

**Neue Untersuchungen zum  
Verordnungsmonitoring sowie zur Kompatibilität  
und Stabilität applikationsfertiger Zytostatika-  
Zubereitungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

**Jeanette Kaiser**

geb. in Mainz

Mainz, 2011

Tag der Promotion: 07. Juni 2011

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>4</b>
<b>2 Verordnungsmonitoring in der zentralen Zytostatikaherstellung .....</b>	<b>12</b>
2.1 Bedeutung des Verordnungsmonitorings in der zentralen Zytostatikaherstellung – Eine Erhebung in deutschen Universitätskliniken ....	13
<b>3 Ladungskapazität und physikalisch-chemische Stabilität von DC Beads™ beladen mit Camptothecin-Derivaten.....</b>	<b>23</b>
3.1 Transarterielle Chemoembolisation .....	23
3.2 Stability of irinotecan-loaded drug eluting beads (DC Bead™) used for transarterial chemoembolization .....	28
3.3 Loading profile of topotecan into polyvinyl alcohol microspheres (DC Bead™) over a 7 day period .....	38
<b>4 Physikalisch-chemische Stabilität applikations-fertiger Zubereitungen neuer Purin-Analoga .....</b>	<b>51</b>
4.1 Applikationsfertige Zubereitungen neuer Purin-Analoga .....	51
4.2 Physico-chemical stability of nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags.....	54
4.3 Long-term stability of clofarabine injection concentrate and diluted clofarabine infusion solutions .....	61
<b>5 Physikalisch-chemische Stabilität von Trastuzumab Infusions- Zubereitungen.....</b>	<b>78</b>
5.1 Monoklonale Antikörper .....	78
5.2 Physico-chemical stability of the trastuzumab infusion solutions in polypropylene infusion bags .....	81
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>106</b>



## Abbildungsverzeichnis

Die Abbildungen der publizierten oder eingereichten Veröffentlichungen sind an dieser Stelle nicht aufgelistet (siehe dazu in der jeweiligen Publikation).

Abbildung 1	Verfahrensanweisung zur „Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia mit toxischem Potenzial“ der Bundesapothekerkammer ....	7
Abbildung 2	Anforderungsformular für Chemotherapeutika in der Universitätsmedizin Mainz.....	8
Abbildung 3	Auszug aus der STABIL-Liste® (Stand 2010).....	10
Abbildung 4	Schematische Darstellung des Prinzips der transarteriellen Chemoembolisation.....	23
Abbildung 5	PVA-Grundstruktur der DC Beads™ .....	24
Abbildung 6	Handelsübliche DC Beads™ der Firma Biocompatibles.....	25
Abbildung 7	Beladung der DC Beads™ .....	26
Abbildung 8	Demethylierung von Nelarabine zu Ara-G .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

506U78	Nelarabin
5-FU	5-Fluoruracil
AB	Antibody (Antikörper)
ADCC	Antibody dependent cell mediated cytotoxicity (AK-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMPS	2-Acyrlamido-2-methylpropanesulfonat
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Ara-C	Cytosin-arabinosid (Cytarabin)
Ara-G	9-β-D-Arabinofuranosylguanine
Ara-GTP	5'-Triphosphat von Ara-G
AUC	Area under the curve
CAFdA	2-Chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosin (Clofarabin)
CAFdA-TP	5'-Triphosphat von Clofarabin
CdA	2-Chlordeoxyadenosin (Cladribin)
CM	Contrast Medium (Kontrastmittel)
CMR	cancerogen, mutagen, reproduktionstoxisch
CPT-11	Irinotecan
CRC	Colorectal Cancer (Kolonrektalkarzinom)
DAV	Deutscher Apothekerverlag
DEB	Drug Eluting Beads (Wirkstofffreisetzende Mikrosphären)
DEBDOX	DEB mit Doxorubicin beladen
DEBIRI	DEB mit Irinotecan beladen
DEBTOP	DEB mit Topotecan beladen
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EVA	Ethylenvinylacetat
Fara-A	Fludarabin
GI26250	Nelarabin

HCC	Hepatocellular carcinoma (Hepatozelluläres Karzinom)
HCl	Hydrochlorid
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2)
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IEB	Irinotecan Eluting Beads (Irinotecan freisetzende Beads)
i.v.	intravenös
KM	Kontrastmittel
LMW	Low Molecular Weight (niedriges Molekulargewicht)
NAAADA	N-Acryloylaminoacetalaldehydedimethylacetal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphate Buffer Solution (Phosphatpuffer-Lösung)
PDA	Photodiodenarray
PE	Polyethylene (Polyethylen)
PP	Polypropylene (Polypropylen)
PSN-1	humane Pankreas-Adenokarzinom-Zellen
PVA	Polyvinyl-Alkohol
PVC	Polyvinylchlorid
RB4	Reactive Blue 4 Dye (blauer Farbstoff)
RSD	Relative Standard Deviation (relative Standardabweichung)
RH	Relative humidity (relative Luftfeuchtigkeit)
rhuMab	rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
SCLC	Small Cell Lung Cancer (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SE-HPLC	Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
T-ALL	T-lymphozytäre Akute Lymphatische Leukämie
TEB	Topotecan Eluting Beads
T-LBL	T-lymphoblastisches Lymphom
t <sub>R</sub>	Retention time (Retentionszeit)
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
UV	Ultraviolett
WS	Wirkstoff



# 1 Einleitung

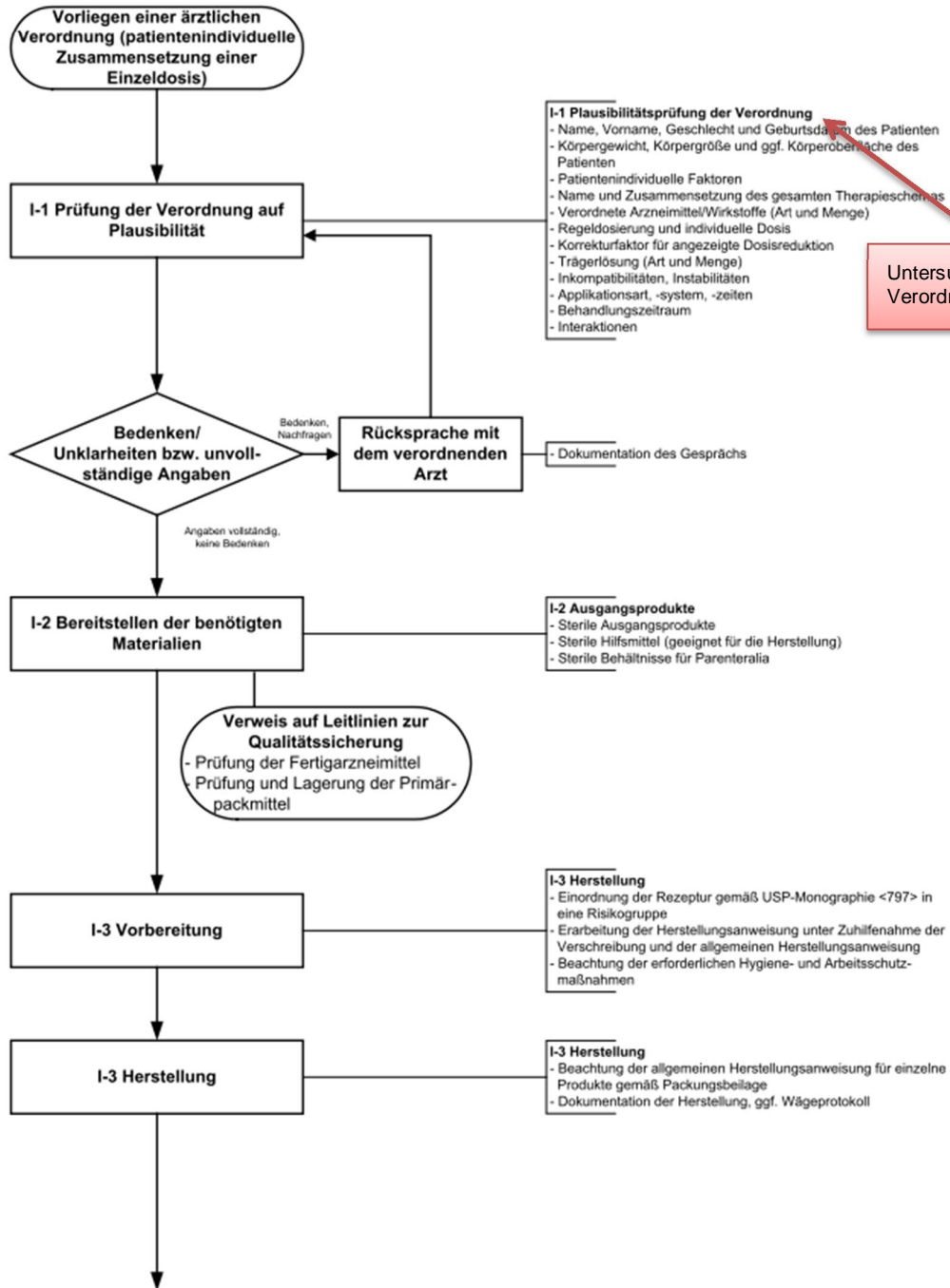
In Deutschland ist Krebs die zweithäufigste Todesursache und jeder vierte Todesfall ist auf ein Krebsleiden zurückzuführen. Bei Männern sind die häufigsten Todesursachen Lungen- und Bronchialkrebs, gefolgt von Prostatakrebs. Bei Frauen ist Brustkrebs die häufigste Krebstodesursache.<sup>1</sup> Jährlich erkranken ca. 426.800 Personen neu an Krebs, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen.<sup>2</sup> Krebserkrankungen treten gehäuft mit zunehmendem Alter auf. Frauen erkranken im Durchschnitt mit 68, Männer mit 69 Jahren. Durch den demographischen Wandel und die steigende Lebenserwartung ist in Zukunft mit einer Zunahme an Krebserkrankungen zu rechnen. Unter Krebs werden im Allgemeinen alle soliden Tumore, Leukämien, sowie Lymphome, verstanden. Im Jahr 2009 wurden bundesweit rund 1,5 Millionen an Krebs erkrankte Patientinnen (0,68 Mio.) und Patienten (0,81 Mio.) im Krankenhaus behandelt. Als Therapieoptionen gelten vor allem die Strahlentherapie, die chirurgische Entfernung des Tumors und die antineoplastische Chemotherapie, teilweise gefolgt von einer Stammzelltransplantation. Die 5-Jahres-Überlebensraten haben sich in den letzten Jahrzehnten erheblich verbessert. Die zuletzt von den Landeskrebsregistern veröffentlichten Daten geben für Frauen eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 62% und für Männer von ca. 56% an. Diese Daten variieren jedoch stark abhängig von der Krebsart.<sup>1</sup>

Die zur Zytostatikatherapie eingesetzten Arzneimittel sind der Gefährdungsbeurteilung entsprechend Stoffe mit gefährlichen Eigenschaften. Die meisten Substanzen haben krebserzeugende, mutagene oder reproduktionstoxische (CMR) Eigenschaften. Daher müssen im Umgang mit Zytostatika besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen und eingehalten werden (siehe TRGS 525 oder BGW Themenheft „Zytostatika im Gesundheitsdienst – Informationen zur sichereren Handhabung von Zytostatika“).<sup>3</sup> Auch hat sich gezeigt, dass im Umgang mit monoklonalen Antikörpern, die seit einigen Jahren erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetzt werden, dieselben Vorsichtsmaßnahmen zu treffen sind wie bei klassischen Zytostatika. Diese Stoffe erwiesen sich ebenfalls als reproduktionstoxisch und teilweise auch erbgutverändernd.<sup>4</sup> In den letzten 25 Jahren hat sich die zentrale Herstellung von applikationsfertigen Zytostatikazubereitungen in der Apotheke etabliert. Die zentrale Herstellung bietet wesentliche Vorteile vor allem im Bereich des Personenschutzes. Das Kontaminationsrisiko des Stationspersonals wird minimiert, da die Infusionszubereitungen applikationsfertig angeliefert werden. Vor Ort muss somit nur das Infusionssystem konnektiert und das Zytostatikum appliziert werden. Die

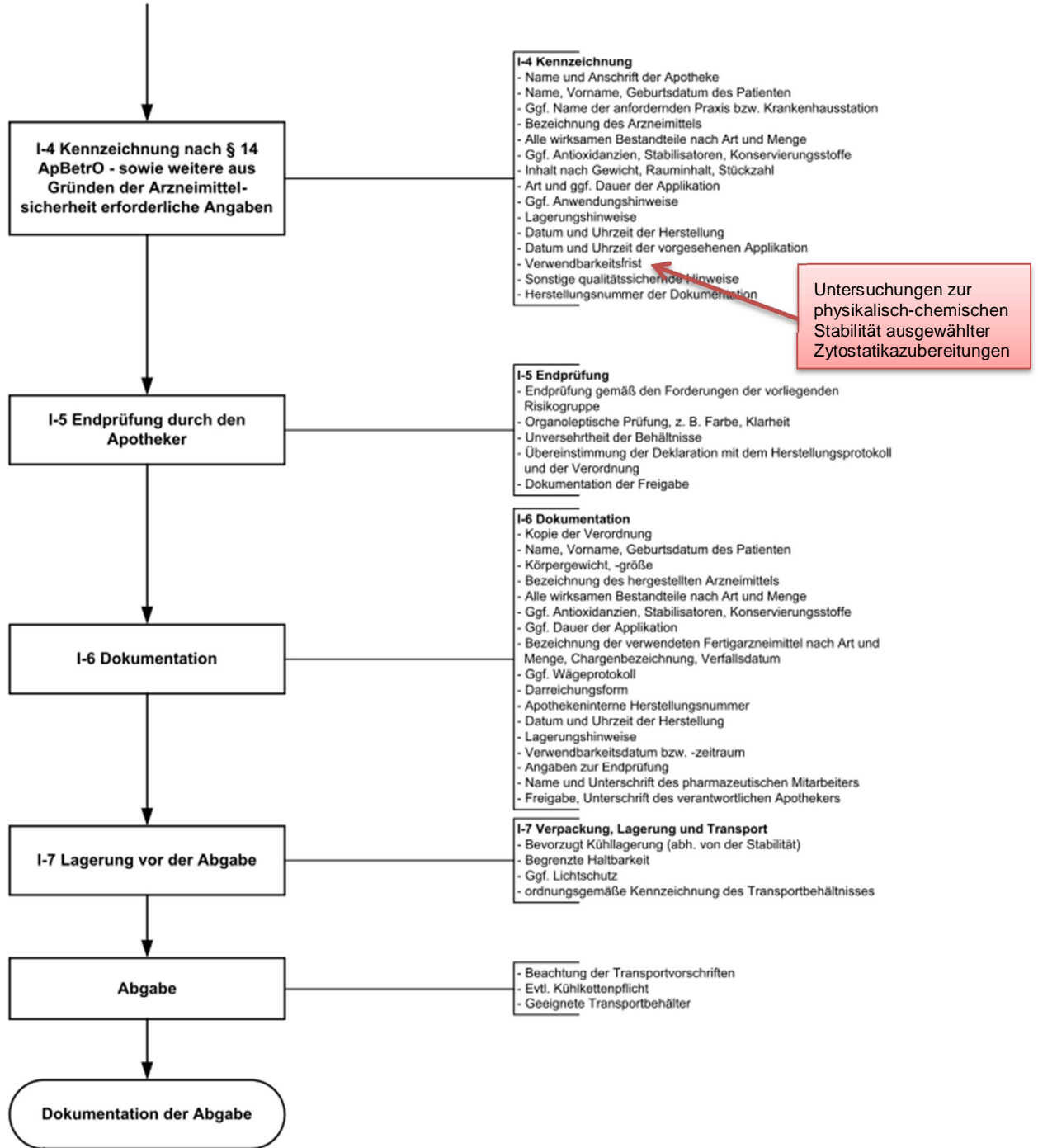
Herstellung in der Apotheke erfolgt gesondert von der Herstellung von Nicht-CMR-Arzneimitteln in speziell dafür eingerichteten Bereichen (Zytostatikaabteilung). Durch spezielle Schutzkonzepte nach Gefahrstoffverordnung (hinsichtlich Kleidung, Raumausstattung, Personalschulungen etc.) ist die potentielle Gefährdung für das herstellende Personal auf ein Minimum beschränkt.<sup>3</sup> Sicherheitswerkbänke der Reinraumklasse A umgeben von Bereichen der Reinraumklassen B oder C, sowie validierte Arbeitstechniken gewährleisten die Herstellung steriler Lösungen. Routinemäßig werden die Luftqualität (Partikelzahl, Luftwechselzahl etc.) und die mikrobiologischen Bedingungen in den Herstellungsbereichen überwacht.<sup>5,6</sup>

Die Herstellung von Zytostatikazubereitungen in Krankenhausapotheken erfolgt entsprechend der Leitlinie „Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia mit toxischem Potenzial“ herausgegeben von der Bundesapothekerkammer (siehe Abbildung 1).<sup>7</sup> Die Verfahrensanweisung umfasst die Verordnung, deren Prüfung sowie die eigentliche Herstellung.

**IV Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia mit toxischem Potenzial**



Fortsetzung






Copyright © Bundesapothekerkammer

Abbildung 1

Verfahrensanweisung zur „Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia mit toxischem Potenzial“ der Bundesapothekerkammer

Der behandelnde Arzt verordnet die Chemotherapie in der Apotheke mittels standardisierter Anforderungsformulare handschriftlich (siehe Abbildung 2) oder als elektronische Verordnung (z.B. AIS-SAP, Zenzy).

Apotheke der Universitätsmedizin Mainz		Station: 						
<b>Zentrale Zytostatika -Zubereitung</b> Anforderung   Tel.: XXXX Fax: XXXX		Patientenname:						
		Vorname:						
		Geburtsdatum:						
Körpergewicht [kg]:		Körpergröße [cm]:		Körperoberfläche [m <sup>2</sup> ]: AIBW				
WBC [μl]:	PTL [μl]:	S-Kreatinin [mg/dl]:	gemessene Kreatininclearance [ml/min]:		S-Bilirubin [mg/dl]:			
Diagnose:		Therapieschema:						
Dosismodifikation: Nein Ja ..... % Für:		Begründung: Clearance-adaptiert						
Applikationsdatum von bis	Therapie- tag(e)	Arzneimittel (INN-Bezeichnung)	Dosierung [mg/m <sup>2</sup> /Appl.]	Dosis [mg]	Dauer der Infusion (z.B. 2x/d über 3h)	Injektion [ml]	Perfusor [ml]	Infusion [ml]
Bestelldatum:		gefaxt:	Arztunterschrift:	Datum:	Hersteller:			

**Abbildung 2 Anforderungsformular für Chemotherapeutika in der Universitätsmedizin Mainz**

Aufgrund der geringen therapeutischen Breite werden Zytostatika in der Regel patientenindividuell dosiert. In sogenannten Chemotherapieprotokollen ist die Dosierung der Zytostatika pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche oder pro Kilogramm Körpergewicht angegeben. Die Körperoberfläche wird aus der Größe und dem Gewicht des Patienten nach der Formel von Du Bois berechnet. Auch Leber- und Nierenwerte müssen bei einigen Zytostatika (z.B. Carboplatin) für die Dosierung berücksichtigt werden. Bei Carboplatin sollte zur optimalen Wirkstoffexposition die Dosisberechnung nicht über die Körperoberfläche, sondern anhand der AUC (Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve) erfolgen.<sup>8</sup>

Die Verordnung der Chemotherapie birgt, vor allem aufgrund der Komplexität der Protokolle und der patientenindividuellen Zusammensetzung der Einzeldosis, ein großes Fehlerrisiko. Eine Plausibilitätsprüfung (siehe Abbildung 1) der ärztlichen Verordnung durch geschultes und qualifiziertes Personal der Apotheke ist daher ein

unumgänglicher Schritt zur Verbesserung der Arzneimittel- und Patientensicherheit. Bei Bedenken, Unklarheiten oder unvollständigen Angaben erfolgt eine Rücksprache mit dem verordnenden Arzt, um eventuelle Fehler zu korrigieren. Konsequentes Verordnungsmonitoring ist ein wesentlicher Teilprozess in der zentralen Zytostatikazubereitung. Die aktuelle Umsetzung und die Ergebnisse des Verordnungsmonitorings in den Universitätskliniken Deutschlands wurden im Rahmen dieser Arbeit in einer prospektiven Erhebung erfasst.

Die Wahl der Trägerlösung nach Art und Menge sowie die Haltbarkeitsdeterminierung der applikationsfertigen Zubereitung liegen in der pharmazeutischen Verantwortung. Durch die aseptische Herstellung in der Apotheke ist es möglich, die applikationsfertigen Zytostatika-Infusionslösungen nicht unmittelbar vor der Applikation, sondern im Voraus herzustellen. Dazu sind Kenntnisse über die Stabilität der applikationsfertigen Infusionslösungen, wie auch der Zytostatika-Fertigarzneimittel nach Anbruch, unerlässlich. Die Hersteller der als Ausgangsmaterial eingesetzten Fertigarzneimittel geben in der Regel an, dass die Zubereitungen unmittelbar nach Herstellung zu applizieren sind oder es wird eine Aufbrauchsfrist von maximal 24 Stunden angegeben. Die Aufbrauchsfrist ist definiert als Zeitraum, in dem man Arzneimittel nach Anbruch, unter Berücksichtigung chemischer, physikalischer und mikrobiologischer Aspekte, verwenden darf. Die Aufbrauchsfrist der Hersteller resultiert aus dem Risiko der mikrobiellen Kontamination bei nicht aseptischer Herstellung. Bei Herstellung unter validierten aseptischen Bedingungen kann die Haltbarkeitsfrist abhängig von der physikalisch-chemischen Stabilität festgelegt werden.<sup>9</sup>

Wenn keine validen Stabilitätsdaten zur physikalisch-chemischen Stabilität, die über die Angaben der Hersteller hinausgehen, bekannt sind, ist die Suche nach entsprechenden Daten zur Stabilitätsdeterminierung der applikationsfertigen Zubereitungen problematisch. Die Stabilität ist vielfach abhängig von der Konzentration, dem Behältnismaterial und der Lagerbedingung. Nur wenn die Untersuchungsbedingungen der in Frage stehenden Zubereitung entsprechen, sind Stabilitätsdaten übertragbar. Zur fundierten Entscheidungsfindung veröffentlicht die Apotheke der Universitätsmedizin Mainz (Krämer et al.) die sogenannte „STABIL-Datenbank<sup>®</sup>“. Die elektronische Datenbank ist eine Zusammenstellung von publizierten Daten oder eigenen Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität und (In)Kompatibilität parenteral applizierbarer Zytostatika und Virustatika. Als Zusammenfassung der Literaturdaten ist auch ein Ringbuch, die „STABIL-Liste<sup>®</sup>“ erhältlich (siehe Abbildung 3). Beide Varianten sind über die Serviceabteilung des Bundesverbandes Deutscher Krankenhausapotheker (ADKA e.V.) zu beziehen.

Arzneimittel	Fertigarzneimittel		Stammlösung			Stammlösung			Infusionslösung				Besonderheiten
	Beispiele (Hersteller)	Gehalt [mg]	Rekonstituens		Konzentration [mg/ml]	Physikalisch-chemische Stabilität			Physikalisch-chemische Stabilität				
			Art	Menge [ml]		RT	2-8 °C	Auf- bewahrung	Träger- lösung Behältnis- material	RT	2-8 °C	Auf- bewahrung	
<b>Aclarubicin-HCl</b> (=Aclacinomycin) (ACM)	Aclaplastin® (medac)	20	NaCl 0,9%	10	2	72 h	14 d	Kühl	NaCl 0,9% oder G 5  (PVC) (PE) (PP)	72 h	7 d	Lichtschutz Kühl	
<b>Alemtuzumab</b>	MabCampath® (Bayer Vital GmbH)	30	–	(1)	30	24 h	28 d	Kühl	NaCl 0,9% oder G 5  PVC PE (PP)	24 h	24 h	Lichtschutz Kühl	Zugabe zur Infusionslösung über beigepackten Filter mit niedrigem proteinbindenden Potential (Filter: Porengröße 5 µm, Polyamidmembran).
<b>Amsacrin</b> (AMSA)	Amsidyl® (Gödecke AG)	75 (1,5 ml)	Verdünnungs- lösung = Milchsäure 0,035 m	13.5	5	96 h	Nicht bekannt	RT	G 5 !  PVC PE PP	96 h	Nicht bekannt	RT	Amsacrin-Konzentrat aus den Ampullen mit B Braun Injekt Spritzen entnehmen.  Bei Zubereitung in NaCl 0,9% kommt es zur Ausfällung von Amsacrin-HCl.
<b>Arsentrioxid</b>	Trisenox® (Cell Therapeutics)	10	–	(10)	1	28 d	28 d	Kühl	NaCl 0,9% oder G 5  (PVC) (PE) (PP)	24 h	48 h	Kühl	
<b>Asparaginase</b> (=C-Asparaginase)	Asparaginase 10000 medac (medac)	10.000 E	Aqua ad inject.	5	2.000 E	5 d	7 d	Kühl	NaCl 0,9%  (PVC) (PE) (PP)	8 h	7 d	Kühl	Nicht heftig schütteln! Kontakt der Lösung mit Gummistopfen vermeiden! (Auch bei der Lagerung in Einmalspritzen beachten) Glucose als Trägerlösung vermeiden (ungünstiger pH).

Abbildung 3 Auszug aus der STABIL-Liste® (Stand 2010)

Die Anwendung der Angaben in der Stabil-Liste<sup>®</sup> zur Haltbarkeitsdeterminierung von Infusionslösungen und Fertigarzneimitteln nach Anbruch liegt jedoch in der Verantwortung des zuständigen Apothekers. Dabei ist stets auf die Vergleichbarkeit der stabilitätsdeterminierenden Parameter (Trägerlösung, Konzentration, Lagerbedingung etc.) für die Untersuchungslösungen und für die eigenen Zubereitungen zu achten.<sup>9</sup>

Die Informationen zur physikalisch-chemischen Stabilität neu zugelassener Arzneimittel gehen in der Regel nicht über die Angaben in den Fachinformationen hinaus. Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität von zwei neuen Purin-Analoga (Nelarabin und Clofarabin) und des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab bei praxisrelevanten stabilitätsdeterminierenden Bedingungen war Gegenstand dieser Arbeit.

Eine neue Therapieoption zur Behandlung von Patienten mit Lebertumoren und Lebermetastasen stellt die Chemoembolisation mit beispielsweise DC Beads<sup>™</sup> dar. Hierbei wird das Chemotherapeutikum direkt auf das Embolisationsystem (Mikrosphären, bestehend aus einem PVA-Grundgerüst) geladen. Nach Embolisation der den Tumor versorgenden Arterie wird das Chemotherapeutikum über einen verlängerten Zeitraum vor Ort freigesetzt. Die systemische Belastung des Körpers durch das Zytostatikum ist hierbei sehr gering und von großem Vorteil für den Patienten. Die Beladung mit Doxorubicin wird schon seit längerem in der Praxis bei Lebertumoren durchgeführt.<sup>10-12</sup> Die Behandlung von Lebermetastasen bei hepatozellulären Karzinomen mit Irinotecan beladenen DC Beads<sup>™</sup> ist noch in den frühen Anfängen.<sup>13-15</sup> Die Möglichkeit der Beladung von Topotecan auf DC Beads<sup>™</sup> wird momentan in *in-vitro* Tests untersucht.<sup>16</sup> Die Beladung der DC Beads<sup>™</sup> mit Wirkstoff erfolgt in der Regel im Rahmen der zentralen Zytostatikaherstellung. Die beladenen Beads werden applikationsfertig in Spritzen an die interventionellen Radiologen geliefert und von diesen im Rahmen der Chemoembolisation mit Kontrastmittel gemischt. Hieraus begründet sich der Bedarf an erweiterten Stabilitätsdaten und Kompatibilitätsdaten. Bestimmungen zur physikalisch-chemischen Stabilität und Ladungskapazität von DC Beads<sup>™</sup> beladen mit Irinotecan und Topotecan in Kombination mit und ohne Kontrastmittel war ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit.



## **2 Verordnungsmonitoring in der zentralen Zytostatikaherstellung**

Die Prüfung der ärztlichen Chemotherapieverordnung durch qualifiziertes pharmazeutisches Personal (Verordnungsmonitoring) kann als Standard in fast allen Zytostatika herstellenden Apotheken angesehen werden. Durch das konsequente Verordnungsmonitoring durch die Apotheken können schwerwiegende Verordnungsirrtümer aufgedeckt und mit den behandelnden Ärzten geklärt werden. Auf Basis der Dokumentation der pharmazeutischen Interventionen festgestellten Verordnungsfehlern lässt sich dessen Nutzen abbilden.

Der Beitrag des pharmazeutischen Verordnungsmonitorings zur Patienten- und Arzneimitteltherapiesicherheit ist in ausländischen Studien gezeigt worden (z.B. Spanien<sup>17;18</sup>). Zielsetzung dieser Studie war, die aktuelle Umsetzung und die Ergebnisse des Verordnungsmonitorings in den Universitätskliniken Deutschlands in einer prospektiven Erhebung zu erfassen.

## **2.1 Bedeutung des Verordnungsmonitorings in der zentralen Zytostatikaherstellung – Eine Erhebung in deutschen Universitätskliniken**

I.Krämer, H.Walz-Jung, J.Kaiser

Krankenhauspharmazie 2010; 31:349-357

# Bedeutung des Verordnungsmonitorings in der zentralen Zytostatikaherstellung

Eine Erhebung in deutschen Universitätskliniken

*Irene Krämer, Hannah Walz-Jung und Jeanette Kaiser, Mainz, für den Ständigen Arbeitskreis der Leitenden Apotheker der Universitätsklinika Deutschlands (LAUD) im Verband der Universitätsklinika Deutschlands (VUD)*

Zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit bei onkologischen Patienten wird das Verordnungsmonitoring der Zytostatikatherapien empfohlen. In einer prospektiven Erhebung wurde über einen Beobachtungszeitraum von 8 bis 12 Wochen der Beitrag universitärer Krankenhausapotheken zur Vermeidung von Verordnungsirrtümern im Rahmen der zentralen Zytostatikaherstellung dokumentiert und analysiert. Insgesamt wurden in 21 Universitätskliniken über etwa drei Monate 835 Verordnungsfehler dokumentiert, von denen 748 bezüglich der Fehlerkategorien und Relevanz ausgewertet werden konnten. Übereinstimmend mit der Literatur traten die meisten Fehler in der Fehlerkategorie Dosisberechnung (48%) auf. Diese wurden in 76% der Fälle als von hoher Relevanz eingestuft. In den Fehlerkategorien Patientendaten traten 26%, Applikationsdatum 15% und Zytostatikum 11% der Fehler auf. Die Inzidenz der Verordnungsfehler betrug durchschnittlich 0,77% bei rund 1 950 Verordnungen pro Tag in 17 Universitätskliniken (von vier Kliniken gab es keine Daten zur Gesamtanzahl hergestellter Zytostatikazubereitungen). Die überwiegend als von hoher Relevanz eingeordneten Verordnungsfehler unterstreichen die Bedeutung des Verordnungsmonitorings für die Arzneimitteltherapiesicherheit. Dem Zeitaufwand für das Verordnungsmonitoring (für 37% der Fehler < 5 Minuten, für 37% der Fehler 5 bis 15 Minuten) steht ein Nutzen gegenüber, der die Kosten überwiegt.

**Schlüsselwörter:** Verordnungsmonitoring, Zytostatikatherapie, Fehlerkategorie, Fehlerinzidenz, Zeitaufwand, Relevanz

*Krankenhauspharmazie 2010;31:349-357.*

Täglich werden in den deutschen Krankenhausapotheken Tausende von patientenindividuellen, applikationsfertigen Zytostatikazubereitungen hergestellt. Allein in den Apotheken der Universitätskliniken Deutschlands werden jährlich rund eine Million Zytostatikaverordnungen bearbeitet. In der Apotheke eingehende Zytostatikaanforderungen werden zunächst auf Richtigkeit und Plausibilität geprüft (Verordnungsmonitoring), anschließend nach dem aktuellen Stand des Wissens und der Technik aseptisch hergestellt und zur Applikation ausgeliefert. Die mutmaßlichen Verordnungsirrtümer werden in Zusammenarbeit mit den verordnenden Ärzten korrigiert und die pharmazeutischen Interventionen dokumentiert.

Bereits vor über 15 Jahren wurde im Rahmen der zentralen Zytostatikazu-

bereitung in der Universitätsmedizin Mainz ein konsequentes Verordnungsmonitoring durchgeführt. In einer prospektiven Beobachtungsstudie über zehn Monate wurden 98 schwerwiegende Verordnungsirrtümer (Fehlerinzidenz 0,57%) dokumentiert. In der Konsequenz wurden verbesserte Verordnungsformulare und Checklisten für das Verordnungsmonitoring etabliert [11]. Das Verordnungsmonitoring ist heute Gegenstand von Leitlinien, die einerseits die zentrale Zytostatikaherstellung [1] und andererseits die Vermeidung von Medikationsfehlern bei onkologischen Patienten von der Verordnung über die Herstellung bis zur Applikation zum Gegenstand haben [3]. Durch konsequentes Verordnungsmonitoring und Vermeidung von Überdosierungen können Neutropenien und deren Komplika-

tionen sowie eine erhöhte Mortalitätsrate kosteneffektiv vermieden werden [14]. Der ständige Arbeitskreis der Leitenden Apotheker der Universitätsklinika Deutschlands ist an der aktuellen Umsetzung und den Ergebnissen des Verordnungsmonitorings in den Universitätskliniken interessiert. Aus diesem Grund wurde eine prospektive Erhebung zu Art und Umfang des Verordnungsmonitorings über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen initiiert.

---

Prof. Dr. Irene Krämer, Hannah Walz-Jung, Jeanette Kaiser, Apotheke der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, E-Mail: irene.kraemer@unimedizin-mainz.de, für den Ständigen Arbeitskreis der Leitenden Apotheker der Universitätsklinika Deutschlands (LAUD) im Verband der Universitätsklinika Deutschlands (VUD)

## Ziele der Untersuchung

In der Untersuchung sollte der Beitrag der Krankenhausapotheken zur Erkennung, Lösung und Vermeidung von Verordnungsirrtümern im Rahmen der zentralen Zytostatikaherstellung dokumentiert und analysiert werden. Dazu wurden für die Verordnungsfehler vier Hauptkategorien (Patientenangaben, Dosis, Zytostatikum, Applikationsdatum) jeweils mit Subkategorien definiert. Gleichzeitig sollte das eingesetzte Erhebungssystem und die benutzte Fehlerklassifikation auf ihre Eignung geprüft werden. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, ob Dringlichkeit und Zeitdruck bei der Herstellung standortbezogen variieren.

## Methode

In der Apotheke der Universitätsmedizin Mainz wurde eine elektronische Dokumentationsdatenbank mittels MS Access® in Anlehnung an die APOSTAT-Datenbank Mainz [12] erstellt. Diese wurde gemäß Absprache den Krankenhausapotheken der 32 Universitätsklinika Deutschlands elektronisch zugestellt. Die verantwortlichen Mitarbeiter in der jeweiligen Zytostatikaherstellung wurden aufgefordert, das wie üblich durchgeführte Verordnungsmonitoring und dessen Ergebnisse über einen Zeitraum von etwa acht Wochen (6. Juli 2009 bis 31. August 2009) in der Datenbank zu erfassen. Die Dokumentationen sollten ab dem 1. September 2009 zur Auswertung an die Apotheke der Universitätsmedizin Mainz übermittelt werden.

Die Eingabemaske der Datenbank ist in **Abbildung 1** dargestellt. Um auf eine Korrelation der Verordnungsirrtümer mit der Diagnose oder dem Chemotherapieprotokoll prüfen zu können, waren diese in Zeile 2 und 3 zu dokumentieren. Die Zeilen 4 bis 7 zeigen die vorgegebenen Hauptkategorien der Verordnungsfehler, für die jeweils Subkategorien hinterlegt waren. Es wurden folgende Fehler-

Abb. 1. Eingabemaske für das Verordnungsmonitoring von Zytostatikaverordnungen

kategorien und Subkategorien (nicht dargestellt in **Abb. 1**) definiert:

### Fehlerkategorie 1: Fehlerhafte Angaben zum Patienten

Subkategorien:

- Gewicht/Größe falsch/fehlend
- Körperoberfläche (KOF) falsch berechnet
- Patientenzuordnung falsch

### Fehlerkategorie 2: Fehlerhafte Auswahl des Zytostatikums

Subkategorien:

- Zytostatikum falsch
- Zytostatikum fehlend

### Fehlerkategorie 3: Fehlerhafte Dosisberechnung

Subkategorien:

- Abweichung von der korrekten Dosis  $\leq 10\%$
- Abweichung von der korrekten Dosis  $> 10\%$

### Fehlerkategorie 4: Fehlerhaftes Applikationsdatum

Subkategorien:

- Applikationsdatum falsch
- Applikationsdatum fehlend

Weitere Erfassungsparameter waren die Relevanz des Verordnungsfehlers gemäß Einschätzung des verantwort-

lichen Apothekers mit definierten Subkategorien (groß, moderat, gering, unklar) sowie der für das Verordnungsmonitoring erforderliche Zeitaufwand ( $\leq 5$  Minuten, 5–15 Minuten,  $\geq 15$  Minuten).

Um die Häufigkeit fehlerhafter Verordnungen berechnen zu können, war von den Teilnehmern die Gesamtanzahl der Zytostatikazubereitungen während des Dokumentationszeitraums anzugeben. Des Weiteren sollte für alle Zubereitungen in diesem Zeitraum die Zeitspanne zwischen Eingang der Anforderung in der Apotheke und gewünschtem Auslieferungstermin erfasst und übermittelt werden.

## Ergebnisse

### Methodik der Auswertung

Von den 32 angefragten Universitätsklinika beteiligten sich 21 an der Erhebung, so dass die Erhebung als repräsentativ erachtet werden kann. Insgesamt wurden über etwa drei Monate 835 Verordnungsfehler dokumentiert. Davon wurden 98 Dokumentationen aus unterschiedlichen Gründen nicht in die Auswertung einbezogen (**Tab. 1**). Die überwiegende Zahl ( $n=64$ ) der von der Auswertung ausgeschlossenen Dokumentationen bezog sich auf Fehlerkategorien, die im Voraus nicht definiert waren. In drei Kliniken wurde eine zusätzliche Fehlerkategorie für die falsche Aus-

Tab. 1. Auswertbarkeit der dokumentierten Verordnungsfehler

Anzahl [n]	Ausschlusskriterien für Auswertung
737	Keine
46	„Falsche Trägerlösung“ als nicht definierte Fehlerkategorie
34	Unzureichende Daten
10	„Fehlende Freigabe/Arztunterschrift“ als nicht definierte Fehlerkategorie
8	„Falsche Applikationsart“ als nicht definierte Fehlerkategorie

## Nur zum persönlichen Gebrauch

© Deutscher Apotheker Verlag

wahl einer Trägerlösung oder des Volumens definiert und in dieser Kategorie 46 Fehler dokumentiert. Weitere 10 bzw. 8 Dokumentationen waren für die nicht im Voraus definierten Fehlerkategorien „fehlende Freigabe/fehlende Arztunterschrift“ bzw. „falsche Applikationsart“ erfolgt. Wegen unzureichender Angaben konnten 34 Dokumentationen nicht in die Auswertung einbezogen werden. Davon fehlten für 14 in der Kategorie „falsche Dosis“ dokumentierte Verordnungsfehler die Angabe der prozentualen Abweichung.

Die Dokumentation mehrerer Verordnungsfehler in verschiedenen Kategorien für eine Verordnung war im Voraus nicht ausgeschlossen worden, so dass „Folgefehler“ in mehreren Fehlerkategorien dokumentiert werden konnten. Waren für eine Verordnung voneinander unabhängige Fehler dokumentiert, ging jeder Fehler in die Dokumentation ein. Wenn aufgrund einer falschen Gewichtsangabe, die falsche Körperoberfläche (KOF) und dadurch eine falsche Dosis errechnet wurde, ging nur der ursächliche Fehler in die Auswertung ein. Bei 11 Fehlern war aufgrund der Daten keine eindeutige Zuordnung möglich, wodurch in der Auswertung 748 kategorisierte Fehler aus 737 fehlerhaften Verordnungen resultierten. Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass die im Vorfeld definierte Klassifizierung der Fehler unzureichend war. Es wurden daher weitere Subkategorien definiert und ausgewertet.

### Fehlerkategorie 1: Fehlerhafte Angaben zum Patienten

Zusätzliche Subkategorien:

- Patientendaten fehlerhaft/fehlend
- KOF fehlend
- Studienzuordnung falsch

### Fehlerkategorie 2: Fehlerhafte Auswahl des Zytostatikums

Zusätzliche Subkategorie:

- Protokoll falsch

### Fehlerkategorie 3: Fehlerhafte Dosisberechnung

Zusätzliche Subkategorien:

- Abweichung von der korrekten Dosis >2%
- Dosis fehlend

Unter „Patientendaten fehlerhaft/fehlend“ konnten damit Fehler wie falsches Geburtsdatum (was zu Verwechslungen führen kann), falsche Station und fehlende Patientenaufkleber eingeordnet werden. Die neu definierte Subkategorie „Studienzuordnung falsch“ erscheint den Autoren relevant und sollte für zukünftige Erhebungen beibehalten werden. Viele onkologische Patienten werden in Studien eingeschlossen und die GCP-konforme Durchführung der Zytostatikatherapie ist von höchster Wichtigkeit (GCP: Good Clinical Practice). In einem der dokumentierten Fälle führte die fehlende Kennzeichnung eines Studienpatienten zum Ausschluss aus der Studie. Die Tatsache, dass durch sorgfältiges Monitoring auch bei Studienprotokollen Fehler vermieden werden, belegt die Bedeutung des Verordnungsmonitorings als Qualitätssicherungsmaßnahme.

Die Fehlerkategorie „Fehlerhafte Auswahl des Zytostatikums“ wurde um die Unterkategorie „falsches Protokoll“ ergänzt, da 28 dokumentierte Fehler dieser Kategorie zuzuordnen waren und es von der Bedeutung dieses Fehlers her angezeigt erscheint.

Da ein Universitätsklinikum eine fehlerhafte Dosis entsprechend der dort üblichen Fehlergrenzen von  $\pm 2\%$  dokumentiert hatte, wurde die Subkategorie „Dosisabweichung >2%“ zusätzlich aufgenommen. Die nachträglich bei Dosisabweichungen gebildete Subkategorie >2% ist für zukünftige Erhebungen ohne Bedeutung. Sie wurde hier eingeführt, um die eingegangenen Fehlerdokumentationen in der Auswertung belassen zu können. Eine Abweichung der errechneten Dosis zwischen 2 und 10% der protokollgemäßen Dosis kann bei erwachsenen Patienten für den

Tab. 2. Häufigkeit der dokumentierten Verordnungsfehler (n = 748) in den definierten Fehler(sub)kategorien

Fehlerkategorie	Anzahl [n]	Häufigkeit [%]
<b>Patientendaten</b>	<b>194</b>	<b>25,9</b>
Gewicht-/Größe falsch/fehlend	73	9,8
KOF falsch berechnet	37	4,9
KOF fehlend*	11	1,5
Patientenzuordnung falsch	11	1,5
Patientendaten fehlerhaft/fehlend*	50	6,6
Studienzuordnung falsch*	12	1,6
<b>Zytostatikum</b>	<b>80</b>	<b>10,7</b>
Falsch	32	4,3
Fehlend	20	2,7
Falsches Protokoll*	28	3,7
<b>Dosisberechnung</b>	<b>360</b>	<b>48,1</b>
≤ 10% Dosisabweichung	68	9,1
> 10% Dosisabweichung	250	33,4
> 2%* Dosisabweichung	26	3,5
Fehlend*	16	2,1
<b>Applikationsdatum</b>	<b>114</b>	<b>15,3</b>
Falsch	97	13,0
Fehlend	17	2,3

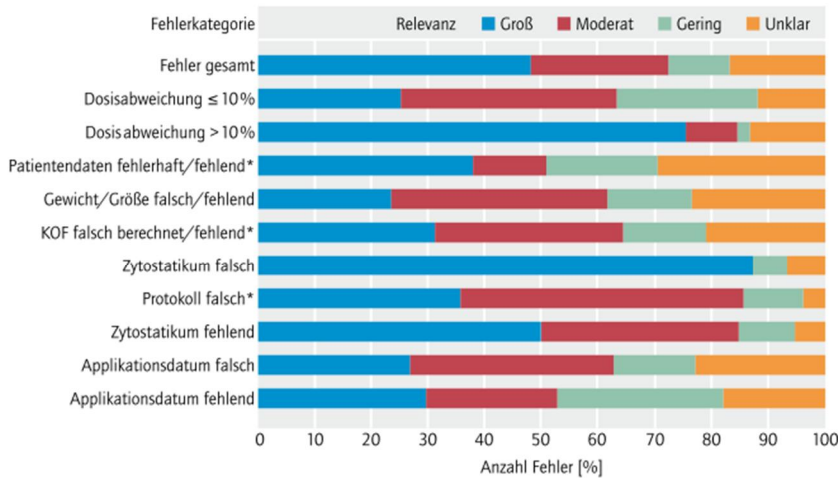
\*Aufgrund eingegangener Dokumentationen ergänzte Subkategorien; KOF: Körperoberfläche

Erfolg und die Sicherheit der Behandlung im Allgemeinen als unbedeutend erachtet werden.

Das vollständige Fehlen einer Dosisangabe wurde ebenfalls aufgrund der dokumentierten Fälle ergänzt.

### Fehlerhäufigkeit nach Kategorien und Relevanz

In Tabelle 2 sind die dokumentierten Verordnungsfehler nach Häufigkeit des Vorkommens für die Kategorien und Subkategorien dargestellt. Fast die Hälfte der Verordnungsfehler (48%) waren der Hauptkategorie „falsche Dosis“ zuzuordnen. Die übrigen 52% Verordnungsfehler verteilten sich zu rund 26% auf „fehlerhafte Patientenangaben“, zu 15% auf „fehlerhaftes Applikationsdatum“ und zu



\* aufgrund der eingegangenen Dokumentationen ergänzte Subkategorien

Abb. 2. Prozentuale Verteilung der Verordnungsfehler differenziert nach Fehlerkategorien und Relevanz; KOF: Körperoberfläche

11% auf ein „fehlerhaftes Zytostatikum“.

In **Abbildung 2** ist die Zuordnung der Fehlerdokumentationen zu den Fehler- und Relevanzkategorien dargestellt. Fast die Hälfte aller dokumentierten Verordnungsfehler (48%) wurden von den dokumentierenden Kliniken als von großer Relevanz eingeordnet. Zwischen den Subkategorien variierte die Zuordnung zu großer Relevanz zwischen rund 20% (Subkategorie „Gewicht/Größe falsch/fehlend“) und fast 90% (Subkategorie „Zytostatikum falsch“). Weitere 25% wurden als von moderater und nur 10% als von geringer Relevanz eingestuft. Für 17% der dokumentierten Fehler war die Relevanz als unklar eingestuft, wobei dieser Kategorie auch alle Dokumentationen ohne Angabe der Relevanz zugeordnet wurden.

### Falsche Dosis

Die Kategorie „fehlerhafte Dosisberechnung“ und hier die Subkategorie „Abweichung von der korrekten Dosis > 10%“ der verordneten Dosis von der protokollgemäßen Dosis wurde bei weitem am häufigsten dokumentiert, was mit dem Befund anderer Untersuchungen übereinstimmt [11, 15]. Dosisfehler, die aus einer falschen KOF oder aus falschen

Gewichtsangaben resultierten, sind hier nicht berücksichtigt, sondern den entsprechenden Fehlerkategorien zugeordnet. Zwangsläufig führt jede unvollständige oder falsche Angabe dieser Parameter zu einem potenziellen Dosisfehler. Dosisabweichungen ≤ 10% wurden nur zu 9% dokumentiert. Mit dem benutzten Erfassungssystem ist nicht auswertbar, wie die von einem Klinikum mit der 2%-Toleranzgrenze dokumentierten Dosisabweichungen in Bezug auf die 10%-Grenzen einzuordnen sind. In der Regel wird eine Abweichung der verordneten Dosis von der Protokoll-gemäßen Dosis in den Grenzen ± 10% in der klinischen Praxis akzeptiert [11]. Es ist folgerichtig, dass fehlerhafte Dosisberechnungen mit einer Abweichung von mehr als 10% in der überwiegenden Zahl der Fälle (76%) als von großer Relevanz eingeordnet wurden. Den Regeln entsprechend wurden Dosisabweichungen ≤ 10% überwiegend als moderat oder von geringer Relevanz eingeordnet. Gründe für die falsche Dosisberechnung waren

- falsche Bezugsgrößen (Größe, Gewicht),
- Kommafehler,
- nicht beachtete Dosisreduktionen und

- Datenübernahme von veralteten Daten aus früheren Verordnungen.

### Fehlerhafte Patientendaten

In der Fehlerkategorie Patientendaten waren die meisten Verordnungsfehler den Subkategorien „Gewicht/Größe falsch/fehlend“ (10%) und „KOF falsch bzw. fehlend“ (6,4%) zuzuordnen. Die Kategorie „KOF fehlend“ war nachträglich gebildet worden und wurde nur dann zugeordnet, wenn Größe und Gewicht angegeben, aber die KOF nicht eingetragen worden war. Dies kann als Flüchtigkeitsfehler gewertet werden, wenn die Dosierungen mit der korrekten KOF berechnet wurden.

### Fehlerhaftes Applikationsdatum

Es ist bemerkenswert, dass 15% der Verordnungsfehler der Subkategorie „fehlerhaftes Applikationsdatum“ zuzuordnen waren. Ursache für diese Fehler waren Verkürzungen oder Verlängerungen der Vorphasentherapie bei neu diagnostizierten Hämoblastosen und das Verschieben des nächsten Zyklus der Chemotherapie. Die Tatsache, dass das Applikationsdatum bei 2% der Verordnungen fehlte, ist wiederum als Flüchtigkeitsfehler zu werten. Die Relevanz der Subkategorien falsches und fehlendes Applikationsdatum wurde überwiegend als moderat und gering eingestuft. Eine korrekte zeitliche Abfolge der Chemotherapie und die Dosisintensität (Dosis pro Zeitintervall) sind insbesondere bei kurativem Therapieansatz von hoher Relevanz. Andererseits sind von den Protokollen abweichende Zeitabfolgen dem klinischen Zustand des Patienten zuzuschreiben und spiegeln die klinische Praxis wieder.

### Fehlerhaftes Zytostatikum/Protokoll

Insgesamt 10% der dokumentierten Verordnungsfehler waren einer fehlerhaften Auswahl des Chemotherapieprotokolls, einer fehlerhaften

## Nur zum persönlichen Gebrauch

### © Deutscher Apotheker Verlag

Auswahl einzelner Zytostatika im Chemotherapieprotokoll oder dem Fehlen einzelner Zytostatika zuzuordnen.

Die Verordnung eines falschen Zytostatikums wurde zu 89% als von großer Relevanz eingestuft und muss eher als noch höher angenommen werden. Die Verwechslungen traten bei den Platinderivaten und Antikörpern auf. Diesen Verordnungen gilt es daher beim Monitoring besonderes Augenmerk zu schenken. Auch muss daraus abgeleitet werden, dass die Antikörpertherapien auch wegen potenzieller Verordnungsfehler unbedingt der zentralen Zubereitung durch die Apotheke bedürfen. Die in der Subkategorie „falsches Protokoll“ dokumentierten Verordnungsfehler erfolgten mehrheitlich durch ein einziges teilnehmendes Universitätsklinikum.

#### Diagnose und Chemotherapieprotokoll

Die Erfassung der Diagnose und des Chemotherapieprotokolls waren vorgesehen, um auf Korrelationen zur Fehlerhäufigkeit und Relevanz prüfen zu können. Die in den acht Wochen gesammelten Fehlerdokumentationen erwiesen sich dafür als nicht ausreichend. Die Diagnosen und angewandten Chemotherapieprotokolle waren einerseits zu heterogen und andererseits fehlten Angaben. Bei 23% der Dokumentationen fehlten Angaben zum Protokoll und bei 34% zur Diagnose.

#### Fehlerinzidenz

Der genaue Dokumentationszeitraum und die Gesamtzahl hergestellter Zytostatikazubereitungen in diesem Zeitraum wurden von 17 Kliniken übermittelt. Von vier Kliniken wurden keine Angaben dazu gemacht. Die errechnete Zahl der Zubereitungen pro Wochentag variierte zwischen 39 und 212. In der Summe wurden in den 17 Kliniken 1946 Zubereitungen pro Tag hergestellt. Hochgerechnet auf das Jahr (250 Werktage) werden von

den 17 Kliniken 486 500 Zytostatikazubereitungen hergestellt mit einer durchschnittlichen Verordnungsfehlerinzidenz von 0,77%. Die Inzidenz der Verordnungsfehler der einzelnen Kliniken schwankt zwischen 0,24% und 1,48% (Median: 0,71%). Zudem imponiert ein Klinikum durch eine besonders niedrige Fehlerinzidenz von 0,08%, die der dort praktizierten elektronischen Verordnung zuzuordnen ist. Die berechnete Fehlerinzidenz darf nicht überbewertet werden, da sie von Art und Intensität des Verordnungsmonitorings abhängig und nur bedingt vergleichbar ist. Die jeweilige Detektionsrate von Verordnungsfehlern ist insbesondere davon abhängig, ob eine Checkliste verwendet wird, welche Parameter geprüft werden und wie konsequent auf erforderliche Dosismodifikationen geprüft wird.

#### Zeitbedarf für das Verordnungsmonitoring

In **Abbildung 3** ist der Zeitaufwand für das Verordnungsmonitoring und zur Klärung der identifizierten Fehler dargestellt. 37% der Verordnungsfehler konnten innerhalb von 5 Minuten und weitere 37% innerhalb von 5 bis 15 Minuten geklärt werden. Nur in 11% der Dokumentationen betrug der erforderliche Zeitaufwand mehr als 15 Minuten (bis zu mehreren Stunden).

Bei der Kalkulation einer Dienstleistungspauschale für die zentrale Zytostatikazubereitung muss der Zeitaufwand für das Verordnungsmonitoring berücksichtigt werden, zumal er ausschließlich von Apothekern mit entsprechender Qualifikation erbracht werden kann.

Ein Zusammenhang zwischen Dringlichkeit und Fehlerinzidenz wurde nicht gesehen. Der Zeitbedarf und Zeitdruck beim Verordnungsmonitoring wird von den Apothekern als stärker empfunden, wenn viele verschiedene oder selten genutzte Therapieprotokolle verordnet werden und häufige Arztwechsel auf den Stationen und Teileinheiten stattfinden.

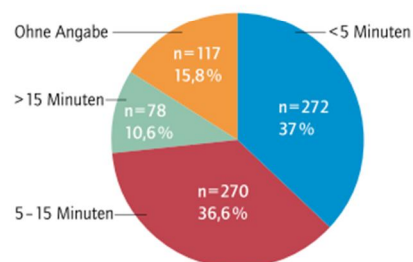


Abb. 3. Zeitbedarf für das Verordnungsmonitoring (n=737 Dokumentationen)

#### Dringlichkeit der Bereitstellung

In acht Kliniken wurde die Dringlichkeit der Bereitstellung der Zytostatikazubereitungen erfasst. Hierfür wurde die Zeit zwischen Eintreffen der Anforderung in der Apotheke und der Auslieferung auf die Station dokumentiert (**Tab. 3**). In zwei Kliniken wurde die Dringlichkeit nur für die fehlerhaften Verordnungen erfasst. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Dringlichkeit der Bereitstellung in den acht Kliniken. Die besonders dringlichen Verordnungen (bis zwei Stunden) betragen zwischen 21% und 76% der Gesamtverordnungen. Im Durchschnitt müssen rund die Hälfte aller Zytostatik-Anforderungen innerhalb von zwei Stunden auf die Station geliefert werden. In der Dringlichkeitskategorie „2 bis 6 Stunden“ betrug der niedrigste Anteil 2% und der höchste 33%

Tab. 3. Dringlichkeit der Bereitstellung (n=8 Universitätskliniken)

Zubereitungen je Klinik [n]	Dringlichkeit		
	Bis 2 h [%]	Bis 6 h [%]	> 6 h [%]
3 300	55	20	25
3 408	25	8	67
3 749	51	2	47
80 <sup>1</sup>	55	15	30
87 <sup>1</sup>	33	29	38
613 <sup>2</sup>	21	14	65
5 090	67	33 <sup>3</sup>	
14 365	ca. 76	ca. 15	ca. 9
Mittelwert	47	14	39

<sup>1</sup> Dringlichkeit nur für fehlerhafte Verordnungen erfasst; <sup>2</sup> Dokumentationszeitraum 1 Woche  
<sup>3</sup> „>6 h“, bei der Mittelwertberechnung nur für „>6 h“ berücksichtigt

der Anforderungen. Im Durchschnitt waren 14% der Zytostatikaverordnungen innerhalb dieser Zeit zu bearbeiten. Eine hohe Zahl von Verordnungen in der Dringlichkeitskategorie „bis zwei Stunden“ war in der Regel mit einer niedrigen Zahl von Verordnungen in der Dringlichkeitskategorie „>6 Stunden“ verknüpft und umgekehrt. Da fast 90% der Verordnungen der höchsten (<2 Stunden) und niedrigsten (>6 Stunden) Dringlichkeit zugeordnet wurden, müssen die gewählten Dringlichkeitskategorien für zukünftige Erhebungen überdacht werden.

## Diskussion

### Methodik

Die Auswertung erfolgte für freiwillig zugesandte Dokumentationen. Es kann daher ein Selektionsbias von qualitätsbewussten Kliniken unterstellt werden, der sich allerdings durch die hohe Beteiligung (66%) relativiert. Zudem wurde das eingesetzte Dokumentationssystem nicht im Vorfeld validiert und für das Klassifikationssystem kein Kappa-Faktor (dimensionsloser Koeffizient zur Beschreibung der über den Zufall hinausgehenden Übereinstimmung zwischen mindestens zwei Möglichkeiten oder mindestens zwei Beurteilenden) für die erzielte Übereinstimmung ermittelt. Der dadurch entstandene Dokumentationsbias ist hinsichtlich der Erfassung und Kategorisierung der Fehler kritisch zu betrachten. Die nachträgliche Anpassung der Fehler-subkategorien ist ebenfalls kritisch zu bewerten. Vor einer zukünftigen Erfassung sollten eine Überarbeitung der Fehlerkategorien und eine Definition von Pflichtfeldern erfolgen, um den Dokumentations- und Auswertungsbias zu verringern. Eine Untersuchung der Verlässlichkeit (siehe auch [6]) der Kategorisierung für diese spezifische Fragestellung wäre ebenfalls angebracht.

Aus der beschränkten Zahl vorgegebener Fehlerkategorien und im

Voraus nicht ausgeschlossener Mehrfachzuordnung eines Fehlers und den sich daraus ergebenden Folgefehlern resultierten Probleme bei der Dokumentation und Auswertung. Am schwierigsten gestaltete sich die Auswertung der Kategorie „fehlerhafte Angaben zum Patienten“, da hier die größten Unterschiede zu den ursprünglich definierten Kategorien auftraten. In den Fehlerdokumentationen wurde 8-mal die KOF fehlend geltend gemacht und der neu definierten Subkategorie „KOF fehlend“ zugeordnet. Mit 1,5% ist die Fehlerquote allerdings so gering, dass sich die Frage nach der Notwendigkeit einer getrennten Erfassung stellt. Wenn Körpergröße und Körpergewicht angegeben sind und mit der korrekten KOF dosiert wurde, ist der fehlende Eintrag der KOF zudem als von geringer Relevanz einzustufen. Für die Weiterentwicklung des Dokumentationssystems sind in Fehlerkategorie 1 für die Zukunft folgende Subkategorien zu empfehlen:

- Gewicht/Größe falsch/fehlend
- KOF falsch berechnet
- Andere Patientendaten fehlerhaft
- Andere Patientendaten fehlend

In 28 Dokumentationsbögen wurde als Fehler „falsches Protokoll“ angegeben. Da dazu keine weitergehenden Informationen dokumentiert waren, wurde die Fehlerkategorie „Zytostatikum“ um die Unterkategorie „falsches Protokoll“ erweitert. Denkbar wäre auch eine Einordnung unter „falsches Zytostatikum“, wenn das falsche Protokoll ein oder mehrere falsche Zytostatika enthält. Für zukünftige Erhebungen sollte die zusätzliche Subkategorie „falsches Protokoll“ dennoch beibehalten werden. Das vollständige Fehlen einer Dosisangabe wurde für 16 Verordnungen dokumentiert. Dafür wurde eine neue Subkategorie gebildet, die man ebenso beibehalten sollte. Die Berechnung kann zwar vom Apotheker vorgenommen werden, aber die verordnete Dosis muss vom verordnenden Arzt schriftlich bestätigt werden. In

der Praxis erreicht dieser Fehler den Patienten in der Regel nicht.

Dokumentierte Fehler, die in keine der vier definierten Hauptkategorien einzuordnen waren, gingen nicht in die Auswertung ein. So war von drei Kliniken eine neue Fehlerkategorie definiert worden, die sich auf die falsche Auswahl einer Trägerlösung oder des Volumens bezog. Diese Fehlerkategorie war ursprünglich nicht vorgegeben worden, weil die Auswahl der Trägerlösung spezielle pharmazeutische Kenntnisse voraussetzt und in der Universitätsmedizin Mainz in der pharmazeutischen Verantwortung gesehen wird. In die Auswahl der Trägerlösung müssen Art der Applikation, Kompatibilität und Stabilität der applikationsfertigen Zubereitung als Entscheidungskriterien eingehen. Die Art und das Volumen der Trägerlösungen sollten standardisiert sein und für die genutzten Chemotherapieprotokolle im Herstellungsprogramm der Apotheke hinterlegt sein. Damit können auch Sicherheitsmaßnahmen wie die Zubereitung von Vincristin als 100-ml-Kurzinfusion routinemäßig umgesetzt werden. Es bleibt dem verordnenden Arzt möglich, in begründeten Ausnahmefällen abweichende Verordnungen zu Art und Volumen der Trägerlösung zu machen. In einer vergleichbaren Untersuchung [7] in einem spanischen Universitätsklinikum wurden fehlende Art und fehlendes Volumen der Trägerlösung über einen Zeitraum von 15 Monaten mit einem Anteil von 16,3% aller Verordnungsfehler dokumentiert. Der hohe Prozentsatz spricht auch dafür, dass zur Qualitäts- und Effizienzsteigerung der Verordnung und des Verordnungsmonitorings die Auswahl von Art und Volumen der Trägerlösung standardisiert und elektronisch unterstützt durch den Apotheker erfolgen sollte.

Nicht in die Auswertung gingen die Dokumentationen zur fehlerhaften Angabe der Applikationsart ein. Es handelte sich dabei beispielsweise



## Nur zum persönlichen Gebrauch

### © Deutscher Apotheker Verlag

um die fehlende Verordnung in einer Elastomerenpumpe, die fehlerhafte Verordnung einer Methotrexat-Infusion zur intrathekalen Gabe und Verordnungen von Kurzinfusionen anstelle von Injektionszubereitungen für die protokollgemäße Bolusapplikation. Diese Fehler könnten auch der Fehlerkategorie „fehlerhafte Art und Volumen der Trägerlösung“ zugeordnet werden und diese gegebenenfalls um die Art des Behältnisses ergänzt werden. Die klinische Relevanz dieser Verordnungsfehler ist als gering einzuschätzen, da der Fehler ein potenzieller bleibt und vor der Applikation am Patienten korrigiert wird. Allerdings ist die fehlerhafte Zubereitung mit wirtschaftlichen Nachteilen verbunden.

#### Relevanz der Verordnungsfehler

Die Kategorisierung der Verordnungsfehler nach Relevanz lag im Ermessen jedes einzelnen Dokumentierenden. Es waren keine konkreten Vorgaben und Definitionen dazu gemacht worden. In der Regel erfolgt die Zuordnung der Relevanz entsprechend dem zu erwartenden Schweregrad der resultierenden Schädigung durch den potenziellen Medikationsfehler (kein Schaden bis lebensbedrohlich für den Patienten). Die Zuordnung erfordert vom dokumentierenden Apotheker Antizipation und Erfahrung. Die Kategorisierung durch den dokumentierenden Apotheker ist nach unseren Untersuchungen nicht verlässlich [6] und die Einzelergebnisse dürfen daher nicht überbewertet werden. Zytostatika sind aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite, steilen Dosis- und Toxizitätswirkungskurven, der individualisierten Dosierung und schwerwiegenden Folgen bei Über- oder Unterdosierung den „critical dose drugs“ zuzuordnen. Darüber hinaus sind Zytostatika auch als „critical use drugs“ [2] einzuordnen, da viele onkologische Patienten eine oder mehrere kritische Faktoren (Alter, Organfunktion, Komorbiditäten etc.) aufweisen, die die Sicher-

heit und Wirksamkeit der Zytostatikatherapie beeinträchtigen können. Daraus leitet sich die Notwendigkeit und Bedeutung des Monitorings der Zytostatikaverordnungen im Rahmen der zentralen Zytostatikazubereitung ab.

In einer Untersuchung von Small et al. [15] zu Verordnungsfehlern bei Zytostatikaverordnungen wurde festgestellt, dass bei Umstellung auf die elektronische Verordnung insbesondere die Häufigkeit von Fehlern mit geringer Relevanz stark reduziert wurde. Die elektronische Verordnung und der Zugang aller Beteiligten zur elektronischen Patientenakte mit vollständigen und aktuellen Daten sind von Vorteil für die Patientensicherheit. Zudem wird die Häufigkeit falscher Dosisberechnungen bei elektronischer Verordnung stark reduziert [3, 15].

Für die Kategorisierung der Relevanz fehlerhafter Dosierungen wäre eine weitergehende Differenzierung der Dosisabweichung von Interesse. Denkbare Kategorien könnten > 10%, > 50%, > 100% und > 1000% sein. Dadurch könnte sich die unterschiedliche Einordnung der Relevanz für Dosisabweichungen > 10% besser nachvollziehen lassen.

#### Fehlerinzidenz

Die Häufigkeit von Verordnungsfehlern liegt für Zytostatikaverordnungen über den Verordnungsfehlerlerraten sonstiger Arzneimitteltherapien [15]. Faktoren, die dazu beitragen, sind die Verordnung nach KOF, Komplexität der Therapieprotokolle, häufig erforderliche Dosismodifikationen, rasche Entwicklung neuer Zytostatika und Therapieschemata. Beschrieben werden Verordnungsfehlerlerraten häufig im Zusammenhang mit der Umstellung von der Verordnung mit spezifischen Anforderungsformularen auf die elektronische Verordnung [9, 13, 15]. Bei herkömmlicher Verordnung werden Fehlerlerraten von 0,5% (mit Therapieprotokoll spezifischen Vordrucken)

[9] über 1,4% [7, 16], 3,6 bis 4,2% [14], 4,15% (mit Therapieprotokoll spezifischen Vordrucken) [9], 8,4% [13] bis 20% [15] berichtet. Bei elektronischer Verordnung werden Verordnungsfehlerlerraten von 1,1% [13], über 1,9% [14], 3,2% [8] bis 11,8% [15] beschrieben. Allerdings sind die Fehlerlerraten aufgrund unterschiedlicher Erfassungssystematiken und Standortfaktoren kaum vergleichbar. Auch die Zusammensetzung des Patientenkollektivs scheint eine Rolle zu spielen. Walsh et al. [16] registrierten bei pädiatrischen Patienten eine höhere Medikationsfehlerlerrate als bei erwachsenen onkologischen Patienten. Markert et al. [14] beschreiben bei stationären onkologischen Patienten höhere Verordnungsfehlerlerraten als bei ambulanten Patienten. Die in unserer Untersuchung gefundene durchschnittliche Fehlerinzidenz (0,77%) ist im Vergleich sehr gering, wobei die in einem Universitätsklinikum mit elektronischer Verordnung gefundene Fehlerinzidenz von 0,08% eingerechnet ist. Die variierenden Fehlerinzidenzen in den 17 Universitätskliniken könnten auf unterschiedliche Standortfaktoren zurückzuführen sein. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der zu bearbeitenden Verordnungen pro Tag (39 bis 212) und der Fehlerinzidenz konnte nicht gefunden werden.

Eine andere Möglichkeit, die Qualität der Verordnung und des Verordnungsmonitorings zu vergleichen, könnte die Prüfung der Einhaltungsraten von Verordnungsregeln sein (vergleiche [5]). Dazu müsste zunächst ein gemeinsamer Katalog mit Regeln erarbeitet werden.

#### Fehlerhafte Dosis

In allen dokumentierenden Kliniken war die falsche Dosisberechnung (48%) der am häufigsten dokumentierte Verordnungsfehler. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Untersuchungsergebnis von Garzás-Martin et al. [7], die ebenfalls die falsche Dosis mit 28% als häufigsten Verord-

nungsfehler fanden. Diese Untersuchung wurde monozentrisch über 15 Monate durchgeführt, und die definierten Fehlerkategorien waren nur teilweise übereinstimmend mit den in der hier vorliegenden Untersuchung gewählten Kategorien. Unabhängig von Zeitpunkt und Länge des Beobachtungszeitraums war in der Universitätsmedizin Mainz die falsche Dosisberechnung jeweils der häufigste Fehler (vergleiche [11]).

Um eine falsche Dosisberechnung erkennen zu können, bedarf es einer vollständigen und sorgfältigen Angabe der für die Dosisberechnung erforderlichen Patientenparameter. Bei der elektronischen Verordnung können die entsprechenden Felder als Pflichtfelder definiert und die Berechnung der patientenindividuellen Dosis automatisiert werden. Die Effektivität dieser Maßnahme zeigt sich deutlich in der geringen Fehlerinzidenz von 0,08% in der teilnehmenden Klinik mit elektronischer Verordnung.

In zukünftigen Untersuchungen sollte die Dosisreduktion eine eigene Fehlerkategorie darstellen. Subkategorien könnten die fehlende Dosisreduktion oder falsche Dosisreduktion sein. Ein zu beachtendes Problem ist auch die Notwendigkeit und Art der Dosisanpassung bei übergewichtigen Patienten. Mangelnde Dosisanpassung an die Organfunktionen stellt insgesamt in der Arzneimitteltherapie ein bedeutendes Arzneimittelrisiko dar und das gilt besonders für Zytostatikaverordnungen. Voraussetzung für ein zielführendes Monitoring bezüglich der Dosisreduktion ist die Zugriffsmöglichkeit auf die Laborparameter der Patienten. Da es keine eindeutigen Standards für die erforderlichen Dosisanpassungen gibt, müssen diese in den einzelnen Kliniken im interdisziplinären Team prospektiv festgelegt werden, um ein effektives und effizientes Vorgehen zu gewährleisten.

Als nachteilig für die Fehleranalyse erwies sich, dass das Ausmaß der Dosisabweichung nicht erfasst wurde.

Es stellt sich die Frage, ob jede Abweichung über 10% als von gleicher Relevanz einzuordnen ist. Beispielsweise wurde in einem Fall eine 1000fache Unterdosierung aufgrund einer Verordnung in Milligramm statt Gramm dokumentiert. Bei Zytostatika, die in einem breiten Dosisbereich angewandt werden (z.B. Cytarabin, Methotrexat), könnte dieser Fehler unbemerkt bleiben.

Die Festlegung der Akzeptanzgrenzen  $\pm 5\%$  bei Kindern und  $\pm 10\%$  bei Erwachsenen ist eine reine Konventionmethode. Für den Einzelfall ist nicht gezeigt, welche prozentuale Abweichung bei welcher Chemotherapie klinisch relevant ist. Die erlaubten Gehaltsabweichungen bei den Fertigarzneimitteln ( $\pm 5\%$  zum Zeitpunkt der Herstellung) und die manuelle Herstellung der Zytostatikazubereitungen lassen die Umsetzung von zu genau berechneten Verordnungen gar nicht zu. Wenn Nachkommastellen bei Dosierungen  $> 10$  Nenneinheiten verordnet werden, kann nach den mathematischen Regeln gerundet werden. Zwischenzeitlich wird auch die Dosierung der Zytostatika nach KOF in Frage gestellt und neben Methoden des therapeutischen Drug-Monitorings auch die Gabe von standardisierten Dosierungen (dose-banding) geprüft [10]. Weitere interessante Dokumentationskriterien wären Über- oder Unterdosierung und Überschreitung der empfohlenen maximalen Einzeldosis oder kumulativen Dosis.

#### Dringlichkeit der Bereitstellung

Um den bei der Bearbeitung und Herstellung der Zytostatika-Anforderungen entstehenden Zeitdruck und seinen Einfluss zu bewerten, sollte die Zeitspanne zwischen Eingang der Anforderung in der Apotheke und der Auslieferung erfasst werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei den acht berichtenden Kliniken sind ein Hinweis auf unterschiedliche Organisationsstrukturen. Ein kurzes Zeitintervall muss nicht unbedingt durch

einen hohen Anteil ambulanter Patienten bedingt sein. Bei zukünftigen Erhebungen müsste zur Beantwortung dieser Fragestellung zusätzlich die Versorgungsform erfasst werden (ambulant, tagesklinisch, stationär). Auch für ambulante Patienten sind durch entsprechende organisatorische Maßnahmen die Verordnungen am Vortag der Applikation möglich. Frühzeitige Anforderungen setzen eine gute Organisation im klinischen Bereich, hohe Flexibilität und eine enge Zusammenarbeit zwischen verordnendem, herstellendem und applizierendem Personal voraus. Andererseits zeigt sich mit einem Anteil von 47% der Dringlichkeit unter zwei Stunden deutlich die Notwendigkeit einer zeitnahen und ortsnahen Versorgung. Dies ist auch im Hinblick auf die begrenzte Haltbarkeit, den hohen Preis der Zubereitungen und das spezielle Patientenkollektiv zu berücksichtigen. Fehlende Freigaben oder fehlerhafte Anforderungen können zu einer mehrstündigen Wartezeit führen, was für die Lebensqualität der Patienten eine nicht zu vernachlässigende Einbuße bedeuten kann. Wartezeiten lassen sich aus der Erfassung allerdings nicht ableiten.

#### Schlussfolgerungen

Die kurzfristig etablierte Dokumentationsdatenbank ist geeignet, um einen Überblick zur Bedeutung des Verordnungsmonitorings im Rahmen der zentralen Zytostatikazubereitung in deutschen Universitätskliniken zu erhalten. Für zukünftige Erhebungen sollten die Fehlerkategorien und Subkategorien auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse ergänzt werden. Der Dokumentations- und Auswertungsaufwand ließe sich dadurch reduzieren. Die Inzidenz der Verordnungsfehler variierte standortbezogen. Die meisten Fehler traten in der Fehlerkategorie Dosisberechnung (48%) auf. Die überwiegend als von hoher Relevanz eingeordneten Verordnungsfehler unterstreichen die Bedeutung

## Nur zum persönlichen Gebrauch

### © Deutscher Apotheker Verlag

des Verordnungsmonitorings für die Arzneimitteltherapiesicherheit. Dem Zeitaufwand für das Verordnungsmonitoring steht ein Nutzen gegenüber, der die Kosten überwiegt. Die Finanzierung des Verordnungsmonitorings zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit bei onkologischen Patienten sollte für die Entscheidungsträger selbstverständlich sein.

#### Danksagung

Wir danken Apothekerin M. Kunkel, Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, für das Zurverfügungstellen und Adaptieren der APOSTAT-Datenbank Mainz als Dokumentationsdatenbank. Wir danken allen teilnehmenden Kliniken für die Mitwirkung.

#### Analysis of prescription monitoring in pharmacy-based cytotoxic preparation units of German University hospitals

Today monitoring of chemotherapy prescriptions by oncology pharmacists is recommended in order to improve medication use and to prevent medication errors. The pharmacy departments of 21 university hospitals in Germany took part in a prospective audit according to error prevention of chemotherapy prescriptions. During the observation period of 8 to 12 weeks 835 prescription errors were documented. 748 errors were analysed with regard to type and severity. 48% of the prescription errors fall into the category "dose error"; out of these 76% were classified as severe. The other errors were related to patient data (26%), administration date (15%) and selection of antineoplastic drug substances. The incidence of prescription errors amounted on average to 0.77% based on 1.950 prescriptions per day in 17 university hospitals. As most of the errors

were highly relevant for patient outcome the checking of prescriptions by oncology pharmacists is obligatory. The benefit of prescription monitoring in the pharmacy department is obvious and the service is highly efficient (37% of errors detected in < 5 min, another 37% of errors detected in 5–15 min).

**Key words:** Prescription monitoring, antineoplastic therapy, error type, severity, incidence, expenditure of time

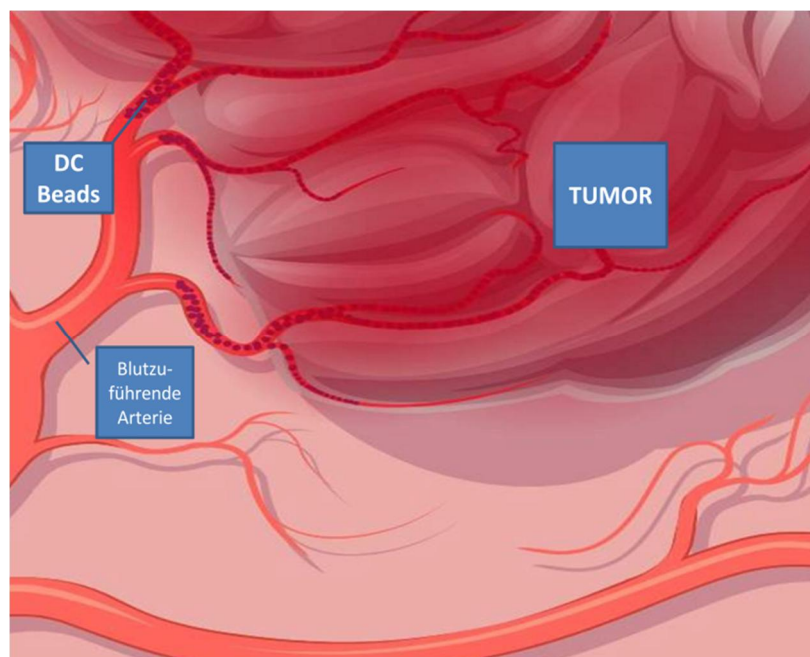
#### Literatur

1. Ausschuss für Arzneimittelherstellung und Analytik ADKA e.V. ADKA-Leitlinie: Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia in der Apotheke. Krankenhauspharmazie 2003;24:195–201.
2. American Pharmaceutical Association (APhA). Substitution of Critical Dose Drugs. <http://www.scribd.com/doc/31914796/Substitution-of-Critical-Dose-Drugs-APhA> (Zugriff 05/2010).
3. American Society of Health System Pharmacists. ASHP Guidelines on preventing medication errors with antineoplastic agents. Am J Health Syst Pharm 2002;59:1649–69.
4. Cohen MR, Anderson RW, Attilio RM, et al. Preventing medication errors in cancer chemotherapy. Am J Health Syst Pharm 1996;53:737–59.
5. Cusano FL, Chambers GR, Summach DL. A medication error prevention survey: five years of results. J Oncol Pharm Practice 2009;15:87–93.
6. Ganso M, Areschin S, Lange P, Emser A, et al. Verlässlichkeit eines Klassifikationssystems für pharmazeutische Interventionen. Krankenhauspharmazie 2007;28:273–83.
7. Garzías-Martin de Almagro MC, Lopez-Malo de Molina MD, Abellion RJ, Fernandez GI, et al. Pharmaceutical validation and error detection in the prescription of antineoplastics in oncohematological patients. Farm Hosp 2008;32:286–9.
8. Grangeasse L, Fagnoni-Legat C, Chaigneau L, et al. Computerized prescribing of standardized chemotherapy schedules: residual medication errors and pharmaceutical interventions. J Pharm Clin 2006;25:33–8.
9. Hicks KL, Paldino L, Manning M, Bhalla P. Implementation of pre-printed chemotherapy order forms in a community hospital: impact on prescribing error rates. ASHP-Midyear Clinical Meeting 2005;40:P-231D.
10. Kaestner SA, Sewell GJ. National survey investigating UK prescribers' opinions on chemotherapy dosing and dose-banding. Clin Oncol 2009;21:320–8.
11. Krämer I, Maas B, Huber C. Pharmazeutische Betreuung onkologischer Patienten. Therapiemonitoring in der zentralen Zytostatikazubereitung. Krankenhauspharmazie 1997;18:56–63.
12. Kunkel M, Ganso M, Krämer I. APOSTAT – eine elektronische Datenbank zur Dokumentation und Analyse der pharmazeutischen Betreuung. Krankenhauspharmazie 2009;30:156–65.
13. Lopez PC, Cuervo SM, Vicedo BT. Computer-assisted prescription for chemotherapy: Evaluation of its implementation in a general hospital. Atencion Farm Eur J Clin Pharm 2007;9:95–8.
14. Markert A, Thierry V, Kleber M, Behrens M, et al. Chemotherapy safety and severe adverse events in cancer patients: Strategies to efficiently avoid chemotherapy errors in in- and outpatient treatment. Int J Cancer 2009;124:722–8.
15. Small MDC, Barett A, Price GM. The impact of computerized prescribing on error rate in a department of oncology/haematology. J Oncol Pharm Practice 2008;14:181–7.
16. Walsh KE, Dodd KS, Seetharaman K, et al. Medication errors among adults and children with cancer in the outpatient setting. J Clin Oncol 2009;27:891–6.

### 3 Ladungskapazität und physikalisch-chemische Stabilität von DC Beads™ beladen mit Camptothecin-Derivaten

#### 3.1 Transarterielle Chemoembolisation

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) ist in den vergangenen Jahren zu einem festen Bestandteil des interdisziplinären Behandlungskonzepts bei inoperablen hepatozellulären Karzinomen (HCC) geworden. Die TACE beinhaltet die simultane Embolisation von tumorversorgenden Arterien mit einer lokalen Chemotherapie. Durch die Embolisation wird ein künstlicher Verschluss von Arterien herbeigeführt. In einem minimal-invasiven Eingriff, meist durch einen Radiologen durchgeführt, wird embolisches Material durch einen Mikrokatheter in die versorgenden Arterien eines hypervaskularisierten Tumors disponiert.



**Abbildung 4**      **Schematische Darstellung des Prinzips der transarteriellen Chemoembolisation**

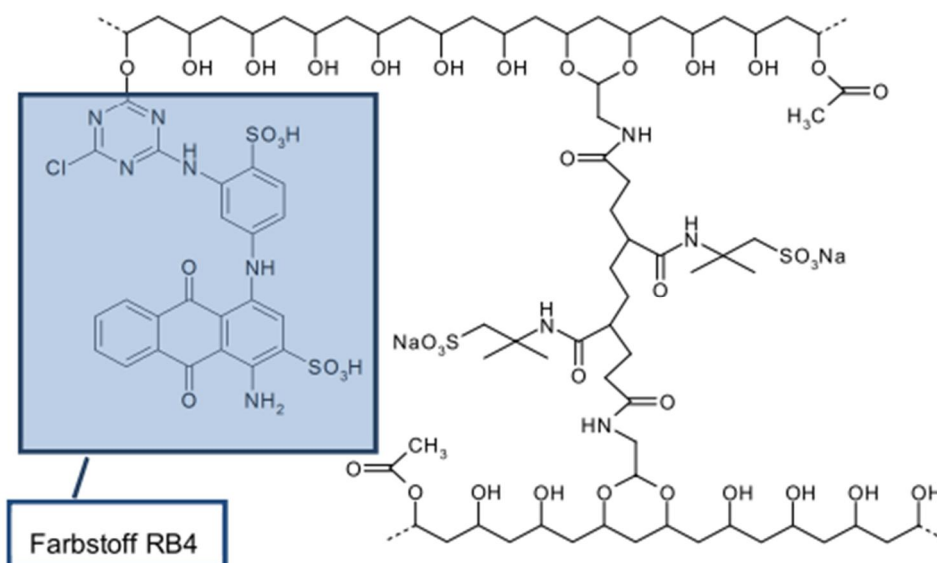
In Folge der mangelnden Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr verringert sich die Tumormasse. Die TACE vereint den Aspekt des Nährstoffentzugs des Tumors mit

dem Aspekt der verlängerten und lokal begrenzten Wirkung des Chemotherapeutikums im Tumorgewebe. Die kontinuierliche Freisetzung in niedriger Dosierung führt zu einer signifikant reduzierten systemischen Toxizität der Chemotherapeutika.<sup>19-22</sup>

Bei der „konventionellen“ TACE wird das gewählte Zytostatikum (Doxorubicin, Mitomycin, Cisplatin etc.) zuvor in einem auf Öl basierendem Medium (z.B. Lipiodol®) emulgiert. Über den Embolisationskatheter wird das emulgierte Chemotherapeutikum in einer hohen Konzentration lokal appliziert. Direkt im Anschluss erfolgt der Verschluss der versorgenden Gefäße durch Embolisation mit Mikrosphären (z.B. Bead Block™). Nachteil dieser Methode ist der relativ schnelle Abtransport des Zytostatikums vom Wirkort.<sup>23-25</sup>

Eine Verbesserung und Weiterentwicklung konnte mit der sogenannten Ein-Schritt-TACE oder Precision TACE erzielt werden. Dieses System mit wirkstoffreisetzenden Mikrosphären (Drug Eluting Beads, DEB) ermöglicht die gleichzeitige Embolisation und Zytostatika-Applikation sowie eine präzisere Dosierung durch kontinuierliche Wirkstofffreisetzung. Die Medikamentenfreisetzung hält bis zu 14 Tage lang an. Die Tumornekrose lässt sich zwei bis drei Wochen nach der Behandlung nachweisen.<sup>26</sup>

Das Mikrosphärenengerüst der Beads (DC Bead™, Biocompatibles, Farnham, UK) basiert auf einem Polyvinyl Alkohol (PVA) haltigen Grundgerüst, welches durch Addition von N-Acryloylaminoacetaldehydedimethylacetal (NAAADA) und anschließendem „Cross-Linking“ mit 2-Acrylamido-2-methylpropanesulfonat (AMPS) Gruppen funktionalisiert wird. Zur besseren Sichtbarkeit werden die Beads mit dem wasserlöslichen Farbstoff RB4 blau gefärbt.<sup>16;20;27</sup>



**Abbildung 5** PVA-Grundstruktur der DC Beads™<sup>27</sup>

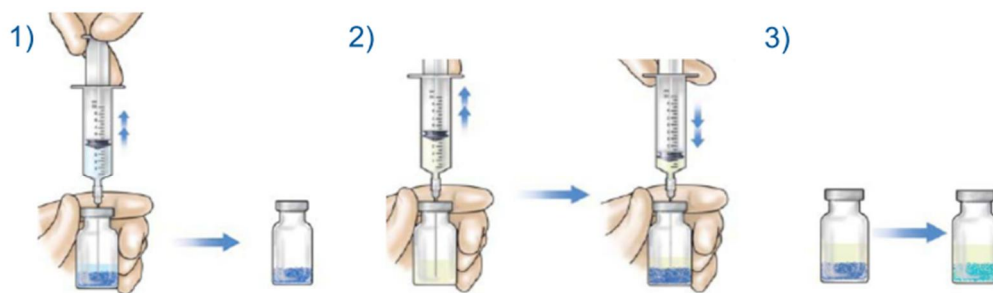
Die vollständig polymerisierten Mikrosphären bestehen zu über 90% aus Wasser, welches zwischen den Molekülen eingelagert ist. Die hohe Anzahl an negativgeladenen AMPS-Resten ermöglicht es, kationische Wirkstoffe zu binden und auch wieder freizusetzen. Durch die Beladung mit kationischen Wirkstoffen werden Wassermoleküle, die in den Beads eingelagert sind, verdrängt. Infolgedessen schrumpft der Mikrosphärendurchmesser um 20 – 30%.<sup>16;22</sup> DC Beads™ sind in vier verschiedenen Größenbereichen auf dem Markt erhältlich (100 – 300 µm, 300 – 500 µm, 500 – 700 µm und 700 – 900 µm). Hauptsächlich wird der Größenbereich von 300 – 500 µm zur transarteriellen Chemoembolisation eingesetzt. Beads mit einem Durchmesser von 500 – 700 µm werden nur zum endgültigen Verschließen der Arterien verwendet (Precision-V-Studie).<sup>28</sup>



**Abbildung 6** Handelsübliche DC Beads™ der Firma Biocompatibles

Die handelsüblichen DC Bead™-Vials enthalten die Mikrosphären in einer Phosphatpufferlösung. Vor der Wirkstoffbeladung der DC Beads™<sup>11;29</sup> muss so viel Pufferlösung wie möglich von den Beads entfernt werden. Die Beladungseffektivität mit den kationischen Wirkstoffen ist stark von der Ionenkonzentration abhängig. Je größer die Ionenstärke des Umgebungsmediums, desto weniger Wirkstoff wird in die Mikrosphären geladen.<sup>19</sup> Die Wirkstofflösung (z.B. Irinotecan - Campto®) muss daher zu einer soweit wie möglich pufferfreien Beadsuspension gegeben werden. Im Falle einer Lyophilisat- bzw. Pulverformulierung des zur Beladung vorgesehenen Zytostatikums (z.B. Topotecan - Hycamtin®) wird dieses zuvor in möglichst hoher Konzentration rekonstituiert. Die zu verwendende Menge an Wirkstofflösung pro Milliliter Beads hängt von der benötigten Dosierung und der Beladungskapazität der Beads ab. Für Doxorubicin hat sich eine Dosis von 50 mg<sup>11</sup> und für Irinotecan eine

Dosis von 100 mg<sup>29</sup> auf 2 ml Beads bewährt. In der Beladungsphase nehmen die Beads das kationische Zytostatikum in ihre Polymerstruktur auf. Die Arzneistoff-Bead-Suspension soll vorsichtig geschüttelt werden, um die Beladungszeit zu verkürzen. Durch die Beladung ändert sich die Farbe der Beads. Im Falle von Doxorubicin ändert sich die Farbe von transparent-blau nach rot.<sup>12</sup> Bei Irinotecan werden die Beads türkisfarben<sup>22</sup> und bei Topotecan gelb-grünlich<sup>16</sup>. Die Beladungszeit, welche durch Bewegung beschleunigt werden kann, variiert zwischen den einzelnen Wirkstoffen und ist, wie für Doxorubicin gezeigt, auch von dem Beaddurchmesser abhängig.<sup>14;16;19</sup>



**Abbildung 7** **Beladung der DC Beads™<sup>29</sup>:**  
**1) Entfernen der Pufferlösung,**  
**2) Überführen der Wirkstoff-Lösung zu den Beads,**  
**3) Beladungsvorgang (hier: Irinotecan)**

Die beladenen Beads werden vor der Applikation mit einem nichtionischen Kontrastmittel und 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gemischt. Das Verhältnis von Kontrastmittel und Salzlösung sollte so gewählt sein, dass die Beads weder sinken noch aufschwimmen, sondern sich gleichmäßig in der Lösung verteilen.<sup>30</sup> Ebenso hängt der Anteil an Kontrastmittel (KM) auch von den Gegebenheiten während der Angiographie und den Gefäßzuständen des Patienten ab. Die Gefahr der Katheterverstopfung durch zu hohe Mengen an Kontrastmittel oder einer zu gepackten Bead-Suspension muss ebenfalls beachtet werden.

Die Precision-TACE mit Doxorubicin beladenen DC-Beads (DEBDOX) der Herstellerfirma Biocompatibles wird seit einigen Jahren erfolgreich zur Therapie von Patienten mit Lebertumoren eingesetzt. Mit dem Camptothecin-Derivat Irinotecan wurde ein weiterer Wirkstoff gefunden, der auf DC Beads™ geladen (DEBIRI) zur Behandlung inoperabler Lebermetastasen bei Kolorektalkarzinomen eingesetzt wird.<sup>31</sup> Für die mit Irinotecan-beladenen DC Beads™ (DEBIRI 100 mg / 2 ml) gibt der Hersteller eine Haltbarkeit von 14 Tagen bei 2 – 8 °C an. Nach Mischung mit

Kontrastmitteln liegen keine Stabilitätsdaten vor.<sup>29</sup> Aufgrund der unzureichenden Datenlage zur Wirkstofffreisetzung und zur physikalisch-chemischen Stabilität von Irinotecan beladenen DC Beads™ wurden in Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma entsprechende Untersuchungen durchgeführt.

Topotecan, wie Irinotecan zu der Gruppe der Topoisomerase-1-Inhibitoren gehörend, wird als weitere Option für die Beladung von DC Beads™ getestet. Topotecan (Hycamtin®) wird systemisch für die Behandlung von Patienten mit metastasierendem Ovarialkarzinom, rezidivierendem kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) und in Kombination mit Cisplatin bei rezidivierendem Zervixkarzinom eingesetzt.<sup>32</sup> Durch den Einsatz in der Precision-TACE käme eine neue Option für Patienten mit Lebermetastasen der erwähnten Karzinome in Betracht. Mit Topotecan beladenen DC Beads™ (DEBTOP) wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine *in vivo* - Studien durchgeführt. Forster et al.<sup>16</sup> führten *in vitro* – Studien zum Ladungsprofil der Beads für Topotecan durch, bestimmten die Kompressibilität, das Freisetzungsprofil in Phosphatpuffer-Lösung und verglichen die Wirkung von DEBIRI mit DEBTOP an humanen Pankreas-Adenokarzinom-Zellen (PSN-1) in Maus-Xenograft-Modellen. Es wurde dabei gezeigt, dass die maximal mögliche Beladung bei 40 – 45 mg Topotecan pro ml Beads liegt. Jedoch benötigt Topotecan, im Unterschied zu Irinotecan, nicht die enzymatische Aktivierung vom Prodrug zum aktiven Metaboliten und ist daher in sehr viel geringeren Dosen wirksam.<sup>16</sup> Die üblichen Dosierungen von Topotecan für die i.v. Behandlung der oben genannten Indikationen betragen zwischen 0,5 und 1,5 mg/m<sup>2</sup>/Tag.<sup>32</sup> Sie liegen damit um 100 bis 200% unter der Dosierung von Irinotecan. Forster et al.<sup>16</sup> konnten im Tierversuch zeigen, dass Dosierungen von 3,3 – 6,6 mg bei DEBIRI und nur 0,2 – 0,4 mg bei der Gabe von DEBTOP verträglich waren. Für den Einsatz in der klinischen Praxis wird demnach nur ein Bruchteil der maximal beladbaren Menge von 40-45 mg auf die DC Beads™ geladen werden müssen. Zudem sollte die Beladung der zentralen Zytostatikaherstellung möglichst praktikabel durchgeführt werden können und Stabilitätsdaten zur validen Haltbarkeitsdeterminierung der Produkte vorliegen.



### **3.2 Stability of irinotecan-loaded drug eluting beads (DC Bead™) used for transarterial chemoembolization**

Ziel der in der nachfolgenden Originalpublikation dargestellten Studie war die Bestimmung der Wirkstofffreisetzung, der Ladungskapazität und der physikalisch-chemischen Stabilität Irinotecan beladener DC Beads™ und deren Mischungen mit einem nichtionischen Kontrastmittel (Accupaque®, Imeron®, Ultravist®) über 28 Tage.

J.Kaiser, J.Thiesen, I.Krämer

Journal of Oncology Pharmacy Practice • Volume 16: No 1 • 2010 • P. 53-61

# Stability of irinotecan-loaded drug eluting beads (DC Bead™) used for transarterial chemoembolization

Jeanette Kaiser, PharmD

Judith Thiesen, PhD

Irene Krämer, PhD

**Purpose.** The aim of this study was to determine the loading efficiency, physicochemical stability, and release of irinotecan-loaded DC Beads™ (bead size 100–300 µm, 300–500 µm) before and after mixing with nonionic contrast medium (Accupaque® 300, Imeron® 300, Ultravist® 300) during a prolonged period of time (28 days) when stored at room temperature or refrigerated.

**Methods.** DC Beads™ were loaded with 50 mg irinotecan (Campto®) per milliliter beads in a 2 h loading period. Drug loading efficiency and stability were determined by measuring the irinotecan concentration in the excess solution. A free-flowing *in vitro* elution method for a period of 2 h and phosphate buffered solution (PBS, pH 7.2) as elution medium were used to analyze the integrity of the irinotecan-loaded. Stability of irinotecan-loaded beads after mixing with an equal volume of three different nonionic contrast agents was determined by measuring irinotecan concentrations in the excess solutions. Vials with loaded beads were stored protected from light at room temperature. Mixtures with contrast media were stored protected from light under refrigeration (2–8°C). Samples were taken periodically over a 4 week period (day 0, 1, 3, 7 and 28). A reversed phase HPLC assay with ultraviolet detection was utilized to analyze the concentration and purity of irinotecan.

**Results.** The loading procedure of DC Beads™ with irinotecan drug solution resulted in a loading

percentage of 96% (bead size 100–300 µm) independent of the storage time. No differences in loading levels and no irinotecan degradation products were observed over the period of 28 days, while the test vials were stored light protected at room temperature. Integrity of loaded irinotecan was also given over that same period of time according to the purity and concentration of irinotecan measured after intentional elution with PBS. Mixing of irinotecan-loaded beads (bead size 100–300 µm, 300–500 µm) with nonionic contrast media decreased the irinotecan loading efficiency by ~5–10% during a maximum period of 24 h. However, no further elution or degradation was observed during a 4-week period when stored protected from light under refrigeration.

**Conclusions.** Irinotecan-loaded DC Beads™ are shown to have adequate physicochemical stability over a period of at least 28 days when stored light protected at room temperature. Due to concerns of microbiological overgrowth refrigeration should always be considered. The preparation of admixtures of irinotecan-loaded beads with contrast medium in centralized cytotoxic preparation units is not recommended, because of rapid elution of 5–10% of irinotecan from the loaded beads. Furthermore, physicians see no advantages of admixtures due to the wide variation of mixing ratios of drug-loaded beads with contrast medium.

Department of Pharmacy, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany

Corresponding author: Prof. Dr Irene Krämer, Department of Pharmacy, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany. Tel: 00496131177209, Fax: 00496131175525. E-mail: kraemer@apotheke.klinik.uni-mainz.de

In addition varying volumes of 0.9% sodium chloride solution are to be admixed during the chemoembolization procedure. *J Oncol Pharm Practice (2010) 16: 53–61.*

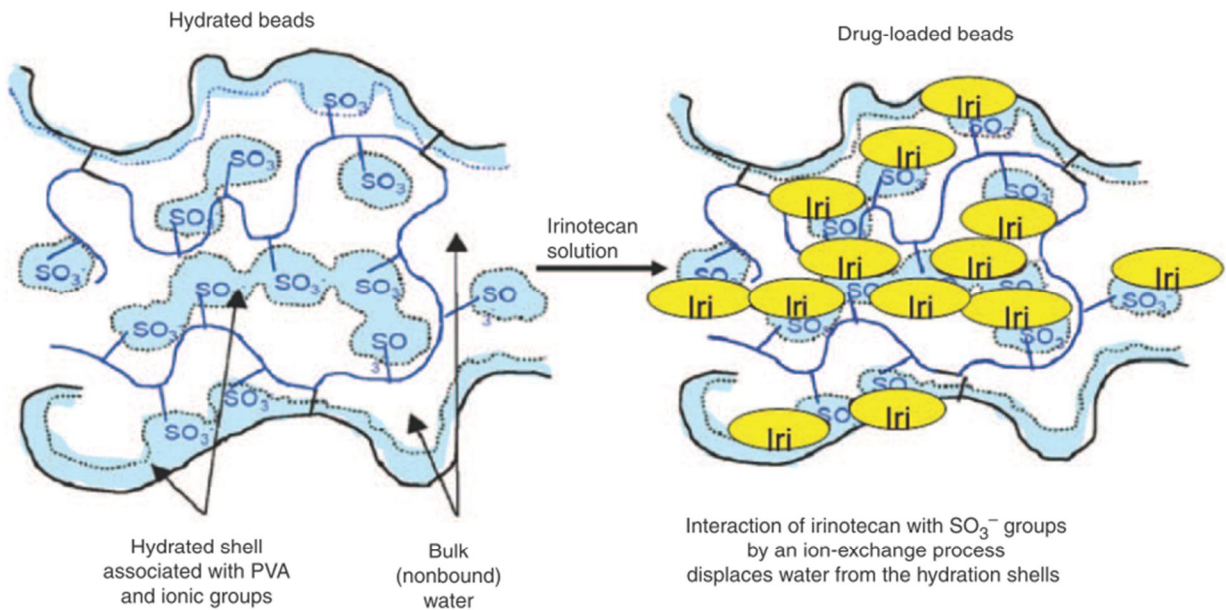
**Key words:** irinotecan; drug eluting beads; chemoembolization; contrast media; stability; drug release; high-performance liquid chromatography (HPLC)

**INTRODUCTION**

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cause of cancer-related death in both genders in Europe.<sup>1,2</sup> At first diagnosis liver metastases are present in 20% of CRC patient population. An additional 25% of patients develop liver metastases after surgery of the primary tumor.<sup>3</sup> The standard treatment procedure is abdominal resection, sometimes preceded by neoadjuvant chemotherapy. However, <20% of all patients are suitable candidates for surgery.<sup>4,5</sup> Patients with unresectable liver metastases are usually treated with systemic chemotherapy based on 5-fluorouracil (5-FU). Recently it has been shown that combination regimens including oxaliplatin or irinotecan and monoclonal anti-EGFR or anti-VEGF antibodies lead to higher response rates and an improved survival.<sup>6,7</sup>

Transarterial chemoembolization (TACE) is a loco-regional and established method in the treatment of CRC related liver metastases.<sup>8</sup> TACE involves selective arterial embolization of a tumors feeding artery combined with a simultaneous or subsequent local delivery of chemotherapeutic agents. Simultaneous

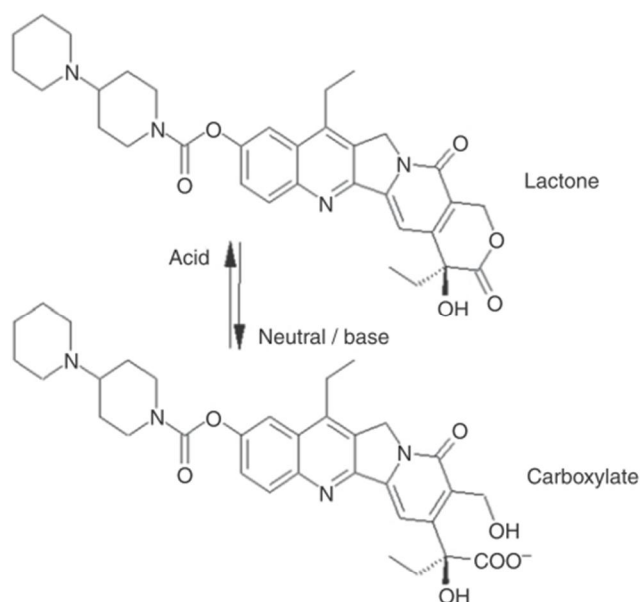
local delivery of anticancer drugs and embolization can be ensured by administration of drug-loaded microspheres, such as DC Beads™. Drug-loaded beads offer an option to control drug release over an extended period of time, which can enhance tumor response.<sup>9</sup> Prior to administration via a catheter, the loaded beads are mixed with an equal volume of nonionic contrast medium to guide the injection. The specific targeting of the drug at the site of the tumor implies enhanced efficacy by a maximized tumor dose and at the same time reduced toxicity due to negligible systemic exposure and toxicity.<sup>7,9</sup> DC Beads™ consist of nondegradable hydrogel microspheres based on polyvinyl alcohol (PVA) with a smooth surface and a precisely calibrated size of 100–900 μm. They are characterized by a high content (45% of the total polymer weight) of negatively charged AMPS (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate). The unsaturated AMPS monomer crosslinks the PVA backbone and allows the load and release of cationic drugs like doxorubicin hydrochloride or irinotecan hydrochloride by an increased number of sulfonate moieties (compare Figure 1). Charge-charge interactions of



**Figure 1.** Scheme of unloaded and irinotecan-loaded DC Beads™.

positively charged antineoplastic drugs and the negatively charged sulfonate groups of the hydrated beads represent the main mechanism of binding and ensure drug-polymer complexes.<sup>10</sup>

Irinotecan (CPT-11) is a water-soluble, semisynthetic analogue of camptothecin. After intravenous (i.v.) application it is rapidly converted in to its water-insoluble active metabolite SN-38 by liver carboxyl-esterase enzymes.<sup>11</sup> Both drugs bind to the topoisomerase I - DNA complex and prevent relegation of single strand breaks. The cytotoxic activity of the camptothecin derivatives is linked to an intact lactone moiety. However, in aqueous solutions the camptothecin derivatives undergo a pH-dependent reversible hydrolysis. Under acidic conditions (pH <4.5) the cyclic lactone form predominates, whereas at pH-values of 7.5 and above the lactone ring is quantitatively opened<sup>12-14</sup> (compare Figure 2). According to the product information, irinotecan-loaded DC Beads™ (100 mg irinotecan per 2 mL DC beads™) are stable over a period of 14 days when stored refrigerated. After mixing with nonionic contrast media irinotecan-loaded beads have to be administered immediately.<sup>15</sup> The bead admixture is reported to be stable for a maximum 24 h at 2-8°C or 4 h at room temperature.<sup>16</sup> The aim of this study was to determine the stability of irinotecan-loaded DC Beads™ before and after mixing with contrast media over a prolonged period of time (28 days) when stored at room temperature or under refrigerated



**Figure 2.** pH dependent equilibrium of ring-closed and ring-opened irinotecan.

conditions. In particular, the irinotecan loading level of irinotecan-loaded beads unmixed or mixed with contrast medium, and the integrity and chemical stability of irinotecan-loaded in beads were studied by a stability indicating HPLC assay.

## MATERIALS AND METHODS

### Loading of DC-beads™ with irinotecan HCl

Tests were performed with commercially available Campto® formulation (irinotecan HCl, 20 mg/mL, 100 mg per vial, Pfizer, Karlsruhe, Germany, lot 75M025-A/75M037-A), and commercially available DC Beads™ (Biocompatibles, Farnham, UK). Beads of the sizes 100-300 µm (7 × lot 060914F-2, 11 × lot 060921F-2), and 300-500 µm (6 × lot 060629F-4) were used. Each vial contains 2 mL of beads in physiological buffered saline with a total volume of 8 mL.<sup>17</sup>

Loading of the beads was performed according to the loading instructions of the manufacturer.<sup>18</sup> For each time interval three samples of beads were loaded and stored. At first as much saline as possible was removed from the hydrogel beads. 5 mL of Campto® solution (100 mg irinotecan HCl) was withdrawn from each vial as received and added to a vial of DC Beads™, respectively. During the loading period of 2 h<sup>7</sup> the vials were stored light protected at room temperature (25°C) and occasionally agitated. Afterwards test vials were stored under the same ambient conditions without agitation for a maximum of 28 days.

### Loading level and integrity of irinotecan-loaded DC beads™

The loading level of irinotecan-loaded DC Beads™ (IEB), bead size 100-300 µm, was determined by measuring the irinotecan concentration in the excess solution of the vials after 0, 1, 3, 7 and 28 days of storage. At each point of time the excess solution was removed from three test vials and filtered through a 5 µm filter needle. A 0.25 mL aliquot of each filtered excess solution was diluted 1:4 with 0.9% sodium chloride infusion solution [100 mL *freeflex* infusion bag (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany lot WD S021)] in order to fit the calibration curve. By adding 10 µL 1% phosphoric acid [117.65 µL 85% phosphoric acid (AppliChem, Darmstadt, Germany) diluted to 10 mL with Water HPLC Gradient Grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey)] pH

was adjusted to 3.5. Triplicate HPLC determinations were performed on each aliquot. Percentage rate loaded was calculated as given below:

$$\text{Percentage rate loaded (\%)} = \frac{(\text{Initial drug concentration in solution} - \text{residual drug concentration in solution})}{\text{Initial drug concentration in solution}} \times 100$$

#### ***In vitro* release and integrity of irinotecan-loaded in DC beads™**

Integrity of irinotecan in IEB was determined by analyzing irinotecan after drug release into phosphate buffered salt solution [GIBCO® PBS pH 7.2 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, lot 239268)]. At each predetermined point of time (0, 1, 3, 7 and 28 days after drug loading) from the samples prepared for the loading level tests, the residual excess solutions were removed and the remaining bead slurry was each suspended in 200 mL PBS elution medium. Elution was performed by agitating the suspensions with a roller mixer (200 mot/min) at room temperature and protected from light for 2 h. Aliquots of 250 µL were removed, using a filter needle. Aliquots were diluted 1:4 with 0.9% sodium chloride infusion solution and acidified with 20 µL of 1% phosphoric acid and analyzed in triplicate. HPLC chromatograms were scrutinized for degradation products. Percentage rate of undegraded irinotecan eluted was calculated as given below:

$$\text{Percentage rate eluted (\%)} = \frac{\text{Irinotecan concentration in PBS solution}}{\text{Irinotecan concentration in beads}} \times 100$$

#### **Irinotecan loading level of DC beads™ after mixing with contrast media**

The loading level of IEB (bead size 100–300 µm or 300–500 µm) was determined after mixing with different nonionic contrast media [Iohexol = Accupaque® 300 (GE Healthcare, München, Germany, lot 10580880), Iomeprol = Imeron® 300 (Bracco-Altana Pharma, Konstanz, Germany, lot 173611), Iopromid = Ultravist® 300 (Bayer Schering Pharma, Leverkusen, Germany, lot 73750A)], i.e. by measuring irinotecan concentrations in the excess solutions over a four-week period. Triplicate test solutions with each of the contrast media were

prepared by loading DC Beads™ with Campto® as described above. At the end of the loading procedure, aliquots were withdrawn from the excess solution and irinotecan concentrations determined by HPLC analysis (results given as 'day 0 unmixed'). The content of each vial (IEB plus excess solutions) was transferred to a 20 mL syringe [Omnifix®, 20 mL Luer Lock (B.Braun, Melsungen)] and approximately an equal volume of contrast medium (6.5 mL) added. Test solutions were stored light protected under refrigeration (2–8°C) over a period of 28 days. After 0, 1, 3, 7, 13 and 28 days of storage aliquots were withdrawn from each syringe by using a 5 µm filter needle. Samples of test solutions prepared with Accupaque® 300 or Imeron® 300 or Ultravist® 300 were diluted 1:10 and 1:5 with 0.9% sodium chloride infusion solution, respectively. Each sample was acidified by adding 10 µL of 1% phosphoric acid and samples were assayed immediately in triplicate using the HPLC assay. Percentage rate of loaded irinotecan was calculated as described above.

#### **HPLC assay**

Concentrations of irinotecan were determined by using a stability indicating reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) assay with photodiode array (PDA) detection. The HPLC system consisted of a Waters 717 plus autosampler, a Waters PDA detector 996 and a Waters 510 HPLC-pump. Data were acquired and integrated by using Waters Empower Pro, Empower<sup>2</sup> software, version 6.10.01.00 (Waters, Eschborn, Germany). The reversed phase column used was the PerfectChrom 100CN, 250 mm × 4.6 mm, particle size 5 µm (MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany). Mobile phase consisted of 75% 0.02 M potassium dihydrogen phosphate solution [2.72 g potassium dihydrogen phosphate anhydrous (Merck, Darmstadt, Germany) dissolved in 1 l of Water HPLC Gradient Grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey)] and 25% acetonitrile HPLC Gradient Grade (Promochem, Wesel, Germany). The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 225 nm. All samples were injected in triplicate with an injection volume of 20 µL. Retention time of irinotecan (lactone-form) was ~9 min and run time 15 min.

The HPLC analysis method used, was a modification of a published method for the determination of irinotecan in pharmaceutical dosage forms.<sup>19</sup>

Suitability of the assay was demonstrated by forced degradation of Campto® infusion solution. The resultant chromatogram of a base degraded

Campto® solution (2.5 mg/mL, 1N NaOH, pH 10, 60°C 1 h) showed a minor peak of the active irinotecan ring-closed lactone form ( $t_R$ : 9.0), a major peak of the inactive carboxylate form ( $t_R$ : 4.5) and three additional peaks of irinotecan degradation products ( $t_R$ : 3.7, 5.7, 6.6).

The calibration curve was set up by using seven irinotecan concentrations ranging from 30 to 200 µg/mL and 5-fold injections. The calibration curve constructed from plots of peak area versus concentration showed linearity with a correlation coefficient of 0.99978.

Accuracy was proven by analyzing three different concentrations (30, 100, 150 µg/mL). For each sample injected (seven injections per concentration) percentage of recovery was calculated and mean recovery was  $99.416 \pm 0.763\%$ .

Intraday precision was assessed at the same time as accuracy also by a 7-fold injection of the three concentrations. Injection reproducibility showed a relative standard deviation of 1.9% for 30 µg/mL, 0.2% for 100 µg/mL, and 0.2% for 150 µg/mL. Interday precision was evaluated by triplicate injections of samples containing different concentrations of irinotecan (30, 100, 150 µg/mL) on five different days. Relative standard deviations were 1.2% for 30 µg/mL, 0.6% for 100 µg/mL and 0.3% for 150 µg/mL containing irinotecan solutions.

## RESULTS

### Loading level and integrity of irinotecan-loaded DC beads™

The loading procedure of 2 mL DC Beads™ of the size 100–300 µm with 100 mg irinotecan drug solution resulted in a loading percentage of 96% in each of the 15 test vials independent from storage time. No differences in loading levels were observed over the period of 28 days, while the test vials were stored light protected at room temperature (Table 1). No irinotecan degradation products were detected in the chromatograms of the excess solutions throughout the entire time. With regard to the loading level and purity of irinotecan in the excess solution the drug-device combination can be categorized as stable over a minimum of 4 weeks.

### *In vitro* release and integrity of irinotecan-loaded in DC beads™

*In vitro* release of IEBs was determined by placing the bead slurry in PBS after different time intervals of

storage (1–28 days). Thereby the *in vivo* release by competitive ion-exchange displacement was simulated. Positively charged irinotecan, which is accumulated inside the beads, is displaced with cationic salt ions present in PBS. The amounts eluted were measured after 2 h, as the irinotecan elution process is known to be finished during that time interval.<sup>7</sup> Indeed high percentage rates of the loaded irinotecan i.e., 86.9–97.1% were eluted after that time interval (Table 2). Variations of the release rates are to be explained by the study design and by technical reasons. By the removal procedure of excess solution from unloaded and loaded beads and the transfer of IEB slurry into 200 mL PBS solution a loss of individual beads may occur. Release rates below 90% are most probably caused by those invisible losses.

The high release rates of intact irinotecan throughout the entire observation period together with the unchanged irinotecan loading levels prove integrity of the IEB over a period of 28 days. Moreover, no irinotecan degradation products were detected in the HPLC chromatograms of samples drawn from the elution medium. With regard to the loading level, release rate and purity of irinotecan in the excess solution and elution medium, the drug-device combination can be categorized as stable over a minimum of 4 weeks.

### Irinotecan loading level of DC beads™ after mixing with contrast media

Prior to local administration IEBs are to be mixed with contrast media. Therefore, we studied whether the addition of contrast media alters the irinotecan loading level by inducing irinotecan release or influences the integrity of bound and unbound irinotecan. Larger bead sizes are known to result in lower loading levels after 2 h loading time.<sup>7</sup> Hence, different bead sizes used in our experiments resulted in slightly different loading levels of the unmixed IEB (Table 3, column day 0 unmixed). The rate and amount of irinotecan release differed depending on the type of contrast medium added. The immediate decrease of the loading level was ~10% in admixtures with Accupaque® 300 (bead size 100–300 µm) and 1% in admixtures with Imeron® 300 or Ultravist® 300 (bead size 300–500 µm). There was no further release of irinotecan found in IEB-Accupaque® admixtures over the entire storage period of 28 days under refrigeration (2–8°C). The loading level of IEB-Imeron® and IEB-Ultravist® admixtures decreased further 5 and 10%, respectively, during the first 24 h of storage and remained subsequently unchanged

**Table 1. Drug loading and integrity level of irinotecan-loaded DC Beads™ 100–300 µm. Percentage rate expressed as mean ± relative standard deviation of triplicate assays of test solutions**

Storage temperature	Test solution	Initial drug concentration (mg/ml)	Percentage rate irinotecan loaded on beads ± relative SD (%)				
			Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 28
25°C	1	14.29	96.07 ± 0.01	97.60 ± 0.01	97.22 ± 0.00	96.80 ± 0.00	95.60 ± 0.01
	2	14.29	96.20 ± 0.01	96.80 ± 0.02	97.02 ± 0.00	97.35 ± 0.01	96.57 ± 0.02
	3	14.29	96.44 ± 0.01	95.69 ± 0.01	96.30 ± 0.02	97.33 ± 0.01	95.76 ± 0.04

**Table 2. In vitro release of irinotecan-loaded in DC Beads™ 100–300 µm. Percentage rate eluted expressed as mean ± relative standard deviation of triplicate assays of test solutions**

Storage temperature	Test solution	Percentage rate eluted from beads ± relative SD <sup>a</sup> (%)				
		Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 28
25°C	1	93.9 ± 2.0	89.5 ± 0.9	93.6 ± 0.8	97.1 ± 0.7	94.6 ± 0.5
	2	86.9 ± 1.5	92.4 ± 0.8	93.3 ± 1.6	95.5 ± 1.0	92.2 ± 0.5
	3	87.1 ± 0.9	93.0 ± 0.4	87.7 ± 2.0	96.1 ± 0.5	96.3 ± 0.8

<sup>a</sup>Irinotecan concentrations according to the results in Table 1 were designated as 100%.

**Table 3. Irinotecan loading level of DC Beads™ 100–300 µm and 300–500 µm mixed with contrast media Accupaque® 300, Imeron® 300, and Ultravist® 300. Percentage rate expressed as mean ± relative standard deviation of triplicate assays of test solutions**

Contrast Medium (CM)	Storage temperature	Test solution	Irinotecan concentration loaded in beads after mixing with non-ionic contrast media ± relative SD <sup>a</sup> (%)						
			Day 0		Day 1	Day 3	Day 7	Day 13	Day 28
			unmixed	mixed					
Accupaque® 300	2–8°C	1 <sup>b</sup>	93.71 ± 0.10	82.49 ± 0.02	83.84 ± 0.03	84.59 ± 0.05	85.71 ± 0.01	86.20 ± 0.04	86.78 ± 0.01
		2 <sup>b</sup>	93.51 ± 0.02	83.07 ± 0.07	84.26 ± 0.03	84.80 ± 0.03	86.07 ± 0.01	86.40 ± 0.04	87.14 ± 0.03
		3 <sup>b</sup>	91.27 ± 0.00	82.70 ± 0.04	82.67 ± 0.08	83.14 ± 0.02	84.38 ± 0.01	85.14 ± 0.03	85.81 ± 0.01
Imeron® 300	2–8°C	1 <sup>c</sup>	89.97 ± 0.05	88.30 ± 0.05	85.02 ± 0.11	84.53 ± 0.30	87.32 ± 1.07	84.87 ± 0.13	85.12 ± 0.09
		2 <sup>c</sup>	90.21 ± 0.06	89.08 ± 0.04	84.15 ± 0.08	83.69 ± 0.26	87.57 ± 0.43	84.55 ± 0.62	84.87 ± 0.08
		3 <sup>c</sup>	89.32 ± 0.04	88.19 ± 0.04	84.50 ± 0.08	83.86 ± 0.18	87.86 ± 0.07	84.89 ± 0.21	85.09 ± 0.02
Ultravist® 300	2–8°C	1 <sup>c</sup>	88.96 ± 0.03	88.47 ± 0.05	79.45 ± 0.17	79.27 ± 0.07	83.45 ± 0.40	79.26 ± 0.16	79.79 ± 0.02
		2 <sup>c</sup>	90.26 ± 0.06	89.16 ± 0.04	82.97 ± 0.11	80.67 ± 0.16	83.15 ± 0.32	78.48 ± 0.03	79.43 ± 0.07
		3 <sup>c</sup>	90.71 ± 0.03	88.11 ± 0.04	80.91 ± 0.10	79.82 ± 0.04	82.53 ± 0.15	78.38 ± 0.16	79.43 ± 0.07

<sup>a</sup>Nominal drug concentration of 100 mg irinotecan was designated as 100%.

<sup>b</sup>Bead size 100–300 µm.

<sup>c</sup>Bead size 300–500 µm.

during long-term storage. The higher loading levels observed on day 7 of storage in IEB-Imeron® and IEB-Ultravist® admixtures are to be admitted as measurement artifacts caused by variation of the sampling volumes. In total a 5–10% release of irinotecan is caused by the admixture of contrast

media. Again no irinotecan degradation products were detected in the HPLC chromatograms of samples drawn after the maximum storage period. With regard to the decreased loading levels, mixtures of IEB with contrast media are to be categorized as unstable.

## DISCUSSION

### HPLC assay

A modified HPLC assay was optimized by previously described methods.<sup>19,20</sup> The mobile phase was adjusted to pH 5. Aliquots were acidified immediately before injection in order to stabilize the irinotecan lactone form and prevent ring opening during analysis.

### Loading level and integrity of irinotecan-loaded DC beads™

Commercially available irinotecan injection concentrate (Campto®, 20 mg/mL) is formulated with lactate buffer and pH adjusted to 3.5 in order to shift the lactone-carboxylate equilibrium to the active lactone form.<sup>21</sup> Admixture of the injection concentrate to the bead slurry minimally changes the pH to 3.7 what favors irinotecan stability. Previously it was reported that the preferential binding of the positively charged irinotecan lactone form to the sulfonate groups in DC Beads™ also shifts the equilibrium towards the active lactone form.<sup>7</sup> Both mechanisms synergistically favor the active lactone form. Our results also demonstrate that loading levels remained unchanged for at least 28 days and unbound irinotecan was not degraded. These observations correspond with our stability studies of irinotecan injection concentrate which was found to be physicochemically stable for a minimum of 4 weeks independent of storage temperature provided that light protection is given.<sup>20</sup> However, due to concerns of microbiological overgrowth storage under refrigeration should always be considered for i.v. preparations. The conditions chosen for the stability studies of the irinotecan-loaded DC Beads™ simulated worst-case conditions with regard to temperature. Pure irinotecan injection concentrate was already shown to be physicochemically stable under refrigeration for a minimum of 4 weeks<sup>20</sup> and irinotecan also remained intact in IEB-contrast media admixtures when stored refrigerated. Therefore, refrigerated storage of irinotecan-loaded DC Beads™ is acceptable when taking microbiological instability in consideration.

### *In vitro* release and integrity of irinotecan-loaded in DC beads™

Using the free-flowing *in vitro* elution method and PBS as elution medium, it was found that ~90% of the irinotecan bound could be eluted. The percentage release rate was calculated according to the amount of irinotecan-loaded in each test vial. Slightly different

results to the findings of Taylor *et al.*<sup>7</sup> could be caused by a variation of methods. Eluted irinotecan showed 100% purity. Ring opening, which inherently occurs during elution with PBS buffer pH 7.2, was totally reversible by acidifying the aliquot immediately before injection. The fact that no other degradation products were detected proves that irinotecan bound inside the beads was stable. Thus the loading procedure of IEB is not necessarily to be done immediately prior to delivery. With regard to physicochemical stability irinotecan drug-device combinations can be stored for a minimum of 4 weeks under refrigeration.

### Irinotecan-loading level of DC beads™ after mixing with contrast media

The question needs to be clarified, whether the release or integrity of IEB is influenced by the admixture of contrast media and if admixtures could be prepared in centralized cytotoxic preparation units and stored. Immediate, rapid release of irinotecan could result in higher concentrations of unbound irinotecan at local delivery and pH changes could shift the equilibrium to the inactive, ring-open carboxylate form. Admixtures of IEB with contrast media were stored refrigerated as the manufacturer reports in-use-stability of 4 h and 24 h for admixtures stored at room temperature and refrigerated, respectively. The three different brands of nonionic contrast media mainly used in Germany were selected for testing. Along with clinical practice in the department of radiology in our hospital, contrast media of the iodine concentration 300 mg/mL and the bead size 300–500 µm were used in our experiments. Formulations and physicochemical data of the different products vary (Table 4) and may cause a variation of test results. Indeed irinotecan release was different in rate and quantity in the different settings. The pH values of the pure contrast media vary from 6.5 to 8. Measured values of pH were in admixtures with Accupaque® 4.5, with Imeron® 4.0, and with Ultravist® 5.5. Lactone hydrolysis is favored at pH values >pH 4.5, and therefore may occur in admixtures with Ultravist®. However, this hypothesis can not be confirmed because aliquots were acidified prior to the HPLC assay. Most probably the different immediate rate of irinotecan elution is rather caused by the different bead sizes than contrast media. Smaller beads tend to have an enhanced release rate compared to larger beads.<sup>7</sup> This phenomenon can be explained by the effect of the larger surface area of smaller beads. In addition, in larger bead sizes the



Table 4. Product characteristics of the nonionic contrast-media used

Trade name	Active substance	Manufacturer	pH value	Viscosity		Osmolality
				at 20°C (mPa.s)	at 37°C (mPa.s)	at 37°C (Osm/kg H <sub>2</sub> O)
Accupaque 300 <sup>a</sup>	Iohexol	GE-Healthcare Buchler	6.8–7.6	11.6	6.1	0.64
Imeron 300 <sup>b</sup>	Iomeprol	Bracco Altana Pharma	6.5–7.2	8.1	4.5	0.51
Ultravist 300 <sup>c</sup>	Iopromide	Bayer Schering Pharma	6.5–8.0	8.7	4.6	0.61

<sup>a</sup>SmPC (Summary of Product Characteristics) Accupaque®).

<sup>b</sup>SmPC Imeron®, Standardinformation für Krankenhausapotheker.

<sup>c</sup>SmPC Ultravist®.

distance of drug diffusion within the microspheres is longer and the high-loading concentrations in our experiments (50 mg/mL) increases the hydrophobicity of the loaded beads. This retards the drug elution rate.<sup>7</sup> The different elution rates of Imeron® and Ultravist® admixtures with IEBs of the same bead size can be explained by different osmolalities of the contrast media. The competitive ion-exchange displacement of protonated irinotecan depends on the ion content in the elution medium and the lower osmolality of Imeron® solution possibly causes reduced irinotecan release. The fact that Accupaque®, which has higher osmolality than Imeron®, results in an overall quantity of irinotecan elution similar to Imeron® is possibly caused by the higher viscosity of the Accupaque® solution.

We do not recommend the preparation of admixtures of irinotecan-loaded beads with contrast medium in centralized cytotoxic preparation units because of elution of irinotecan from the loaded beads. Furthermore, physicians see no advantages of admixtures due to the wide variation of mixing ratios of drug-loaded beads with contrast medium. In addition varying volumes of 0.9% sodium chloride solution are to be admixed during the chemoembolization procedure. The mixing ratios depend on arterial size and actual delivery conditions. The delivered dose of IEBs is limited by patient individual clinical factors and also technical issues, and therefore cannot be planned reliably. Overall the premixture of IEBs is not time saving for the physician, but probably reducing the loading level of IEBs.

Release and integrity of irinotecan in the admixtures were not tested as local delivery is combined with rapid dilution and wash away of the excess solution. Moreover, the release conditions for the remaining beads are similar to those we tested by transferring the pure IEB slurry to PBS and similar results are to be expected.

## CONCLUSION

According to our results DC Beads™ is a suitable drug delivery system to carry and deliver intact irinotecan drug substance. Irinotecan-loaded DC Beads™ are shown to have adequate physicochemical stability over a period of minimal 28 days when stored light protected. Due to concerns of microbiological overgrowth refrigeration should always be considered.

The preparation of admixtures of irinotecan-loaded beads with contrast medium in centralized cytotoxic preparation units is not recommended, because of rapid elution of 5–10% of irinotecan from the loaded beads. Furthermore, physicians see no advantages of admixtures, due to the wide variation of mixing ratios of drug loaded beads with contrast medium and 0.9% sodium chloride solution necessary during the chemoembolization procedure.

## REFERENCES

- 1 Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A et al. Krebs in Deutschland, 2003–2004, Häufigkeiten und Trends. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes* 2008; 6: 34–37.
- 2 Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18(3): 581–92.
- 3 Ramos FJ, Tabernero J. Cetuximab and chemotherapy for patients with unresectable CRC liver metastasis: are we changing the natural course of the disease? *Onkologie* 2007; 30(12): 602–04.
- 4 Wei AC, Greig PD, Grant D, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Survival after hepatic resection for colorectal metastases: a 10-year experience. *Ann Surg Oncol* 2006; 13(5): 668–76.
- 5 Cohen AD, Kemeny NE. An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. *Oncologist* 2003; 8(6): 553–66.

- 6 Vogl TJ, Zangos S, Eichler K, Yakoub D, Nabil M. Colorectal liver metastases: regional chemotherapy via transarterial chemoembolization (TACE) and hepatic chemoperfusion: an update. *Eur Radiol* 2007; 17(4): 1025-34.
- 7 Taylor RR, Tang Y, Gonzalez MV, Stratford PW, Lewis AL. Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolisation: In vitro and in vivo evaluation of drug release properties. *Eur J Pharma Sci* 2007; 30(1): 7-14.
- 8 O'Toole D, Ruzzniewski P. Chemoembolization and other ablative therapies for liver metastases of gastrointestinal endocrine tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19(4): 585-94.
- 9 Biocompatibles UK. DC Bead Drug Delivery Embolisation System for Precision TACE, Information for Pharmacists. 2006.
- 10 Gonzalez MV. Delivery of Drugs from Embolisation Microspheres, 2006.
- 11 Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 1991; 51(16): 4187-91.
- 12 Akimoto K, Kawai A, Ohya K. Kinetic studies of the hydrolysis and lactonization of camptothecin and its derivatives, CPT-11 and SN-38, in aqueous solution. *Chem Pharm Bull* 1994; 42: 2135-38.
- 13 Sasaki Y, Yoshida Y, Sudoh K, Hakusui H, Fujii H, Ohtsu T *et al.* Pharmacological correlation between total drug concentration and lactones of CPT-11 and SN-38 in patients treated with CPT-11. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86(1): 111-16.
- 14 Dodds HM, Craik DJ, Rivory LP. Photodegradation of irinotecan (CPT-11) in aqueous solutions: identification of fluorescent products and influence of solution composition. *J Pharm Sci* 1997; 86(12): 1410-16.
- 15 Biocompatibles, UK. Physical and Chemical Stability of DC Bead loaded with Doxorubicin, Epirubicin and Irinotecan. 2007.
- 16 Biocompatibles UK. DC Bead™ Drug Delivery Embolisation System for Precision TACE, Guidelines for the Use of DC Bead™ Loaded with Irinotecan for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer, 2007.
- 17 Biocompatibles UK. DC Bead™ - Drug Delivery Embolisation System - Instructions for Use, 2005.
- 18 Biocompatibles, UK. DC Bead™ Irinotecan loading instructions. 2006.
- 19 Balaram M, Rao V, Ramakrishna, Ganesh S, Krishna B. Validated reverse phase HPLC method for the determination of irinotecan in pharmaceutical dosage forms. *E-J Chem* 2007; 4(1): 128-136.
- 20 Thiesen J, Krämer I. Physicochemical stability of irinotecan injection concentrate and diluted infusion solutions in PVC bags. *J Oncol Pharm Practice* 2000; 6(3): 115-121.
- 21 Pfizer Pharma GmbH. Campto® Fachinformationen, 2007.

### **3.3 Loading profile of topotecan into polyvinyl alcohol microspheres (DC Bead™) over a 7 day period**

Gegenstand dieser Studie war die Bestimmung der Ladungskapazität von DC Beads™ für den Topoisomerase-1-Inhibitor Topotecan sowie die Bestimmung der physikalisch-chemischen-Stabilität Topotecan beladener DC Beads™ über einen Zeitraum von 7 Tagen. Da noch keine Dosierungsempfehlungen vorliegen, wurde eine Dosis von 4 mg Topotecan geladen auf 2 ml Beads gewählt, die basierend auf theoretischen Überlegungen und den Ergebnissen von Tierversuchen zufolge eine geeignete Dosierung für die TACE darstellen könnte und gleichzeitig in zentralisierten zytostatischen Herstellungsbereichen wie einer Krankenhausapotheke gut zu handhaben ist.

Jeanette Kaiser, Irene Krämer

Journal of Oncology Pharmacy Practice eingereicht am 17.04.2011

Manuscript ID JOPP-11-0024

## **Loading profile of topotecan into polyvinyl alcohol microspheres (DC Bead™) over a 7 day period**

Jeanette Kaiser PharmD, Irene Krämer PhD

Department of Pharmacy, University Medical Center of Johannes Gutenberg-University, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany

### **Corresponding author**

Prof. Dr. Irene Krämer

Department of Pharmacy, University Medical Center of Johannes Gutenberg-University,

Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany

Telephone: +49 6131 177209, Fax: +49 6131 175525

E-mail: [irene.kraemer@unimedizin-mainz.de](mailto:irene.kraemer@unimedizin-mainz.de)

**Key words:** topotecan, loading rate, chemoembolization, DC Bead™, microspheres, high-performance liquid chromatography (HPLC)

This work was supported in part by a grant of Biocompatibles UK Ltd.

## ***Abstract***

**Purpose:** DC Bead™ is successfully used for chemoembolization of various liver cancers. The purpose of this study was to determine the loading capacity of the semi-synthetic topoisomerase-1 inhibitor topotecan into the DC Bead™ microspheres under static or agitated conditions and to assess the physico-chemical stability over a period of 7 days.

**Methods:** Commercially available topotecan hydrochloride powder (Hycamtin®) was reconstituted with water for injection to yield a nominal concentration of 1 mg/mL topotecan. Polyvinyl alcohol (PVA) based microspheres (DC Bead™, 300-500 µm, 2 mL/vial) were mixed with 4 mL of the reconstituted topotecan solution. Vials were stored light protected at room temperature under static or agitated conditions for 7 days (n=3, for each loading condition). At different time intervals samples were taken from the excess solution and assayed via a stability-indicating HPLC assay. Drug loading profiles were determined by measuring the remaining topotecan concentration in the excess solution.

**Results:** Under agitated conditions, topotecan was loaded into the microspheres rapidly after mixing. After 5 minutes  $86.4 \pm 0.1\%$  of topotecan was loaded. Under static conditions, drug uptake was slower. Only  $65.0 \pm 0\%$  were loaded after 5 minutes;  $86.6 \pm 0.1\%$  drug uptake was achieved not until one hour. Over a storage period of 7 days, topotecan remained loaded in the DC Bead™ microspheres at a level of  $> 90\%$ .

**Conclusion:** Drug uptake of 2 mg topotecan (1 mg/mL solution) into DC Beads™ was faster under agitated loading conditions. Nevertheless, after one hour  $\sim 90\%$  of topotecan was loaded into the DC Bead™ microspheres independent from the type of loading condition. The loading rate remained  $>90\%$  over the observation period of 7 days and light protected storage at room temperature. Loading and stability of topotecan-loaded DC Beads™ is suitable and convenient for preparation in a pharmacy-based cytotoxic preparation unit.

## Introduction

DC Bead™ is a medical product used for trans-arterial chemoembolization (TACE), i.e. selective arterial embolization of a tumour's feeding artery and subsequent local delivery of chemotherapeutic agents. The sustained-release delivery of the chemotherapeutic drug from the DC Bead™ system favours high local activity and reduces systemic toxicity.<sup>33</sup> However the loading efficacy is limited to positively charged antineoplastic drugs.<sup>12</sup> The DC Bead™ microspheres are based on a biocompatible polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel which is modified with negatively charged sulphonate groups. The increased number of sulphonate moieties permits cationic antineoplastic drugs to be loaded and to be released from the microspheres into dilution media or biological fluids by ion exchange.<sup>19;20</sup> Today, doxorubicin- and irinotecan-loaded DC Beads™ are used for the local treatment of hepatocellular carcinoma and liver metastases of various tumours. DC Beads™ can also be delivered by other routes (e.g. intraperitoneal, intratumoral) and loaded with other drugs. Topotecan loaded beads are currently studied and may result in a new approach for the treatment of ovarian cancer. Topotecan has proven activity against ovarian cancer.<sup>16;19</sup>

Topotecan HCl (9-[(dimethylamino)methyl]-10-hydroxy-camptothecin hydrochloride) is commercially available in a lyophilized form (Hycamtin®) for intravenous use. The positively charged topotecan salt is suitable to be loaded by ionic interaction to DC Beads™ (see Figure 1).

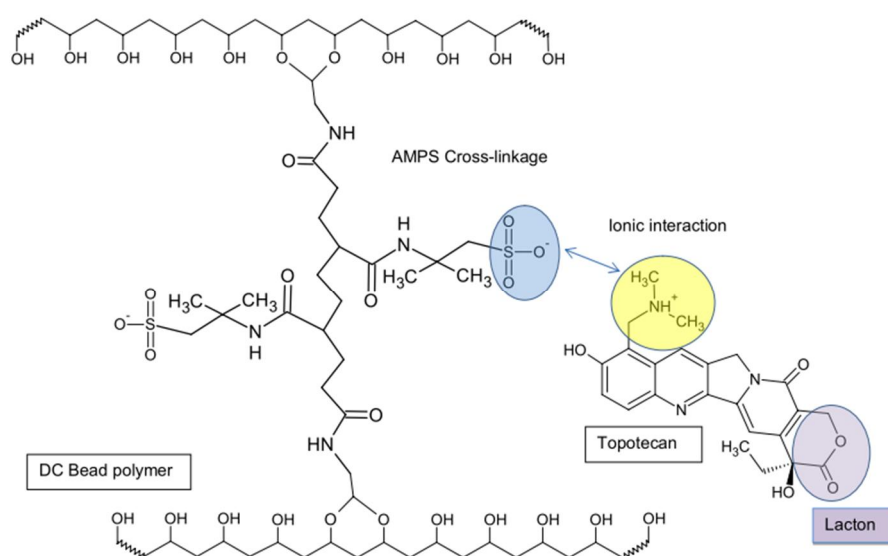


Figure 1 Chemical structure of DC Bead™ polymer and the proposed interaction with the topotecan active lactone form.

Loading experiments with solutions of the pure active substance showed that a maximum loading of 40-45 mg topotecan per mL of hydrated beads is achievable.<sup>16</sup> The Hycamtin<sup>®</sup> formulation contains mannitol as bulking agent, tartaric acid as a stabilizer as well as hydrochloric acid and sodium hydroxide to adjust the pH to 2.5 – 3.5. The pH-adjustment ensures an adequate stability of topotecan during storage and reconstitution with water for injection.<sup>34</sup> In aqueous solution, topotecan undergoes a pH dependent, reversible equilibrium between the closed ring lactone form and the open ring carboxylate form. The carboxylate form predominates at alkaline pH, while the lactone form predominates at acidic pH-values. The cytotoxic activity of the camptothecin derivatives is linked to the lactone form and its binding to the topoisomerase I-DNA complex.<sup>35-37</sup> Topotecan is not a prodrug and does not require enzymatic activation as it is the case for irinotecan.<sup>16</sup> Therefore topotecan is used in much lower doses (0.7 - 1.5 mg/m<sup>2</sup>) than irinotecan (>100 mg/m<sup>2</sup>) for intravenous chemotherapy.

As the drug formulation as well as the ionic interaction with the DC Beads<sup>™</sup> favours the active topotecan lactone form, the DC Bead<sup>™</sup> loading capacity most probably exceeds by far the favourable dose in humans. Therefore the loading profile of topotecan HCl equivalent to 4 mg topotecan base (1 vial of powder for injection) into 2 mL of hydrated DC Beads<sup>™</sup> was evaluated. Unlike previous studies we used the commercially available brand and studied the loading capacity over a prolonged period of 7 days.

### ***Material and Methods***

Commercially available topotecan hydrochloride for injection (Hycamtin<sup>®</sup>, 4 mg topotecan/vial, lot C406, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, Munich, Germany) was reconstituted with 4 mL of Water for Injection (lot 8064A191, B.Braun, Melsungen, Germany) according to the SmPC<sup>32</sup> of Hycamtin<sup>®</sup> powder for infusion solution concentrate. DC Beads<sup>™</sup> (sulfonate-modified polyvinyl alcohol hydrogel beads, lot 060629F-4, Biocompatibles UK Ltd., Farnham, UK) were used in the size range of 300-500 µm to assess the loading efficiency of topotecan. Each vial contains 2 mL of blue tinted beads in sodium phosphate solution with a total volume of 8 mL.<sup>38</sup>

Loading of DC Beads™ with topotecan hydrochloride and determination of drug loading level

The packing solution of DC Beads™ (1 mmol sodium phosphate solution) was removed as far as possible from the microspheres. Afterwards 2 mL of reconstituted topotecan solution (1 mg/mL) were added to 1 mL of residual bead slurry remaining in the vials. Six test suspensions were prepared. Directly after mixing three test vials were placed on a roller mixer (KL 2, Product No. 6115 000, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Germany) and three vials were stored under static conditions. The test suspensions were handled under light protection at room temperature. The loading level of topotecan-loaded beads (TEB) was assessed after 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h, and after 7 days. At each interval, 0.3 mL of the excess solution was removed from the test vials (G19 Sterifix® 5 µm filter needle, 1 mL Luer Injekt®-F syringe, B.Braun, Melsungen, Germany). The topotecan concentration in the excess solution was determined via RP-HPLC. Prior to the analysis the samples withdrawn were diluted 1:5 with Water for Injection (lot 8064A191, B.Braun, Melsungen Germany) in order to fit the calibration curve. Triplicate HPLC determinations were performed on each aliquot. The percentage rate of loading was calculated as given below:

Percentage rate loaded (%) =

$$\frac{(\text{Nominal initial drug concentration in solution} - \text{residual drug concentration})}{\text{Nominal initial drug concentration in solution}} \times 100$$

HPLC assay

Analysis of topotecan concentrations was performed by using the stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) assay as described previously.<sup>36;39</sup> The assay was conducted on an HPLC system consisting of a Waters 717 plus autosampler, a Waters photodiode array (PDA) detector 996 and a Waters 510 HPLC-pump. Data were acquired and integrated by using Waters Empower Pro, Empower<sup>2</sup> software, version 6.10.01.00 (Waters, Eschborn, Germany). The reversed phase column used was the Symmetrie C<sub>18</sub>, 150 mm x 3.9 mm, particle size 5 µm (Part No. WAT046980, Waters, Eschborn, Germany). The mobile phase



consisted of 85% Water *HPLC* Grade (lot 731100034, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey), 15% acetonitrile *HPLC* Grade (lot 76726, Promochem, Wesel, Germany) and 0.1% trifluoroacetic acid (lot C48H03, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey), at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup>. Samples were analyzed using UV absorption at 228 nm. All samples were injected in triplicate with an injection volume of 20 µL. In addition, PDA chromatograms (wavelength ranging from 200 to 600 nm) were obtained to observe the formation of degradation products. Under these conditions, the retention time ( $t_R$ ) of topotecan (lactone-form) was approximately 5 minutes (see Figure 2).

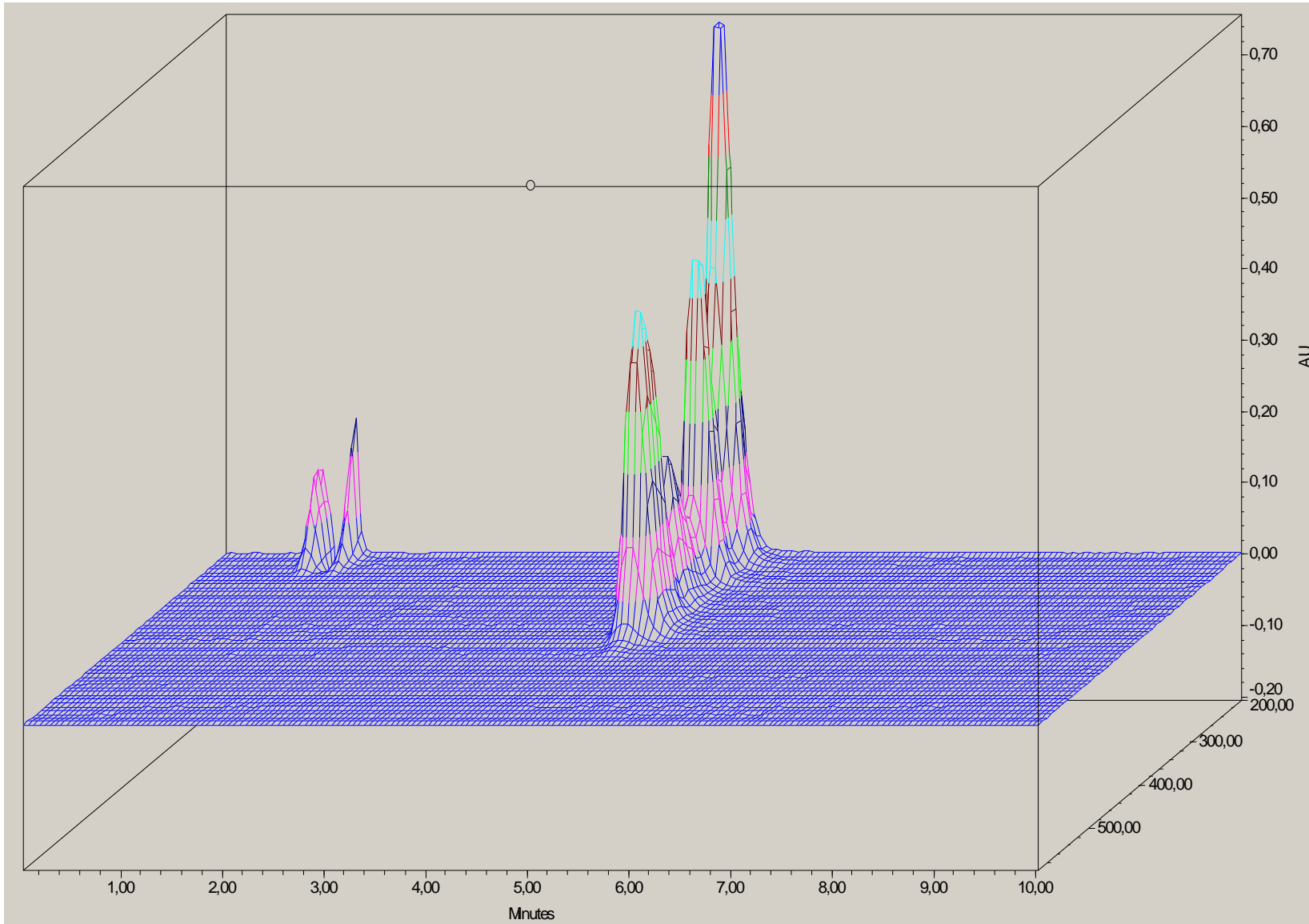


Figure 2 PDA chromatogram (200 – 600 nm) of topotecan.

The suitability of the assay was proven by analyzing forced degraded topotecan solutions. A diluted topotecan solution (50 µg/mL) was heat-degraded at 100 °C for 45 minutes. The resultant chromatogram showed two degradation peaks ( $t_R$  0.8 min and 12 min), which were clearly separated from the reduced parent drug peak ( $t_R$ : 5 min). Another topotecan solution (50 µg/mL) was base-degraded by diluting with 1N NaOH (lot HC617630, Merck, Darmstadt, Germany), resulting in a pH value of 13.5. The chromatogram showed a large peak of topotecan in the carboxylate form ( $t_R$ : 0.8 min) and one minor degradation peak ( $t_R$ : 2.5 min) which was also clearly separated from the peak of the topotecan lactone form.

The linearity of the method was evaluated at seven concentrations injected 5-fold each ranging from 12.5 to 100 µg/mL topotecan. The calibration curve constructed from plots of peak area versus topotecan concentration was linear with a correlation coefficient of 0.9998.

Assay accuracy was determined by analyzing three topotecan solutions with nominal concentrations of 12.5, 30, and 65 µg/mL and 10-fold injections each. For each sample injected, percentage rate of recovery was calculated. Mean recovery of  $n=30$  was  $100.4 \pm 0.5\%$ . Injection reproducibility was determined by 10 replicate injections and resulted in relative standard deviations of 0.6%, 0.8%, and 0.3% for solutions of the nominal concentrations 12.5 µg/mL, 30 µg/mL, and 65 µg/mL, respectively. Interday precision was evaluated on five different days with triplicate injections of three different solutions. Relative standard deviations were calculated to be 0.6%, 1.2% and 1.8% for solutions containing 12.5 µg, 30 µg, and 65 µg topotecan per mL.

## **Results**

After addition of the inherent yellow to yellow-green topotecan solution concentrate to the blue-tinted DC Bead™ slurry, the excess solution depleted in color and the blue tinted microspheres turned yellow-green. No further changes of color or appearance of the TEB suspensions were observed during the one week observation time.

From the loading efficacy profiles (see Figure 3) it becomes obvious that under agitated conditions topotecan was taken up into the microspheres very rapidly. After 5 minutes 86% of topotecan was loaded. Under static conditions drug uptake required a longer period of time. After 5 minutes only 65% of topotecan was loaded. It took about 1 hour to reach a loading capacity of 87%. Topotecan loading increased up to 95% over a 7 day period (see Table 1). In the HPLC chromatograms of the excess solutions no degradation peaks were detected. With regard to the loading level and purity of

topotecan the drug-device-combination can be categorized as stable over a minimum of 1 week.

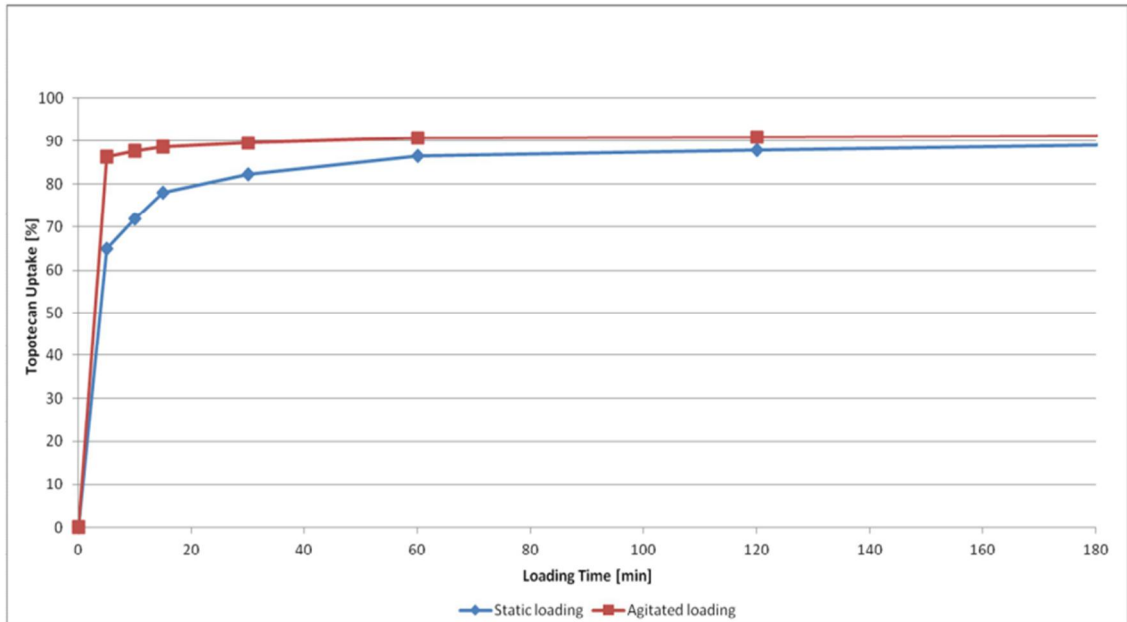


Figure 4 Agitated and static loading profiles (% loading) of 2 mg topotecan per mL of 300-500  $\mu$ m beads (n=3) over the first 3 hours of loading.

Table 1 Static and agitated loading of 4 mg topotecan into 2 mL of 300-500 µm beads (n=3) over a 7 day period. Loading expressed as mean of triplicate assays of 3 samples from each test solution.

Loading time № of test solution	Static loading profile (percentage rate of loading)									
	0 min [%]	5 min [%]	10 min [%]	15 min [%]	30 min [%]	1 h [%]	2 h [%]	6 h [%]	24 h [%]	7 d [%]
1	0	64.98	72.27	77.91	82.35	86.64	87.80	92.56	93.81	95.01
2	0	64.99	71.76	78.07	82.15	86.49	87.93	92.28	93.82	95.05
3	0	64.98	71.89	78.41	82.25	86.56	87.90	92.37	94.03	95.05
<b>Mean</b>	0	64.98	71.98	78.13	82.25	86.56	87.88	92.40	93.89	95.03
<b>SD (n=27)</b>	0	0.01	0.27	0.26	0.10	0.07	0.07	0.15	0.13	0.02
<b>RSD [%] (n=27)</b>	0	0.02	0.37	0.33	0.12	0.09	0.08	0.16	0.13	0.03

Loading time № of test solution	Agitated loading profile (percentage rate of loading)									
	0 min [%]	5 min [%]	10 min [%]	15 min [%]	30 min [%]	1 h [%]	2 h [%]	6 h [%]	24 h [%]	7 d [%]
1	0	86.44	87.63	88.63	89.54	90.74	90.81	92.17	93.58	94.67
2	0	86.30	87.55	88.38	89.39	90.65	90.84	92.13	93.48	94.62
3	0	86.32	87.70	88.56	89.46	90.52	90.71	92.21	93.56	94.64
<b>Mean</b>	0	86.35	87.63	88.52	89.46	90.64	90.79	92.17	93.54	94.64
<b>SD (n=27)</b>	0	0.07	0.08	0.13	0.07	0.11	0.07	0.04	0.05	0.02
<b>RSD [%] (n=27)</b>	0	0.09	0.09	0.15	0.08	0.12	0.08	0.04	0.06	0.02

## ***Discussion***

DC Bead™ is a CE approved medical device for loading with doxorubicin and irinotecan, but not yet with topotecan. There are no dosing recommendations or loading instructions for TEB available so far. In our studies, loading of TEB was performed in analogy to the instructions of the manufacturer for “Loading of DC Bead™ using doxorubicin powder in a vial”.<sup>11</sup> With regard to the dosing recommendations for intravenously administered topotecan infusion solutions, which vary between 0.7 and 1.5 mg/m<sup>2</sup> BSA, it was decided to load 4 mg of topotecan into 2 mL of beads. This dose equates to one commercially available Hycamtin® vial loaded into one commercially available DC Bead™ vial. The dose chosen would facilitate convenient handling in clinical practice and be favorable for initial dosage in dose-finding studies although doses up to 40 – 45 mg topotecan per mL of unloaded beads are achievable. In a PSN-1 mouse xenograft model, DC Beads™ loaded with irinotecan doses of 3.3 – 6.6 mg were well tolerated, whereas TEB loaded with doses of about 1 mg were lethal after 6 days. TEB loaded with 0.2 - 0.4 mg topotecan demonstrated good efficacy and tolerability.

In the study performed approximately 90% of the topotecan in the loading solution was taken up into the beads after 1 hour. This result matches with the loading capacity of a pure topotecan loading solution.<sup>16</sup> 88% of the available topotecan was loaded up to a dose of 35 mg when pure topotecan hydrochloride powder was dissolved in distilled water.<sup>16</sup> The concentration used for all studies was the same, with 1 mg/mL topotecan. As a reason for the incomplete loading, Forster et al. assumed that the residual salt within the packing solution is exchanging with ionically bound topotecan. However, the loading rate increased up to 95% after 7 days, whereas the maximum loading rates of doxorubicin and irinotecan tend to be 98 - 100%. The lower maximum loading rate may also be caused by the low concentration of the loading solution. Loading of DC Beads™ (300-500 µm) with 2 mg/mL doxorubicin loading solution takes a loading time of 9 or 18 hours depending on the dose loaded (50 mg or 75) mg. When a 25 mg/mL doxorubicin loading solution is used, the loading capacity is 98% after 90 minutes for 75 mg.<sup>119</sup> As described by Forster et al. loading of topotecan was faster under agitated conditions compared to static conditions (see Figure 3).<sup>16</sup> However, in the study performed with topotecan, the loading rate difference between agitated and static suspensions was substantially lower and the standard deviations of the static loading were merely influenced by unintentional movement of the test vials. Definitely agitation helps to disturb the electrical double-layer build up of ions at the bead surface thereby

impeding the loading process.<sup>16</sup> The manufacturer also recommends gentle agitation in the loading instructions for doxorubicin and irinotecan.<sup>11;40</sup>

The time to achieve maximum loading is also dependent on the size of the beads. The drug is taken up more rapidly into smaller beads (100 - 300  $\mu\text{m}$ ) than into larger beads, which can be explained by a decreasing surface area with increasing bead sizes.<sup>12;22</sup> With an eye to clinical practice, the most commonly used bead size was chosen, ranging from 300 – 500  $\mu\text{m}$  for the experiments. It can be assumed that smaller bead sizes (100 – 300  $\mu\text{m}$ ), which are also used in clinical practice, are loaded at the same rate, whereas the loading time for larger bead sizes is marginally longer. In pharmacy-based cytotoxic preparation units it is accepted to agitate the beads gently directly after mixing the drug solution with the bead slurry. Afterwards the vials are stored under static conditions in the Laminar Air Flow hood until loading is completed. With regard to this standard procedure, a loading time of 1 hour for TEB can be stated as suitable.

During the storage period of seven days topotecan, remained loaded in the microspheres and no degradation products could be detected. This observation corresponds with results of previous stability tests for topotecan infusion solutions.<sup>36</sup> The excipients contained in the commercially available topotecan injection do not affect the loading of topotecan into the beads but favor the stability of the active topotecan lactone form. TEB proved to be physico-chemically stable when stored at room temperature and light protected for a minimum of seven days. In recent studies reconstituted topotecan infusion concentrates were already shown to be physico-chemically stable under refrigeration and at room temperature for 28 days.<sup>36</sup> For microbiological reasons we recommend refrigerated storage. We do not recommend the admixture of TEB with contrast media in the pharmacy departments since rapid elution of topotecan might take place.<sup>37</sup>

### ***Conclusion***

The loading of DC Beads™ with the commercially available topotecan HCl drug formulation results in a 90% loading efficacy after a loading time of 1 hour for a dose of 4 mg and a loading solution with the concentration of 1 mg/mL. Gentle agitation after mixing and during the loading time is recommendable. Since stability of TEB for at least 7 days has been demonstrated, the loading procedure can be easily performed in pharmacy departments.

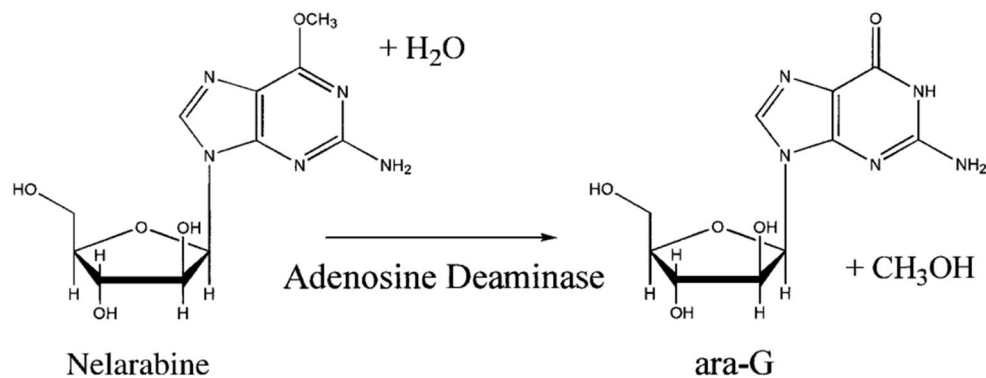
## 4 Physikalisch-chemische Stabilität applikationsfertiger Zubereitungen neuer Purin-Analoga

### 4.1 Applikationsfertige Zubereitungen neuer Purin-Analoga

Nukleosid-Analoga werden seit langem erfolgreich in der Krebstherapie, vor allem bei hämatologischen Erkrankungen, eingesetzt. Ende der 50er Jahre wurde das erste Nukleosid-Analogon Cytarabin (Ara-C) synthetisiert und ist seit dieser Zeit aus der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) nicht mehr wegzudenken.<sup>41</sup> Der Erfolg von AraC führte zur Entwicklung anderer Arabinosylpurin-Analoge wie Fludarabin (Fara-A) und Cladribin (CdA). In den 90er Jahren wurde mit Clofarabin (CAFdA) eine neue Generation der Desoxyadenosin-Analoga entwickelt. Clofarabin ist das 2'-Arabino-fluoro-Derivat von Cladribin und zeichnet sich durch eine erhöhte Stabilität im Plasma, wie auch im säurehaltigen Magensaft aus.<sup>42;43</sup> Diese Erkenntnisse führten zu der Überlegung, dass ein Arabinosyl-Analogon von Desoxyguanosin, 9-β-D-Arabinosylguanin (Ara-G) erfolgreich bei der Behandlung hämatologischer Krankheiten eingesetzt werden könnte. Es konnte gezeigt werden, dass Ara-G eine hohe Toxizität auf T-Zellen ausübt. Doch ist die Wasserlöslichkeit für den Einsatz als Chemotherapeutikum zu gering.<sup>44;45</sup> Mit Nelarabin wurde ein wasserlösliches Prodrug von Ara-G entwickelt, das zur Behandlung der T-ALL und T-LBL zugelassen ist.<sup>46;47</sup>

Nukleosid-Analoga können in Purin- und Pyrimidin-Analoga (z.B. Gemcitabin) unterteilt werden. Sie besitzen selbst keine zytotoxische Aktivität. Als Prodrugs müssen sie in die jeweiligen Ribonukleotide und weitere aktive Metaboliten umgewandelt werden.<sup>48</sup> Nelarabin wird durch das körpereigene Enzym Adenosindesaminase rasch zu Ara-G demethyliert.





**Abbildung 8** Demethylierung von Nelarabine zu Ara-G<sup>44</sup>

Die weitere Metabolisierung erfolgt intrazellulär durch zelluläre Kinasen, die Ara-G schrittweise phosphorylieren bis das aktive 5'-Triphosphat Ara-GTP entsteht.<sup>49;50</sup> Clofarabin kann direkt durch zelluläre Kinasen zum Mono-, Di- und letztendlich zum aktiven Triphosphat (CAFdA-TP) metabolisiert werden.<sup>43</sup>

Nelarabin und Clofarabin haben, wie alle Purin-Analoga, ähnliche Wirkungsmechanismen. Sie führen zur Hemmung der DNA-Synthese, hemmen DNA-Reparaturmechanismen und induzieren DNA-Strangbrüche, was letztendlich zur Apoptose führt.<sup>51</sup> Clofarabin hemmt die DNA-Polymerase und die Ribonukleotidreduktase. Die Mitochondrienmembran wird geschädigt, woraus die Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Apoptose resultiert.<sup>52</sup> Nelarabin kumuliert nach der Metabolisierung zum aktiven Ara-GTP in leukämischen Blasten und wird durch Verdrängen des körpereigenen dGTP in die DNA eingebaut. Ara-GTP kumuliert bevorzugt in malignen T-Zellen. Die Halbwertszeit von Ara-GTP ist in B-Zellen vergleichsweise kürzer.<sup>45;46;53</sup> Dies erklärt, wieso Nelarabin erfolgreich für die Behandlung von T-Zell spezifischen Leukämien, wie T-ALL und T-LBL, eingesetzt werden kann.<sup>50</sup>

Clofarabin (Evoltra<sup>®</sup>) erhielt 2006 die europäische Marktzulassung für die Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) bei pädiatrischen Patienten, bei denen erwartet wird, dass keine andere Behandlungsoption zu einem dauerhaften Ansprechen führt.<sup>54</sup> Nelarabin (Atriance<sup>®</sup>) ist seit Ende 2007 von der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) für die Behandlung der T-ALL und T-LBL zugelassen.<sup>55</sup> Aufgrund der speziellen und seltenen Formen der Leukämien als Indikation wurden beide Chemotherapeutika als „Orphan Drugs“ zugelassen.

Die applikationsfertige Infusionslösung des Chemotherapeutikums in patientenindividueller Dosierung wird in zentralen Zytostatika-Herstellungsbereichen aseptisch hergestellt. Im Falle von Nelarabin wird die als Fertigarzneimittel im Handel befindliche Infusionslösung (Atriance<sup>®</sup>) mit einer Konzentration von 5 mg/ml unverdünnt in der erforderlichen Menge in Leerbeutel überführt. Der Hersteller gibt für die applikationsfertige Infusionslösung eine maximale Haltbarkeit von 8 Stunden bei Temperaturen unter 30 °C an.<sup>55</sup> Clofarabin ist als Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung (Evoltra<sup>®</sup>) als Fertigarzneimittel erhältlich. Vor Applikation muss das Konzentrat laut Fachinformation mit 0,9%iger Natriumchlorid-Infusionslösung verdünnt werden. Der Hersteller gibt für das verdünnte, sterile Konzentrat eine Haltbarkeit von 3 Tagen bei 2 – 8 °C oder bei Raumtemperatur an.<sup>54</sup>

Stabilitätsdaten, die über diese Angaben hinausgehen, wurden bisher nicht publiziert. Für die klinische Praxis sind hierbei vor allem Stabilitätsdaten über einen längeren Zeitraum wie auch die Kompatibilität mit verschiedenen Behältnismaterialien (EVA, PE, PP, etc.) und Trägerlösungen (NaCl 0,9%, Glukose 5%) von großem Interesse.

## **4.2 Physico-chemical stability of nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags**

Ziel der nachfolgend als Originalpublikation dargestellten Studie war die Bestimmung der physikalisch-chemischen Stabilität von applikationsfertigen Nelarabin-Infusionslösungen in Ethylvinylacetat (EVA) Infusionsbeuteln über einen Zeitraum von 4 Wochen.

J.Kaiser, I.Krämer

EJHP Science • Volume 17 • 2011 • Issue 1 • P. 1-6

# Physico-chemical stability of nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags

Jeanette Kaiser, PharmD; Professor Irene Krämer, PhD

## ABSTRACT

**Objectives:** To determine the physico-chemical stability of ready-to-use nelarabine infusion solutions in ethylene vinyl acetate (EVA) infusion bags stored under refrigeration (2°C–8°C) or at room temperature, and either protected from light or exposed to light.

**Methods:** Stability of nelarabine infusion solutions was determined by a stability-indicating reversed-phase high-performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection. Undiluted nelarabine solution for infusion (Atriance, 5 mg/mL) was transferred to EVA infusion bags and the physico-chemical stability of the infusion solutions assessed over a four-week storage period. Test solutions were stored under refrigeration (2°C–8°C) or at room temperature, and either protected from or exposed to light. Nelarabine concentrations were determined after preparation on days 0 (initial), 1, 3, 7, 14, 21, and 28. In addition, pH values were measured once a week during the storage period and test solutions were visually checked for colour change and precipitation.

**Results:** The stability tests revealed that nelarabine infusion solutions are physico-chemically stable for a minimum of four weeks. Nelarabine concentrations remained at a level of > 95% of the initial concentration independent of the storage conditions. Exposure to daylight did not influence the stability of the nelarabine infusion solutions. No colour change or precipitation occurred. The pH of the infusion solutions varied between 5.7 and 6.5.

**Conclusion:** Ready-to-use nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags are physico-chemically stable over a four-week period even when stored at room temperature without protection from light.

## KEYWORDS

Degradation, high-performance liquid chromatography (HPLC), infusion solution, nelarabine, physico-chemical stability

## INTRODUCTION

Nelarabine (code 506U78 and GI26250), a new purine nucleoside analogue, was approved in 2005 by the FDA (brand name Arranon) and in 2007 by the EMA (brand name Atriance) for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukaemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. Nelarabine is indicated when patients have failed to respond or have stopped responding to at least two types of chemotherapy. The T-cell phenotype occurs in only about 15–20% of children and 25% of adults with acute lymphoblastic leukaemia and in approximately 10–20% of patients with non-Hodgkin's lymphoma. Because of the rarity of the condition, nelarabine was

authorised under exceptional circumstances and has been granted orphan drug status [1].

Nelarabine is a water-soluble prodrug of a cytotoxic deoxyguanosine analogue named 9-β-D-arabinofuranosylguanine (ara-G). *In vivo*, nelarabine is rapidly converted to ara-G and subsequently into the active 5'-triphosphate (ara-GTP) [1-5].

The recommended dose of nelarabine in adults and adolescents (16 years and older) is 1,500 mg/m<sup>2</sup> to be administered intravenously over two hours on days 1, 3 and 5, repeated every 21 days. In children and adolescents, 21 years and younger, the recommended dose is 650 mg/m<sup>2</sup> on five consecutive days, repeated every 21 days. The prescribing physician should consider which regimen is appropriate when treating patients in the age range of 16–21 years.

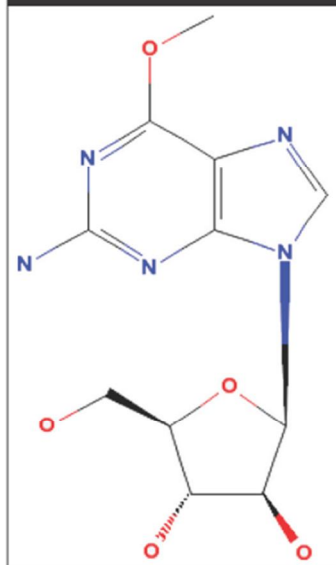
Nelarabine is chemically designated as 9-β-D-arabino-furanosyl-6-methoxy-9H-purine-2-amine, see Figure 1. It is an ampholyte with an aqueous solubility of 8–9 mg/mL at 25°C over the pH range of 4 to 10 and has a molecular weight of 297.27 [1, 6]. Nelarabine is manufactured by GlaxoSmithKline and marketed under the names of Atriance

---

**Contact for correspondence:** Professor Irene Krämer, PhD  
Department of Pharmacy  
Johannes Gutenberg-University Hospital  
1 Langenbeckstraße  
DE-55131 Mainz, Germany  
Tel: +49 6131 177209  
Fax: +49 6131 175525  
kraemer@apotheke.klinik.uni-mainz.de

Received: 31 May, 2010; Revised manuscript received: 9 November 2010; Accepted: 10 November 2010

Figure 1: Chemical structure of nelarabine



or Arranon, depending on the country. It is commercially available as a solution for infusion and supplied as a clear, colourless, sterile solution in glass vials. Each ready-to-use liquid injectable dosage-form contains 250 mg of the active substance, nelarabine, dissolved in 50 mL water for injection. Sodium chloride is used as an excipient to adjust the tonicity of the formulation, and sodium hydroxide or hydrochloric acid to adjust the pH. In aqueous solution, nelarabine is most stable between pH 5 and 7 [1, 7].

Nelarabine is intended for IV use only. The commercially available solution for infusion is not diluted before administration. The appropriate volume of nelarabine solution for infusion is transferred into ethinyl vinyl acetate (EVA) or polyvinylchloride (PVC) infusion bags or into glass containers and administered as a two-hour infusion in adult patients and as a one-hour infusion in paediatric patients [7, 8].

When nelarabine was stored at 30°C/65% relative humidity (RH) for 24 months or at 40°C/75% RH for six months, the results of all studies complied with the manufacturer's product specification. No changes were observed under photostability, stress or freeze/thaw conditions [1, 7]. According to the summary of product characteristics, Atriance solution is stable for up to eight hours at up to 30°C once the vial is opened [9]. No further information, either on the stability of nelarabine infusion solution in the glass vial or on the ready-to-use nelarabine infusion solutions in infusion bags, was found in the literature. Therefore a systematic study was initiated to determine the stability of nelarabine infusion solution in EVA infusion bags under different storage conditions. The results can be used to set storage-period limits for drugs prepared in pharmacy-based cytotoxic preparation units.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of test solutions

Stability studies were performed on the commercially available Atriance liquid injectable dosage form nelarabine 5 mg/mL, 250 mg per vial; excipients: sodium chloride,

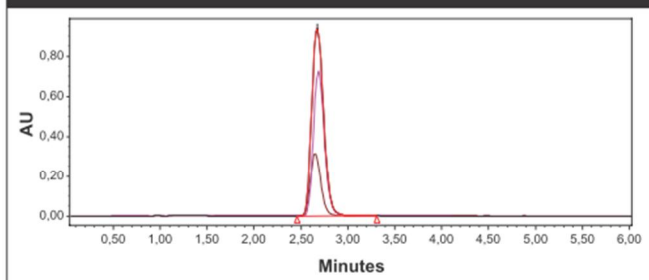
hydrochloric acid, sodium hydroxide and water for injection [1] (lot C370069, GlaxoSmithKline, Munich, Germany). Nelarabine test solutions were prepared aseptically by transferring 50 mL of nelarabine infusion solution to empty EVA infusion bags (nominal volume 100–300 mL, product number: SN2020P, lot: 01O001, Neocare, Lüdenscheid, Germany). Test solutions were stored under refrigeration (2°C–8°C) or at room temperature (20°C–25°C), either protected from or exposed to light for a period of 28 days. For each storage condition, three test solutions were prepared (a total of nine test solutions).

### HPLC Assay

Nelarabine concentrations were analysed by a stability-indicating reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) assay with photodiode array detection adopted from Reichelova [10]. The HPLC system consisted of a Waters 717 plus autosampler, a Waters photodiode array (PDA) detector 996 and a Waters 510 HPLC-pump. Data were acquired and integrated by using Waters Empower Pro, Empower 2 software, version 6.10.01.00 (Waters, Eschborn, Germany). The column used was the Spherisorb ODS-2 C18, end-capped, 80 Å x 4.6 mm, particle size 3 µm (MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany). The mobile phase consisted of 80% 0.01 M potassium dihydrogen phosphate solution [1.36 g anhydrous potassium dihydrogen phosphate (Merck, Darmstadt, Germany) dissolved in 1 L of water HPLC gradient grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, US)] pH 6.8 and 20% methanol [methanol HPLC gradient grade (Fisher Scientific, Schwerte, Germany)]. The pH of the potassium dihydrogen phosphate solution was adjusted to pH 6.8 with 1.0 M potassium hydroxide solution [55.61 g potassium hydroxide pellets (Merck, Darmstadt, Germany) dissolved in 1 L of water HPLC gradient grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, US)] using a pH 210 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany). The flow rate was set at 1.0 mL/minute, with an injection volume of 10 µL. The detection wavelength was set at 265 nm. Under these conditions, the retention time of nelarabine was about 2.5 minutes, see Figure 2. Therefore the run time was set at six minutes. The calibration curve was constructed from plots of peak area versus concentration. The linearity of the method was evaluated at seven nelarabine concentrations varying from 0.05 mg/mL to 1.0 mg/mL and five-fold injections. Nelarabine stock solution (Atriance 5 mg/mL) was diluted with 0.9% sodium chloride solution to the required concentration. The calibration curve was linear, the correlation coefficient was 0.999.

The accuracy of the assay was proved by analysing three different concentrations (0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL and

**Figure 2: Sample RP-HPLC chromatogram of nelarabine solutions (200, 500 and 700 µg/mL)**



0.7 mg/mL, 10 injections per concentration). The percentage rate of closeness to the nominal value was calculated for each sample injected. Mean accuracy was  $100\% \pm 1.7$  ( $n = 30$ ). The intraday precision, expressed as relative standard deviation (RSD), was 1.8% for 0.2 mg/mL solutions, 1.9% for 0.5 mg/mL solutions, and 1.3% for 0.7 mg/mL solutions. Interday precision was determined with three different nelarabine concentrations assayed on five different days. Triplicate injections of each concentration yielded interday RSDs of 1.4% for the 0.2 mg/mL, 0.3% for the 0.5 mg/mL and 0.4% for the 0.7 mg/mL concentrations.

The assay was validated as stability indicating by analysing forced degraded nelarabine solutions. Samples were diluted with 0.9% sodium chloride solution to a nominal concentration of 1.0 mg/mL nelarabine and heated for three hours at 85°C or adjusted to acidic (pH 1 with HCl) or alkaline (pH 13 with NaOH) conditions without heating for one day or with heating for three hours at 85°C.

In addition, forced degradation samples were analysed by using a mobile phase that consisted of 90% 0.05 M potassium dihydrogen phosphate solution and 20% methanol. Run time was set at 15 minutes because of the nelarabine retention time of 6.8 minutes. Degradation peaks were clearly separated from the original nelarabine peak, see Figures 3b and 4b.

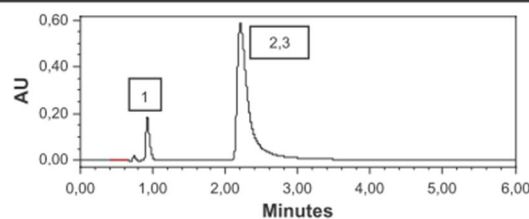
#### SAMPLE PREPARATION

On days 0, 1, 3, 7, 14, 21 and 28, 1 mL samples were withdrawn from each test solution and diluted 1:10 with 0.9% sodium chloride solution [100 mL Freeflex infusion bag (lot 13BAS091, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany)] in order to fit the calibration curve. Immediately after dilution, the samples were analysed in triplicate by RP-HPLC.

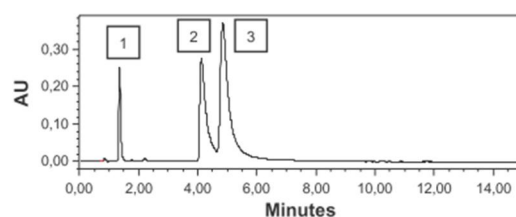
#### PHYSICAL STABILITY

Physical stability was determined by visual inspection and pH measurement. Test solutions were visually

**Figure 3: HPLC chromatograms of nelarabine solution adjusted to pH 1 and heated for three hours at 85°C**



a: With a mobile phase of 20% MeOH and 80%  $K_2HPO_4$  0.01 M



b: With a mobile phase of 10% MeOH and 90%  $K_2HPO_4$  0.05 M  
(1 + 2 = unknown degradation products, 3 = 2-amino-6-mercapto-purine)

examined in normal laboratory light whenever samples were withdrawn. Test solutions with no colour change or any precipitation were defined as physically stable.

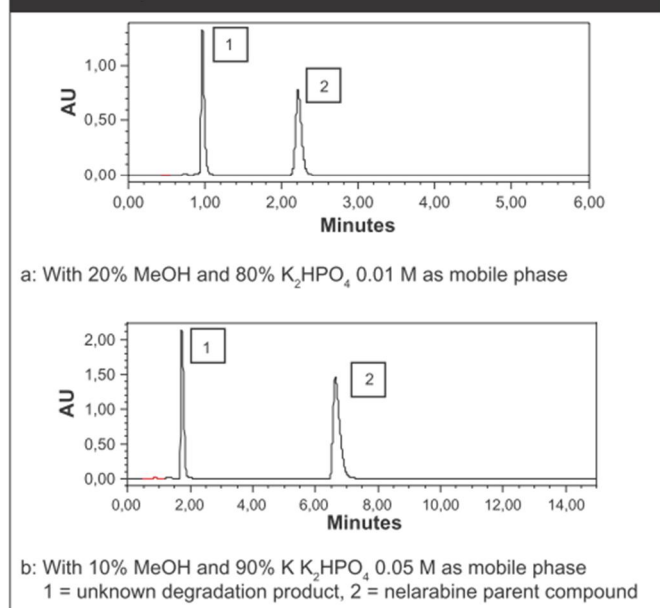
Once a week, samples of nelarabine test solutions were withdrawn. Values of pH were measured, using a pH 210 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany) equipped with an InLab Micro pH glass electrode (Mettler Toledo, Giessen, Germany). The pH meter was calibrated with standard buffer solutions (pH 4.01 and 7.01) from Hanna Instruments. pH values were stated as stable between pH 5 and 7 [11].

## RESULTS

### RP-HPLC

The HPLC method adopted from Reichelova et al. [10] was shown to be suitable for stability studies of the guanosine analogue, nelarabine, although the method was originally developed to study deoxyadenosine analogues. By using this method, degradation products could only be detected when the pH-modified samples were heated for three hours at 85°C, see Figures 3a and 4a. Analysing the forced degradation samples with an adapted mobile phase, three main degradation products (after retention times ( $t_R$ ) of 1.4, 4.0 and 4.8 minutes) were recognised in the chromatograms of the acidulated and heat-degraded samples. Intact nelarabine (after  $t_R$  6.8 minutes) was no longer detectable. Chromatograms of the alkalisied and heated samples revealed one degradation product peak ( $t_R$ : 1.8 minutes)

**Figure 4: HPLC chromatograms of nelarabine solution adjusted to pH 13 and heated for three hours at 85°C**



and a decreased parent peak ( $t_R$ : 6.8 minutes), see Figures 3b and 4b. The additional peak with the retention time of 4.8 minutes results from acid-catalysed cleavage of the N-glycosidic bond. The degradation product corresponds to the respective free purine base as was demonstrated by chromatography of pure 2-amino-6-methoxy-(9H)-purine (CAS-Nr. 20535-83-5, Chemos, Regenstauf, Germany).

Ready-to-use nelarabine infusion solutions in EVA bags were found to be chemically stable for a minimum of four weeks, independent of temperature or light conditions. Nelarabine concentrations declined less than 5% over the entire test period, see Table 1, and no peaks of degradation products were detected in the PDA chromatograms. In none of the chromatograms was tailing of the nelarabine parent peak or peaks of degradation products detected after a storage period of 28 days, see Figure 5. Marginal variations in nelarabine concentration can be explained by the dilution step before HPLC assay and by standard deviations in the HPLC method.

**PHYSICAL STABILITY**

Nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags are physically stable for at least four weeks. No colour changes and no haze or precipitation were observed in the test solutions during the entire storage period.

The pH values measured over the four-week period remained between 5.7 and 6.5, see Table 2.

**DISCUSSION**

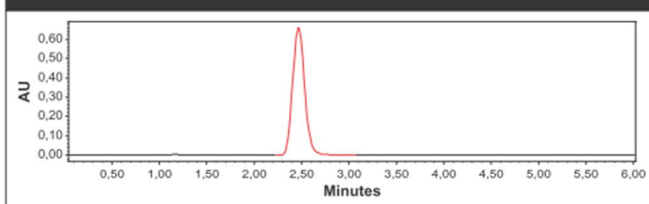
Nelarabine is commercially available as a solution for injection. The medicinal product Atriance undergoes terminal sterilisation after filling the filtered solution in sterile vials. Its stability is not affected under long-term storage conditions and accelerated conditions including exposure to light. These facts indicate the thermal stability and photostability of nelarabine in aqueous

**Table 1: Stability of nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags over a 28-day period (determined with RP-HPLC) under different storage conditions**

Storage conditions	Infusion bag number	Initial drug concentration (mg/mL)		Initial concentration remaining [%]					
		Nominal	Actual	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Room temperature Exposed to light	1	5.0	4.88 ± 0.03	102.28 ± 0.90	101.88 ± 1.08	102.33 ± 0.72	98.19 ± 0.81	103.26 ± 2.37	102.88 ± 0.31
	2	5.0	5.05 ± 0.13	96.80 ± 2.49	98.07 ± 1.48	97.98 ± 2.19	94.86 ± 2.60	98.38 ± 2.33	97.47 ± 2.74
	3	5.0	5.02 ± 0.08	98.85 ± 1.37	96.84 ± 0.77	97.74 ± 1.51	96.78 ± 1.83	98.24 ± 1.22	97.99 ± 1.22
2°C–8°C Protected from light	1	5.0	5.08 ± 0.21	96.81 ± 3.25	99.09 ± 3.93	95.52 ± 3.52	96.15 ± 4.10	96.92 ± 5.90	95.93 ± 4.02
	2	5.0	4.98 ± 0.09	99.48 ± 0.58	101.46 ± 1.76	99.55 ± 1.98	97.83 ± 1.57	97.26 ± 1.94	97.36 ± 1.83
	3	5.0	5.07 ± 0.08	98.72 ± 0.65	98.49 ± 1.99	97.26 ± 1.09	96.80 ± 0.64	95.68 ± 0.59	96.82 ± 2.38
Room temperature Protected from light	1	5.0	5.00 ± 0.09	98.13 ± 2.24	102.51 ± 1.27	99.32 ± 1.94	100.01 ± 2.11	95.70 ± 2.00	98.78 ± 1.94
	2	5.0	5.01 ± 0.09	98.14 ± 1.05	101.86 ± 2.39	98.61 ± 2.07	98.62 ± 1.63	95.87 ± 1.23	99.13 ± 1.68
	3	5.0	4.96 ± 0.07	99.98 ± 1.51	102.46 ± 1.32	98.92 ± 1.18	100.03 ± 1.78	102.65 ± 1.32	99.15 ± 1.12

Concentration expressed as mean ± standard deviation of triplicate assays of one test solution. Drug concentrations in samples taken at time zero were designated as 100%

Figure 5: Sample RP-HPLC chromatogram of nelarabine infusion solution after a storage period of 28 days



solution. In addition, during the manufacturing process no loss in content was seen at any point [1]. In the study, nelarabine concentrations remained consistently above 95% of the initial concentration over the four-week test period, independent of storage, temperature and light conditions. Loss of nelarabine because of adsorption on to EVA, the primary packaging material, can be excluded. No degradation products could be detected in PDA chromatograms of the test solutions at any time.

Test solutions, in primary packing material at the standard available concentration, and storage conditions were selected to observe normal clinical practice. Because the commercially available infusion solution is not diluted before administration, the influence of different vehicles with different ionic strengths and pH values was not assessed. The pH of Atriance infusion solution is adjusted to pH 5–7 because it is the optimum pH range for the stability of aqueous nelarabine solutions. During

the entire test period, the pH of test solutions remained in the range given by the manufacturer (GlaxoSmithKline), thereby supporting the chemical stability of nelarabine. Moreover, nelarabine was revealed to be fairly stable in acid and base conditions. In the forced degradation studies, sole acidification or alkalisation of nelarabine solutions did not induce degradation. Only maximum forced conditions (pH modification plus prolonged heating at 85°C) caused significant degradation. Purine nucleosides are known to undergo acid-catalysed hydrolysis of the N-glycosylic bond resulting in the respective sugar and purine moiety [10, 12]. The acid-catalysed hydrolysis rates depend on the structure of the purine base and the structure of the sugar moiety. Guanine nucleosides are slightly less stable than adenine nucleosides. The 2'-hydroxyl component on the sugar moiety was shown to have a very strong stabilising effect on the rate of acid hydrolysis thereby explaining the stability of nelarabine. The configuration of the hydroxyl group on the 2'-carbon atom has only minor influence [12]. Consequently, the arabinoside configuration decreases the hydrolysis rate and favours the stability of nelarabine. Liquid chromatographic studies of acid stability of adenosine analogues also revealed unknown products which were different from the expected adenine analogues [10]. This was also the case in this study, which revealed two unknown degradation products in addition to the expected purine base.

In general, nucleosides are even more resistant to alkaline nucleoside hydrolysis. Elevated temperatures (60°C–80°C) are necessary to obtain reasonable rates of hydrolysis independent from the structure of the sugar moiety [13]. In addition to the cleavage of the glycosyl bond, certain purine nucleosides undergo alkaline-induced cleavage of the imidazole ring. Alkaline-based forced degradation of nelarabine resulted in only one additional peak in the HPLC chromatogram (see Figures 4a and 4b) which corresponds most probably to ring opening of the imidazole ring. Solvolysis of nelarabine to the respective purine was not observed. Alkaline solvolysis by two parallel routes has been thoroughly investigated for adenine nucleosides [11] and shown that ring opening is favoured at higher alkalinities. These results support the assumption in this study of a ring-opened

Table 2: pH values of nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags under different storage conditions. Mean of three infusion bags is calculated from (H<sup>+</sup>) concentrations

Storage conditions	Infusion bag number	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Room temperature Exposed to light	1	5.64	6.53	5.79	5.15	6.09
	2	5.67	6.50	5.65	5.42	6.23
	3	5.80	6.16	5.71	5.54	6.38
	Mean	5.70	6.36	5.71	5.34	6.22
2°C–8°C Protected from light	1	5.62	6.00	5.78	5.67	6.46
	2	5.74	5.89	5.77	5.66	6.54
	3	5.78	5.81	5.82	5.76	6.45
	Mean	5.71	5.89	5.79	5.69	6.48
Room temperature Protected from light	1	5.82	5.97	5.82	5.94	6.50
	2	5.82	5.96	5.89	5.93	6.43
	3	6.03	6.04	5.75	5.83	6.36
	Mean	5.88	5.99	5.82	5.90	6.43



degradation product of nelarabine (as a guanosine analogue) under strong alkaline conditions. The fact that during the stability tests no tailing of the nelarabine parent peak or additional peaks of degradation products ( $t_R$ : 1.2 minutes) were to be found at any time gives proof of the stability of nelarabine.

With regard to physico-chemical stability, pharmacy-based centralised preparation of ready-to-use nelarabine infusion solutions has proved unproblematic and cost-saving. However, despite its pronounced physico-chemical stability, the risk of microbiological contamination should be considered when preparing the solutions and assigning extended expiry dates. The tests carried out in this study revealed physico-chemical stability of

nelarabine infusion solution in EVA bags. Considering that there is no preservative in the commercially available product, handling under strict aseptic conditions and storage of all products under refrigeration is crucial.

#### CONCLUSION

Ready-to-use nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags are physico-chemically stable for at least four weeks, either refrigerated or at ambient temperature, and with or without protection from light.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The study was supported in part by a grant from GlaxoSmithKline GmbH & Co KG.

#### REFERENCES

1. European Medicines Agency, London: Scientific discussion on Atriance. 2007 [cited 2010 November 16]. Available from: [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000752/WC500027915.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000752/WC500027915.pdf)
2. Lambe CU, Averett DR, Paff MT, Reardon JE, Wilson JG, Krenitsky TA. 2-Amino-6-methoxypurine arabinoside: an agent for T-cell malignancies. *Cancer Res.* 1995; 55(15):3352-6.
3. Gandhi V, Plunkett W, Weller S. Evaluation of the combination of nelarabine and fludarabine in leukemias: clinical response, pharmacokinetics, and pharmacodynamics in leukemia cells. *J Clin Oncol.* 2001;19(8):2142-52.
4. Cohen MH, Johnson JR, Massie T, et al. Approval summary: nelarabine for the treatment of T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5329-35.
5. Parker WB, Secrist JA 3rd, Waud WR. Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs.* 2004;5(6):592-6.
6. GlaxoSmithKline. Arranon prescribing information. Research Triangle Park, NC. Revised December 2009 [cited 2010 November 16]. Available from: [http://us.gsk.com/products/assets/us\\_arranon.pdf](http://us.gsk.com/products/assets/us_arranon.pdf)
7. Center for Drug Evaluation and Research. Application number: 21-877, Pharmacology Review of Arranon. October 28 2005 [cited 2010 November 22]. Available from: [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2005/021877\\_s000\\_Arranon\\_Pharmr.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/021877_s000_Arranon_Pharmr.pdf)
8. European Medicines Agency. London: Product Information for Atriance. Updated 2009 February 24 [cited 2010 November 16]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000752/human\\_med\\_000656.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&jenabled=false](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000752/human_med_000656.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&jenabled=false)
9. GlaxoSmithKline, München. Summary of product characteristics for Atriance, January 2010 [cited 2010 November 22]. Available from: [www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/01/05/010503.pdf](http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/01/05/010503.pdf)
10. Reichelova V, Liliemark J, Albertioni F. Liquid chromatographic study of acid stability of 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, 2-chloro-2'-deoxyadenosine and related analogues. *J Pharm Biomed Anal.* 1995;13(4-5):711-4.
11. US National Library of Medicine, Bethesda, MD. Current medication information for Arranon. December 2009 [cited 2010 November 22]. Available from: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=14253&CFID=56057883&CFTOKEN=1970cd3ab443c5b6-7433826E-B334-2078-68D55E99BE1C&jsessionid=ca304b87464e5a7d4446>
12. Garrett ER, Mehta PJ. Solvolysis of adenine nucleosides. I. Effects of sugars and adenine substituents on acid solvolyses. *J Am Chem Soc.* 1972;94(24):8532-41.
13. Garrett ER, Mehta PJ. Solvolysis of adenine nucleosides. II. Effects of sugars and adenine substituents on alkaline solvolyses. *J Am Chem Soc.* 1972;94(24):8542-7.

### **4.3 Long-term stability of clofarabine injection concentrate and diluted clofarabine infusion solutions**

Ziel der nachfolgend in Form einer eingereichten Originalpublikation dargestellten Studie war die Bestimmung der physikalisch-chemischen Stabilität der Clofarabin-Stammlösung und applikationsfertiger Clofarabin-Infusionslösungen über einen Zeitraum von 28 Tagen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

J.Kaiser, I.Krämer (2011)

Journal of Oncology Pharmacy Practice eingereicht am 6.2.2011

Manuskript ID JOPP-11-0010

## **Long-term stability study of clofarabine injection concentrate and diluted clofarabine infusion solutions**

Jeanette Kaiser PharmD, Irene Krämer PhD

Department of Pharmacy, University Medical Center of Johannes Gutenberg-University, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany

### **Corresponding author**

Prof. Dr. Irene Krämer

Department of Pharmacy, University Medical Center of Johannes Gutenberg-University,

Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany

Telephone: 49 6131 177209, Fax: 49 6131 175525

E-mail: Irene.kraemer@unimedizin-mainz.de

**Key words:** clofarabine, physicochemical stability, infusion solutions, adsorption, high-performance liquid chromatography (HPLC) assay

This work was supported in part by a grant of Genzyme Europe B.V.

## ***Abstract***

**Purpose:** The aim of this study was to investigate the physicochemical stability of clofarabine injection concentrate and ready-to-use clofarabine infusion solutions over a prolonged period of 28 days.

**Methods:** To determine the stability of clofarabine infusion solutions, the injection concentrate (Evoltra<sup>®</sup>, 1 mg/mL, Genzyme) was diluted either with 0.9% sodium chloride or 5% glucose infusion solution. The resulting concentrations of 0.2 mg/mL or 0.6 mg/mL respectively were chosen to represent the lower and upper limit of the ordinary concentration range. Test solutions were stored under refrigeration (2-8 °C) or at room temperature either light protected or exposed to light. Clofarabine concentrations and pH values were determined at different time intervals throughout a 28 days storage period. Compatibility of diluted clofarabine infusion solutions (0.1 – 0.4 mg/mL) with different container materials (PVC, glass, PP/PE) was tested over a 48-hours storage period. Clofarabine concentrations were measured by a stability-indicating reversed phase HPLC assay with ultraviolet detection.

**Results:** Clofarabine injection concentrate and clofarabine infusion solutions remained physico-chemically stable (> 90% clofarabine) for 4 weeks. Results are independent of storage conditions, drug concentrations (0.2, 0.6 and 1.0 mg/mL) and diluents (0.9% sodium chloride, 5% glucose infusion solution). Adsorption of clofarabine to container material can be excluded.

**Conclusions:** Clofarabine injection concentrate and diluted infusion solutions in commonly used vehicles are stable for at least 28 days either refrigerated or at room temperature. Physicochemical stability favours pharmacy-based centralized preparation. Due to microbiological reasons, strict aseptic handling and storage of the products under refrigeration is recommended.

## Introduction

Clofarabine (CAFdA) is a halogenated-adenosine analogue approved for the treatment of relapsed or refractory hematologic malignancies (ALL or AML). Like other nucleoside analogues which are acting as anti-metabolite anticancer agents, clofarabine is to be phosphorylated to its triphosphate derivative to be active in cells. Clofarabine leads to inhibition of ribonucleotide reductase and DNA polymerase- $\alpha$ <sup>56</sup> and furthermore to disruption of mitochondrial function through release of cytochromic and proapoptotic proteins.<sup>57</sup> The recommended dose of clofarabine is 52 mg per m<sup>2</sup> body surface area (BSA) administered intravenously daily for five consecutive days. Treatment cycles should be repeated every 2 – 6 weeks.<sup>58</sup>

The chemical name of clofarabine is 2-chloro-9-(2'-deoxy-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosyl)-9H-purine-6-amine (Figure 1).

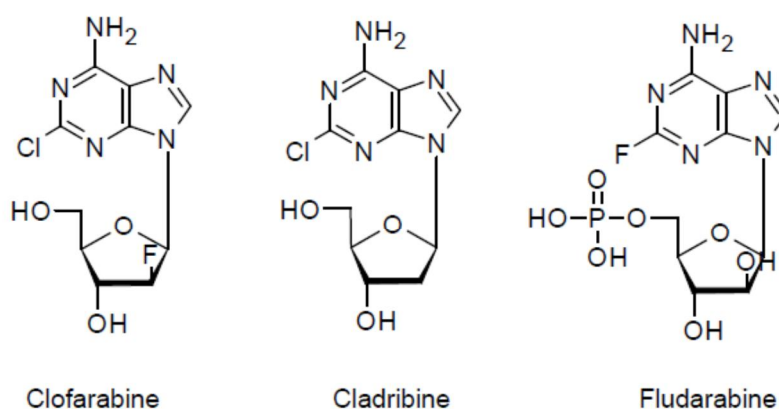


Figure 1      Chemical structures of clofarabine (CAFdA), cladribine (CdA) and fludarabine (Fara-A)

In the U.S. and Canada clofarabine infusion solution concentrate is marketed as Clolar<sup>®</sup>, in Europe and Australia/New Zealand as Evoltra<sup>®</sup>. Each 20 mL vial contains 20 mg of active substance clofarabine [1mg/mL], 180 mg of sodium chloride and water for injections. Clofarabine concentrate is a clear, practically colourless solution with a pH of 4.5 to 7.5.<sup>59</sup> Clofarabine has the highest lyophilicity among the anticancer purine analogues.<sup>42</sup> The stability of 5'-triphosphate clofarabine in leukaemic cells was shown to be higher than the stability of phosphorylated cladribine.<sup>60</sup> 2-Chloradenine (CAde) is the major catabolite of clofarabine as well as of cladribine.<sup>61</sup> The introduction of a

fluorine atom at the 2'-arabino position of the deoxyribose moiety increases acid stability to the glycosidic linkage.<sup>8</sup>

It is known that diluted clofarabine concentrate is chemically and physically stable for 3 days at 2 – 8 °C or at room temperature.<sup>59</sup> During photostability tests (room temperature, up to 4.8 million lux hours) no significant changes in appearance, content (HPLC, 95.0 – 105.0 %) and impurities (HPLC) were observed.<sup>58</sup> In plasma samples clofarabine is almost intact (87% of the initial concentration) after 24 weeks of storage at – 20 °C. More than 50% of cladribine is degraded under the same conditions.<sup>61</sup> No further information on the stability and compatibility of clofarabine concentrate and clofarabine infusion solutions was found in the literature.

The purpose of this study was to determine the physicochemical stability of ready-to-use clofarabine infusion solutions and of the undiluted injection concentrate [Evoltra<sup>®</sup>, 1 mg/mL] after first opening of the vial. Tests were performed over a period of four weeks under different storage conditions. Chemical stability was determined by using a stability-indicating high-performance-liquid-chromatographic (HPLC) assay with ultraviolet detection. Physical stability was determined by pH-measurement and visual inspection.

## ***Materials and Methods***

### ***Sample preparation***

Clofarabine infusion solutions were aseptically prepared by transferring clofarabine injection concentrate (clofarabine Pre-Clinical, 1mg/mL, 20 mL, Genzyme, lot. 09-002398) to commercially available prefilled polypropylene/polyethylene (PP/PE) infusion bags (freeflex<sup>®</sup>, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) containing 0.9% sodium chloride solution (Product No. B248356) or 5% glucose solution (Product No. B248087) in amounts yielding nominal clofarabine concentrations of 0.2 and 0.6 mg/mL. The ready-to-use infusion solutions and injection concentrate in original glass vials (1 mg/mL) were stored at room temperature exposed to light or light protected or under refrigeration (2-8 °C) in parallel. For each storage condition and concentration one vial of stock solution and three infusion solutions were examined. Samples of the infusion solutions were withdrawn immediately after dilution (day 0) and after 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days and assayed in triplicate without further dilution. Samples of clofarabine injection concentrate were withdrawn immediately after first opening the vials and at the same intervals given for the infusion solutions. Samples withdrawn

from the injection concentrate had to be diluted 1:1 with diluent (0.9% NaCl or 5% glucose infusion solution) in order to fit the calibration curve.

In order to study adsorption behaviour, diluted clofarabine infusion solutions were stored in different container materials (PP/PE, PVC, glass) over a period of 48 hours at 2-8 °C. Therefore stock solution was transferred to prefilled (PP/PE bags: freeflex<sup>®</sup>, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany, Item No. B248356) or empty containers (PVC: extension line "Heidelberg", Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany, Product No. 287311; glass: Duran<sup>®</sup> iodine flask, Schott AG, Mainz, Germany, Item No. 24 192 27) and diluted with 0.9% sodium chloride infusion solution (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany, Item No. B248356) to achieve the predetermined concentrations (PP/PE: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL, glass: 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL, PVC: 0.1, 0.2, 0.3 mg/mL). Each test solution was prepared in triplicate. Immediately after dilution and after a storage period of 24 and 48 hours samples were withdrawn and assayed.

Samples were assayed for impurities and concentrations of clofarabine were determined by reversed phase HPLC.

### Chemical stability

#### Reversed phase HPLC assay

Concentrations of clofarabine were determined by using a stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) assay with photodiode array detection adopted from Reichelova.<sup>42</sup> The HPLC system consisted of a Waters 2695 separation module and a Waters photodiode array (PDA) detector 2998. Data were acquired and integrated by using Waters Empower Pro, Empower<sup>2</sup> software, version 6.10.01.00 (Waters, Eschborn, Germany). The reversed phase column used was a Spherisorb ODS-2 C18, endcapped, 80 Å x 4.6 mm, particle size 3 µm (MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany). The mobile phase consisted of 80% 0.01 M potassium dihydrogen phosphate solution [1.36 g potassium dihydrogen phosphate anhydrous (Merck, Darmstadt, Germany) dissolved in 1 L of Water HPLC Gradient Grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey)] pH 6.8 and 20% methanol [Methanol HPLC Gradient Grade (Fisher Scientific, Schwerte, Germany)]. The pH of the potassium dihydrogen phosphate solution was adjusted to pH 6.8 with 1.0 M potassium hydroxide solution [55.61 g potassium hydroxide pellets (Merck, Darmstadt, Germany) dissolved in 1 L of Water HPLC Gradient Grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey)] using a pH 210 Microprocessor pH Meter (Hanna

Instruments, Kehl am Rhein, Germany). The flow rate set was  $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; the injection volume was  $10 \text{ } \mu\text{l}$ . Detection wavelength was set at  $265 \text{ nm}$ . Under these conditions retention time of clofarabine was about 5.9 minutes (compare Figure 2). Therefore run time was set at 10 minutes. Each sample of the clofarabine test solutions was injected in triplicate.



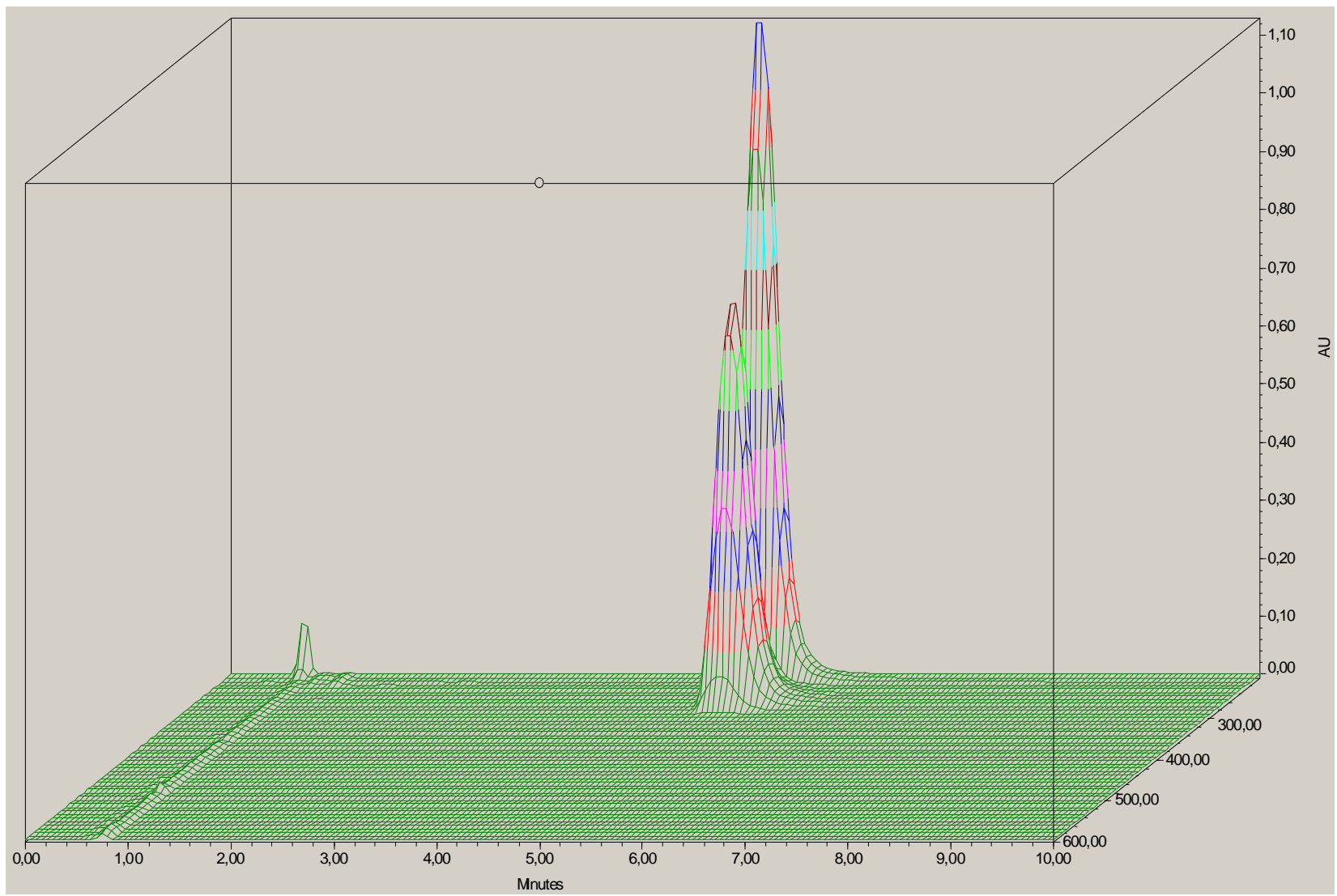


Figure 2 Clofarabine 3D Plot (800 µg/mL)

### Validation of the RP-HPLC assay

#### *Suitability*

Suitability of the assay was proven by analyzing forced degraded clofarabine solutions. Samples were diluted with 0.9% sodium chloride to a nominal concentration of 500 µg clofarabine per mL. After heating (85 °C for three hours), acidifying to pH 1 [HCl 1N, Merck, Darmstadt, Germany] or alkalizing to pH 13 [NaOH 1N, Merck, Darmstadt, Germany] and storage for three hours at room temperature no additional peaks of degradation products were observed. Therefore acidified and alkalized samples were heated for 3 hours at 85 °C.

#### *Linearity*

The linearity of the method was determined at 7 concentrations (varying from 50 to 1000 µg/mL of clofarabine) by 5-fold injections. The calibration curve constructed from plots of peak area versus concentration of clofarabine was linear with a correlation coefficient of 0.999977.

#### *Repeatability and Precision*

Precision was determined by calculating the relative standard deviations (RSD [%]). Intraday precision was defined by analyzing three standard solutions (100, 400, and 800 µg/mL). Therefore clofarabine injection concentrate [1 mg/mL] was diluted with 0.9% NaCl solution to the concentrations required. Ten replicate injections of the solutions yielded a relative standard deviation of 0.2%, 0.2%, and 0.1% respectively. Interday precision was determined by analyzing the three standard solutions on different days. Each day fresh test solutions were prepared as described above. Triplicate injections on five different days resulted in RSD`s of 2.2% (100 µg/mL), 0.9% (400 µg/mL) and 0.8% (800 µg/mL).

#### *Accuracy*

Accuracy was proven by analyzing samples of the standard solutions (100, 400, 800 µg/mL) ten times. For each sample injected percentage of recovery was calculated and the mean recovery rate was  $99.09 \pm 0.16 \%$ .

## Physical stability

Physical stability was determined by visual inspection and pH measurement.

Test solutions were visually examined in normal laboratory light whenever samples were withdrawn. Test solutions with no colour change or any precipitation were defined as physically stable.

Once a week (on days 0, 7, 14, 21 and 28 after preparation of the test solutions) samples of clofarabine test solutions were withdrawn. Values of pH were measured, using a pH 210 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany) equipped with an InLab<sup>®</sup> Micro pH glass electrode (Mettler Toledo, Giessen, Germany). The pH meter was calibrated with standard buffer solutions (pH 4.01 and 7.01) from Hanna Instruments.

## **Results**

The HPLC method adopted from Reichelova<sup>42</sup> revealed to be suitable for the stability studies. Only after heating of the acidified and alkalized samples, degradation products were detected in the chromatograms. The peaks of degradation products were clearly separated from the clofarabine peak ( $t_R$ : 5.9). The resultant chromatogram of acid degraded Evoltra<sup>®</sup> solution showed one unknown degradation peak with a retention time of 2.8 minutes and a major peak of the intact form of clofarabine (compare Figure 3). The chromatogram of the alkalized and heated clofarabine solution (compare Figure 4) showed multiple degradation peaks ( $t_R$ : 1.0, 1.4, 1.5, 1.6, 2.7, 3.5, 4.3 and 4.8). The major peak had a retention time of 1.0 minute. Only a minor peak corresponding to the intact clofarabine remained ( $t_R$ : 5.9). None of the decomposition peaks interfered with the parent peak.

Clofarabine injection concentrate of the concentration 1 mg/mL and the ready-to-use infusion solutions of the concentrations 0.2 and 0.6 mg/mL were found to be physico-chemically stable for a minimum of 28 days. Clofarabine concentrations declined less than 10% of the initial concentrations during the entire test period independent from the type of vehicle or storage conditions (compare Table 1). No clofarabine degradation products were detected in the HPLC chromatograms. However there was a remarkable decline of the clofarabine concentrations during the first 24 hours of storage in all test solutions of the concentration 0.2 mg/mL independent from the type of vehicle or storage temperature. However the resulting concentrations (91% - 94% of the initial concentrations) did not further decrease during the remaining observation period. In

additional studies of test solutions with low clofarabine concentrations (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL) in different container materials (PP/PE, glass, PVC) the initial decline was not verifiable over a test period of 48 hours (see Table 2). According to these results the initial decrease of clofarabine concentrations as a consequence of low drug concentrations and adsorption to container materials is to be excluded.

No visible changes were detected. The solutions remained colourless and clear. No evidence of precipitation occurred. Results of pH-measurements are shown in Table 3. In clofarabine infusion solutions diluted with 0.9% NaCl vehicle pH values varied between 6.4 and 6.1 independent from the initial clofarabine concentration, storage conditions or storage period. Infusion solutions diluted with 5% glucose vehicle showed different pH values depending on the clofarabine concentration. The pH measured in solutions with low (0.2 mg/mL) or high (0.6 mg/mL) clofarabine concentrations varied around pH 4.4 or pH 5.0 respectively independent from the storage conditions or storage period. The pH of the injection concentrate decreased from pH 7.0 after first opening to pH 6.4 at day 28 of the observation period.

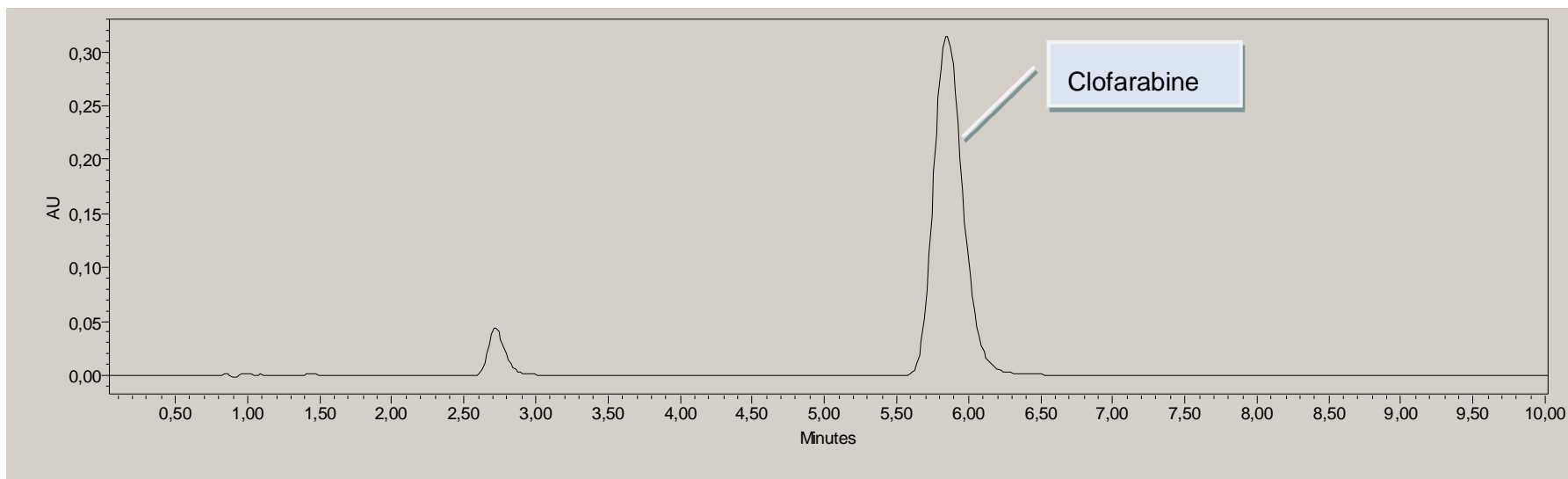


Figure 3 HPLC-chromatogram of acid degraded clofarabine infusion solution (pH1, 85 °C for 3h)

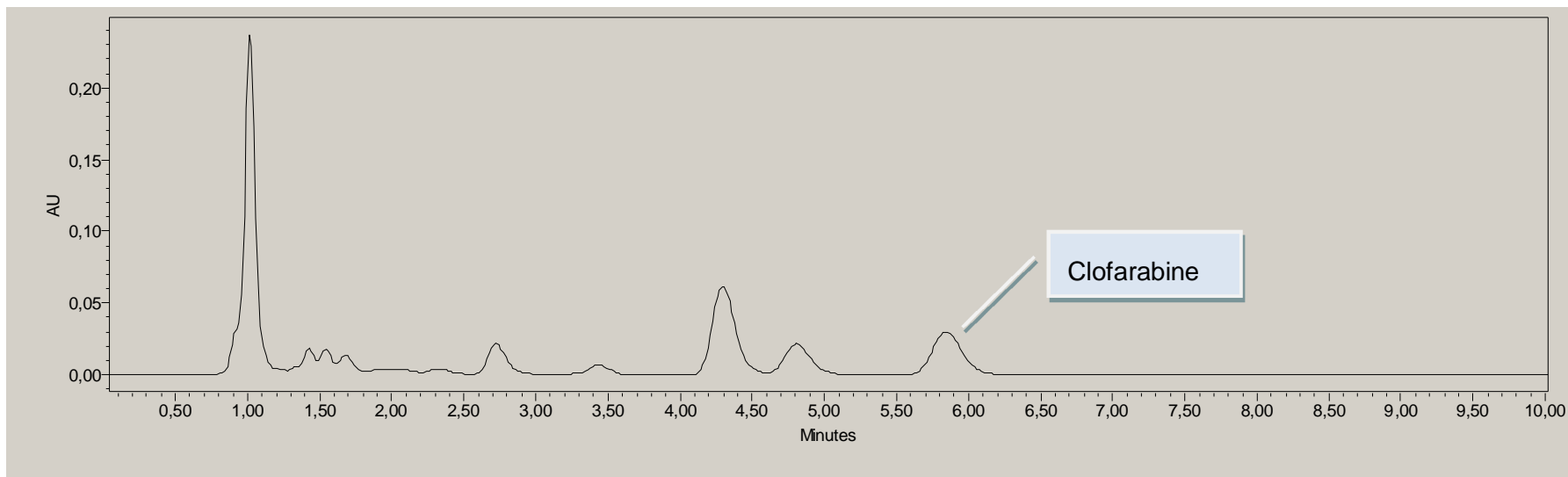


Figure 4 HPLC-chromatogram of base degraded clofarabine infusion solution (pH13, 85°C for 3h)

Table 1 Stability of diluted and undiluted clofarabine (Evoltra®) solutions at different storage conditions. Drug concentrations in samples taken at time zero were designated as 100%.

Diluent	Storage condition		Initial drug concentration [mg/mL]		[%] Initial concentration remaining ± RSD (mean of 3 test solutions, triplicate assays)					
			Nominal	actual	day 1	day 3	day 7	day 14	day 21	day 28
5% glucose solution (in PP/PE bags)	2-8°C	light protected	0.2	0.21 ± 0.00	93.3 ± 2.7	93.3 ± 2.7	93.4 ± 2.9	93.2 ± 3.2	92.7 ± 2.9	92.9 ± 2.9
	25°C	exposed to light	0.2	0.21 ± 0.02	91.3 ± 7.4	91.6 ± 7.4	91.4 ± 7.4	91.4 ± 7.4	91.0 ± 7.5	91.4 ± 7.3
	2-8°C	light protected	0.6	0.59 ± 0.01	99.8 ± 1.7	100.6 ± 1.7	100.3 ± 1.8	100.9 ± 1.8	100.1 ± 1.8	100.3 ± 1.8
	25°C	exposed to light	0.6	0.59 ± 0.01	99.7 ± 1.3	100.5 ± 1.1	100.1 ± 1.1	100.5 ± 1.2	100.1 ± 1.1	100.4 ± 1.2
0.9% sodium chloride solution (in PP/PE bags)	2-8°C	light protected	0.2	0.21 ± 0.00	92.2 ± 0.5	92.2 ± 0.6	92.2 ± 0.6	92.0 ± 0.5	91.4 ± 0.5	91.8 ± 0.5
	25°C	exposed to light	0.2	0.21 ± 0.00	93.6 ± 1.7	93.5 ± 1.8	93.6 ± 1.8	93.5 ± 2.1	93.1 ± 1.7	93.5 ± 1.8
	2-8°C	light protected	0.6	0.58 ± 0.01	100.4 ± 0.2	101.4 ± 0.1	101.3 ± 0.4	101.6 ± 0.0	101.0 ± 0.1	101.0 ± 0.1
	25°C	exposed to light	0.6	0.58 ± 0.01	100.9 ± 0.2	102.0 ± 0.1	101.6 ± 0.2	102.1 ± 0.3	101.5 ± 0.1	101.8 ± 0.0
Undiluted (in the original glass vial)	25°C	exposed to light	1.0	0.99 ± 0.00	100.0 ± 0.7	101.3 ± 0.0	101.0 ± 0.1	102.0 ± 0.3	101.7 ± 0.2	101.9 ± 0.2
	2-8°C	light protected	1.0	0.99 ± 0.00	100.3 ± 0.6	101.1 ± 0.1	100.5 ± 0.8	100.7 ± 0.2	100.5 ± 0.3	100.9 ± 0.6

Table 2 Stability of diluted clofarabine (Evoltra®) solutions in different container materials. Test solutions were diluted with 0.9% sodium chloride and stored light protected at 2 – 8 °C. Drug concentrations in samples taken at time zero were designated as 100%.

Material	Initial drug concentration [mg/mL]		[%] Initial concentration remaining ± RSD (mean of 3 test solutions, triplicate assays)	
	nominal	actual	day 1	day 2
PP/PE	0.1	0.09 ± 0.00	99.9 ± 0.1	100.4 ± 0.1
	0.2	0.19 ± 0.00	97.3 ± 0.7	97.3 ± 1.2
	0.3	0.30 ± 0.00	98.5 ± 0.0	98.4 ± 0.1
	0.4	0.40 ± 0.01	98.6 ± 0.1	98.6 ± 0.2
glass	0.2	0.20 ± 0.00	98.4 ± 0.1	98.5 ± 0.2
	0.3	0.29 ± 0.00	98.5 ± 0.1	98.5 ± 0.2
	0.4	0.39 ± 0.00	98.7 ± 0.1	98.5 ± 0.1
PVC	0.1	0.10 ± 0.00	100.2 ± 0.2	101.2 ± 1.1
	0.2	0.20 ± 0.00	99.5 ± 1.1	99.7 ± 2.0
	0.3	0.29 ± 0.00	100.2 ± 0.1	100.0 ± 1.5

Table 3 The pH-values of diluted and undiluted clofarabine (Evoltra®) solutions at different storage conditions.

Diluent	Storage condition		Nominal drug concentration [mg/mL]	pH-values ± SD (mean of 3 test solutions)				
				day 0	day 7	day 14	day 21	day 28
5% glucose solution (in PP/PE bags)	2-8°C	light protected	0.2	4.47 ± 0.02	4.42 ± 0.01	4.50 ± 0.05	4.34 ± 0.01	4.39 ± 0.04
	25°C	exposed to light	0.2	4.44 ± 0.07	4.45 ± 0.04	4.48 ± 0.08	4.35 ± 0.03	4.38 ± 0.06
	2-8°C	light protected	0.6	5.05 ± 0.02	4.92 ± 0.08	4.92 ± 0.05	4.87 ± 0.03	4.94 ± 0.04
	25°C	exposed to light	0.6	5.06 ± 0.06	4.97 ± 0.10	5.03 ± 0.08	4.86 ± 0.08	4.94 ± 0.12
0.9% sodium chloride solution (in PP/PE bags)	2-8°C	light protected	0.2	6.42 ± 0.09	6.25 ± 0.01	6.32 ± 0.22	6.19 ± 0.03	6.08 ± 0.05
	25°C	exposed to light	0.2	6.37 ± 0.03	6.35 ± 0.04	6.40 ± 0.05	6.34 ± 0.07	6.30 ± 0.15
	2-8°C	light protected	0.6	6.40 ± 0.01	6.20 ± 0.02	6.31 ± 0.27	6.28 ± 0.04	6.36 ± 0.11
	25°C	exposed to light	0.6	6.43 ± 0.06	6.29 ± 0.03	6.23 ± 0.14	6.30 ± 0.08	6.44 ± 0.06
Undiluted (in the original glass vial)	25°C	exposed to light	1.0	7.03 ± 0.12	6.66 ± 0.09	6.50 ± 0.04	6.40 ± 0.03	6.40 ± 0.04
	2-8°C	light protected	1.0	7.03 ± 0.07	6.61 ± 0.03	6.45 ± 0.18	6.36 ± 0.03	6.35 ± 0.07



## **Discussion**

Forced-degradation experiments revealed the chemical stability of clofarabine. Degradation was only achieved by heating acidified or alkalized solutions. Acidic conditions plus heat were less deleterious than alkaline conditions plus heat. It is known from the literature<sup>62</sup> that the stability of clofarabine under acidic conditions is favoured by introduction of the fluorine atom at the 2'-arabino position of cladribine. Carson et al<sup>62</sup> reported that clofarabine (CAFdA) was much more stable than cladribine (CdA) at pH 2. The latter was nearly completely degraded after 24 hours at 37 °C while CAFdA showed only minimal degradation caused by acid-catalysed hydrolysis of the N-glycosylic bond resulting in the respective sugar and purine moiety. According to the liquid chromatographic studies of acidic cleavage of CAFdA performed by Reichelova et al.<sup>5</sup> the respective 2-Cl-Ade base is further degraded to an unknown product. The additional peak in the HPLC-chromatogram in Figure 3 most probably corresponds to this unknown degradation product of 2-Cl-Ade. The alkaline hydrolysis of adenine nucleosides also results in the cleavage of the glycosyl bond and at higher alkalinities preferred ring opening of the imidazole ring, glycosylic cleavage and further degradation of the pyrimidine moiety<sup>63</sup>. The numerous degradation peaks noticeable in the HPLC-chromatogram in Figure 4 may result from the different degradation pathways.

Test solutions and storage conditions were selected to mimic normal clinical practices. Injection concentrate was stored in the original Evoltra® vials following the common practice of pharmacy-based cytotoxic services. Concentrations of the diluted clofarabine infusion solutions were chosen according to the summary of product characteristics (SmPC) of Evoltra<sup>®54</sup>. The calculated dose of clofarabine injection concentrate (1 mg/mL) is to be diluted with 0.9% sodium chloride or 5% glucose infusion solution to a total volume of 100 mL or 200 mL in the case of extremely high doses. By calculating the dose for a 1 year old child (BSA 0.44 m<sup>2</sup>) or an overweight adult (BSA 2.3 m<sup>2</sup>) the resulting concentrations of 0.2 mg/mL or 0.6 mg/mL respectively were chosen to represent the lower and upper limit of the ordinary concentration range. The remarkable 8% decline of the clofarabine concentration in all test solutions containing 0.2 mg/mL clofarabine raised the question of potential adsorption to the inner layer of polypropylene/polyethylene (PP/PE) infusion bags. However in additional tests with different container materials and even lower clofarabine concentrations the particular results were not reproducible. Compatibility with different container materials was given and no adsorption detected. As prefilled PVC bags are not any longer

available in Germany we stored the clofarabine samples in PVC lines. Even the resulting unfavourable volume to surface correlation was not causing detectable adsorption. Therefore we concluded that the initial decline of clofarabine concentrations during the stability studies was most probably caused by measurement artefacts.

The pH values of diluted clofarabine infusion solutions mostly remained in the range of 4.5 – 7.5 which is predefined in the SmPC of Evoltra<sup>®</sup> injection concentrate and does not affect the stability of clofarabine. Values of pH varied as a function of the type of vehicle and in the case of glucose vehicle of the drug concentration. This phenomenon is based on the lower pH values of 5% glucose solutions (pH 3.5 and 6.5)<sup>64</sup> than of 0.9% sodium chloride solutions (pH 4.5 – 7.0).<sup>65</sup>

The prolonged stability data are advantageous for centralized cytotoxic preparation units because they facilitate less disposal of cytotoxic waste and savings of material costs.

### ***Conclusion***

The results of this study show that clofarabine injection concentrate (Evoltra<sup>®</sup>) is physicochemical for at least four weeks after first opening of the vial. Ready-to-use clofarabine infusion solutions (0.2 and 0.6 mg/mL) in PP/PE-bags in customary fluids (0.9% NaCl and 5% glucose) are physicochemical stable over at least 28 days when refrigerated or stored at room temperature. PVC containers are also suitable for diluted solutions because over a period of 48 hours compatibility with PVC was proven. Storage of the ready-to-use infusion solutions under refrigeration is recommended for microbiological reasons.

## 5 Physikalisch-chemische Stabilität von Trastuzumab Infusions-Zubereitungen

### 5.1 Monoklonale Antikörper

Biopharmazeutika spielen heute in vielen Bereichen der Arzneimitteltherapie eine immer größere Rolle. Nach der Einführung der Rekombinationstechnologie wurde 1977 mit Somatostatin das erste humane Peptid rekombinationstechnisch hergestellt.<sup>66</sup> Wenige Jahre später folgte das erste gentechnologisch hergestellte Insulin<sup>67</sup>, das 1982 die Zulassung in den USA bekam. Heute werden rekombinationstechnisch hergestellte monoklonale Antikörper der IgG Klasse wie Rituximab, Alemtuzumab und Trastuzumab erfolgreich in der Behandlung von Krebspatienten eingesetzt.

Peptide und Proteine haben relativ große komplexe dreidimensionale Strukturen und können in vieler Hinsicht nicht direkt mit dem einfachen chemischen Grundgerüst ‚kleiner‘ Arzneistoffe verglichen werden. Die Fähigkeit zur Bindung an die Zielstruktur und damit das Auslösen eines pharmakologischen Effekts hängt von der korrekten Struktur und Faltung des Proteins ab.<sup>68</sup> Jede Änderung in der Primärstruktur (Aminosäuresequenz), Sekundärstruktur (Faltung:  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt), Tertiärstruktur (dreidimensionale Struktur) oder der Quartärstruktur (Proteinkomplex) kann zur Inaktivität des Proteins führen. Die komplexe Struktur eines Proteins bedingt seine starke Anfälligkeit für Abbaureaktionen.<sup>69</sup> Vor allem während des Transportes, der Lagerung, der Herstellung zur applikationsfertigen Arzneiform und der Anwendung können verschiedenste Einflussfaktoren die Wirksamkeit reduzieren.<sup>70</sup> Die Abbaureaktionen können in physikalische und chemische Instabilitäten unterteilt werden. Chemische Abbaureaktionen führen zu einer Veränderung der kovalenten Bindungen der Peptidstruktur. Diese werden typischerweise ausgelöst durch Oxidations-, Desamidierungs- und Hydrolysereaktionen, Isomerisierungen und Disulfid-Umlagerungen. Chemische Veränderungen finden an der Primärstruktur im Protein statt. Physikalische Abbaureaktionen betreffen die dreidimensionale Proteinstruktur: die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur wird verändert ohne kovalente Bindungen zu zerstören. Die Proteine denaturieren, es bilden sich Aggregate oder Präzipitate. Auch die Adsorption an Oberflächen wird den physikalischen Instabilitäten zugeordnet.<sup>71</sup> Jedoch kann man physikalische und chemische Instabilitäten nicht komplett voneinander trennen, sie laufen in den meisten Fällen parallel ab. Chemische

Abbaureaktionen können physikalische Veränderungen induzieren und umgekehrt. Zum Beispiel können Disulfid-Umlagerungen zum Verlust der nativen Proteinkonformation führen. Umgekehrt können auch Denaturierungen zur Oxidation von Aminosäureresten beitragen, die zuvor geschützt waren.<sup>70;72;73</sup>

Die Frage der Stabilität und Haltbarkeit von Biopharmazeutika und insbesondere Antikörper-Arzneimitteln ist ein intensiv diskutiertes Thema und erfordert aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber physikalischen und chemischen Instabilitätsreaktionen sorgfältige analytische Prüfung. Gegenstand der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen ist die physikalisch-chemische Stabilität von Trastuzumab.

Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2). Im Jahre 1998 erhielt Trastuzumab die Zulassung in den USA und im Jahr 2000 folgte die Zulassung in der europäischen Union für Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs und gleichzeitiger Überexpression des Oberflächenrezeptors HER2/neu. Seit 2006 ist Trastuzumab auch für die adjuvante Therapie bei Brustkrebs zugelassen.<sup>74</sup> Im Januar 2010 folgte die erweiterte Zulassung zur Erstlinienbehandlung des metastasierenden HER2-positiven Magenkarzinoms in Kombination mit Cisplatin und Capecitabin oder 5-Fluoruracil.<sup>75</sup> Trastuzumab wurde aus einem klonalen humanen Immunglobulin (IgG<sub>1</sub>) und den Antigenbindungsresten des anti-HER2 monoklonalen Antikörpers entwickelt. Somit besteht Trastuzumab zu 95% aus humanen Proteinen und nur die Antigenbindungsreste sind muriner Herkunft.<sup>76</sup> Wie alle IgG-Antikörper besteht Trastuzumab aus zwei schweren und zwei leichten Ketten und hat ein Molekulargewicht von ca. 145 kDa, was typisch für monoklonale Antikörper ist.<sup>73</sup> Der HER2-Rezeptor, der durch Trastuzumab blockiert wird, ist unter normalen Bedingungen nur in sehr geringer Anzahl auf der Zelloberfläche zu finden. Durch ihn werden Wachstumssignale in die Zelle geleitet, was zu einem kontrollierten Zellwachstum führt. Die erhöhte HER2-Rezeptorkonzentration (HER2-Überexpression) bewirkt, dass permanent wachstumsfördernde Signale an die Zelle abgegeben werden. Es kommt zu einer erhöhten Zellteilungsrate und damit zu einem unkontrollierten Tumorwachstum. Der HER2-Rezeptor ist bei 20 – 25 % der Mammakarzinom-Patientinnen überexprimiert und diese leiden oft an besonders aggressiven Krankheitsverläufen. Mit Trastuzumab konnte eine gut ansprechende, spezifische Therapieoption gefunden werden. Das permanente Wachstum und die Teilung der HER2-überexprimierenden Krebszelle werden blockiert. Darüber hinaus stimuliert der Einsatz des HER2-Antikörpers eine zellvermittelte Toxizität (ADCC: antibody dependent cell mediated cytotoxicity), die zur Vernichtung der Tumorzelle führt.<sup>77</sup>

Trastuzumab ist als Lyophilisat mit dem Namen Herceptin® im Handel erhältlich. Das Lyophilisat wird mit Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert und mit 0,9%iger Natriumchlorid-Infusionsträgerlösung verdünnt. Laut Herstellerangaben soll die Verdünnung mit Glucoselösung wegen möglicher Proteinaggregation vermieden werden. Die Haltbarkeit des rekonstituierten Trastuzumab-Konzentrats wird uneinheitlich dargestellt. Die Herstellerfirma Roche gibt für das mit sterilem Wasser rekonstituierte Lyophilisat eine physikalische und chemische Stabilität von 48 Stunden an.<sup>78</sup> Die Firma Genentech in den USA hingegen gibt nach Rekonstitution mit konserviertem Wasser (1% Benzylalkohol) eine Haltbarkeit von 28 Tagen an.<sup>79</sup> Im europäischen Raum ist die Rekonstitution von intravenösen Arzneimitteln mit Konservierungsmitteln aus rechtlichen Gründen nicht erlaubt. In der Annahme, dass der einzige Unterschied hierbei in der mikrobiologischen Stabilität liegt, sollten die verlängerten Haltbarkeitsdaten der USA bei steriler Herstellung und Lagerung auf das rekonstituierte Lyophilisat ohne Konservierungsmittel übertragbar sein.

Für die applikationsfertige Infusionslösung von Trastuzumab, verdünnt mit 0,9 % NaCl, gibt der Hersteller eine Haltbarkeit von 24 Stunden bei Temperaturen bis zu 30 °C an.<sup>80</sup> Weitere Daten, die darüber hinausgehen, liegen unseres Wissens nicht vor. Daher wurden Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität über einen Zeitraum von 28 Tagen bei Lagerung unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Diese sind Gegenstand der nachfolgend in Form der eingereichten Originalpublikation dargestellten Untersuchungen.

## **5.2 Physico-chemical stability of the trastuzumab infusion solutions in polypropylene infusion bags**

J.Kaiser, I.Krämer

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

eingereicht am 09.05.2011

## **Physico-chemical stability of diluted trastuzumab infusion solutions in polypropylene infusion bags**

Jeanette Kaiser, Irene Krämer

Department of Pharmacy, Johannes Gutenberg-University Medical Center Mainz,  
Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany

### **Corresponding author**

Irene Krämer PhD

Department of Pharmacy, Medical Center of Johannes Gutenberg-University, Mainz  
Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany

Telephone: +49 6131 177209, Fax: +49 6131 175525

E-mail: irene.kraemer@unimedizin-mainz.de

**Key words:** Trastuzumab, antibody formulation, infusion solution, physico-chemical stability, degradation, size exclusion chromatography (SE-HPLC), SDS-PAGE

Partly supported by a grant of Hoffmann-La Roche AG.

## **Abstract**

Study objectives: Purpose of this study was to determine the physico-chemical stability of ready-to-administer trastuzumab infusion solutions in 0.9% NaCl solution as vehicle over a prolonged period of 28 days.

Methods: Trastuzumab lyophilised powder (rhuMab HER2, Herceptin<sup>®</sup>) was reconstituted with water for injection to a nominal concentration of 21 mg/mL. The reconstituted trastuzumab concentrate was further diluted with 0.9 % sodium chloride in polypropylene (PP) infusion bags (freeflex<sup>®</sup>). The physico-chemical stability of the infusion solutions was assessed over a 4 week storage period. Test solutions were stored under refrigeration (2-8 °C) or at room temperature under light protection and exposed to light. Samples of test solutions were withdrawn on day 0 (initial), 1, 3, 7, 14, 21, and 28. Preparation of the test solutions and sampling were conducted under aseptic conditions. Stability of trastuzumab infusion solutions was determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC), ultraviolet spectrometry and SDS-Page. In addition, pH-values were measured weekly over the storage period and test solutions were visually examined for potential colour changes, turbidity or particulate matter.

Results: The stability tests used revealed that in ready-to-administer trastuzumab infusion solutions (0.4 mg/ml, 4 mg/mL) trastuzumab concentrations remained above 90% of the initial concentrations, independent of the storage conditions. No degradation products were observed. Exposure to daylight did not affect the stability of the trastuzumab test solutions.

Conclusion: Ready-to-administer trastuzumab infusion solutions prepared with 0.9% sodium chloride solution in PP bags are storable over a 4 week period, even when stored at room temperature without light protection. For microbiological reasons storage under refrigeration is recommended.



## ***Introduction***

Trastuzumab (rhuMab HER2) is a recombinant humanized IgG1 antibody (MM ~ 145 kDa) that binds to the extracellular domain of the tyrosine kinase receptor HER-2 and pre-vents HER2-receptor dimerization. Due to suppression of intracellular tyrosine kinase with attenuation of cell signalling, tumour proliferation is suppressed. Additional mechanisms of action discussed are HER2-receptor down regulation with subsequent degradation, inhibition of angiogenesis and G1 arrest of treated cells. Trastuzumab is indicated for the treatment of breast and metastatic gastric cancer, in case of overexpression of HER-2 receptors at the tumour cell surface.<sup>73;79;81;82</sup> Trastuzumab is used either as a single agent or in combination with conventional cytotoxic drugs like taxanes, anthracyclines, platinum derivatives, 5-fluorouracil or vinorelbine. The recommended dose is either 4 mg/kg as loading dose, followed by a maintenance dose of 2 mg/kg per week, or an initial dose of 8 mg/kg followed by 6 mg/kg every three weeks.

The parenteral formulation of Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Roche Pharma AG) is supplied in Europe as a pale yellow, lyophilised powder in 150 mg single dose vials. The finished product contains L-Histidine, L-Histidine HCl, trehalose, and polysorbate 20 as excipients. Each vial has to be reconstituted with 7.2 mL of sterile water for injection. The solvent should be added slowly and shaking should be avoided. The resulting infusion concentrate (21 mg/mL) is a pale yellow, transparent solution with a pH-value of approximately 6.0. The appropriate amount of trastuzumab infusion concentrate has to be further diluted with 250 mL of 0.9% sodium chloride solution. Dilution with 5% dextrose solution is not recommended due to potential risk of protein aggregation.<sup>78;79;83;84</sup> Moreover reducing sugars such as glucose can react with amino groups of the protein, resulting in carbohydrate adducts (Maillard reaction).<sup>85</sup>

The stability of reconstituted and diluted protein drugs, including monoclonal antibodies, is an important issue of drug safety. Inappropriate handling may cause reduced efficacy and potential side-effects. Pharmacists responsible for the preparation of ready-to-administer antineoplastic drug solutions have to determine the shelf-life of these preparations. However the shelf-life is limited by a number of chemical and physical degradations pathways of protein drugs like MABs. Chemical degradation of an antibody is due to deamidation, isomerization, oxidation or fragmentation. Physical degradation processes include denaturation, aggregation, precipitation (insolubility), and adsorption.<sup>69;71</sup> The aggregation rate is dependent on different factors, e.g. concentration, temperature, shaking, long-term storage. Protein aggregates generally

have reduced activity. Aggregation, deamidation and isomerization seem to be prevalent degradation pathways in antibodies<sup>73</sup> and are reported in the literature for trastuzumab.<sup>72;81</sup> Accelerated degradation resulted in deamidation of Asn30 and Asn55 and in isomerization of Asp102 in the complementary determining regions.<sup>81</sup>

According to the Herceptin<sup>®</sup> Summary of Product Characteristics (SmPC) reconstituted solutions are physico-chemically stable for 48 hours at 2-8 °C. Moreover, trastuzumab infusion solutions further diluted with 0.9% sodium chloride solution in polyvinylchloride (PVC)-, poly-ethylene (PE), or polypropylene (PP) infusion bags are declared to be physically and chemically stable for 24 hours at temperatures up to 30 °C.<sup>78</sup> However in the US a multidose formulation containing 440 mg trastuzumab per vial is approved. After reconstitution with bacteriostatic water for injection, containing 1% benzyl alcohol, unused solutions are to be discarded after 28 days.<sup>79</sup> Extended stability is of utmost interest in pharmacy based cytotoxic preparation units. Known physico-chemical stability allows a more efficient preparation of the ready-to-administer cytotoxic preparations. The purpose of this study was to determine the physico-chemical stability of diluted trastuzumab solutions free from preservatives. Concentrations and storage conditions were chosen with an eye to clinical practice.

## ***Materials and Methods***

### ***Sample Preparation***

Stability studies of trastuzumab infusion solutions were performed with Herceptin<sup>®</sup> lyophilized powder (trastuzumab pre-clinical, lot. G119.00) granted by Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Germany). Each vial contained 150 mg trastuzumab, 3.36 mg L-Histidine HCl, 2.16 mg L-Histidine, 136.2 mg trehalose dihydrate and 0.6 mg polysorbate 20.<sup>83</sup>

Test solutions were prepared by reconstitution of trastuzumab lyophilized powder with 7.2 mL of Water for Injection (Aqua ad Injectabilia, B.Braun, Melsungen, Germany). The reconstituted trastuzumab solutions (nominal concentration 21 mg/mL) were further diluted with 0.9% sodium chloride solution in prefilled polypropylene based freeflex<sup>®</sup> infusion bags (PP as short form in the following text) granted by Fresenius Kabi GmbH (Bad-Homburg, Germany) in amounts yielding trastuzumab concentrations of 0.4 or 4.0 mg/mL. Test solutions were stored under refrigeration (2-8 °C) or at room temperature, either light protected or exposed to ambient light conditions. For each

concentration and each storage condition, infusion solutions were prepared in triplicate. Throughout the test period of 28 days samples were withdrawn under aseptic conditions.

#### Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SE-HPLC)

Concentrations of intact trastuzumab, soluble aggregates, and fragments were determined by using a known stability indicating SE-HPLC assay with photodiode array detection.<sup>72;86;87</sup> The HPLC system consisted of a Waters 2695 separation module and a Waters 2998 photodiode array (PDA) detector. Data were acquired and integrated by using Waters Empower Pro, Empower<sup>2</sup> software, version 6.10.01.00 (Waters, Eschborn, Germany). The TSK-Gel G3000SWXL column (7.8 mm x 30 cm, particle size 5 µm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany) was operated with a mobile phase buffer solution pH 7.2 (Ph. Eur. 6) consisting of 25% 0.2 M potassium dihydrogen phosphate (Merck, Darmstadt, Germany) solution and 17.5% 0.2 M NaOH solution dissolved in water HPLC gradient grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, US). The flow rate was set at 1.0 mL/min with an injection volume of 20 µL. The detection wavelength was set to 214 nm. Under these conditions retention times of trastuzumab were approximately 10 minutes. Therefore, cycle times were set at 20 minutes. In addition, PDA chromatograms (wavelength range 200 - 600 nm) were obtained regularly in order to evaluate the formation of potential degradation products.

Linearity of the method was evaluated at six trastuzumab concentrations in the range of 0.1 mg/mL to 2.0 mg/mL prepared from Herceptin<sup>®</sup> lyophilised powder. Each concentration was injected five times. The calibration curve resulting from plots of peak areas versus trastuzumab concentrations was linear, with a correlation coefficient of 0.9996. Accuracy was proven by analysing three different concentrations (0.4 mg/mL, 1.0 mg/mL and 2.0 mg/mL) with 10 injections per concentration. Mean accuracy was 100% ± 0.4 (n = 30). The intraday precision, expressed as relative standard deviation (RSD), was 0.9% for 0.4 mg/mL solutions, 0.2% for 1.0 mg/mL solutions, and 0.1% for 2.0 mg/mL solutions. Interday precision was determined with three different trastuzumab concentrations assayed on five different days. Triplicate injections of each concentration yielded interday RSDs of 2.1% for the 0.4 mg/mL, 1.3% for the 1.0 mg/mL and 2.8% for the 2.0 mg/mL concentrations. Validation studies were performed with different batches of the mobile phase.

The suitability of the assay was proven by analysing forced degraded samples. Trastuzumab solutions (1 mg/mL) were degraded at elevated temperatures. After

heating for two hours at 100 °C the solution showed visible white precipitates (cp. Fig. 1).

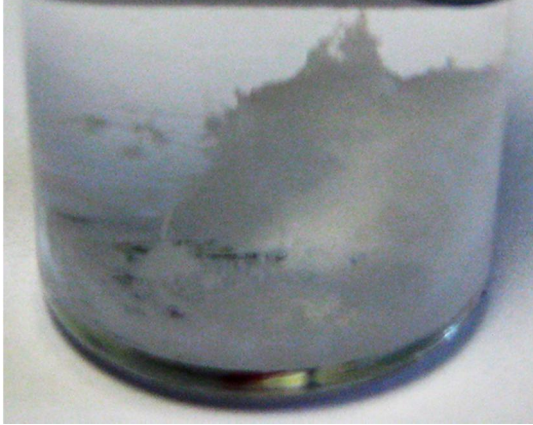


Figure 1 Denaturated protein solution after heating for 2 hours at 100 °C

In the resulting SE-HPLC chromatogram intact trastuzumab monomer was not detectable. Trastuzumab solution was heated at 65 °C for a period of 24 hours and samples analysed after 0, 1, 2, 4, 6, 24 hours. The monomer peak decreased constantly and in parallel a degradation peak of fragments ( $t_R = 12.9$  min) appeared, which was clearly separated from the monomer peak (cp. Fig. 2). In addition, samples were exposed to acidic (pH 1 with HCl) and alkaline stress conditions (pH 13 with NaOH). After 24 hours with and without heating at 65 °C peaks indicating the trastuzumab monomer were no longer detectable, neither in the acidic nor in the alkaline solutions.

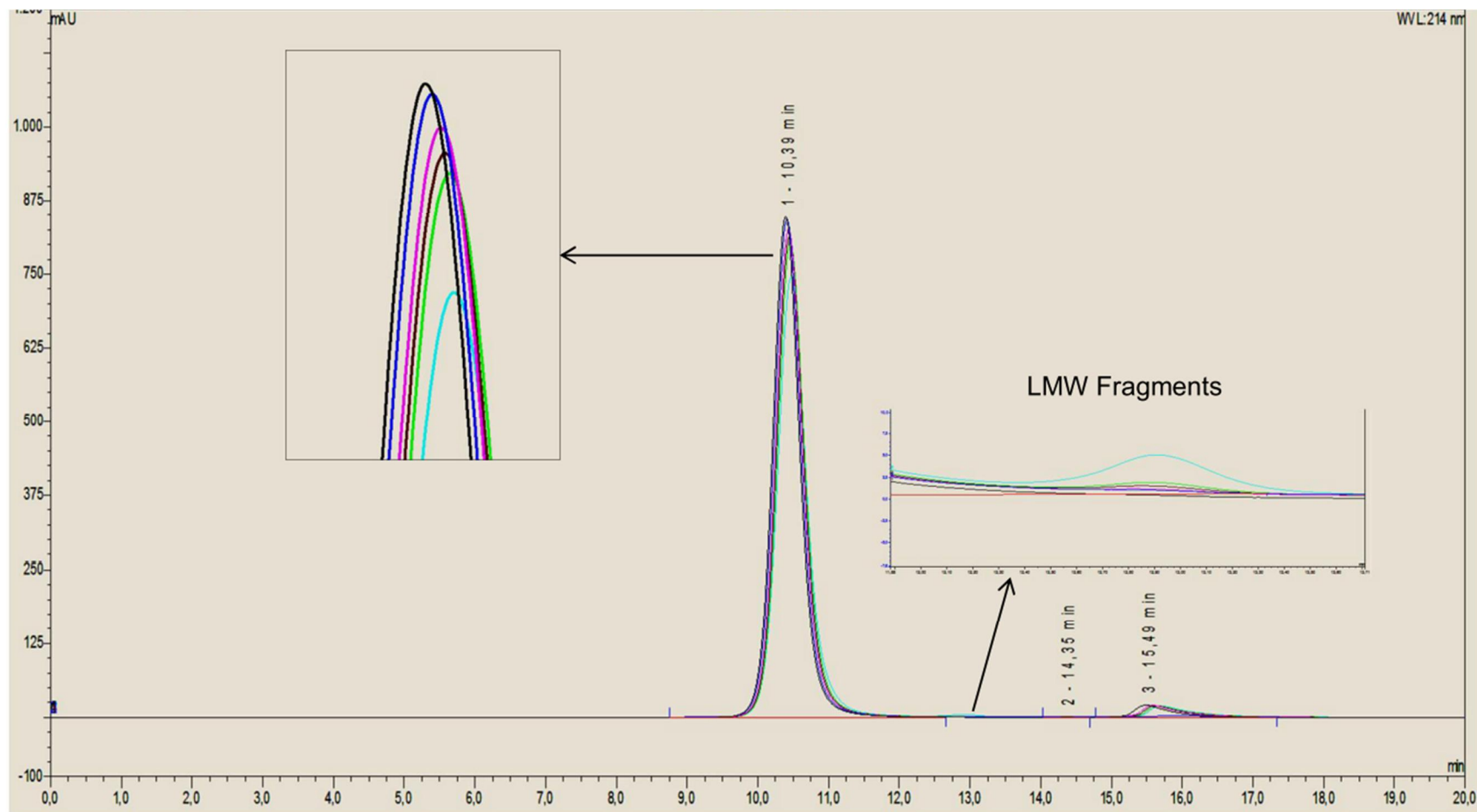


Figure 2 Size-exclusion chromatogram of trastuzumab solutions after different time intervals of heat degradation at 65 °C: 0 h (black), 1 h (blue), 2 h (pink), 4 h (brown), 6 h (green) and 24 h (turquoise).

For stability testing one sample of each test solution was withdrawn immediately after preparation (i.e. initial value) and after 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days of storage. If appropriate (e.g. for the 4.0 mg/mL concentration) test solutions were diluted with 0.9% sodium chloride solution (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) to a nominal concentration of 1.0 mg/mL in order to fit the calibration curve. After dilution, samples were analysed in triplicate by SE-HPLC. Samples of known protein concentration were used as control standards for each set of test samples. The percentage rate of drug remaining at the respective time intervals was calculated while the initial concentration at time zero was defined as 100%.

#### *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-Page)*

A polyacrylamide gel containing 4 – 20% tris-glycine (Anamed Electrophorese, Groß-Bieberau, Germany) was used for SDS-Page analysis of trastuzumab test solutions. The running buffer used consisted of a 25 mM tris base solution in water with 192 mM glycine and 0.1% sodium dodecyl sulphate. The buffer was adjusted to pH 8.3 with tris or glycine (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Directly after preparation (i.e. “time zero”) of the test solutions and after a storage period of 28 days, a sample of each storage condition and concentration was prepared with reducing and non-reducing buffer. The non-reducing buffer (“Laemmli-buffer”<sup>88</sup>) contained 62 mM tris base, 10% glycerine, 2% sodium dodecyl sulphate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and 0.05% bromophenol blue (AppliChem, Darmstadt, Germany). The solution was adjusted to pH 6.8 with HCl. Reducing conditions were achieved by addition of 2-mercaptoethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in an amount to yield a concentration of 1%. Samples were diluted with 0.9% sodium chloride solution to achieve a target concentration of 250 µg trastuzumab per mL, mixed with the reducing or non-reducing buffer and heated for 10 minutes at 85 °C. The unstained standard “Precision Plus Protein” (Biorad, Munich, Germany) was used as molecular weight size marker. Following the electrophoresis (XCell Sure Lock™ MiniCell, Invitrogen, Carlsbad, Canada) the gel was stained with Coomassie® brilliant blue solution (AppliChem, Darmstadt, Germany) for visualization of the protein bands.

## UV-Spectroscopy

A Spectronic Helios Alpha UV-VIS Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) was used to measure the protein concentration. Measurements were carried out at 280 nm in silica glass cells (QS Suprasil<sup>®</sup>, VWR, Darmstadt, Germany) using a 0.9% sodium chloride solution (equal to the vehicle of test solutions) as blank reference. Protein concentrations were calculated based on the trastuzumab absorption determined at 280 nm.

Accuracy was proven by analysing 3 different concentrations, 50 µg/mL, 100 µg/mL and 150 µg/mL, respectively. For each sample tested, the percentage rate of recovery was calculated. Mean recovery was  $102.0 \pm 0.4\%$  resulting from 10 measurements per concentration. Intra-day precision was assessed in parallel with accuracy consecutively measuring the absorbance of the three concentrations 10 times. Reproducibility showed a relative standard deviation of 0.4% for 50 µg/mL, 0.6% for 100 µg/mL and 0.2% for 150 µg/mL solutions. Interday precision was evaluated by triplicate determinations of samples containing different concentrations of trastuzumab (50 µg/mL, 100 µg/mL and 150 µg/mL) on 5 different days. Relative standard deviations were 6.5% for 50 µg/mL, 5.0% for 100 µg/mL and 5.6% for 150 µg/mL trastuzumab solutions.

For the wavelength of 280 nm and a constant layer thickness of 10 mm (d) a linear correlation between the trastuzumab concentration ( $c = 0.02, 0.05, 0.08, 0.01, 0.15,$  and  $0.20$  mg/mL) and absorbance (A) with a correlation factor of 0.9968 was determined. The remaining concentration of the undegraded trastuzumab monomer was calculated based on the Lambert-Beer's law ( $A_{280} = \epsilon \times c \times d$ ). The extinction coefficient for trastuzumab was estimated to be  $\epsilon = 215130$  with the aid of the Protparam software program.<sup>89</sup> The calculation was based on the known amino acid sequences of the light and heavy chains of trastuzumab ( $M_r = 145531.5$ ).<sup>90</sup>

Directly after preparation of the test solutions (i.e. "time zero") and after 1, 3, 7, 14, 21, 28 days of storage one sample of each test solution was withdrawn and diluted with 0.9 % sodium chloride solution to a concentration of 100 µg/mL trastuzumab. Immediately after dilution, solutions were assayed in triplicate using samples of known concentrations as control standards.

### Visual inspection and pH measurement

Whenever samples were withdrawn, the trastuzumab test solutions and the samples were visually inspected with the unaided eye for colour changes, turbidity or particulate matter.

PH of the reconstituted trastuzumab solutions was measured once per week over the 4 week test period using a pH 210 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany) equipped with an InLab Micro pH glass electrode (Mettler Toledo, Giessen, Germany). The pH meter was calibrated with standard buffer solutions of pH 4.01 and pH 7.01 (Hanna Instruments). PH limits set for stability were pH 5.5 (lower limit) and pH 6.5 (upper limit) according to pH 6 of the commercially available trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>).<sup>72;83</sup>

## **Results**

Ready-to-administer trastuzumab infusion solutions (Herceptin<sup>®</sup>) with 0.9% sodium chloride solution as vehicle in polypropylene infusion bags were according to the subset of test methods used, found to be physico-chemically stable for a minimum of 4 weeks. No differences were registered depending on the storage conditions, such as refrigeration at 2-8 °C in comparison to room temperature or exposition to light in comparison to protection from light.

Trastuzumab concentrations, determined via SE-HPLC, decreased less than 10% over the test period of 28 days (cp. Table 1). No significant changes were observed in the PDA-chromatograms over the entire test period. Neither additional peaks indicating derivatives with higher molecular weights, such as aggregates, nor peaks of fragmentation products were detected in the chromatograms.

Comparing the SDS-Page results of the trastuzumab test solutions directly after dilution and after 28 days of storage no significant differences were observed. Under the non-reducing conditions a single major band was seen (Fig. 3/1). This band was located in the region of the 150 kD size marker and corresponds to intact trastuzumab with the known molecular weight of ~ 145 kD. Under reducing conditions all samples degraded into the heavy chain (50 kD) and light chain fragments (25 kD) of trastuzumab as expected. In none of the test solutions stored under different conditions over a 28 day period additional fragmentation or aggregation products were seen (Fig. 3/3). These results provide a strong indication that trastuzumab remains intact during storage.



In the UV-spectrophotometric assay differing results were registered depending on the trastuzumab concentrations of the test solutions. The more diluted solutions (0.4 mg/mL) exhibited decreased trastuzumab concentrations. Because of the erratic results and varying RSDs it is difficult to determine the shelf-life of these solutions. Concentrations of the more concentrated trastuzumab solutions declined only marginally over the four week period (cp. Table 2).

PH-values of the trastuzumab test solutions remained between 6.2 and 6.4 over the entire observation period (cp. Table 3). All test solutions remained clear. No colour changes and no particulate matter or turbidity were observed during the entire storage period.

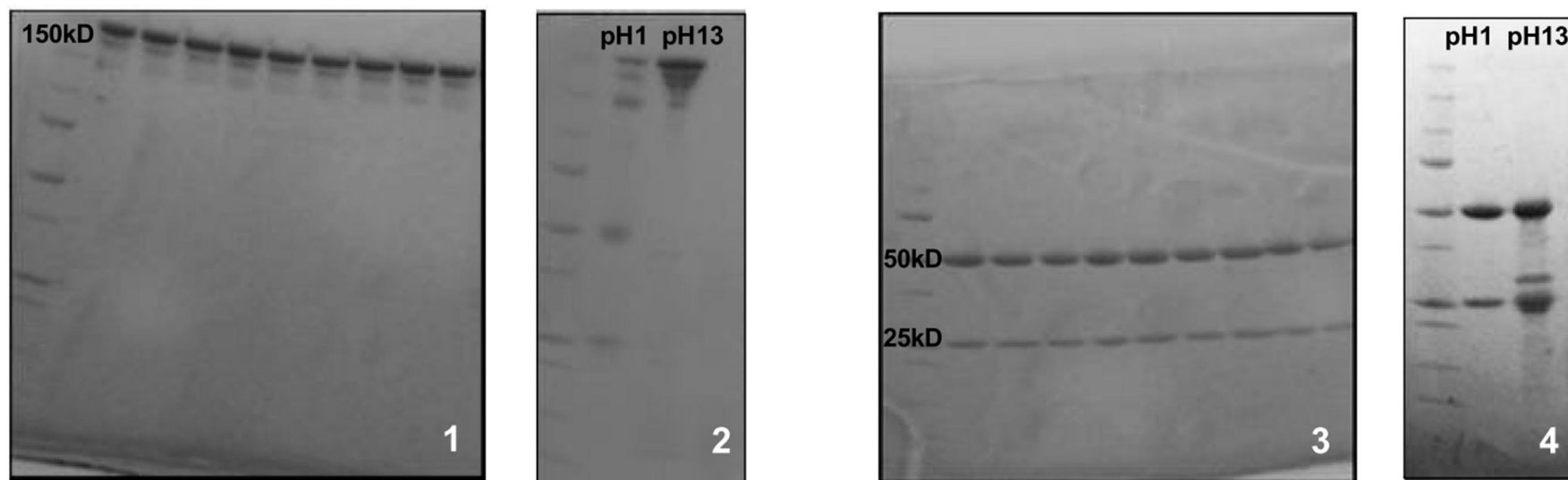


Figure 3 SDS-Page of trastuzumab (Herceptin®) infusion solutions run under non-reducing conditions (1+2) and reducing conditions (3+4).

Samples were withdrawn after a storage period of 28 days (1+3). In parallel forced degraded samples at pH 1 and pH 13 (2+4) were assayed.

Lane	Storage condition	Nominal concentration
1	<i>MW standard</i>	
2	RT exposed to light	0.4 mg/mL
3	2-8°C	0.4 mg/mL
4	RT protected from light	0.4 mg/mL
5	RT exposed to light	4.0 mg/mL
6	2-8°C	4.0 mg/mL
7	RT protected from light	4.0 mg/mL
8	RT exposed to light	21.0 mg/mL
9	2-8°C	21.0 mg/mL
10	RT protected from light	21.0 mg/mL

Table 1 Stability of diluted trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) infusion solutions (vehicle 0.9% sodium chloride solution in PP infusion bags) determined via SE-HPLC. Drug concentrations in samples taken at time zero were designated as 100%. Concentrations expressed as mean ± relative standard deviation (RSD) of three infusion solutions (triplicate assays of 1 sample of each infusion solution), n=9.

Storage condition		Initial drug concentration [mg/mL] ± SD		[%] of initial concentration remaining ± RSD					
		Nominal	Actual	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
25°C	exposed to light	0.4	0.3 ± 0.0	100.8 ± 4.7	97.3 ± 0.4	96.4 ± 0.5	96.2 ± 1.2	97.5 ± 0.7	96.9 ± 0.7
2-8°C	light protected		0.4 ± 0.0	96.0 ± 2.6	94.4 ± 1.3	93.5 ± 2.9	93.8 ± 3.1	93.8 ± 3.1	93.8 ± 3.1
25°C	light protected		0.3 ± 0.0	95.5 ± 2.4	94.8 ± 2.6	93.5 ± 2.7	93.5 ± 2.7	93.5 ± 2.7	93.5 ± 2.7
25°C	exposed to light	4.0	3.6 ± 0.1	100.8 ± 1.3	99.5 ± 1.0	98.7 ± 1.4	92.2 ± 3.1	96.5 ± 3.0	98.5 ± 1.2
2-8°C	light protected		3.6 ± 0.1	95.7 ± 4.1	100.2 ± 1.3	97.9 ± 0.6	97.1 ± 0.6	96.2 ± 4.2	99.7 ± 1.1
25°C	light protected		3.6 ± 0.1	98.9 ± 3.4	98.6 ± 1.3	97.4 ± 2.1	96.7 ± 1.2	99.1 ± 0.7	98.7 ± 0.7

Table 2 Stability of diluted trastuzumab (Herceptin®) infusion solutions (vehicle 0.9% sodium chloride solution in PP infusion bags) determined via UV/Vis-spectroscopy. Drug concentrations in samples taken at time zero were designated as 100%. Concentrations expressed as mean ± relative standard deviation (RSD) of three (<sup>1</sup> or two, n=6) infusion solutions (triplicate assays of 1 sample of each infusion solution), n=9.

Storage condition		Initial drug concentration [mg/mL] ± SD		[%] initial concentration remaining ± RSD					
		Nominal	Actual	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
25°C	exposed to light	0.4	0.37 ± 0.01 <sup>1</sup>	94.7 ± 3.8 <sup>1</sup>	106.87 ± 5.61 <sup>1</sup>	94.59 ± 0.22 <sup>1</sup>	93.35 ± 5.87 <sup>1</sup>	92.03 ± 7.98 <sup>1</sup>	94.66 ± 3.82 <sup>1</sup>
2-8°C	light protected		0.41 ± 0.03	85.3 ± 5.9	90.56 ± 12.33	92.96 ± 6.62	87.21 ± 3.29	85.74 ± 7.45	85.55 ± 1.81
25°C	light protected		0.40 ± 0.01	89.1 ± 8.6	97.48 ± 2.56	90.71 ± 5.98	89.06 ± 3.35	85.71 ± 1.83	85.71 ± 1.83
25°C	exposed to light	4.0	3.98 ± 0.11	99.0 ± 7.3	103.80 ± 3.12	97.02 ± 5.64	90.24 ± 2.71	92.79 ± 6.13	95.42 ± 2.33
2-8°C	light protected		3.93 ± 0.04	87.8 ± 4.3	103.62 ± 4.32	100.40 ± 5.24	93.54 ± 3.88	93.40 ± 4.97	97.89 ± 1.90
25°C	light protected		3.95 ± 0.23	97.8 ± 12.1	103.84 ± 3.52	99.87 ± 2.01	92.49 ± 3.07	94.57 ± 6.08	97.53 ± 4.11

Table 3 PH-values of diluted trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) infusion solutions (vehicle 0.9% sodium chloride infusion solution in PP infusion bags) at different storage conditions.

Storage condition		Nominal drug concentration [mg/mL]	pH-values ± SD (mean of 3 test solutions)				
			day 0	day 7	day 14	day 21	day 28
25°C	exposed to light	0.4	6.30 ± 0.06	6.29 ± 0.06	6.30 ± 0.03	6.34 ± 0.01	6.33 ± 0.05
2-8°C	light protected		6.30 ± 0.10	6.34 ± 0.04	6.24 ± 0.03	6.30 ± 0.05	6.34 ± 0.03
25°C	light protected		6.34 ± 0.02	6.40 ± 0.02	6.32 ± 0.02	6.31 ± 0.02	6.37 ± 0.02
25°C	exposed to light	4.0	6.37 ± 0.02	6.28 ± 0.02	6.20 ± 0.02	6.29 ± 0.02	6.29 ± 0.02
2-8°C	light protected		6.40 ± 0.03	6.29 ± 0.01	6.22 ± 0.02	6.30 ± 0.02	6.31 ± 0.02
25°C	light protected		6.38 ± 0.02	6.31 ± 0.01	6.26 ± 0.01	6.33 ± 0.02	6.33 ± 0.01

## ***Discussion***

The degradation pattern of MABs such as trastuzumab is complex and no single method can address all modes of degradation. Because aggregation and protein degradation (deamidation, isomerisation) are known degradation pathways of trastuzumab, SE-HPLC, UV-Spectroscopy and SDS Page were chosen as analytical methods to monitor instability. These methods are suitable to detect soluble protein aggregates and fragments of the proteins. But these methods are usually inadequate in detecting deamidated products. Insoluble aggregates of high molecular weight and large size are also difficult to detect by means of SE-HPLC, but can be detected by visual inspection.<sup>72;73;81</sup> However, a weak point of the study is that insoluble aggregates forming subvisible particles were not measured with sensitive and objective methods. Preliminary tests with Dynamic Light Scattering (DLS) showed no particles arising from aggregation products. Nevertheless, tests for detecting and analysing subvisible particles are necessary in future studies. On the other hand generation of aggregates was only reported after longer storage periods<sup>84</sup> and the fact that concentrations of intact trastuzumab altered only minimally over the test period favours the assumption that aggregation is not a stability limiting parameter. But aggregation inducing factors, such as unsuitable vehicles, pH alterations, shaking, freezing or heating should be avoided.<sup>73;91;92</sup> Heating at 100 °C resulted in denaturation and considerable precipitation. Heating at 65 °C resulted in fragmentation. The amount of fragments was increasing over time. Under strong alkaline and acidic conditions of the forced-degradation experiments, trastuzumab was completely degraded. During the entire test period the pH-values of the diluted trastuzumab infusion solutions remained between pH 6.2 - 6.4, which is optimal for the stability and verifies the results of the stability studies.

Trastuzumab consists of two heavy chains and two light chains which linked by reducible disulphide bonds.<sup>93</sup> SDS-PAGE is a suitable method for size estimation and to distinguish reducible covalent aggregates from noncovalent aggregates. The single band, representing the monomer of trastuzumab (~ 150 kD), showed smaller bands shouldering the main band. No other bands like that were detected under reducing-conditions. These results suggest that the smaller bands did not arise from protein fragmentation and might be caused by the preparation procedure with a comparatively high protein content of 10 µg protein per lane.<sup>91</sup> Overall, no bands above 150 kD and no additional bands of fragmentation products were observed, confirming the results of the SE-HPLC and UV-Spectroscopy analysis.

Quantification of the intact trastuzumab monomer was performed with two different methods, i.e. UV-Spectroscopy and SE-HPLC in parallel. The nominal and actual concentrations as well as the results are slightly different, what might be caused by inaccuracies of dilution and preparation of the test solutions with 1 mL syringes. In clinical practice the measuring of such small volumes of reconstituted trastuzumab is unlikely. Another explanation to be discussed, are the different detection wavelengths used, which were chosen according to the literature. The SE-HPLC chromatograms were extracted at 214 nm in analogy to Xiao et al.<sup>87</sup>, while in UV-Spectroscopy the absorptions were measured at 280 nm<sup>94</sup>. In general, results from SE-HPLC are expected to be more precise, since the method is more specific due to the chromatographic separation step. Samples prepared for UV-Spectroscopy are ten-fold more diluted, which can also lead to higher variability of results due to inaccuracies.

Stability of reconstituted trastuzumab infusion concentrate in the original glass vials was not experimentally determined in this study. However stability is proven after reconstitution with bacteriostatic water for injection for a period of 28 days under refrigeration.<sup>79</sup> Because there are no differences in the formulation of the products marketed in the US and Europe equivalent stability can be assumed. Moreover the admixture of benzyl alcohol is more likely de-creasing stability. The fact that stability is proven for the infusion concentrate over 28 days also verifies the results that diluted trastuzumab infusion solution are stable over the same time interval, because in general more diluted solutions are less prone for aggregate formation. However in more diluted solutions agitation stress can cause more aggregation.<sup>17</sup> In case of preparation under strict aseptic conditions similar microbiological stability is to be assumed.

## ***Conclusion***

The results of the stability tests approve the assumption that ready-to-use infusion solutions of trastuzumab with protein concentrations between 0.4 and 4.0 mg/mL in PP bags are physico-chemical stable over a period of up to 4 weeks independent from storage temperatures or light conditions. However, the risk of microbiological contamination needs to be considered when preparing such solutions and assigning extended shelf-lives. Hence handling under strict aseptic conditions and storage under refrigeration is crucial to ensure adequate stability of trastuzumab infusion solutions.

## 6 Zusammenfassung

### ***Bedeutung des Verordnungsmonitorings in der zentralen Zytostatikaherstellung – Eine Erhebung in deutschen Universitätskliniken***

Das Verordnungsmonitoring von Chemotherapieverordnungen hat die Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit zum Ziel. Durch eine prospektive Erhebung zum Verordnungsmonitoring in universitären Krankenhausapotheken Deutschlands sollten valide Aussagen zu Art und Häufigkeit detektierter Verordnungsfehler und deren Ursachen im Rahmen der zentralen Zytostatikazubereitung gemacht werden.

In 21 Universitätskliniken wurden über etwa 3 Monate 835 Verordnungsfehler dokumentiert, von denen 748 hinsichtlich Relevanz und Fehlerkategorie ausgewertet werden konnten. Übereinstimmend mit der Literatur traten als häufigste Verordnungsirrtümer Fehler bei der Dosisberechnung (48%) auf. Diese wurden in 76% der Fälle als von hoher Relevanz eingestuft. In der Fehlerkategorie falsche Patientendaten traten 26% der Fehler auf. Fehler bezüglich des Applikationsdatums (15%) und des Zytostatikums (11%) spielten eine nachgeordnete Rolle. Die Inzidenz der Verordnungsfehler betrug durchschnittlich 0,77% bei rund 1950 Verordnungen pro Tag in 17 Universitätskliniken (vier Kliniken konnten wegen mangelnder Daten zur Gesamtanzahl hergestellter Zytostatikazubereitungen nicht in diese Auswertung einbezogen werden). Die überwiegend als von hoher Relevanz eingeordneten Verordnungsfehler unterstreichen die Bedeutung des Verordnungsmonitorings.

Das konsequente Verordnungsmonitoring aus pharmazeutischer Seite erwies sich als höchst effizient (Zeitaufwand < 5 Minuten bei 37% der Fehler) und leistet einen hohen Beitrag zur Patienten- und Arzneimitteltherapiesicherheit in der Onkologie.

### ***Physikalisch-chemische Stabilität von DC Beads™ beladen mit Camptothecin-Derivaten***

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) mit wirkstoffbeladenen DC Beads™ ermöglicht die gleichzeitige Embolisation von tumorversorgenden Gefäßen und eine lokale Chemotherapie. Infolge der superselektiven Applikation und der langen Verweildauer im Tumor werden die systemischen Nebenwirkungen der Zytostatika minimiert und die lokale Wirksamkeit erhöht. Das Mikrosphärengerüst der DC Beads™



besteht aus einem polyvinylalkohol (PVA)-haltigen Grundgerüst, welches mit Sulfatgruppen modifiziert wurde, um positiv geladene Wirkstoffe zu binden. Während der Beladung werden Wassermoleküle durch die positiv geladenen Substanzen aus dem Mikrosphärenengerüst verdrängt. Die ursprünglich blau gefärbten Beads ändern dabei abhängig vom jeweiligen Wirkstoff ihre Farbe und der Mikrosphärendurchmesser nimmt ab. In der klinischen Praxis werden die DC Beads™ in den zentralen Zytostatika-Herstellungsbereichen der Krankenhausapotheken beladen und applikationsfertig an den Anwender, in der Regel einen interventionellen Radiologen, geliefert. Vor Applikation werden die Beads zur besseren Visualisierung der Angiographie-gestützten Platzierung in einem nichtionischen Kontrastmittel suspendiert.

Die Precision-TACE wird seit einigen Jahren erfolgreich mit Doxorubicin beladenen DC Beads™ (DEBDOX) bei hypervaskularisierten Lebertumoren eingesetzt. Mit Irinotecan beladenen DC Beads™ (DEBIRI) konnte eine neue Therapieoption für inoperable Lebermetastasen bei Kolorektalkarzinom gefunden werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkstofffreisetzung, die Ladungskapazität und auch die physikalisch-chemische Stabilität Irinotecan beladener DC Beads™ vor und nach dem Mischen mit einem nichtionischen Kontrastmittel (Accupaque®, Imeron®, Ultravist®) bestimmt. Die DC Beads™ wurden mit 50 mg Irinotecan (Campto®) pro 1 ml Beads beladen und lichtgeschützt bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 28 Tagen gelagert. Die Ladungskapazität und die Stabilität wurden durch Messung der Irinotecankonzentration im Überstand ermittelt. Die Integrität der mit Irinotecan-beladenen DC Beads™ wurde anhand einer *in vitro* Elutionsmethode mit Phosphatpuffer-Lösung (PBS, pH 7,2) untersucht. Mischungen von beladenen DC Beads mit Kontrastmittel wurden im Kühlschrank (2-8 °C) ebenfalls lichtgeschützt über 4 Wochen aufbewahrt. An den Tagen 0, 1, 3, 7 und 28 wurden bei allen Testverfahren Proben entnommen und mittels einer Reversed-Phase HPLC Methode mit UV-Detektion die Irinotecan-Konzentrationen sowie dessen Reinheit bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Ladungskapazität von DC Beads für Irinotecan nach einer 2-stündigen Ladungszeit bei ~ 96% lag und über den gesamten Untersuchungszeitraum von 28 Tagen stabil blieb. Abbauprodukte von Irinotecan konnten nicht detektiert werden. Des Weiteren konnte nach eingeleiteter Elution mittels PBS die Integrität des in die Beads geladenen Irinotecans nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass *in-vivo* eine vergleichbare Freisetzung des Wirkstoffs in das Tumorgewebe erfolgt.

Nach dem Mischen der Irinotecan-beladenen Beads mit einem nichtionischen Kontrastmittel nahm die Ladungskapazität in den ersten 24 Stunden um 5 – 10% ab. In den folgenden 4 Wochen konnte jedoch keine weitere Elution des Wirkstoffes aus den Beads festgestellt werden. Abbauprodukte wurden zu keinem Zeitpunkt detektiert.

Die Aufbewahrung der beladenen DC Beads™ erfolgte unter Lichtschutz bei Raumtemperatur um „worst case“ – Bedingungen zu simulieren. Hinsichtlich mikrobiologischer Stabilität wird jedoch eine Lagerung bei 2 – 8 °C empfohlen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass nach Zugabe von nichtionischem Kontrastmittel die mit Irinotecan beladenen DC Beads über einen Zeitraum von mindestens 28 Tagen physikalisch-chemisch stabil sind, kann die Herstellung dieser vorgefertigten Mischungen in der zentralisierten Zytostatika-Herstellung nicht empfohlen werden. Ein Grund hierfür ist die initiale Elution von 5 – 10% Irinotecan aus den Beads. Des Weiteren setzen die interventionellen Radiologen unterschiedliche Mengen an Kontrastmittel pro ml Beads und auch sehr unterschiedliche Mengen an 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung im Rahmen der Embolisation ein. Die geeignete Menge an Kontrastmittel und 0,9%iger NaCl-Lösung wird individuell auf den Patienten abgestimmt. Ein Vorteil von vorgefertigten Mischungen aus beladenen Beads und Kontrastmitteln ist daher nicht gegeben.

Topotecan, wie Irinotecan zu der Gruppe der Topoisomerase-1-Inhibitoren gehörend, wird als weitere Option für die Beladung von DC Beads getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ladungskapazität von Topotecan in DC Beads™ unter statischen oder agitierten Bedingungen untersucht. Da noch keine Dosierungsempfehlungen vorliegen, wurde eine Konzentration (4 mg Topotecan auf 2 ml Beads) gewählt, die in Zukunft zu einer verträglichen Dosierung führen könnte und gleichzeitig in zentralisierten Zytostatika-Herstellungsbereichen einfach zu handhaben ist (1 Vial Beads auf 1 Vial Topotecan HCl).

Handelsübliches Topotecan Hydrochlorid Lyophilisat (Hycamtin®, 4 mg / Vial) wurde mit Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert, um eine Konzentration von 1 mg Topotecan pro ml zu erhalten. Die Mikrosphären (DC Bead™, 300 – 500 µm, 2ml / Vial) wurden mit 4 ml der rekonstituierten Wirkstofflösung versetzt. Je 3 Proben wurden direkt nach Mischung auf eine Schüttelapparatur gestellt oder ohne Bewegung unter statischen Bedingungen gelagert. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 7 Tagen. In verschiedenen Zeitintervallen (nach 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 6, 24 h, 7 Tagen) wurden Proben aus dem Überstand entnommen und mittels einer Reversed-Phase HPLC Methode mit UV-Detektion die

Topotecan-Konzentration gemessen. Die Ladungskapazität wurde durch Bestimmung der Wirkstoffkonzentration im Überstand ermittelt.

Die Beladung mit 2 mg Topotecan in 1 mg DC Beads™ erfolgte schneller, wenn die Mischung leicht geschüttelt wurde. Nach einer Beladungszeit von 1 Stunde wurden jedoch ~ 90% des Topotecans auch unter statischen Bedingungen auf die Beads geladen, was für die Praxis der zentralisierten Zytostatikaherstellung einfacher durchführbar ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Topotecan beladenen DC Beads™ über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen bei Raumtemperatur unter Lichtschutz physikalisch-chemisch stabil sind. Mit Topotecan beladene DC Beads™ können also im Voraus unter aseptischen Bedingungen hergestellt werden. Für die Praxis wird allerdings empfohlen, die Topotecan beladenen DC Beads™ im Kühlschrank aufzubewahren, um die mikrobielle Stabilität zu gewährleisten. Wegen lichtbedingter Zersetzungsreaktionen von Topotecan sollten Arzneimittel-Zubereitungen prinzipiell vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

### ***Physikalisch-chemische Stabilität von Infusionslösungen der Purin-Analoga Nelarabin und Clofarabin***

In den letzten Jahren wurden zwei Antimetabolite zur Behandlung von Leukämien neu zugelassen.

Das Zytostatikum Nelarabin wird seit 2005 zur Behandlung von Patienten mit T-ALL und T-LBL eingesetzt, wenn diese zuvor nicht auf andere Therapien angesprochen haben. In der vorliegenden Studie wurde die physikalisch-chemische Stabilität von applikationsfertigen Nelarabin-Infusionslösungen in Ethylenvinylacetat-haltigen (EVA) Leerbeuteln über einen Zeitraum von 4 Wochen zu bestimmen.

Die zugelassene Nelarabin-Infusionslösung (Atriance®) der Konzentration 5 mg/ml soll laut Fachinformationen unverdünnt appliziert werden. Im Rahmen der Studie wurde handelsübliche Nelarabin-Infusionslösung, erhältlich in Glasflaschen mit 250 mg Nelarabin, in Leerbeutel (EVA-Infusionsbeutel 100 - 300 ml, Neocare) überführt. Die applikationsfertigen Infusionsbeutel mit einer Konzentration von 5 mg/ml wurden bei 2 - 8 °C oder bei Raumtemperatur, entweder lichtgeschützt oder unter Lichtexposition, gelagert. Direkt nach Herstellung und an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21 und 28 wurden Proben entnommen und mittels einer validierten RP-HPLC-Methode mit UV-Detektion analysiert. Wöchentlich wurden pH-Messungen durchgeführt. Des Weiteren wurden

die Lösungen auf sichtbare Farbveränderungen und Präzipitationen bei jeder Probenentnahme inspiziert.

Die Stabilitätstests zeigen, dass Nelarabin-Infusionslösungen in EVA-Infusionsbeuteln mindestens 28 Tage physikalisch-chemisch stabil sind. Die gemessenen Nelarabin-Konzentrationen blieben unabhängig der Lagerbedingung stabil (> 95%). Weder Farbveränderungen noch Ausfällungen konnten in den Lösungen beobachtet werden.

Trotz der gezeigten physikalisch-chemischen Stabilität auch bei Raumtemperatur sollte die Lagerung im Voraus hergestellter Nelarabin-Infusionslösungen unter mikrobiologischen Aspekten bevorzugt bei 2-8 °C erfolgen.

Neben Nelarabin wurde 2006 ein weiteres Purin-Analogon, welches zur Behandlung von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) eingesetzt wird, zugelassen. Das Zytostatikum Clofarabin wirkt als Antimetabolit von Adenin und hemmt die DNA-Polymerase und RNA-Reduktase.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die physikalisch-chemische Stabilität der Clofarabin-Stammlösung (Evoltra<sup>®</sup>) und die Stabilität applikationsfertiger Clofarabin-Infusionslösungen geprüft. Hierzu wurde Clofarabin-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml mit 0,9% Natriumchlorid- oder 5% Glucoselösung (freeflex<sup>®</sup>, Polypropylen-Infusionslösungen) auf zwei übliche Konzentrationen verdünnt (0,2 mg/ml und 0,6 mg/ml). Sowohl die verdünnten Clofarabin-Infusionslösungen als auch die Stammlösungen wurden bei 2-8 °C oder bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 28 Tagen gelagert. An den Tagen 0, 1, 3, 7, 14, 21 und 28 wurden Proben entnommen. Je Messtag wurden die pH-Werte und der Clofarabin-Gehalt der Lösungen mittels validierter RP-HPLC Analyse bei 265 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Kompatibilität von verdünnten Clofarabin-Lösungen (0,1 – 0,4 mg/ml) mit unterschiedlichen Behältnismaterialien (PVC, Glas, PP) über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht.

Die handelsübliche unverdünnte Clofarabin-Stammlösung und applikationsfertige Clofarabin-Infusionslösungen erwiesen sich, unabhängig von den Lagerbedingungen, den eingesetzten Trägerlösungen oder gewählten Konzentrationen, über 28 Tage als physikalisch-chemisch stabil (Clofarabingehalt > 90%). Eine Adsorption an die getesteten Behältnismaterialien konnte nicht beobachtet werden. Auch hier ist wegen der mikrobiologischen Stabilität Kühlung zu bevorzugen.

## ***Physikalisch-chemische Stabilität von Trastuzumab Infusions-Zubereitungen***

Der monoklonale IgG-Antikörper Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) ist für die Behandlung von HER2-Rezeptor positiven Patienten mit Mamma- und metastasierendem Magenkarzinom zugelassen. Die Haltbarkeit von Antikörper-haltigen Arzneimitteln und deren Untersuchung ist wesentlich problematischer als für Nicht-Protein-Arzneimittel. Dementsprechend ist über die Stabilität applikationsfertiger Antikörperzubereitungen in der klinischen Praxis noch wenig bekannt. Zu beachten ist in jedem Fall die Empfindlichkeit gegenüber Temperatureinflüssen und Scherkräften sowie die Gefahr der Adsorption. In dieser Arbeit wurde die physikalisch-chemische Stabilität von applikationsfertigen Trastuzumab Infusions-Zubereitungen über einen Zeitraum von 28 Tagen und praxisüblichen Lagerbedingungen bestimmt.

Trastuzumab-Lyophilisat wurde mit Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert und anschließend mit 0,9% NaCl-Trägerlösung (freeflex<sup>®</sup>, PP-Infusionsbeutel) auf therapeutisch übliche Konzentrationen (0,4 und 4,0 mg/ml) verdünnt. Die applikationsfertigen Lösungen wurden bei 2-8 °C oder bei Raumtemperatur, bei Tageslicht oder unter Lichtschutz gelagert. An den Tagen 0 (initial), 1, 3, 7, 14, 21 und 28 wurde die Stabilität mittels SE-HPLC, UV-Spektroskopie, SDS-Page und pH-Messungen (wöchentlich) untersucht. Die quantitative Bestimmung der Konzentration des Antiköpers erfolgte parallel mit SE-HPLC und UV-Spektroskopie.

In den getesteten Trastuzumab-Infusionslösungen mit 0,9% NaCl-Infusionslösung blieb die Trastuzumab Konzentration über einen Zeitraum von minimal 28 Tagen stabil. Die gemessenen Trastuzumab-Konzentrationen lagen > 90% der initial gemessenen Konzentration. Zwar lag bei den sehr stark verdünnten Testlösungen der Konzentration 0,4 mg/ml die Konzentration nach 14 Tagen unterhalb der Stabilitätsgrenze, doch scheint dies am ehesten methodenbedingt zu sein. In einer qualitativen Untersuchung auf Zersetzungsreaktionen mit SDS-PAGE wurden keine zusätzlichen Banden, die auf Fragmente oder Abbauprodukte hinweisen, detektiert. Auch in der SE-HPLC konnten keine Abbauprodukte nachgewiesen werden. Die Lagertemperatur und die Lichtexposition hatten keinen Einfluss auf die Stabilität. Sichtbare Partikel, Trübung oder Verfärbung der Infusionslösungen traten nicht auf. Subvisuelle Partikel wurden nicht quantitativ bestimmt, doch ist aus der Literatur bekannt, dass Trastuzumab wenig zur Aggregation neigt. Die Verdünnung mit 5%iger Glucose-Lösung wurde nicht untersucht, da der Hersteller dies wegen möglicher Proteinaggregation nicht empfiehlt. Aus mikrobiologischer Sicht wird die Lagerung der applikationsfertigen Trastuzumab-

Infusionslösungen im Kühlschrank empfohlen. Bei sorgsamer Herstellung und Lagerung ist in der Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse von Stabilität der Trastuzumab-Infusionslösungen über einen Zeitraum von 28 Tagen auszugehen.

## 7 Literaturverzeichnis

Die Literaturquellen der bereits publizierten Veröffentlichungen sind an dieser Stelle nicht aufgelistet (siehe dazu in der jeweiligen Originalpublikation).

- (1) Statistisches Bundesamt. Todesursachen. Statistisches Bundesamt 2010 [cited 2011 Mar. 11]; Available from: <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell,templateld=renderPrint.psml>
- (2) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V.(GEKID), Robert Koch-Institut (RKI). Krebs in Deutschland 2005/2006. Robert Koch-Institut [ 2010 [cited 2011 Mar. 11];
- (3) Halsen G, Krämer I. Umgang mit Zytostatika: Gefährdungsbeurteilung - kein Problem?! Krankenhauspharmazie 2004; 25/2:43-52.
- (4) Halsen G, Krämer I. Assessing the risk to health care staff from long-term exposure to anticancer drugs - the case of monoclonal antibodies. J Oncol Pharm Pract 2011; 17(1):68-80.
- (5) Krämer I. Zytostatikaherstellung in der Apotheke. Pharmazie in unserer Zeit 2010; 39.
- (6) Kramer, Heeg, Botzenhart. Krankenhaushygiene. Urban & Fischer; 2001.
- (7) BAK. Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia mit toxischem Potenzial. Leitlinie der Bundesapothekerkammer zur Qualitätssicherung . 25-11-2008.
- (8) Jaehde U, Kloft C. Zytostatika maßgeschneidert dosieren - Dosis-Individualisierung in der Krebs-Chemotherapie. Wiley Inter Science 2006; 2(35):150-156.
- (9) Schneemann H, Wurm G. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer-Verlag; 1995.
- (10) Lewis AL, Taylor RR, Hall B, Gonzalez MV, Willis SL, Stratford PW. Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization. J Vasc Interv Radiol 2006; 17(8):1335-1343.
- (11) Biocompatibles UK. DC Bead™ Doxorubicin loading instructions. Biocompatibles UK 2006 Available from: <http://www.biocompatibles.com/products/dcbead/loading-instructions>
- (12) Lewis AL, Gonzalez MV, Leppard SW, Brown JE, Stratford PW, Phillips GJ et al. Doxorubicin eluting beads - 1: effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution. J Mater Sci Mater Med 2007; 18(9):1691-1699.

- (13) Fiorentini G, Aliberti C, Turrisi G, Del Conte A, Rossi S, Benea G et al. Intraarterial Hepatic Chemoembolization of Liver Metastases from Colorectal Cancer Adopting Irinotecan-eluting Beads: Results of a Phase II Clinical Study. *in vivo* 2007; 21:1085-1092.
- (14) Taylor RR, Tang Y, Gonzalez MV, Stratford PW, Lewis AL. Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization: in vitro and in vivo evaluation of drug release properties. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30(1):7-14.
- (15) Martin RC, Robbins K, Tomalty D, O'Hara R, Bosnjakovic P, Padr R et al. Transarterial chemoembolisation (TACE) using irinotecan-loaded beads for the treatment of unresectable metastases to the liver in patients with colorectal cancer: an interim report. *World J Surg Oncol* 2009; 7:80.
- (16) Forster RE, Small SA, Tang Y, Heaysman CL, Lloyd AW, Macfarlane W et al. Comparison of DC Bead-irinotecan and DC Bead-topotecan drug eluting beads for use in locoregional drug delivery to treat pancreatic cancer. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21(9):2683-2690.
- (17) Garzas-Martin de Almagro MC, Lopez-Malo de Molina MD, Abellon RJ, Fernandez G, I, Isla TB. [Pharmaceutical validation and error detection in the prescription of antineoplastics in oncohematological patients]. *Farm Hosp* 2008; 32(5):286-289.
- (18) az-Carrasco MS, Pareja A, Yachachi A, Cortes F, Espuny A. [Prescription errors in chemotherapy]. *Farm Hosp* 2007; 31(3):161-164.
- (19) Lewis AL, Gonzalez MV, Lloyd AW, Hall B, Tang Y, Willis SL et al. DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization. *J Vasc Interv Radiol* 2006; 17(2 Pt 1):335-342.
- (20) Krämer I. Drug-eluting beads: a pharmaceutical assessment. *Hospital Pharmacy Europe* 2007.
- (21) Dhanasekaran R, Kooby DA, Staley CA, Kauh JS, Khanna V, Kim HS. Comparison of conventional transarterial chemoembolization (TACE) and chemoembolization with doxorubicin drug eluting beads (DEB) for unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J Surg Oncol* 2010; 101(6):476-480.
- (22) Taylor RR, Tang Y, Gonzalez MV, Stratford PW, Lewis AL. Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolisation: In vitro and in vivo evaluation of drug release properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 30(1):7-14.
- (23) Wallace S, Carrasco CH, Charnsangavej C, Richli WR, Wright K, Gianturco C. Hepatic artery infusion and chemoembolization in the management of liver metastases. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1990; 13(3):153-160.
- (24) Talamonti MS, Tellez C, Benson AB, III. Local-regional therapy for metastatic liver tumors. *Cancer Treat Res* 1998; 98:172-199.
- (25) Tellez C, Benson AB, III, Lyster MT, Talamonti M, Shaw J, Braun MA et al. Phase II trial of chemoembolization for the treatment of metastatic colorectal



- carcinoma to the liver and review of the literature. *Cancer* 1998; 82(7):1250-1259.
- (26) Biocompatibles UK. DC Bead<sup>®</sup> embolic Drug-Eluting Bead using DC Bead Doxorubicin (DEBDOX) animation. Biocompatibles UK 2011 [cited 2011 Feb. 27]; Available from: <http://www.biocompatiblesoncology.com/pages/animation/>
  - (27) Small S. Topotecan uptake and elution by PVA embolic micro-spheres [ 2008.
  - (28) Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A et al. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010; 33(1):41-52.
  - (29) Biocompatibles. DC Bead<sup>™</sup> Irinotecan loading instructions. Biocompatibles UK 2006 Available from: [www.biocompatibles.com](http://www.biocompatibles.com)
  - (30) Biocompatibles UK. Recommendations for DC Bead (doxorubicin) Microcatheter Deliver. Biocompatibles UK 2011 [cited 2011 Feb. 27]; Available from: <http://www.biocompatiblesoncology.com/pages/dc-bead-technique-guidelines/>
  - (31) Fiorentini G, Aliberti C, Benea G, Montagnani F, Mambrini A, Ballardini PL et al. TACE of liver metastases from colorectal cancer adopting irinotecan-eluting beads: beneficial effect of palliative intra-arterial lidocaine and post-procedure supportive therapy on the control of side effects. *Hepatogastroenterology* 2008; 55(88):2077-2082.
  - (32) GlaxoSmithKline. SmPC (Fachinformation) Hycamtin 4mg. Fachinformation 2009 [cited 2010 Dec. 15]; Available from: [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)
  - (33) Varela M, Real MI, Burrell M, Forner A, Sala M, Brunet M et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007; 46(3):474-481.
  - (34) EMA. Hycamtin (topotecan) - Scientific Discussion. EMA 2006 [cited 2011 Feb. 11]; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000123/WC500051538.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000123/WC500051538.pdf)
  - (35) Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *Lancet* 2003; 361(9376):2235-2242.
  - (36) Krämer I, Thiesen J. Stability of topotecan infusion solutions in polyvinylchloride bags and elastomeric portable infusion devices. *Journal of oncology pharmacy practice* 1999; 5(2):75-82.
  - (37) Kaiser J, Thiesen J, Krämer I. Stability of irinotecan-loaded drug eluting beads (DC Bead) used for transarterial chemoembolization. *J Oncol Pharm Pract* 2010; 16(1):53-61.
  - (38) Biocompatibles UK. DC Bead<sup>™</sup> - Drug Delivery Embolisation System - Instructions for use. 2005.

- (39) Craig SB, Bhatt UH, Patel K. Stability and compatibility of topotecan hydrochloride for injection with common infusion solutions and containers. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 16(2):199-205.
- (40) Biocompatibles UK. DC Bead™ Irinotecan loading instructions. Biocompatibles UK 2006 Available from: <http://www.biocompatibles.com/products/dcbead/loading-instructions>
- (41) Tallmann M. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19:311-320.
- (42) Reichelova V, Liliemark J, Albertioni F. Liquid chromatographic study of acid stability of 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, 2-chloro-2'-deoxyadenosine and related analogues. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13(4-5):711-714.
- (43) Zhenchuk A, Lotfi K, Juliusson G, Albertioni F. Mechanisms of anti-cancer action and pharmacology of clofarabine. *Biochem Pharmacol* 2009; 78(11):1351-1359.
- (44) Kisor DF, Plunkett W, Kurtzberg J, Mitchell B, Hodge JP, Ernst T et al. Pharmacokinetics of nelarabine and 9-beta-D-arabinofuranosyl guanine in pediatric and adult patients during a phase I study of nelarabine for the treatment of refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2000; 18(5):995-1003.
- (45) Rodriguez CO, Jr., Stellrecht CM, Gandhi V. Mechanisms for T-cell selective cytotoxicity of arabinosylguanine. *Blood* 2003; 102(5):1842-1848.
- (46) Kisor DF. Nelarabine: a nucleoside analog with efficacy in T-cell and other leukemias. *Ann Pharmacother* 2005; 39(6):1056-1063.
- (47) Gandhi V, Plunkett W, Weller S, Du M, Ayres M, Rodriguez CO, Jr. et al. Evaluation of the combination of nelarabine and fludarabine in leukemias: clinical response, pharmacokinetics, and pharmacodynamics in leukemia cells. *J Clin Oncol* 2001; 19(8):2142-2152.
- (48) Bruhn, Fölsch, Kneba, Löffler. *Onkologische Therapien - Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren*. 2004.
- (49) Gandhi V, Keating MJ, Bate G, Kirkpatrick P. Nelarabine. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(1):17-18.
- (50) EMA. Atriance - EPAR Scientific Discussion. EMA 2007 Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000752/WC500027915.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000752/WC500027915.pdf)
- (51) Robak T, Korycka A, Lech-Maranda E, Robak P. Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases. *Molecules* 2009; 14(3):1183-1226.
- (52) Bonate PL, Arthaud L, Stuhler J, Yerino P, Press RJ, Rose JQ. The distribution, metabolism, and elimination of clofarabine in rats. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(6):739-748.

- (53) Gandhi V, Plunkett W. Clofarabine and nelarabine: two new purine nucleoside analogs. *Curr Opin Oncol* 2006; 18(6):584-590.
- (54) Genzyme. Evoltra: Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels (Fachinformation/SmPC). fachinfo.de 2010 Available from: <http://www.fachinfo.de/data/fi/jsearch?praep>
- (55) GlaxoSmithKline. Fachinformation Atriance 5mg/ml Infusionslösung. fachinfo.de 2010 Available from: [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)
- (56) Arner ES, Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* 1995; 67(2):155-186.
- (57) Bonate PL, Arthaud L, Stuhler J, Yerino P, Press RJ, Rose JQ. The distribution, metabolism, and elimination of clofarabine in rats. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(6):739-748.
- (58) EMA. Evoltra: EPAR - Scientific Discussion. EPARs for authorised medicinal products for human use 2007 [cited 2011 Jan. 5]; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000613/WC500031194.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000613/WC500031194.pdf)
- (59) EMA. Evoltra: EPAR - Product Information. EMA 2010 [cited 2011 Jan. 5]; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000613/WC500031191.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000613/WC500031191.pdf)
- (60) Lotfi K, Mansson E, Spasokoukotskaja T, Pettersson B, Liliemark J, Peterson C et al. Biochemical pharmacology and resistance to 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, a novel analogue of cladribine in human leukemic cells. *Clin Cancer Res* 1999; 5(9):2438-2444.
- (61) Lindemalm S, Albertioni F, Liliemark J. Stability and analysis of 2-chloro-2'-deoxyadenosine, 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine and 2-chloroadenine in human blood plasma. *Anticancer Drugs* 1997; 8(5):445-453.
- (62) Carson DA, Wasson DB, Esparza LM, Carrera CJ, Kipps TJ, Cottam HB. Oral antilymphocyte activity and induction of apoptosis by 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(7):2970-2974.
- (63) Garrett ER, Mehta PJ. Solvolysis of adenine nucleosides. II. Effects of sugars and adenine substituents on alkaline solvolyses. *J Am Chem Soc* 1972; 94(24):8542-8547.
- (64) Fresenius Kabi. Glucosteril 5% Infusionslösung (Fachinformation/SmPC). Fresenius Kabi 2010 Available from: [http://www.fresenius-kabi.de/internet/kabi/de/fkintpub.nsf/AttachmentsByTitle/FI\\_STglucosteril\\_5\\_infusionslsg.pdf/\\$FILE/Glucosteril5\\_Infus.pdf](http://www.fresenius-kabi.de/internet/kabi/de/fkintpub.nsf/AttachmentsByTitle/FI_STglucosteril_5_infusionslsg.pdf/$FILE/Glucosteril5_Infus.pdf)
- (65) Fresenius Kabi. Isotonische Kochsalzlösung Fresenius Infusionslösung. Fresenius Kabi 2010 Available from: [http://www.fresenius-kabi.de/internet/kabi/de/fkintpub.nsf/AttachmentsByTitle/FI\\_Isotone\\_Kochsalz\\_Infus\\_Fresenius/\\$FILE/IsotoniKochsalzInfusion.pdf](http://www.fresenius-kabi.de/internet/kabi/de/fkintpub.nsf/AttachmentsByTitle/FI_Isotone_Kochsalz_Infus_Fresenius/$FILE/IsotoniKochsalzInfusion.pdf)

- (66) Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F et al. Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science 1977; 198(4321):1056-1063.
- (67) Crea R, Kraszewski A, Hirose T, Itakura K. Chemical synthesis of genes for human insulin. Proc Natl Acad Sci U S A 1978; 75(12):5765-5769.
- (68) Krämer I, Jelkmann W. Rekombinante Arzneimittel. Springer Verlag; 2008.
- (69) Manning MC, Patel K, Borchardt RT. Stability of protein pharmaceuticals. Pharm Res 1989; 6(11):903-918.
- (70) Mahler HC, Thiesen J, Krämer I. Biopharmazeutika - Qualitätssicherung bei Transport, Lagerung und Handhabung aus pharmazeutisch-technologischer Sicht. Krankenhauspharmazie 2005; 26:303-311.
- (71) Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. Pharm Res 2010; 27(4):544-575.
- (72) Cleland JL, Lam X, Kendrick B, Yang J, Yang TH, Overcashier D et al. A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. J Pharm Sci 2001; 90(3):310-321.
- (73) Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. J Pharm Sci 2007; 96(1):1-26.
- (74) Untch M, Jackisch C, Thomsson C, Nitz U, von Minckwitz G, Kaufmann M. Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. Deutsches Ärzteblatt 2006; 103(50):3406-3410.
- (75) Ema. Herceptin: EPAR Product Information. EMA 2010 Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000278/WC500074922.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf)
- (76) Dittrich C. Signaltransduktion in der Onkologie. Uni-Med Verlag; 2006. 44-51.
- (77) Roche. Herceptin. Roche 2011 [cited 2011 Mar. 8]; Available from: <http://www.roche.de/pharma/indikation/fachinfo/onkologie/brustkrebs/herceptin/index.html?sid=52805c7792052e943761f25ab6875240>
- (78) Roche Pharma AG. Fachinformation Herceptin (Summary of product characteristics). Fachinfo 2010 Available from: [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)
- (79) Genentech I. Herceptin Prescribing Information. Genentech 2010 Available from: <http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/herceptin-prescribing.pdf>
- (80) Roche. Fachinformation Herceptin 150mg. Fachinfo de [ 2010
- (81) Harris RJ, Kabakoff B, Macchi FD, Shen FJ, Kwong M, Andya JD et al. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 752(2):233-245.
- (82) Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. Ann Oncol 2007; 18(6):977-984.

- (83) Ema. Herceptin - EPAR Scientific Discussion. EMA 2007 Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion\\_-\\_Variation/human/000278/WC500049823.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion_-_Variation/human/000278/WC500049823.pdf)
- (84) Demeule B, Palais C, Machaidze G, Gurny R, Arvinte T. New methods allowing the detection of protein aggregates: a case study on trastuzumab. *MAbs* 2009; 1(2):142-150.
- (85) Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1999; 185(2):129-188.
- (86) Moorhouse KG, Nashabeh W, Deveney J, Bjork NS, Mulkerrin MG, Ryskamp T. Validation of an HPLC method for the analysis of the charge heterogeneity of the recombinant monoclonal antibody IDEC-C2B8 after papain digestion. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 16(4):593-603.
- (87) Xiao G, Bondarenko PV. Identification and quantification of degradations in the Asp-Asp motifs of a recombinant monoclonal antibody. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47(1):23-30.
- (88) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.
- (89) Swiss Institute of Bioinformatics. ProtParam. ExPASy Proteomics Server 2011 Available from: <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>
- (90) Drugbank - Herceptin. drugbank.ca 2010 [cited 2010 Feb. 15]; Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>
- (91) Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci* 2008; 98(9):2909-2934.
- (92) Mahler HC, Muller R, Friess W, Delille A, Matheus S. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59(3):407-417.
- (93) Edelman G, Gall W. The antibody problem. *An Rev Biochem* 1969; 38:415.
- (94) Mach H, Middaugh CR, Denslow N. Determining the identity and purity of recombinant proteins by UV absorption spectroscopy. *Curr Protoc Protein Sci* 2001; Chapter 7:Unit.

## **Folgende Teile der vorliegenden Arbeit wurden vorab veröffentlicht**

### ***Publikationen***

Kaiser, J., Thiesen, J., Krämer, I. (2010) Stability of irinotecan-loaded drug-eluting beads (DC Bead™) used for transarterial chemoembolization. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 16: 53 – 61

Krämer, I., Walz-Jung, H., Kaiser, J. (2010) Bedeutung des Verordnungsmonitorings in der zentralen Zytostatikaherstellung – Eine Erhebung in deutschen Universitätskliniken. *Krankenhauspharmazie* 8:349 – 357

Kaiser, J., Krämer, I. (2011) Physico-chemical stability of nelarabine infusion solutions in EVA infusion bags. *EJHP Science* 17: 1 – 6

Kaiser, J., Krämer, I. (2011) Long-term stability study of clofarabine injection concentrate and diluted clofarabine infusion solutions. *Journal of Oncology Pharmacy practice*, eingereicht am 06.02.2011, Manuskript ID JOPP-11-0010

Kaiser, J., Krämer, I. (2011) Loading profile of topotecan into polyvinyl alcohol microspheres (DC Bead™) over a 7 day period. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, eingereicht am 17.04.2011, Manuscript ID JOPP-11-0024

Kaiser, J., Krämer, I. (2011) Physico-chemical stability of the trastuzumab infusion solutions in polypropylene infusion bags. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, eingereicht am 09.05.2011

### **Posterbeiträge**

Kaiser, J., Klemmer, A., Krämer, I. (2009) Stability of irinotecan-loaded drug eluting beads used for transarterial chemoembolization. 2<sup>nd</sup> Pharmaceutical Sciences Fair & Exhibition (PharmSciFair) und Pre-Satellite Meeting, Nizza, 07.–12.06.2009

Kaiser, J., Krämer, I. (2010) Physico-chemical stability of nelarabine in EVA infusion bags. 7<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Malta, 08.-11.03.2010

Kaiser, J., Krämer, I. (2010) Physikalisch-chemische Stabilität von Clofarabin-Zubereitungen. 35. Wissenschaftlicher ADKA-Kongress, Freiburg, 29.04.-02.05.2010

Krämer, I., Walz-Jung H., Kaiser, J. (2010) Die Bedeutung des Verordnungsmonitorings in der zentralen Zytostatikaherstellung – Eine Erhebung in deutschen Universitätskliniken, 9. Deutscher Kongress für Versorgungsforschung, Bonn, 30.09.-02.10.2010

Kaiser, J., Krämer, I. (2011) Physikalisch-chemische Stabilität von Trastuzumab Infusionslösungen. 36. Wissenschaftlicher ADKA-Kongress, Berlin, 12.05.-15.05.2011

## **LEBENS LAUF**

Name: Jeanette Kaiser

Geburtsdatum: 10.10.1981

Geburtsort: Mainz

Eltern: Lieselotte Kaiser, Apothekerin  
Wolfgang Kaiser, Studiendirektor

### **Schul Ausbildung:**

1988 – 1992 Grunds chule, Walluf

1992 – 1998 Gymnasium, Eltville

1998 – 2001 Oberstufengymnasium Carl-von-Ossietzky,  
Wiesbaden

08.06.2001 Allgemeine Hochschulreife

### **Hochschulausbildung:**

2001 – 2006 Studium der Pharmazie an der Johannes-  
Gutenberg Universität Mainz

01.05.2006 – 31.10.2006 Erste Hälfte des Praktischen Jahres  
in der AVIE-Apotheke im Walmart, Wiesbaden

01.11.2006 – 30.04.2007 Zweite Hälfte des Praktischen Jahres  
bei Bayer Health Care, Monheim

26.06.2007 Approbation als Apothekerin

### **Berufsausübung:**

01.06.2007 – 31.07.2007 Rosen-Apotheke, Hochheim

seit 01.08.2007 Apothekerin in der Apotheke der  
Universitätsmedizin Mainz

seit 01.08.2007 Weiterbildung zur Fachapothekerin für klinische  
Pharmazie

### **Promotion:**

seit 01.08.2007 Doktorandin im Fachbereich Klinische-Pharmazie  
der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Mainz, den 09.05.2011