van ultrafiltratie en diafiltratie bestudeerd. Verder zijn *Fourier Transform Infrared* (FTIR) *Microscopy*, *Scanning Electron Microscopy Coupled Energy-dispersive X-ray Spectroscopy* (SEM-EDX) en *Fluorescence Spectroscopy* gebruikt. De intensiteit van het interferentiesignaal was afhankelijk van het type suiker en zuiverheid, en de leverancier en productiepartij. Ultrafiltratie van monsters met een 0.02- μm filter verwijderde het interferentiesignaal. Het interferentiesignaal bleek veroorzaakt te worden door nanodeeltjes – bestaande uit dextranen, mineralen en aromatische kleurstoffen – die niet volledig verwijderd waren tijdens het suikerraffinage proces. Kortom, het interferentiesignaal werd veroorzaakt door nanodeeltjes die als verontreiniging aanwezig zijn in farmaceutische suikers. Verder in deze samenvatting zal er naar deze nanodeeltjes gerefereerd worden als *Nano-Verontreinigen* (NVs).

In **Hoofdstuk 8** wordt omschreven welk effect de eerder omschreven NV's hebben op de stabiliteit van verschillende monoklonale antilichamen. Eerst zijn NV's verkregen uit

farmaceutische graad sucrose (saccharose). Vervolgens zijn de verkregen NV's toegevoegd aan trastuzumab-, rituximab-, infliximab- en cetuximab-formuleringen. De stabiliteit van de monoklonale antilichamen is onderzocht door middel van *Visual Inspection*, FIM, NTA, *Size-exclusion Chromatography* (SEC), *Capillary Isoelectric Focusing en Intrinsic Differential Scanning Fluorimetry* als functie van opslagtijd, temperatuur en NV-concentratie. Ook zijn de NV's gekarakteriseerd met behulp van laser Doppler electrophoresis en de GlucateLL assay om de ζ -potentiaal en het (1-3)- β -glucaaangehalte te bepalen. NV's bleken een schadelijke invloed te hebben op alle onderzochte monoklonale antilichamen. Na het toevoegen van NV's aan trastuzumab werden de formuleringen troebel en ontstonden er grote aantallen microdeeltjes. In rituximab- en cetuximabformuleringen vormden zich alleen hoge aantallen nanodeeltjes. Na het toevoegen van NV's aan infliximab ontstonden er zowel nanodeeltjes als microdeeltjes. Bovendien werd het infliximab-mengsel troebel. Hoewel de stabiliteit van trastuzumab en infliximab vrijwel direct na het toevoegen van NV's al verminderde, was dit bij rituximab en cetuximab pas detecteerbaar na een opslagtijd van 14 weken en een verhoogde opslagtemperatuur. Bovendien werd de stabiliteit van rituximab en infliximab al beïnvloed door een NV-concentratie die mogelijk in commerciële producten aanwezig is. De stabiliteit van trastuzumab werd alleen beïnvloed bij hogere concentraties NV's. NV's bleken ook een hoog gehalte te hebben aan (1-3)- β -glucaa, een immuunstimulerende stof. Samengevat vormt de aanwezigheid van NV's in farmaceutische suikers een risico op stabiliteitsproblemen en ongewenste immunogeniciteit.

Gezien de problemen met betrekking tot het karakteriseren van deeltjes in de nanometer- en micrometer-schaal zal dit proefschrift hopelijk leiden tot een verbetering van bestaande en opkomende analytische technieken om subvisuele deeltjes te onderzoeken. Daarnaast kunnen wetenschappers die werkzaam zijn bij bedrijven of universiteiten de verkregen inzichten toepassen om analytische technieken zo effectief mogelijk te gebruiken. Dit proefschrift laat ook zien dat farmaceutische suikers NV's bevatten die niet alleen interfereren met analytische technieken, maar ook een schadelijk effect bleken te hebben op de stabiliteit van monoklonale antilichamen. De resultaten gepresenteerd in de voorgaande hoofdstukken dragen dus bij aan de mondiale inspanning om veilige en effectieve geneesmiddelen te ontwikkelen.