



トータル・ホログラフィック・キャラクタリゼーション® (THC) を用いた蛋白質凝集体の検出、識別、定量 (個数カウント)

序論

蛋白質凝集体は、バイオ医薬品業界における主要な課題です[1-6]。FDA は、蛋白質ベースの製剤中の蛋白質凝集体の存在によって誘発される免疫原性応答の危険性を強調しています[7]。特に 200nm~2 μ m のサイズ範囲の蛋白質凝集体の濃度を正確に検出し、それらの形成メカニズムを理解することは、最大の薬効と安全性を確保するために重要です[8-11]。バイオ製剤中には、蛋白質凝集体に加えて、他の一般的な汚染物質として、シリコンオイル、気泡、金属粒子、他の賦形剤もしくは界面活性剤の劣化品の混入が考えられます[12-15]。蛋白質凝集体と他の汚染物質を区別するには、粒子組成を決定する必要があります。しかしながら、現在、懸濁液中のサブミクロン粒子を正確にカウントし、同時に粒子組成を決定することができる技術は、殆どありません。

ここでは、蛋白質凝集体を検出、識別、カウントできる革新的な測定技術であるトータル・ホログラフィック・キャラクタリゼーション® (THC) について説明します[16-18]。THC は、個々の粒子の正確な定量情報と、サンプル特性の統計的概要の双方を提供する効率的な光学的アプローチ方法です。THC の本質的な利点は、粒子径に加えて、粒子の屈折率も決定できることです。屈折率は、粒子の組成を明らかにし、同じ粒子径の場合でも異なる材料の粒子を識別するために使用できます。以下の図 1 は、この

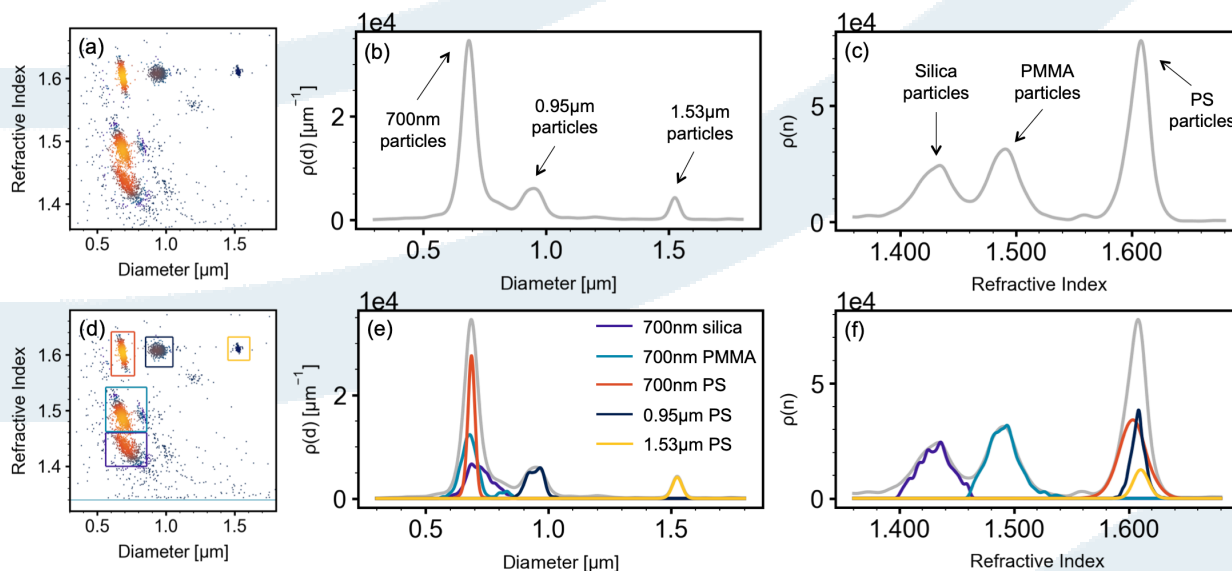


図1: 次の微粒子を含む試料の THC 分析の結果: 700nm のシリカ、700nm の PMMA、700nm の PS、0.95 μ m の PS 及び 1.53 μ m の PS。(a) 粒子径(横軸)と屈折率(縦軸)の散布図。色は領域内のポイントの密度(粒子数)を表し、暖かい色(黄色)は、密度の高いことを示し、冷たい色(青)は密度の低いことを表しています。(b) 同じ試料の粒度分布。(c) 同じ試料の屈折率分布。(d) (a)と同じ散布図で、各分子種集団ごとに色付きボックスで囲んでいます。(e) (b)と同じ粒度分布。粒子種ごとの粒度分布は(d)で指定したボックスに基づいています。(f) (c)と同じ屈折率分布。分子種ごとの屈折率分布は、(d)で指定したボックスに基づいています。

技術の独自の強みを示しています。図 1a は、3 つの異なる粒子径、3 種の材料で作られた 5 つの異なる粒子の混合試料を、THC を利用した xSight により測定した結果を示しています。横軸は直径、縦軸は屈折率とした散布図です。プロット上の各ポイントは、xSight により検出された単一粒子を表しています。各ポイントの色は、領域内の粒子密度を表しています。暖かい色（黄色）は密度の高い領域を表し、冷たい色（青）は密度の低い領域を示します。このプロットでは、粒子径 700nm の粒子が 3 種、0.95 μ m の粒子が 1 種、1.53 μ m の粒子が 1 種、合計 5 つのクラスターがあることを確認できます。これらのクラスターは、この試料に存在する 5 つの異なる種に対応し、各々、図 1d に示すユーザー定義の色付きボックスで示すことができます。

図 1b は、同じ測定における粒子个数基準の粒度分布を示しています。最も高いピークは、粒子径 700nm 付近にあり、この試料に最も多く含まれる粒子の粒子径は約 700nm であることが判ります。他の 2 つのピークは、0.95 μ m の粒子と 1.53 μ m の粒子を示しています。この種の粒度分布曲線は、他の粒子計測技術でも得ることはできますが、そのほとんどが、粒子径は決定できるものの、試料に存在する粒子種の数と特定することは不可能です。この種の粒度分布曲線からは、実際には 5 種の粒子種が混在されているにも関わらず、3 種の粒子種しか含まれていないと誤って結論付けられます。xSight の測定では、図 1d に示すように、屈折率の違いからクラスターを区別することにより、5 種の存在を明らかにします。図 1e は、図 1b と同じ粒度分布曲線を示していますが、図 1d のユーザー定義領域の色に応じて、各粒子種の粒度分布曲線も追加しています。図 1e では、最も高い 700nm 粒子のピークを 3 つに分離し、そこに材料の異なる 3 種の粒子が含まれていることを示しています。（オレンジ、シアン、紫の曲線で表示しています）。xSight で自動的に測定される各粒子の屈折率を用いて、各粒子の組成を識別できます。

図 1c は、屈折率密度分布を示しています。ここでの 3 つのピークは、この試料に、屈折率が 1.43、1.49、1.61 の 3 種の異なる組成の粒子が含まれていることを示しています。これらの屈折率は、各々シリカ、メタクリル樹脂（PMMA）、ポリスチレン（PS）に相当します。この試料には、他のどの材料よりも多くの PS 粒子が含まれているため、PS ピークが最も高くなります。図 1f は 1c と同じ屈折率分布曲線を示しており、5 種類の粒子が各々の色で識別されています。この試料では PS ピークを直径 700nm、0.95 μ m、1.53 μ m の 3 種の PS 粒子に分けることができます。

このように xSight は、PS、PMMA、シリカ粒子を区別できますが、同様に蛋白質凝集体を、シリコンオイルや界面活性剤の分解生成物など他の汚染物質から区別することができます。蛋白質のモデル試料の測定例を以下に示し、この機能を実証します。

測定方法

ここで実施する全ての測定は、xSight で行われています。xSight は、30 μ L の試料をマイクロ流体サンプルチップである xCell に入れ、スタートボタンを押すだけで測定を開始します。スタートボタンを押すと、試料は xCell のマイクロ流体チャンネルに自動的に送液されます。測定部にはレーザーが照射され、試料が測定部を通過する際に観測される粒子ホログラムを記録し、分析を開始します。xCell の測定チャンネルは試料ごとに独立しているため、測定ごとに洗浄の必要が無く、相互汚染の危険性もありません。分析時間は、粒子濃度とユーザーが選択した測定容量に応じて、10~40 分掛かります。測定容量は 0.2~5 μ L の範囲で選択できます。データが分析されると、結果はリアルタイムで画面にプロットされます。分析中、測定容量を正確に計測し、その中の粒子をカウントするため、正確な濃度を得ることができます。xSight は、粒子カウントと濃度に加え、検出した粒子の粒子径、屈折率及び形態をレポートします。

IgG 蛋白質凝集体とその他の汚染物質など、このアプリケーションノートに記載されている試料の調製については、幾つかの論文[16-18]で詳しく説明されており、ここでは簡単に概説します：

- IgG 溶液は、ヒト IgG をろ過したイオン交換水に、室温で 1mg/mL の濃度に溶解することにより調製しました。蛋白質凝集体は、室温で自発的に形成されました。
- シリコンオイルエマルジョンは、イオン交換水にシリコンオイルを加え、試料を手で激しく振とうすることにより調製しました。
- オレイン酸試料は、オレイン酸をメタノールに 20% 溶解した後、イオン交換水で 10 倍希釈すること

により作成しました。

- 気泡試料は、ポリソルベート20 (1mg/mL) とスクロース (64wt%) の水溶液をシリンジから素早く排出することにより作成しました。

結果

蛋白質凝集体とシリコンオイルの識別

製剤中の蛋白質凝集体の濃度を正確に測定するには、それらを他の汚染物質と識別することが不可欠です。シリコンオイルは、注射器やプラスチックチューブ、その他の医療機器や実験装置の表面から容易に溶出するため、バイオ医薬品製剤中に、よく見られます。xSight は、粒子の屈折率から組成を特定することにより、同じ大きさの粒子であっても、異なる種の粒子を識別できます。下の図 2 は、水中の IgG 蛋白質凝集体とシリコンオイルの混合物を示しています。図 1a と同様に、図 2a は散布図であり、プロット上の各ポイントは xSight で検出された単一の粒子を表しています。図 2a の右上のカラーバーで示されているように、各ポイントの色は領域内のポイント（粒子）の密度を表し、暖かい色（黄色）は、高密度（粒子数が多い）の領域を表し、冷たい色（青）は低密度（粒子数が少ない）の領域を表しています。

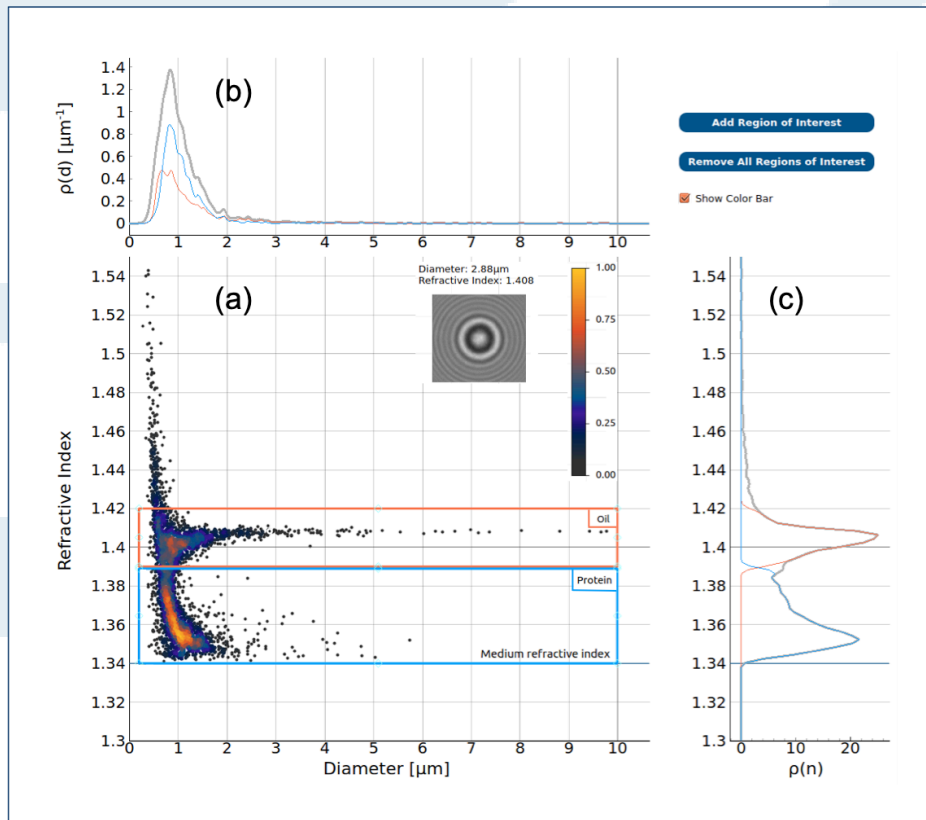


図 2: (a)xSight ソフトウェア画面から取得した検出したシリコンオイルと IgG 凝集体の粒子径と屈折率の散布図。各ポイントは単一粒子の測定値を示します。色は密度（粒子数）を表しており、黄色は最高密度、灰色は最低密度を表しています。挿入画像は、直径 2.88μm、屈折率 1.408 の単一のシリコン油滴のホログラムです。
(b) 粒度分布曲線：オレンジはシリコン油滴を示すオレンジ色ボックス内のデータに対応する曲線、シアンは蛋白質凝集体を示すシアン色ボックス内のデータに対応する曲線、灰色は、全てのデータを示した曲線です。
(c) (b)と同じ色の屈折率分布曲線。

縦軸は粒子の屈折率、横軸は粒子径です。屈折率が 1.41 に近い粒子は、シリコンオイルの屈折率 (1.41) に相当し、シリコンオイルの油滴として識別できます。1.34~1.39 の低屈折率粒子は、蛋白質凝集体として識別できます。オレンジとシアンのボックスは、1つの試料内の様々な種類の粒子を描写することを目的としたユーザー定義の関心領域です。ここでは、オレンジ色のボックスには油滴が含まれ、シアン色のボックスには蛋白質凝集体が含まれています。ここに示すデータは、この試料 3μL 中に検出された

3,995 個の粒子の特性を表しており、そのうち 1,553 個はシリコンオイル、2,159 個は IgG 凝集体として識別されます。ユーザーが、任意のポイントをクリックすると、図 2a の挿入図として表示されているように、その粒子の代表的なホログラムが表示されます。

シリコンオイルと蛋白質凝集体は、屈折率が異なるため、xSight で簡単に識別できます。図 2a では、2 種の粒子を明確に区別するために、2 つの関心領域（オレンジ色とシアン色のボックス）に分類しています。図 2c に示す屈折率分布にて、それらがどれほど区別できたかを確認できます。また図 2b に示す粒度分布曲線では、特定の粒子径における特定の粒子種の量を確認できます。オレンジ色の曲線は、オレンジ色のボックスで囲まれたポイントを示し、シアン色の曲線は、シアン色のボックスで囲まれたポイントを示し、灰色の曲線は、全てのポイントを示しています。図 2b のオレンジ色とシアン色の曲線の重なりは、シリコンオイルと蛋白質凝集体の粒子径が類似していることを示しています。これらの類似した粒度分布を持つ粒子種を区別することは、他の粒子計測技術では困難です。THC 法のユニークな利点は、粒子径に加えて粒子の屈折率を決定できることです。図 2c に示す屈折率分布では、オレンジ色とシアン色の曲線は、明確に分離されており、THC 法が、粒子の物理的特性の客観的な測定に基づいて、この試料中の 2 つの粒子種を区別する能力があることを示しています。

粒子径と屈折率の測定に加えて、xSight ソフトウェアは、図 3 に示すように粒子濃度も算出します。図 2 と同様に、オレンジ色の曲線はシリコンオイルとして識別された粒子を示し、シアン色の曲線は蛋白質凝集体として識別された粒子を示し、濃い青色の曲線は検出された全ての粒子を示します。図 3 の下部の表は、1 μ m の粒子径ごとの累積粒子個数及び濃度を示したものです。

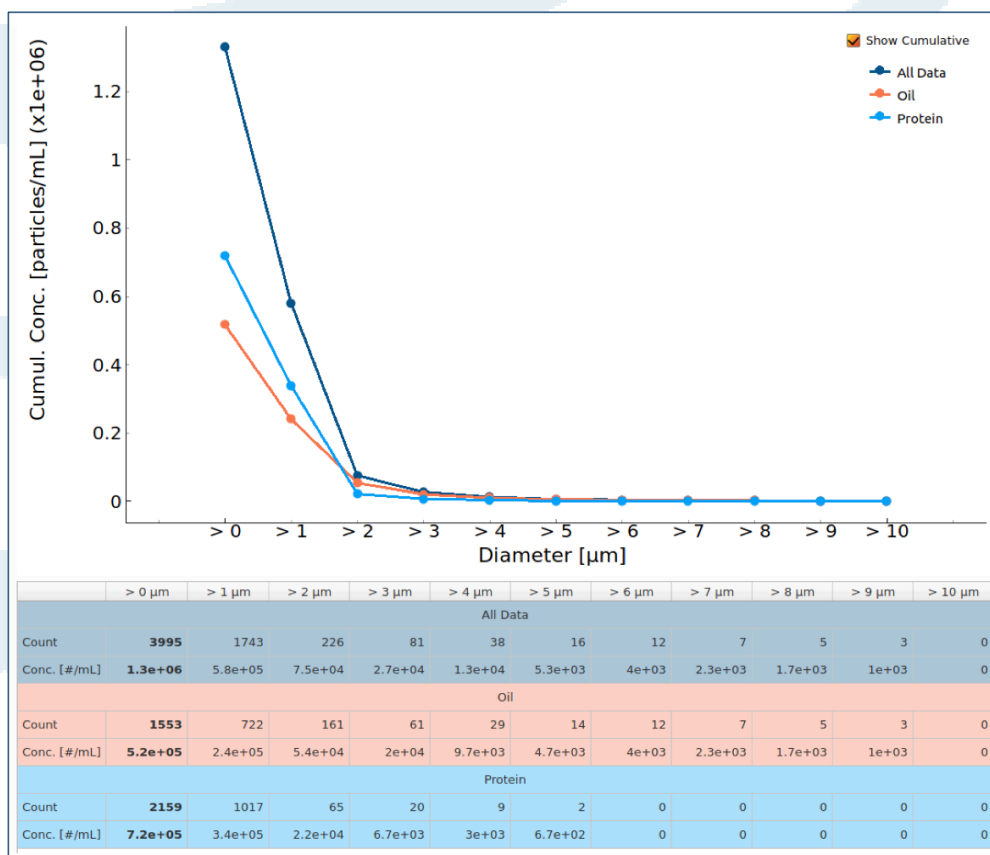


図 3: このプロットとデータの表は、xSight ソフトウェアの表示画面から取得したものです。上のグラフは、粒子径に対する累積粒子濃度の関数を示しています。オレンジ色の図 2 でシリコンオイルと識別された粒子に対応し、シアン色の曲線は蛋白質凝集体として識別された粒子に対応し、濃い青色の曲線は全ての粒子に対応します。下の表は粒子濃度と個数を 1 μ m のビンに分類し、各試料の累積濃度と個数を表示しています。

蛋白質製剤中の他の汚染物質の中で界面活性剤の劣化物を識別及び区別します

界面活性剤は、バイオ医薬品製剤に一般的に使用されていますが、界面活性剤の分解生成物は、蛋白質凝集体と区別するのが難しい場合があります。ポリソルベート 20 の一般的な分解生成物の 1 つは、オレイン酸です。下の図 4 は、蛋白質凝集体とシリコンオイルの混合物中に含まれるオレイン酸を検出、識別し、定量化する能力があることを示しています。図 4 は、水中のシリコンオイル油滴、蛋白質凝集体、オレイン酸液滴の混合物からなる試料、5 μ L 中の 4,875 個の粒子データを表示しています。図 4a は、図 2a と同様に、粒子の屈折率と粒子径を示した散布図です。図 2a とは異なり、ここでは 3 つの異なる粒子種を簡単に識別しています。約 1.48 を中心とする最も高屈折率の母集団は、オレイン酸として識別され、紫色のボックスで囲まれています。図 2a と同様に、約 1.41 の屈折率を中心とする母集団はシリコンオイル（オレンジ色のボックス）であり、1.34~1.39 の最低屈折率の母集団は IgG 凝集体（シアン色のボックス）です。3 種全ての粒子径は類似しているため、図 4b に表示される粒度分布は、重複しています。このことは、粒子径に基づいて、これらの汚染物質を区別することが、いかに困難であることを示しています。特に粒子径のみの情報では、この試料中に存在するオレイン酸を検出することは、ほぼ不可能です。粒子の屈折率を測定することにより、図 4a における色付きボックスの分離と、図 4c の屈折率分布曲線において、3 つのピークが分離されていることから明らかなように、3 種の粒子を区別できます。

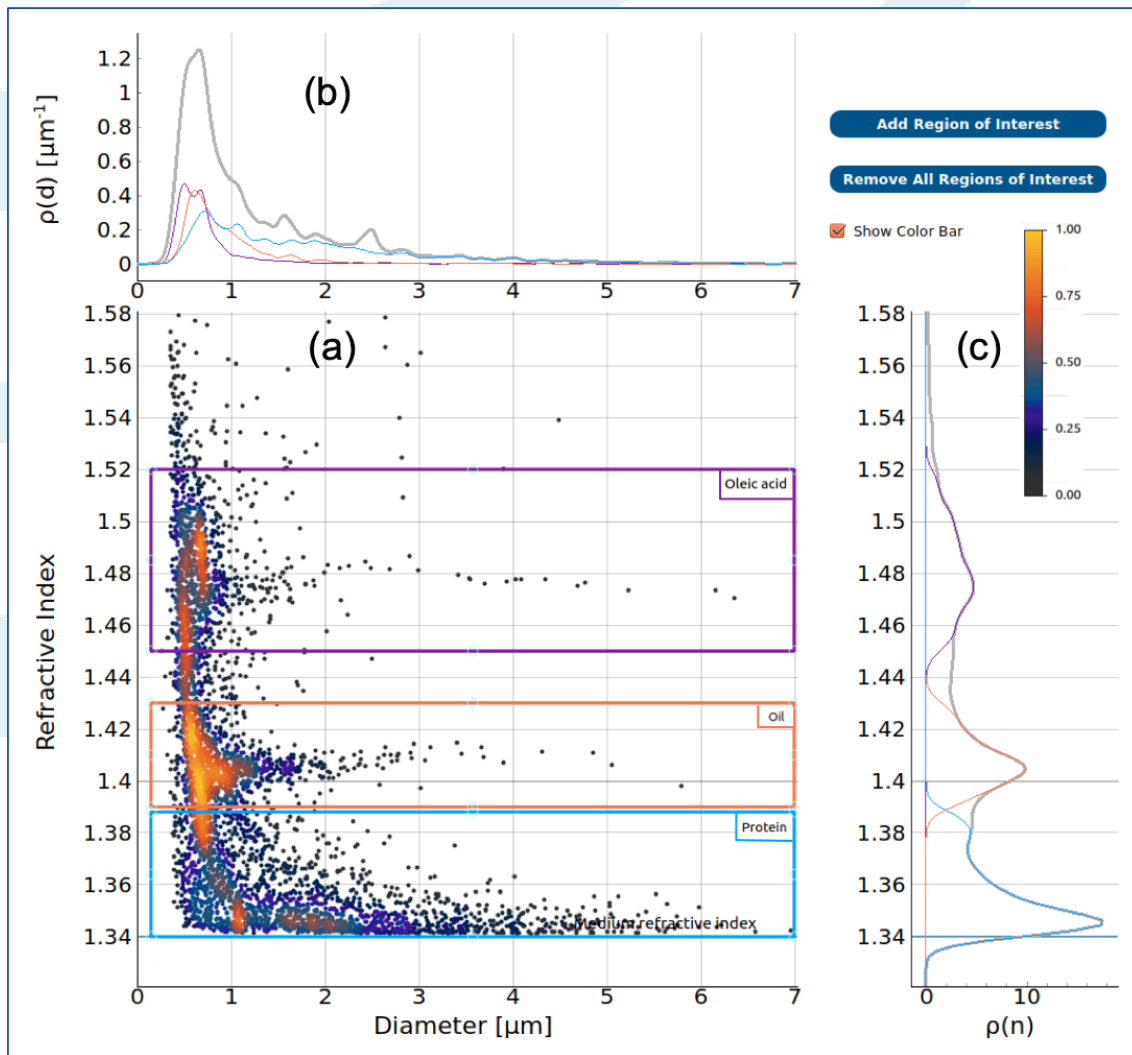


図 4: IgG 凝集体、シリコンオイル、オレイン酸の散布図及び粒度、屈折率分布

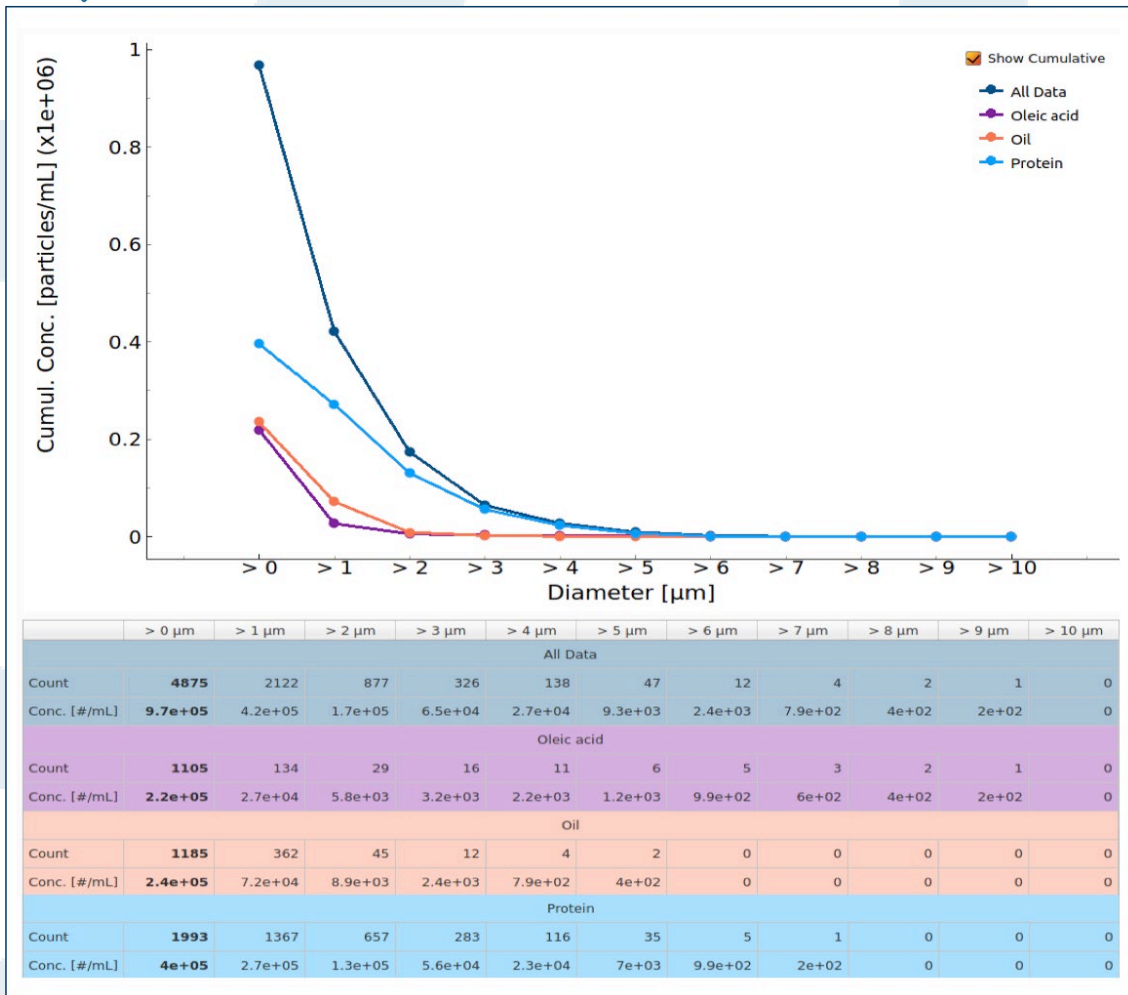


図 5: シリコンオイル、蛋白質凝集体、オレイン酸の粒子径と濃度の累積分布曲線

xSight は、1 回の測定で、オレイン酸などの界面活性剤分解生成物を検出するだけでなく、各汚染物質の正確な濃度を同時に測定します。図 5 は、図 4 で示した 3 種の粒子の累積濃度のグラフと表を示しています。表は、1μm ごとに 3 種の粒子の濃度をサイズ別に分類したものです。

気泡の検出とシリコンオイルとの識別

蛋白質製剤のもう 1 つの一般的な汚染物質は気泡です。気泡は急激な放出や激しい攪拌を受けた際に粘性のある試料で形成されることがあります[19, 20]。気泡は特定が難しいことで知られていますが、屈折率を測定することで、他の汚染物質と簡単に区別できます。図 6 は、シリコンオイルと気泡の混合物の THC 分析結果を示しています。この図は、2,816 個の粒子のデータを示しており、そのうち 2,616 個はシリコンオイル油滴として識別され、197 個は気泡として識別されています。上記の図のように、シリコンオイル油滴は、屈折率 1.41 付近に現れ、図 6a のオレンジ色のボックスで囲まれています。空気の屈折率は 1 であるため、気泡は屈折率 1.0 付近に現れ、シアン色のボックスで囲まれています。気泡の存在は、図 6b の粒度分布では、殆ど目立たないものですが、図 6c の屈折率分布では、明確に目立っています。図 6c のオレンジ色の曲線はシリコンオイル油滴を表し、下部にある小さなシアン色の曲線は気泡を表しています。これら 2 種の屈折率は大きく異なるため、xSight は、気泡を簡単にかつ間違いなく区別できます。

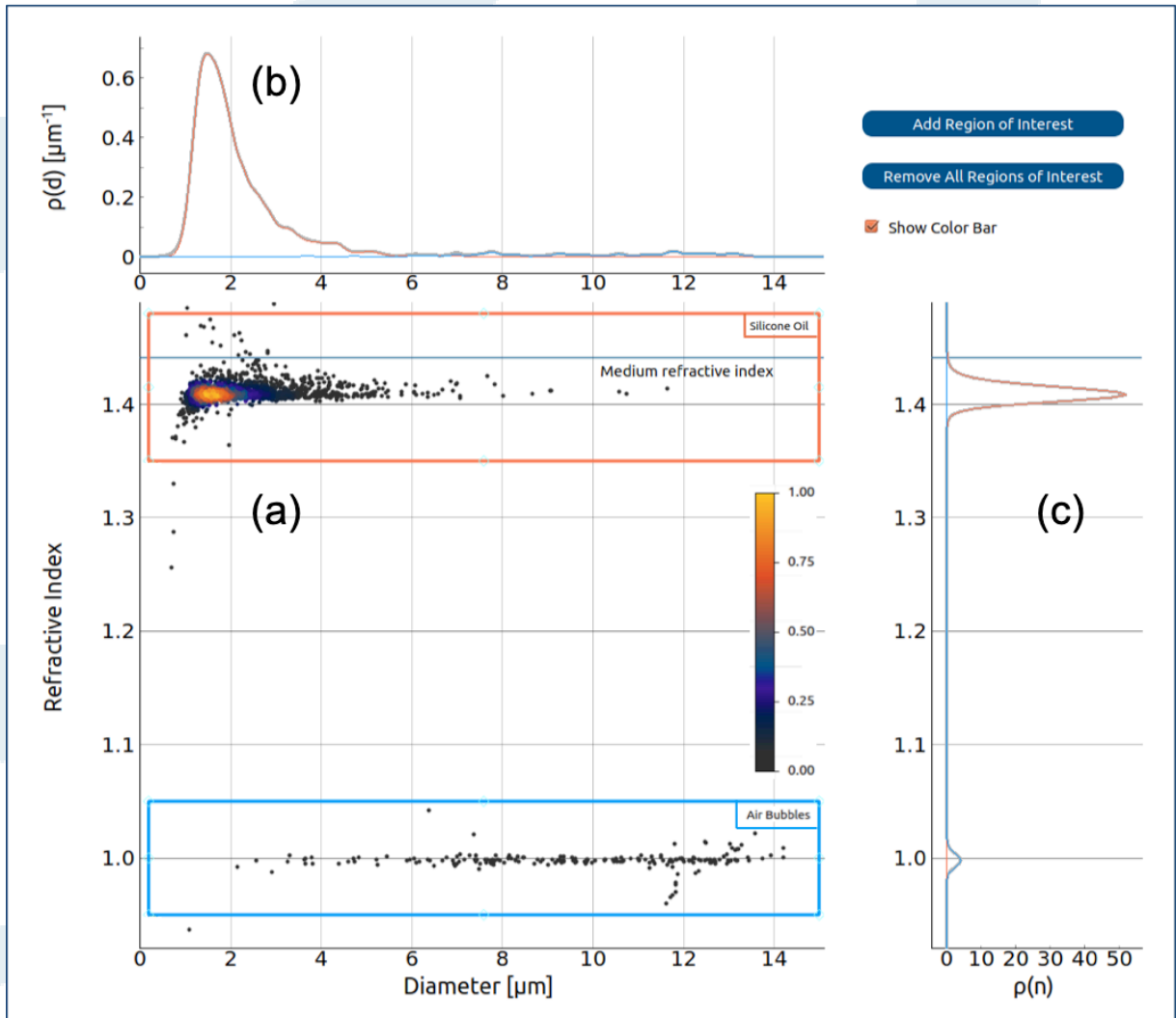


図 6: シリコンオイルと気泡の散布図と粒度及び屈折率分布。

形態情報から他の汚染物質の中から蛋白質凝集体を区別し、より適切に特徴付ける

粒子径と屈折率に加えて、Spheryx は新しい粒子特性評価ツールである粒子形態も提供できるようになりました。下の図 7 は、図 2 と同じ試料（シリコンオイルと IgG 凝集体の混合物）を示していますが、色はポイントの密度（粒子数）ではなく、粒子形態に基づいています。図 7a では、球状の粒子はシアンに、棒状の粒子は黄色に、他の形状の粒子はオレンジに、信号が小さすぎて正確な形状を決定できない粒子は灰色で示しています。図 7a の紫色のボックスは、粒子径 800~10μm 範囲のシリコンオイル油滴を示しています。懸濁液中の油滴は球状であり、紫色ボックス内のポイント（粒子）の主要な形態(98%)は、球状の形態を示すシアンです。800nm 未満の粒子は、S/N 比が低く、正確な粒子形態を決定できないホログラムを生成することが多く、これらの粒子の殆どは未決定(undetermined)としてラベル化されます。この試料では、1.34~1.39 の屈折率で見られる IgG 凝集体は、3つの異なる形態を示しています。粒子径が約800~1.5μm、屈折率が1.37~1.39 の場合、IgG 凝集体は球状に見えますが、1.5~3.5μmの凝集体の殆どは棒状に見え、3.5μm より大きなものは、他のより複雑な形状になります。この形状パターンは、蛋白質凝集体の THC測定によく見られますが、試料ごとに異なる可能性があり、更に調査する必要があります。

図 7a の挿入図は、3 つの異なる形態のホログラムの例を示しています。左側のシアン枠線で囲まれているホログラムは、屈折率1.407 のシリコンオイル油滴のもので、ホログラムの高度に対称なリングパターンは、球状(Spherical)のもものと一致しています。黄色枠線で囲まれた中央のホログラムは、直径2.51 μm 、屈折率 1.350 の IgG 凝集体のもので、このホログラムの干渉パターンは、典型的な棒状であり、棒状のような(Rod-Like)形態と一致しています。オレンジ枠線で囲まれた右側のホログラムは、直径5.04 μm 、屈折率 1.343 の IgG 凝集体のもので、このホログラムの干渉パターンは複雑で、複雑な粒子の形状を示しており、この図における形態の割り当てには、「その他の形状(other shape)」というラベルが付けられています。

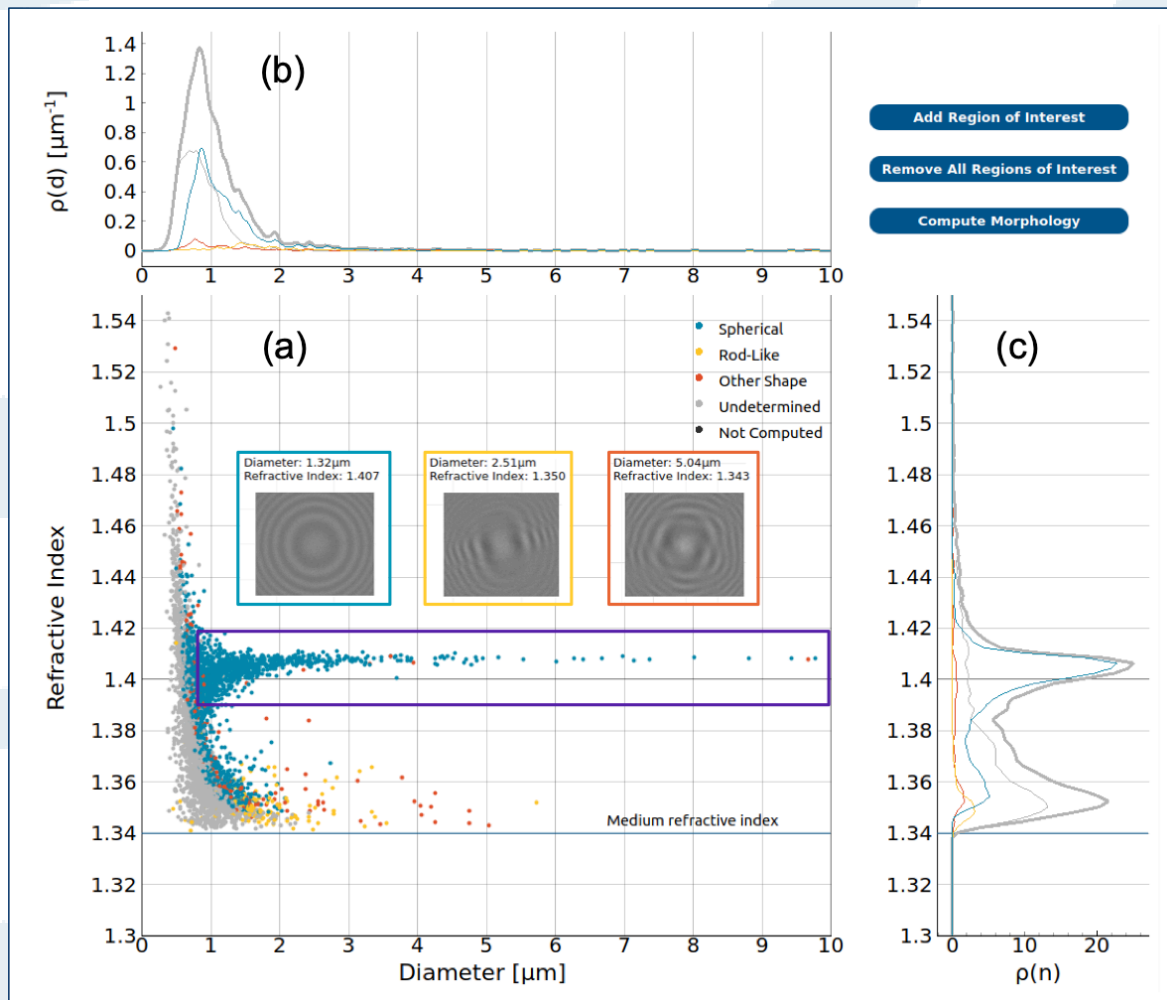


図 7: (a) 粒子形態に基づいたポイントの色分けをした図 2 と同じ試料の粒子径と屈折率の散布図。球状の粒子はシアン、棒状の粒子は黄色、他の形状の粒子はオレンジ、形状未決定（正確な形態識別のためには信号が弱すぎるため）の粒子は明るい灰色で表示しています。ホログラムの挿入図は、3 種の異なる形態の粒子のもので、(b)(a)と同じ配色の粒子径分布。灰色の曲線は全粒子のデータを示しています。(c) (a)と同じ配色の屈折率分布。灰色の曲線は全粒子のデータを示しています。

図 7b と 7c は、各々粒度分布と屈折率分布を示しています。シアンの曲線は球状粒子の分布を、黄色の曲線は棒状粒子の分布を、オレンジ色の曲線は他の形状の粒子の分布を、明るい灰色の曲線は未決定の粒子を、濃い灰色は、この試料中の全ての粒子の分布を示しています。

油滴と蛋白質凝集体は、主に屈折率で区別できますが、一部の蛋白質粒子は、屈折率 1.41 付近に現れ、油滴と混同されることがあります。このような場合、形態の識別は、2 つの種を区別するのに役立ちます。

下の図8 は、図4 に示したものと同一試料（オレイン酸、シリコンオイル、IgG 凝集体の混合物）の形態特性を示しています。この試料に含まれる 2 つのエマルション（シリコンオイルとオレイン酸）は、懸濁液中の液滴は球状であるため、球状の粒子を示すと予想されます。オレンジと紫の枠で描かれたボックス内のポイントの大部分は、球状を示すシアン色です。図 7 と同様に、屈折率 1.39 未満の IgG 凝集体には、球状粒子、棒状凝集体、及びより複雑な形状の 3 つの異なる形態が混合していることを示しています。

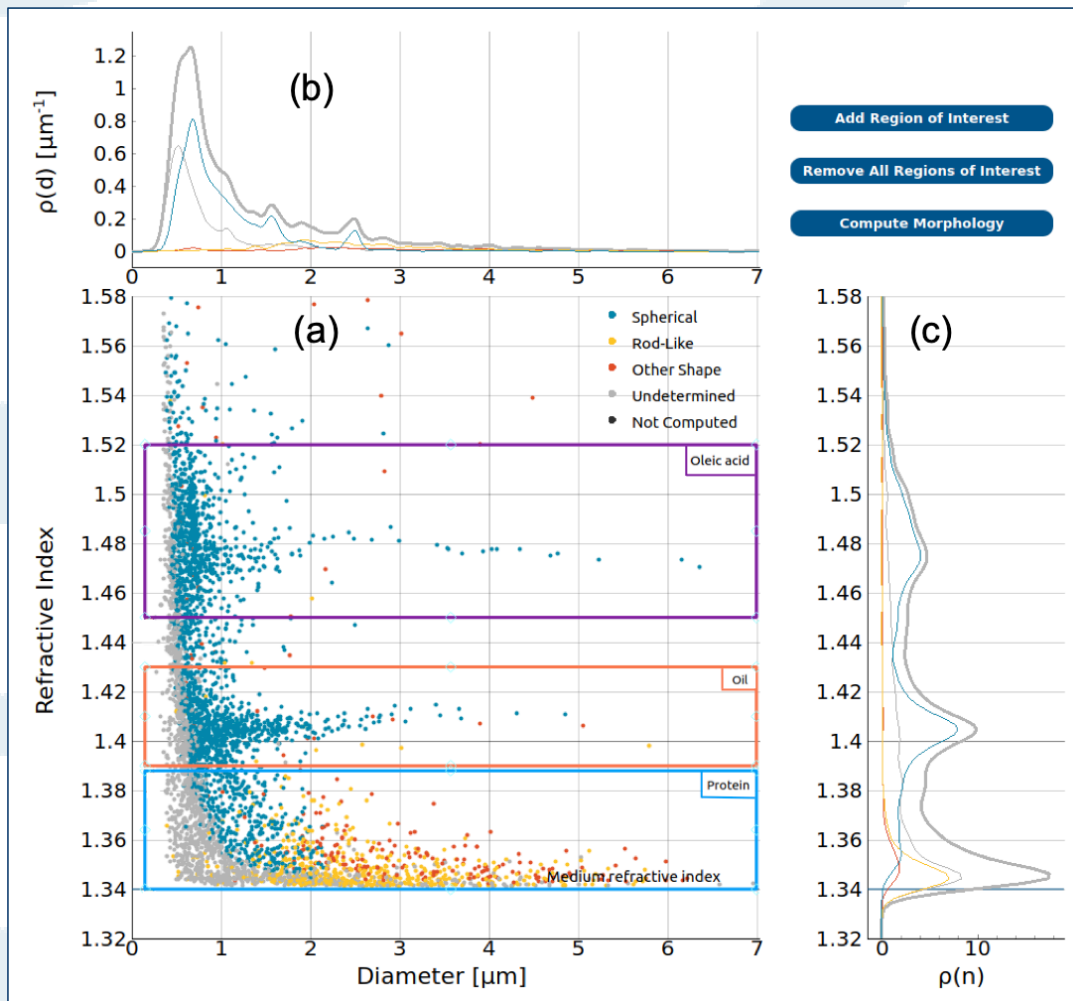


図 8: 図 7 と同様に、粒子形態に基づいたポイントの色分けをした、オレイン酸、シリコンオイル、蛋白質凝集体の粒子径と屈折率の散布図

THC は、蛋白質凝集体やその他の汚染物質の堅牢で再現性のある結果を提供します

蛋白質製剤の分析をする上で、測定の再現性は非常に重要です。以下の粒度分布（図 9a）と屈折率分布（図 9b）は、水中に IgG 凝集体とシリコンオイルを含む試料を xSight で 16 回測定した結果です。この試料の IgG 凝集体の濃度は $2.9 \pm 0.3 \times 10^5$ 粒子/mL、粒子径は $1.25 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 、屈折率は 1.350 ± 0.001 です。シリコンオイル油滴の濃度は $6.6 \pm 1.0 \times 10^5$ 粒子/mL、粒子径は $1.04 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、屈折率は 1.41 ± 0.001 です。曲線は優れた再現性を示しています。

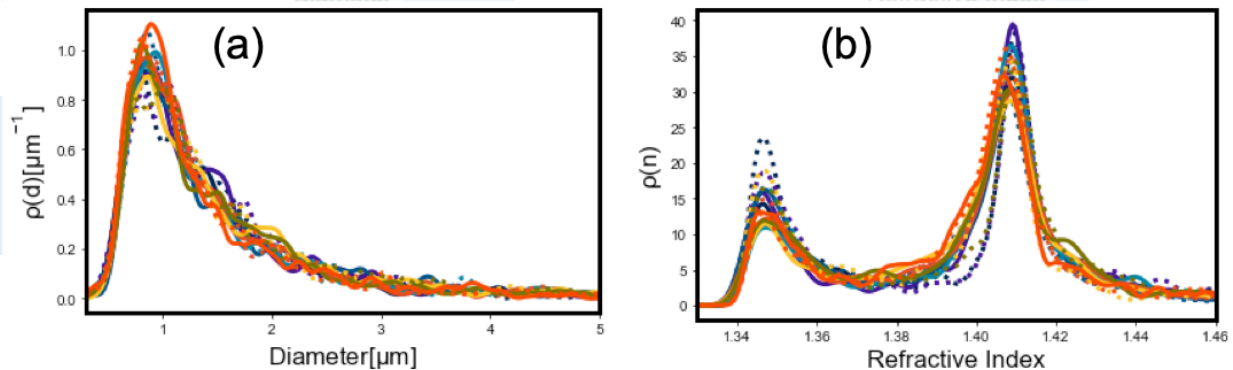


図 9: IgG 凝集体とシリコンオイル混合物を16回測定した際の粒度分布と屈折率分布を重ね書きしたものの

結論

THC は蛋白質製剤中の蛋白質凝集体及び他の一般的な汚染物質の同定と特性評価に、有益で定量的な独自のアプローチを提供します。THC は、粒子径に加え、粒子の屈折率と形態を測定することにより、同じ試料内の複数の分子種が類似した粒子径であっても、それらを識別できます。更に xSight は、1 回の測定で、複数種の粒子の正確な濃度を再現良く求めることができます。このアプリケーションノートでは、シリコンオイル、オレイン酸、気泡などの汚染物質と混合された IgG 凝集体を識別し、各々定量する機能を紹介しました。また、xSight が信頼性と再現性の高い結果を提供することも明らかにしました。THC を使用するこのアプローチにより、試料をより深く、より正確に理解することができます。更に、Spheryx が提供するソフトウェアは、粒子ごとの特性評価と統計的な情報をユーザーに提供します。

著者

Dr. Rostislav Boltyanskiy,
Spheryx Senior Scientist II & Director of Scientific Communications

日本語訳：昭光サイエンス株式会社

より詳細な情報は、以下にお問い合わせください。:

日本語：info@shoko-sc.co.jp 英語：info@spheryx.solutions

参考文献

1. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:457– 462.
2. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in bio- pharmaceuticals. *Int J Pharma.* 2005;289:1–30.
3. Carpenter JF, Randolph TW, Jiskoot W, Commelin DJA, Middaugh CR, Winter G, et al. Overlooking sub- visible particles in therapeutic protein products: Gaps that may compromise product quality. *J Pharm Sci.* 2009;4:1201– 1205.



4. Singh SK, Afonina N, Awwad M, Bechtold-Peters K, Blue JT, Chou D, et al. An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics. *J Pharm Sci.* 2010;99:3302–3321.
5. den Englesman J, Gandel P, Smulders R, Koll H, Smith B, Bassarab S, et al. Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res.* 2011;28:920–933.
6. Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J. Immunotoxicol.* 2014;11:99-109.
7. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. U.S. Department of Health and Human Services; 2014.
8. Panchal J, Kotarek J, Marszal E, Topp EM. Analyzing subvisible particles in protein drug products: a comparison of Dynamic Light Scattering (DLS) and Resonant Mass Measurement (RMM). *AAPS J.* 2014;16(3):440– 451.
9. Hamrang Z, Hussain M, Tingey K, Tracka M, Casas-Finet J, Uddin S, et al. Characterization of stress induced aggregate size distributions and morphological changes of a bi-specific antibody using orthogonal techniques. *J Pharm Sci.* 2015;104(8):2473–2481.
10. Sharma DK, King D, Oma P, Merchant C. Micro-Flow Imaging: Flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations. *AAPS J.* 2015;12(3):455–464.
11. Zoëlls S, Wiggenghorn M, Winter G, Friess W, Jiskoot W. Flow imaging microscopy for protein particle analysis – A comparative evaluation of four different analytical instruments. *AAPS J.* 2013;15(4):1200–1211.
12. Felsovalyi F, Janvier S, Jouffray S, Soukiassian H, Mangiagalli P. Silicone-oil- based subvisible particles: their detection, interactions, and regulation in prefilled container closure systems for biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2012;101:4569-4583.
13. Shah M, Rattray Z, Day K, et al. Evaluation of aggregate and silicone-oil counts in pre-filled siliconized syringes: an orthogonal study characterising the entire subvisible size range. *Int J Pharm.* 2017;519:58-66.
14. Martos A, Koch W, Jiskoot W, et al. Trends on analytical characterization of polysorbates and their degradation products in biopharmaceutical formulations. *J Pharm Sci.* 2017;106:1722-1735.
15. Scherer TM, Leung S, Owyang L, Shire, SJ. Issues and challenges of subvisible and submicron particulate analysis in protein solutions. *AAPS J.* 2012;14:236-243.
16. Wang C, Zhong X, Ruffner DB, et al. Holographic characterization of protein aggregates. *J Pharm Sci.* 2016;105:1074-1085.
17. Kasimbeg PN, Cheong FC, Ruffner DB, Blusewicz JM, Philips LA. Holographic characterization of protein aggregates in the presence of silicone oil and surfactants. *J Pharm Sci.* 2019;108:155-161.
18. Winters A, Cheong FC, Odete MA, et al. Quantitative Differentiation of Protein Aggregates from Other Subvisible Particles in Viscous Mixtures Through Holographic Characterization. *J. Pharm Sci.* 2020; 109:2405-2412.
19. Randolph TW, Schiltz E, Sederstrom D, et al. Do not drop: mechanical shock in vials causes cavitation, protein aggregation, and particle formation. *J Pharm Sci.* 2015;104:602-611.
20. Tobias W, Volkin DB, Mahler HC. Effect of solution properties on the counting and sizing of subvisible particle standards as measured by light obscuration and digital imaging methods. *Eur J Pharm Sci.* 2014;53:95-108.