



Universiteit
Leiden
The Netherlands

novel analytical approaches to characterize particles in biopharmaceuticals

Grabarek, A.D.

Citation

Grabarek, A. D. (2021, October 21). *novel analytical approaches to characterize particles in biopharmaceuticals*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3217865>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3217865>

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

Samenvatting en conclusies

Het ontwikkelen van analytische methoden voor de karakterisering van deeltjes is van groot belang tijdens de ontwikkeling van biofarmaca. Vroegtijdige bepaling van deeltjesonzuiverheden en degradatieprocessen in therapeutische eiwitformuleringen tijdens (versnelde) opslag en geforceerde degradatieomstandigheden kan de kans op klinische mislukkingen in latere ontwikkelingsstadia verkleinen en de stabiliteits- en kwaliteitsbeoordeling van deze geneesmiddelen ondersteunen. Daarnaast zijn op cellen gebaseerde geneesmiddelen (*cell-based medicinal products*; CBMPs) in opkomst, welke gebaseerd zijn op heterogene suspensies van verschillende deeltjes. Hiervoor zijn analytische methodes nodig in combinatie met geavanceerde dataverwerking om een uitgebreide productkarakterisering mogelijk te maken.

In **hoofdstuk 2** onderzochten we de voordelen en beperkingen van een recentelijk ontwikkelde techniek om nanodeeltjes te karakteriseren: *microfluidic resistive pulse sensing* (MRPS). Deze analysetechniek die in staat is individuele deeltjes in een oplossing te analyseren was vergeleken met bestaande deeltjesanalysetechnieken, waaronder *dynamic light scattering* (DLS), *nanoparticle tracking analysis* (NTA) en *resonant mass measurement* (RMM), met betrekking tot het bepalen van de deeltjesgrootte en het deeltjesaantal. Hiervoor werden monsters gemeten met polystyreennanodeeltjes, liposomen, bacteriën en eiwitaggregaten. MRPS bleek van alle geteste technieken het breedste meetbare concentratiebereik te hebben. Dit zou MRPS superieur maken voor het kwantificeren van medicamenten met hoge deeltjesaantallen, zoals formuleringen op basis van virussen en liposomen, aangezien er geen verdunning van het monster nodig is. MRPS, RMM en NTA zijn technieken voor het tellen van individuele deeltjes, waardoor de resolutie bij het bepalen van de deeltjesgrootte in monsters met heterogene deeltjespopulaties superieur is aan die van DLS. Uit verder onderzoek naar de resolutie voor de deeltjesgrootte bleek dat MRPS ietwat beter presteerde dan RMM, terwijl NTA het slechtst in staat was om onderscheid te maken tussen twee groepen deeltjes met elk een andere grootte. Het feit dat metingen via MRPS een relatief hoge elektrische geleiding

van monsters vereisen kan echter een beperkende factor zijn van deze techniek, zoals in het volgende hoofdstuk is beschreven.

Hoofdstuk 3 beschrijft een vervolgstudie over nanodeeltjesanalysetechnieken voor het analyseren van eiwitdeeltjes in een oplossing van een monoclaal antilichaam (*monoclonal antibody*; mAb). In het bijzonder werd het effect van de toevoeging van elektrolyten op de stabiliteit van de mAb onderzocht. Metingen met *tunable resistive pulse sensing* (TRPS) en MRPS vereisen dat de monsters genoeg elektrische geleiding hebben. Voor algemeen gebruikte eiwitformuleringen met een lage geleiding moeten elektrolyten worden toegevoegd voordat een monster gemeten kan worden. Door gebruik te maken van RMM en NTA werd echter een substantiële verhoging van het aantal nanometerdeeltjes gevonden in aan hitte blootgestelde mAb-formuleringen waaraan natriumchloride of histidine was toegevoegd. Een dergelijke verandering werd niet vastgesteld in verhitte eiwitmonsters zonder zulke toevoegingen. Daarom dient voorafgaand aan metingen met *resistive pulse sensing* het effect van de toevoeging van elektrolyten aan eiwitformuleringen op de eiwitstabiliteit, met name aggregatie, vooraf bepaald te worden.

In **hoofdstuk 4** onderzochten wij de immunogeniciteit van eerder vastgestelde nanodeeltjesonzuiverheden (*nanoparticulate impurities*; NPIs) in suikers van farmaceutische kwaliteit. NPIs geïsoleerd uit sucrose van farmaceutische kwaliteit, een veelgebruikte hulpstof in eiwitformuleringen, bleken β -glucanen te bevatten die als adjuvantia kunnen fungeren in de aanwezigheid van immunogene stoffen (zoals eiwitaggregaten). In tegenstelling tot eerder onderzoek werd in trastuzumabformuleringen die gedurende enkele uren waren geïncubeerd met NPIs slechts een geringe toename in de concentratie van nanodeeltjes en geen substantiële toename in microdeeltjes vastgesteld. NPIs in een hoge concentratie (10^{10} p/ml), al dan niet in combinatie met 1 mg/ml trastuzumab, zorgde niet voor de activatie van *monocyte-derived dendritic cells*. Deze resultaten suggereren dat, in tegenstelling tot onze

verwachting, NPIs in zowel de aan- als afwezigheid van eiwitten niet immunogeen zijn in het gebruikte *in vitro* model.

Hoofdstuk 5 richtte zich op de rol van de zuiverheid van polysorbaat 80 (PS80), een ander belangrijke hulpstof, op het eiwit-stabiliserend effect tijdens blootstelling aan mechanische stress, waarvan bekend is dat dit kan leiden tot de vorming van eiwitaggregaten in de vorm van deeltjes. Twee soorten PS80, gespecificeerd door de *United States Pharmacopeia* (USP) en de Chinese Farmacopee (ChP), werden getest op hun stabiliserende werking op een model mAb onder drie mechanische-stressomstandigheden: schudden, vrije val en pompen. UV-spectroscopie, DLS, *backgrounded membrane imaging* (BMI) en *flow imaging microscopy* (FIM) werden gebruikt ter bepaling van de stabiliteit van de mAb onder deze omstandigheden. Ondanks de hogere zuiverheid van ChP PS80 (gehalte aan oliezuur >98%) in vergelijking met USP PS80 (gehalte aan oliezuur 50-60%), werden geen duidelijke verschillen in functionaliteit waargenomen. Rekening houdend met de lagere chemische stabiliteit van ChP PS80 in vergelijking met USP PS80, biedt ChP PS80 ondanks de hogere zuiverheid wellicht geen voordelen voor de stabilisatie van mAbs.

De nadruk van de in de **hoofdstukken 6 en 7** beschreven studies lag op de analytische karakterisering van een innovatieve, op cellen gebaseerde geneesmiddelen categorie, CBMPs. Het onderzoek was gericht op het uitbreiden van de momenteel beperkte analytische gereedschapskist voor de karakterisering van celsuspensies.

In **hoofdstuk 6** ontwikkelden we een op FIM gebaseerde methode, in combinatie met convolutionele neurale netwerken (FIM-CNN) voor beeldanalyse, voor het detecteren en kwantificeren van de deeltjesonzuiverheden in CBMPs. De focus werd gelegd op de identificatie van Dynabeads, met antilichamen gecoate magnetische microdeeltjes die worden gebruikt voor celactivering, in aanwezigheid van Jurkat-cellen in een concentratie tot 500,000 cellen per ml. De morfologische standaardparameters afkomstig van de software van het gebruikte instrument (FlowCam) waren onvoldoende om onderscheid te maken tussen Dynabeads, cellen, celresten en adducten (aan cellen gehechte Dynabeads). Daarom werd in deze studie gebruik gemaakt van *machine learning* voor beeldclassificatie.

Door gebruik te maken van FIM-CNN daalde het foutenpercentage bij de classificatie van Dynabeads met het 50-voudige in vergelijking met de standaard morfologische parameterbenadering. Bovendien werd een *limit of quantification* (LOQ) vastgesteld bij 50,000 Dynabeads/ml met een hoge nauwkeurigheid en een lage variabiliteit in de concentratiebepaling boven de LOQ.

Het in **hoofdstuk 6** verrichte werk legde de basis voor het bestuderen van de stabiliteit van Jurkat-celsuspensies die worden onderworpen aan geforceerde degradatieomstandigheden in **hoofdstuk 7**: ontdooien bij verschillende temperaturen, vriezen-dooien en schudden. De analyse van cellen werd uitgevoerd door gebruik te maken van de nieuw ontwikkelde FIM-CNN, naast meer conventionele op fluorescentie gebaseerde celkarakteriseringstechnieken. FIM-CNN werd toegepast om de concentratie van cellen (levensvatbare en necrotische) en overige deeltjes (waaronder celdebris) te bepalen. De met FIM-CNN verkregen resultaten inzake levensvatbaarheid waren goed te vergelijken met die van calceine-AM- en propidiumjodide-assays. Het ontdooien bij lage temperatuur (5 °C) van bevroren cellen bleek nadelig te zijn voor de levensvatbaarheid en het aantal cellen, vergeleken met ontdooien bij 20 en 37 °C. Bovendien werden cellen geformuleerd met verschillende dimethylsulfoxide (DMSO)-concentraties (0 - 10% [v/v]) en onderworpen aan één vries-dooicyclus (van -20 °C naar 37 °C). De laagste geteste DMSO-concentratie (1% [v/v]) vertoonde geen beschermende effecten, terwijl de beste celstabiliserende eigenschappen van DMSO werden bereikt bij 5% (v/v). Horizontaal schudden van celsuspensies had geen invloed op de levensvatbaarheid van de cellen onder de onderzochte omstandigheden, maar leidde wel tot een aanzienlijke daling van het totale aantal cellen. De daling van de celconcentratie na schudden werd verminderd door toevoeging van foetaal kalfsserum (10%[v/v]) aan de celsuspensie. Onze bevindingen tonen het nut aan van de drie types van geforceerde-degradatiestudies voor CBMP-formuleringsontwikkeling, alsook het belang van orthogonale analysetechnieken voor celkarakteriseren