



Takayuki Yoshimori, Ph.D

Danışman / Consultant
Ant Teknik Cihazlar

Biyofarmasötik İlaçlarda Protein Agregatlarının / Çözünmeyen Partikül Maddelerin Visible ve Subvisible (SVP) Alanda Ölçülmesi *Evaluation of Protein Aggregate/insoluble Particulate Matters Including Subvisible Particles (SVP) in Biopharmaceuticals*

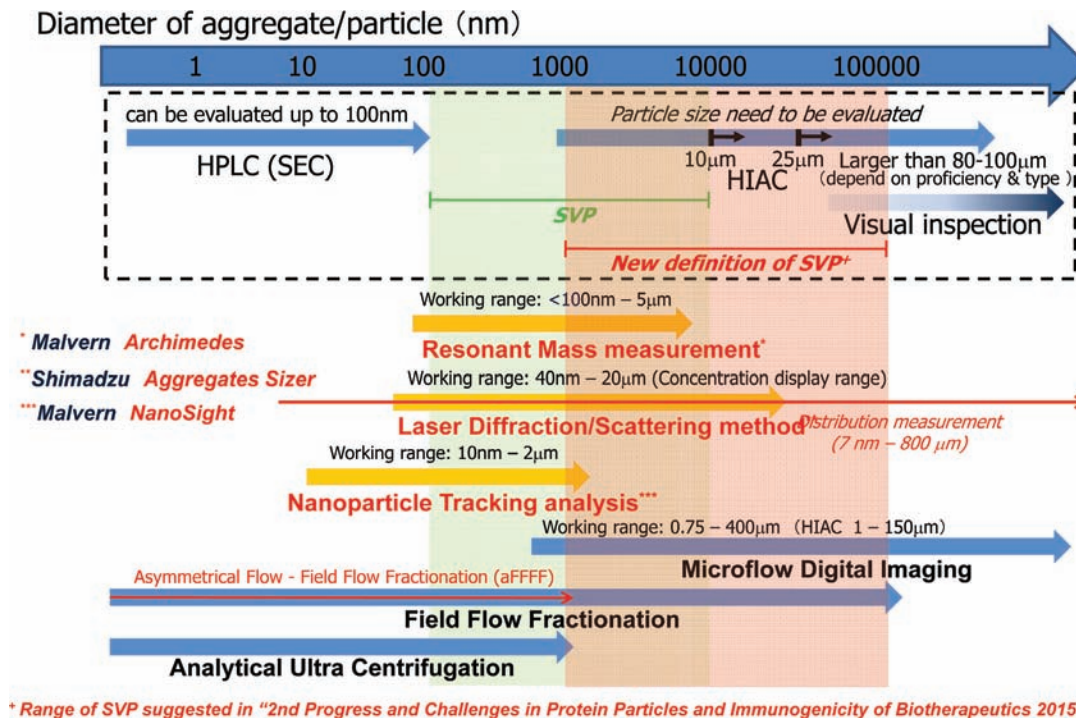
Proteinin topaklanması (agregasyon), biyofarmasötik ürünlerin klinik deneme periyodunda ve ürünün piyasaya sürülmesinden sonra karşılaşılabilen immünojenik açıdan çok ciddi bir sorundur.

In bio-pharmaceutical products, immunogenicity associated with an aggregation phenomenon of the protein has been attracting a lot of attention as a serious problem during clinical trials and after launch.

Protein topaklanmasının ve çözünmeyen partiküllerin Analitik Metodları ölçüm aralıklarına göre, Şekil 1'de gösterilmektedir. Şekilde görülebileceği üzere, Size Exclusion Chromatography (SEC) 0.1-0.2 μm 'nin altındaki oligomerlerinin/agregatların ölçümü için kullanılmaktadır. SEC metodunun, diğer metotlara göre daha kolay kullanımı ve yüksek tekrarlanabilirliği gibi nedenlerle pek çok avantajı bulunmaktadır.

Working range of Analytical Methods used for evaluating Protein aggregate/Insoluble particulate matters including Subvisible particles (SVP) are shown in Figure 1. As shown in this figure, Size Exclusion Chromatography (SEC) has been used to evaluate protein oligomers/ aggregate less than size of 0.1-0.2 μm . SEC method has many advantages over other methods such as its simple experimental protocol and high reproducibility. However, due to the presence of many problems (Decline of recovery ratio caused by trapping on the column top and absorption on the matrix & surface of the column, dissociation of protein oligomers/ aggregates by dilution of sample by mobile solution during analysis and its high pressure, etc.) in the quantitative evaluation of protein oligomers/ aggregates has received pointed out with respect to its legitimacy by research developers and FDA¹.

SEC metodu, çalışma prensibi gereği (basınç) protein oligomerlerinin ve topaklanmalarının dağılmasına sebep olabilmektedir. Ancak, FDA ve araştırmacılar, protein oligomerlerinin ve agregatların kantitatif değerlendirilmesi için SEC metoduna ihtiyaç duymaktadır¹.

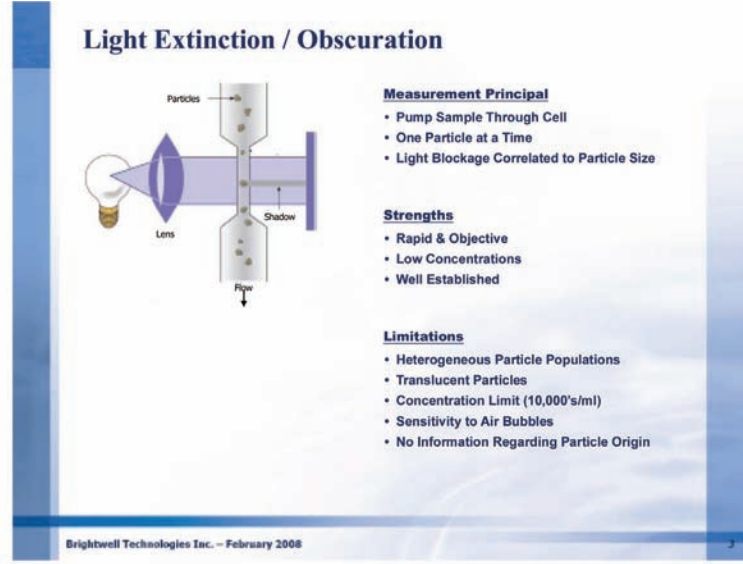


Şekil 1. Protein Agregatlarının / Çözünmeyen Partikül Maddelerin Visible ve Subvisible (SVP) Alanda Ölçümü için Kullanılan Analitik Metodların Ölçüm Aralıkları

Figure 1. Working range of Analytical Methods used for evaluating Protein aggregate/Insoluble particulate matters including Subvisible Particles (SVP)

10 um ile 25 um arasındaki çözünmeyen partikül maddelerin değerlendirilmesi için, Light Extinction/ Obscuration analizi (Analitik cihaz: HIAC) dünya genelinde kullanılmaktadır.² [Şekil 2].

For the evaluation of insoluble particulate matters over 10 um and 25 um, Light Extinction/ Obscuration analysis (Analytical device: HIAC) has been used in worldwide.² [Figure 2].



Dave Thomas et al, Particle Characterization Using Flow Microscopy, 2008 BioProcess International Conference & Exhibition

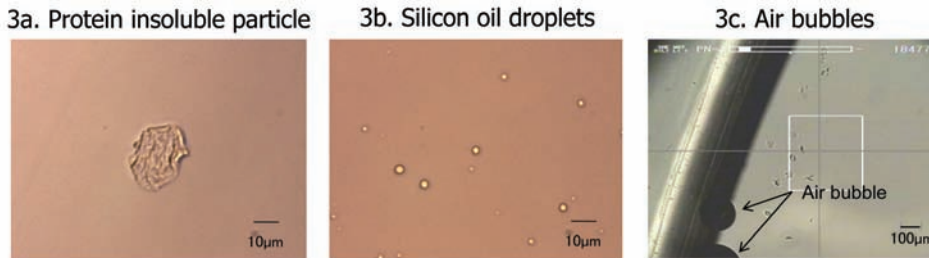
Şekil 2. Light Extinction/Obscuration Metodu Çalışma Prensipli ve Özellikleri
Figure 2. Principle and Characteristics of Light Extinction/Obscuration Method

Light Extinction/ Obscuration metodu 10 um - 25 um büyüklüğündeki çözünmez partikül maddelerin analizi için uzun yıllardır kullanılmakta olsa da biyofarmasötik ilaçlarda protein agregatlarının analizinde karşılaşılan ciddi problemler bulunmaktadır.

- Şekil 3'te görüldüğü gibi, dedeksiyon hassasiyeti gölgenin alanı ve yoğunluğuna bağlıdır. Partiküllere ışık uygulandığında, protein agregatlarının [Şekil 3a] ve silikon yağı damlacıklarının [Şekil 3b] dedekte edilmesi zordur, çünkü bu partiküller ışığı geçirmektedir.
- Hava kabarcıkları, Şekil 3c'de görüleceği üzere, ışığı bloke ettiği için Light Extinction/ Obscuration metodu na son derece hassastır.
- Hangi tür partiküllerin dedekte edildiğini bilmek mümkün değildir.

Although Light Extinction/ Obscuration method has been used for evaluating insoluble particulate matters over 10 um and 25 um in biopharmaceuticals for long time, there is serious problems for evaluating protein aggregates in biopharmaceuticals.

- As shown in Figure 3, since the detection sensitivity is proportional to the area and density of the shadow caused when light is applied to the particles, protein aggregates [Figure 3a] and silicone oil droplet [Figure 3b] are difficult to detect because those particles transmit light.
- Air bubble is highly sensitive for Light Extinction/ Obscuration method because air bubbles block the light as shown in Figure 3c.
- It is impossible to know what type of particles have been detected.

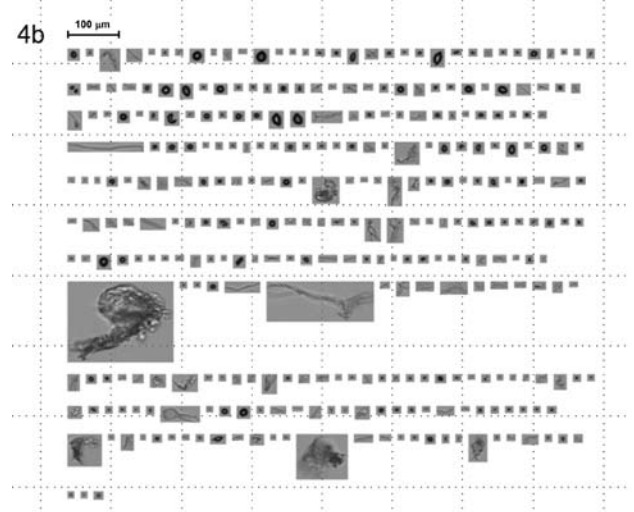
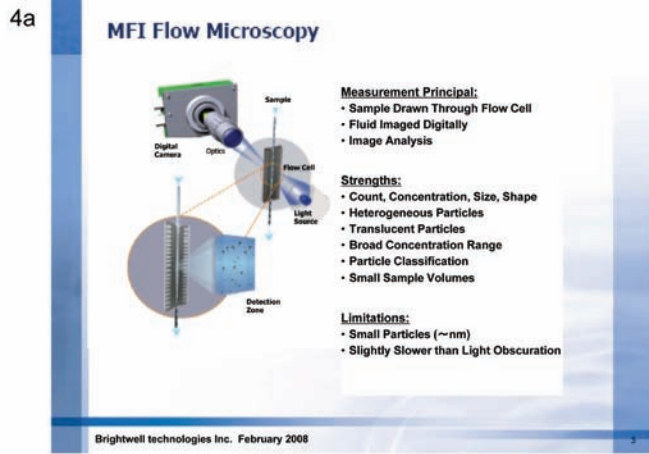


Şekil 3. Çözünmeyen protein partiküllerinin, silikon yağ damlacığının ve hava kabarcığının mikro akış hücresi kullanılarak hücre transmisyon mikroskop altında elde edilen görüntüleri

Figure 3. Transmission microscopic images of protein insoluble particle, Silicon oil droplet, and air bubble using microfluidic cell

Aslında, Light Extinction/ Obscuration metodu ile ölçüm esnasında, protein agregatları gerçek partikül boyutlarından daha küçük boyutlarda dedekte edilmektedir [Protein agregatlarının büyüklüğüne bağlı olup genellikle gerçek büyüklüklerinin onda biri kadar dedekte edilmektedir.]. Çözünmeyen partikül maddelerin doğru analizi için, Light Extinction/ Obscuration metoduna benzer ve hatta daha da geniş bir çalışma aralığı bulunan mikro akış dijital görüntüleme metodu destekleyici/alternatif metod olarak kullanılmaktadır. Mikro akış dijital görüntüleme metodunun prensibi son derece basittir. Yalnızca tüm partiküllerin görüntüsü alınmakta ve partikül büyüklüğü gerçek görüntü üzerinden belirlenmektedir [Şekil 4a ve 4b]. Bu nedenle, Light Extinction/ Obscuration metodunun aksine, mikro akış dijital görüntüleme metodu çoğunlukla silikon yağ damlacığı gibi transparan protein agregatlarının analizinde başarılı sonuç vermektedir. Çözünür olmayan partikül maddelerin analizinde Extinction/ Obscuration metodunun yerine mikro akış dijital görüntüleme metodunun kullanılması biyofarmasötik ilaç kullanan hastaların büyük protein agregatlarından korunabilmesi açısından son derece önemlidir.

Indeed, in the measurement by Light Extinction/ Obscuration method, protein aggregates have been evaluated as smaller size compared to the actual particle size [Although depending on the thickness of protein aggregates, usually less than one-tenth of their actual size: data not shown]. To evaluate insoluble particulate matters more accurately, Microflow digital imaging method which has similar and even wider working range has been used as supporting/ alternative method of Light Extinction/ Obscuration method. Principle of Microflow digital imaging method is simple. Just take picture of all particles and evaluate the size of particle from the actual picture [Figure 4a & 4b]. Therefore, unlike Light Extinction/ Obscuration method, Microflow digital imaging method is able to evaluate mostly transparent protein aggregates so as silicon oil droplet. Replacement of Extinction/ Obscuration method to Microflow digital imaging method for evaluating insoluble particulate matters are very important to protect patients from large protein aggregates exist in biopharmaceuticals.



Dave Thomas et al, Particle Characterization Using Flow Microscopy, 2008 BioProcess International Conference & Exhibition

Şekil 4. Mikroakış Dijital Görüntüleme Tekniğinin Çalışma Prensibi ve Özellikleri (4a) ve Mikro akış dijital görüntüleme yöntemi ile elde edilen görüntüler (4b)

Figure 4. Principle and Characteristics of Microflow Digital Imaging (4a) and images taken by Microflow digital imaging method (4b)

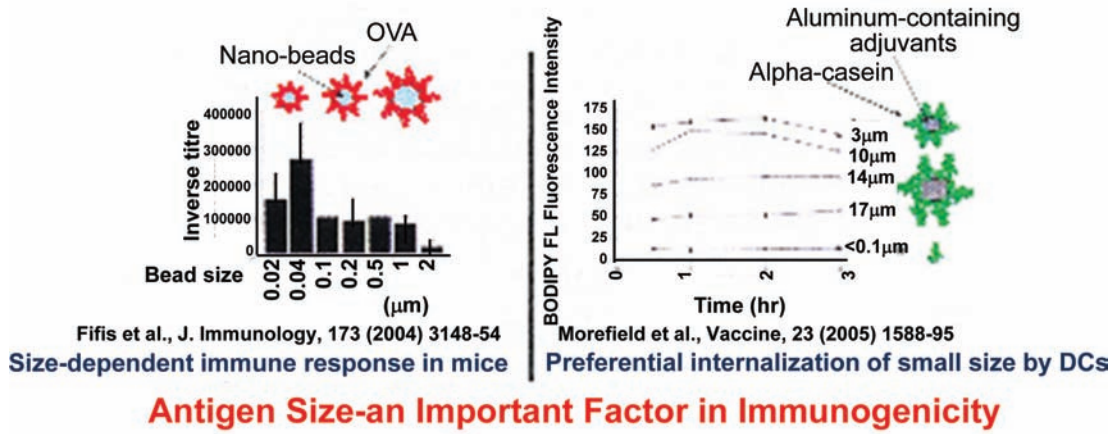
Şekil 1'de gösterildiği üzere, 0.1-0.2 μm'nin altındaki protein oligomer / aggregate'ları, 10 μm ve 25 μm'nin üzerindeki çözünür olmayan partikül maddeler, ve gözle tespit edilebilen partiküllerin analizi ve regülasyonlara göre izlenmesi mümkündür. Öte yandan, yakın zamana kadar, 0.1-0.2 μm ve 10 μm aralığındaki partiküllerin analizi ve regülasyonlara göre izlenmesi söz konusu değildi. Bu nedenle, bu partiküller "subvisible partikül" (SVP)³ olarak adlandırılmaktadır. Yakın zamanda, bu büyüklükteki partiküllerin yüksek immunojenite özelliği gösterdiği doğrulanmıştır [Şekil 5]. SVP'nin analiz edilememesinin nedeni bu konuda yeterli analitik metodların olmaması idi. Resonant Mass ölçümü

As indicated in Figure 1, protein oligomers/ aggregate less than 0.1-0.2 μm, insoluble particulate matters over 10 μm & 25 μm, and particles able to be detected by visual inspection are evaluated/ regulated. It means particles between 0.1-0.2 μm and 10 μm has not been evaluated/ regulated at present. Therefore, this size of particles is classified/ defined as Subvisible particles (SVP)³. Recently, the particles of this size exhibits a high immunogenicity has been confirmed [Figure 5]. One of the reason why SVP has not been evaluated is lack of analytical methods. Archimedes using Resonant Mass measurement, NanoSight using nanoparticle tracking analysis, and Aggregates Sizer

kullanan Archimedes, nanopartikül izleme analizi yöntemi ile çalışan NanoSight, ve Laser Diffraction/ Scattering metoduna dayalı Aggregates Sizer, SVP ölçümleri için özel olarak geliştirilmiş olan cihazlardır [Şekil 1].

using Laser Diffraction/ Scattering method are the devices specially made for evaluating SVP [Figure 1].

How does the Immune System Respond To Particulates $\leq 10\mu\text{m}$



Şekil 5. Farklı boyutlarda protein içeren partiküller için immünojenitenin ölçümü
Figure 5. Evaluation of immunogenicity for different size of protein containing particles

Bu arada, "2nd Progress and Challenges in Protein Particles and Immunogenicity of Biotherapeutics 2015" kongresinde SVP'nin tanımının mevcut 0.2 – 10 µm aralığındaki partiküller yerine 1 – 100 µm aralığındaki partiküller olarak değiştirilmesi önerilmiştir. [Şekil 1]. Archimedes ve NanoSight gibi SVP analiz cihazları yeni tanımlanan SVP aralığının ölçümünde yetersiz kaldığı için, FDA orthogonal metodların kullanımı önermektedir⁴. Aynı partiküllerin kantitatif ölçümleri konusunda son derece iyi sonuçlar veren [Şekil 6] Mikro akış Dijital görüntüleme metodu ve Aggregates Sizer, [Şekil 7], yeni tanımlanan aralıktaki SVP'lerin ölçümünü mümkün kılmaktadır.

By the way, it was suggested that the definition of SVP may change from the current particle size range of 0.2 – 10 µm to particle size range of 1 – 100 µm at "2nd Progress and Challenges in Protein Particles and Immunogenicity of Biotherapeutics 2015" [Figure 1]. Since SVP analyzing devices such as Archimedes and NanoSight are not capable of evaluating new SVP range, and use of orthogonal methods are recommended by FDA⁴, use of Microflow Digital imaging method and Aggregates Sizer, which has quantitatively comparable measuring ability of same particles [Figure 6], are highly recommendable for evaluation of SVP with new SVP range.

Şekil 6. Aggregate Sizer ve MFI ile agregat ölçümü sonuçlarının karşılaştırılması

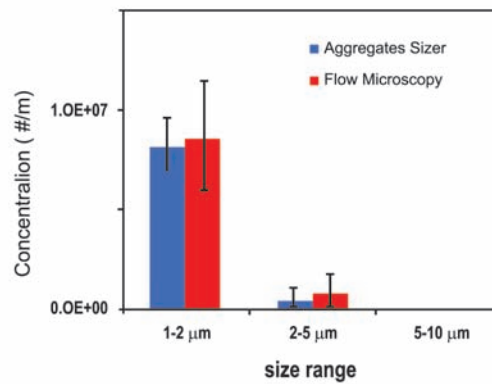


Figure 6. Comparison of aggregates analysis results between Aggregate Sizer and MFI

Sample: IVIG solution (0.87 mg/mL, PBS pH 7.4)
Stress: Heat stressed for 15 min. at 70°C

Totoki., et al. (2015) J. Pharm. Sci.



Şekil 7. Aggregates Sizer (SALD) [Ölçüm aralığı: 7 nm – 800 um]
Figure 7. Aggregates Sizer (SALD) [Working range: 7 nm – 800 um]

Sonuç olarak, biyofarmasötik ilaçlardaki protein oligomerleri / agregatlar, çözünmeyen partiküller ve SVP'ler tanımlanmış ve halen kullanılan ölçüm metodlarının doğruluğu ile ilgili birçok problem olduğu gözlemlenmiştir. Başlangıçta belirtildiği üzere, biyofarmasötik ilaçlarda oluşması muhtemel ve hastanın güvenliği açısından bir risk oluşturan agregasyondan kaynaklı immünojenesitelere rastlanabilmektedir. Lazer Difraksiyon / Saçılma tekniği (Aggregates Sizer), geniş ölçüm aralığı sebebiyle (7 nm – 800 um) visible ve SVP ölçümleri için güvenle kullanılabilir bir tekniktir.

Kaynaklar:

1. Shire SJ. Assessment of Self-Association of Protein Therapeutics at High Concentration and its Impact on Viscosity. International Light Scattering Colloquium 2006.
2. Thomas D. Particle Characterization Using Flow Microscopy. 2008 BioProcess International Conference & Exhibition: Formulation Strategies for Protein Therapeutics
3. Carpenter JF. et al. 2008. Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. J Pharm Sci, ODI: 10.1002/jps.21530.
4. Susan L. Kirshner. Regulatory Expectations for Analysis of Aggregates and Particles. 2014 Workshop on Protein Aggregation and Immunogenicity, 2014.July 17th.

Finally, quantitative evaluation methods of protein oligomers / aggregates, insoluble particles, and SVP in biopharmaceuticals have been described, and it is true that there are many problems in accuracy for evaluation methods using at present. As mentioned at the outset, immunogenicity occurs due to the aggregation phenomena of the biopharmaceuticals has become risk to the patient's safety. It can be said that Laser Diffraction / Scattering (Aggregates Sizer) technique for evaluating aggregates/SVP/insoluble particles in biopharmaceuticals is recommendable due to its wide measurement range (7 nm – 800 um).

Resources:

1. Shire SJ. Assessment of Self-Association of Protein Therapeutics at High Concentration and its Impact on Viscosity. International Light Scattering Colloquium 2006.
2. Thomas D. Particle Characterization Using Flow Microscopy. 2008 BioProcess International Conference & Exhibition: Formulation Strategies for Protein Therapeutics
3. Carpenter JF. et al. 2008. Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. J Pharm Sci, ODI: 10.1002/jps.21530.
4. Susan L. Kirshner. Regulatory Expectations for Analysis of Aggregates and Particles. 2014 Workshop on Protein Aggregation and Immunogenicity, 2014.July 17th.