

**Physikalisch-chemische und mikrobiologische Stabilität ausgewählter  
chemisch und biotechnologisch hergestellter Arzneimittel für die  
systemische Krebstherapie**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Pharmazie

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

**Jannik Almasi**  
geboren in Siegen

Mainz, 27. Oktober 2023

Dekanin:

[REDACTED]

1. Berichterstatterin:

[REDACTED]

2. Berichterstatter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

27. Oktober 2023

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Parenterale (Zytostatika-) Zubereitungen.....	1
1.2 Gute Praxis der Stabilitätsuntersuchung aseptisch hergestellter applikationsfertiger Parenteralia.....	3
1.3 Physikalisch-chemische Stabilität von applikationsfertigen Parenterialiazubereitungen – Small molecules.....	7
1.4 Physikalisch-chemische Stabilität von applikationsfertigen Parenterialiazubereitungen – Monoklonale Antikörper.....	12
1.5 Mikrobiologische Stabilität von applikationsfertigen Parenterialiazubereitungen .....	26
1.6 Gute Praxis der Haltbarkeitsdeterminierung aseptisch hergestellter applikationsfertiger Parenteralia .....	29
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>31</b>
<b>3 Physikalisch-chemische Stabilitätsuntersuchungen</b> .....	<b>33</b>
<b>4 Mikrobiologische Stabilitätsuntersuchung</b> .....	<b>39</b>
<b>5 Schlussfolgerung</b> .....	<b>41</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>43</b>
<b>7 Anhang</b> .....	<b>55</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AM	Arzneimittel
AMTS	Arzneimitteltherapiesicherheit
ApBetrO	Apothekenbetriebsordnung
ATMP	Advanced therapy medicinal products
CDR	Complementary determining regions
CE	Capillary electrophoresis
CMR	Karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch
CRS	Cytokine release syndrome
DAD	Diodenarray-Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fab	Antigen-binding fragments
FAM	Fertigarzneimittel
Fc	Crystallizable fragment
FI	Fachinformation
GC	Gaschromatographie
H	Heavy chain
HS	Hilfsstoff
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry
IEC	Ion-exchange chromatography
Ig	Immunglobulin
IRR	Infusion-related reaction
KBE	Keimbildende Einheiten
L	Light chain
mAb	Monoclonal antibody
MMC	Mitomycin C
MS	Massenspektrometrie
OOS	Out of Specification
PES	Polyethersulfon
Ph Eur	Pharmacopoeia Europaea
PO	Polyolefin
PVC	Polyvinylchlorid
RP-HPLC	Reversed-phase high-performance liquid chromatography

RTA	Ready-to-administer
RTU	Ready-to-use
SACT	Systemic anti-cancer therapy
SmPC	Summary of Product Characteristics
SEC	Size-exclusion chromatography
UHPLC	Ultra high-performance liquid chromatography
USP	United States Pharmacopeia
WS	Wirkstoff

## Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1:** Schematische Darstellung von internen und externen stabilitätsdeterminierenden Faktoren für Parenteraliazubereitungen

**Abb. 2:** Schematische (links) und dreidimensionale Darstellung (rechts) eines intakten IgG-Antikörpers [50,51]; Leichte Ketten grün, schwere Ketten blau, Oligosaccharide orange, Disulfidbrücken gelb

**Abb. 3:** Struktur und Funktion eines IgG-Antikörpers [52]

**Abb. 4:** Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur von mAbs [59]

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Relevante Parameter für die „Gute Praxis von Stabilitätsuntersuchungen“ in Anlehnung an [24,25,29]
- Tab. 2:** Stabilitätsdeterminierende Faktoren und korrespondierende Instabilitätsreaktionen bei Zubereitungen aus chemisch hergestellten Arzneistoffen
- Tab. 3:** Übliche Hilfsstoffe für mAb-Formulierungen und deren Funktion analog [54]
- Tab. 4:** Auswahl an Methoden zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität von punktierten/rekonstituierten mAb-FAM und RTA mAb-Zubereitungen basierend auf [14,15,24,26,49]

## Zusammenfassung

In Krankenhausapotheken wird eine große Zahl von parenteral zu applizierenden Arzneimitteln für die systemische Krebstherapie patientenindividuell unter kontrollierten aseptischen Bedingungen zubereitet. Dabei werden zahlreiche Wirkstoffe (chemisch hergestellt, Biologika), unterschiedliche Formulierungen und verschiedene Primärbehältnisse eingesetzt. Die Verwendbarkeit der Stammlösungen und der verdünnten, applikationsfertigen (ready-to-administer (RTA)-Zubereitungen) ist in den Fachinformationen der als Ausgangsmaterial eingesetzten Fertigarzneimittel oft unzureichend beschrieben. Um die Verwendbarkeit der hergestellten RTA-Zubereitungen sicher deklarieren zu können, benötigen die verantwortlichen Apotheker valide und passende Informationen zur physikalisch-chemischen sowie mikrobiologischen Stabilität. Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, valide Daten zur physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Stabilität ausgewählter Arzneimittel und RTA-Zubereitungen zu generieren, um damit Herstellungsprozesse zu optimieren und die Arzneimitteltherapiesicherheit (AMTS) für die Patienten zu verbessern.

Seit 2017 sind die Mitomycin C (MMC)-haltigen Fertigarzneimittel der Firma medac GmbH mit Harnstoff formuliert, um die Löslichkeit zu verbessern. Laut Fachinformation muss die rekonstituierte Lösung unmittelbar appliziert werden und Reste der konzentrierten Lösungen verworfen werden. Um eine sichere und effiziente Herstellung in der zentralen Zytostatikazubereitung der Krankenhausapotheke zu ermöglichen, sind weitergehende Kenntnisse zur Löslichkeit und physikalisch-chemischen Stabilität von Mitomycin medac Zubereitungen erforderlich. In der klinischen Praxis werden Lösungen der Konzentration 2 mg/mL und 1 mg/mL für die Chemoembolisation und Lösungen der Konzentration 0,4 mg/mL und 0,2 mg/mL intraokular nach Trabekulektomie eingesetzt. Entsprechende Testlösungen wurden mit Wasser für Injektionszwecke als Rekonstituens und NaCl 0,9% als Verdünnungslösung im Glasvial (1 mg/mL) oder PP-Plastikspritzen als Primärbehältnisse hergestellt. Alle Testlösungen wurden lichtgeschützt bei 2-8 °C und bei 20-25 °C gelagert und zu definierten Zeitpunkten über bis zu 8 Tage untersucht. Zur quantitativen Bestimmung von MMC wurde eine bekannte RP-HPLC-Methode mit Diodenarray-Detektion (DAD) etabliert und validiert. Die harnstoffhaltige Formulierung verbessert die Löslichkeit von MMC und ermöglicht die Herstellung von 2 mg/mL MMC-Lösungen ohne zusätzliches Schütteln oder Erhitzen. Allerdings neigen MMC-Lösungen dieser Konzentration vor allem bei Kühlung zur Auskristallisation. Bei Raumtemperatur sind die 2 mg/mL MMC-Lösungen für 8 Stunden physikalisch-chemisch stabil (Spezifikation: Gehalt an intaktem MMC > 90% des Ausgangswerts). Bei 1 mg/mL MMC-Lösungen ist das Risiko der Auskristallisation geringer. Die Lösungen können kühl gelagert werden und sind für 2 Tage physikalisch-chemisch stabil. Verdünnte 0,4 mg/mL und 0,2 mg/mL MMC-Lösungen haben kein Risiko der Auskristallisation und sind bei kühler Lagerung für 3 beziehungsweise 5 Tage physikalisch-chemisch stabil.



Für die intravesikale Applikation wird MMC in speziellen Blaseninstillationssets vertrieben, die eine sichere Rekonstitution und anschließende Instillation in einem geschlossenen System unmittelbar am Point-of-Care ermöglichen. Das Lösungsmittel NaCl 0,9% ist in einem konnektierten Beutel enthalten. Es wurde die physikalisch-chemische Stabilität der harnstoffhaltigen MMC-Fertigarzneimittel Mitomycin medac und mito-medac® sowie vergleichend zwei weiterer Blaseninstillationslösungen (Urocin®, Mitem®) mit anderer Formulierung untersucht. Die Präparate wurden entweder mit WFI (Mitomycin medac, Mitem®, Urocin®) oder mit der konnektierten NaCl 0,9%-Lösung (mito-medac®, Mitem®, Urocin®) zu einer Nennkonzentration von 1 mg/mL gelöst. Die Proben wurden unmittelbar nach der Rekonstitution und nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur entnommen und mittels RP-HPLC untersucht. Die initialen pH-Werte der mit NaCl 0,9% rekonstituierten Testlösungen (5,2-5,6) waren signifikant niedriger als die der mit WFI rekonstituierten Lösungen (6,6-7,4). Die physikalisch-chemische Stabilität war in den mit NaCl 0,9% rekonstituierten MMC-Lösungen über den Untersuchungszeitraum von 24 Stunden nicht gegeben. Nach Rekonstitution mit WFI betrug die MMC-Konzentration bei Mitomycin medac und Urocin® nach 24 Stunden > 90% der Ausgangskonzentration.

Monoklonale Antikörper (mAb) gehören in der systemischen Krebstherapie zwischenzeitlich zum Standard. Da mAbs eine komplexe Glykoprotein-Struktur aufweisen, unterscheidet sich die Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität hinsichtlich Art und Aufwand von denen kleiner, chemisch hergestellter Moleküle.

Für die Untersuchung des monoklonalen PD-L1-Antikörpers Durvalumab wurde Imfinzi® 50 mg/mL Infusionslösungskonzentrat mit einem Microspike punktiert und lichtgeschützt bei 2-8 °C und bei 20-25 °C gelagert. Die physikalisch-chemische Stabilität wurde zu definierten Zeitpunkten über 28 Tage mittels Ionenaustausch- und Größenausschluss-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (IE-, SE-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD) und pH-Messung bestimmt. Zusätzlich wurde auf Veränderungen der Farbe, der Klarheit und auf die Bildung sichtbarer Partikel untersucht. Die chromatographischen Methoden wurden basierend auf Originalpublikationen zu sonstigen mAbs etabliert, optimiert und analog der *ICH Guideline Q2 (R1)* validiert. Die Eignung für Stabilitätsuntersuchungen wurde mittels forcierter Degradation nachgewiesen.

Über den Untersuchungszeitraum wurden keine Anzeichen von Instabilität detektiert. Der pH-Wert, die Farbe und die Klarheit des Infusionslösungskonzentrats blieben unverändert. Sichtbare Partikel wurden nicht detektiert. Die Ergebnisse der SE-HPLC zeigten keine Konzentrationsänderungen des Durvalumab-Monomers über den gesamten Untersuchungszeitraum von 28 Tagen. In den Chromatogrammen wurden keine sekundären Peaks nachgewiesen, die auf Aggregate, Oligomere und/oder Fragmente hingedeutet hätten.

Die IE-HPLC-Untersuchungen ergaben ebenso keine Veränderungen der Peakflächen-Verhältnisse des Hauptpeaks und der basischen/sauren Ladungsvarianten von Durvalumab. Die physikalisch-chemische Stabilität von Durvalumab-Konzentrat konnte mit orthogonalen Untersuchungsmethoden unabhängig von der Lagertemperatur für 28 Tage nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der mikrobiologischen Stabilität aseptisch hergestellter Parenteralia ist Wissen über das wachstumsbeeinflussende Potential einer RTA-Zubereitung von Interesse. Um dieses Wissen zu erweitern, wurde die Viabilität fakultativ pathogener Mikroorganismen (MO; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*) in 20 neuen Arzneimitteln (chemisch hergestellt, Biologika) für die systemische Krebstherapie untersucht. Hierfür wurden die RTA-Zubereitungen mit den Testkeimen entsprechend einer geringfügigen Kontamination (Konzentration:  $10^4$ - $10^5$  MO/mL) inokuliert. Die Testlösungen wurden bei 22 °C bis zu 6 Tage gelagert und Proben an definierten Zeitpunkten entnommen, verdünnt und auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 24 Stunden (Bakterienstämme) oder 72 Stunden (*C. albicans*) bei 37 °C bebrütet und anschließend die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt.

Die Viabilität der ausgewählten, fakultativ pathogenen MOs blieb in den meisten getesteten RTA-Zubereitungen erhalten. Ausgeprägte nutritive Eigenschaften der Biologika wurden nicht festgestellt. Einige chemisch hergestellte Arzneimittel zeigten hingegen speziesspezifisch bakterio-statische und sogar bakterizide Wirkung.

Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen liefern valide Grundlagen zur Haltbarkeitsdeterminierung von aseptisch hergestellten, applikationsfertigen Parenteralia zur Behandlung von Tumorpatienten. MMC-Lösungen unterschiedlicher Konzentration können in der zentralen Zytostatikazubereitung hergestellt und entsprechend der deklarierten Haltbarkeit sicher angewendet werden. Der Verwurf von Durvalumab-Konzentrat kann reduziert und das Risikoprofil verschiedener neuer Arzneimittel bezüglich der Viabilität von MOs besser eingeschätzt werden.

## Abstract

In hospital pharmacies, a large number of parenteral preparations for systemic anti-cancer therapy are individually prepared for patients under controlled aseptic conditions. Numerous active ingredients (small molecule drugs, biologics), different formulations and various primary containers are used. The shelf-life of stock solutions and diluted ready-to-administer (RTA) preparations is often insufficiently described in the Summary of Product Characteristics of the finished medicinal products used as starting material. To determine the shelf-life of RTA preparations, responsible pharmacists need valid and appropriate information on the physicochemical as well as microbiological stability. The aim of this dissertation was to provide valid data on the physicochemical and microbiological stability of selected medicinal products and RTA preparations in order to optimize the preparation process and improve medication safety.

Since 2017, the finished medicinal products containing mitomycin C (MMC) from medac GmbH have been reformulated with urea to improve solubility. According to the Summary of Product Characteristics, the reconstituted solution should be administered immediately and residues of the concentrated solutions must be discarded. Further knowledge of the solubility and physicochemical stability of Mitomycin medac derived RTA-preparations is necessary to facilitate the preparation in pharmacy-based cytotoxic preparation units. In clinical practice, solutions of 2 mg/mL and 1 mg/mL MMC are used for chemoembolization and solutions of 0.4 mg/mL and 0.2 mg/mL concentration are injected intraocularly after trabeculectomy. Respective test solutions were prepared using water for injection (WFI) as solvent and 0,9% NaCl as diluent in glass vials (1 mg/mL) or PP plastic syringes as primary containers. All test solutions were stored protected from light at 2-8 °C and at 20-25 °C and assayed at predefined time points for up to 8 days. A known RP-HPLC method with diode array detection (DAD) was implemented and validated for MMC analysis. The urea-containing formulation improves the solubility of MMC and enables the preparation of 2 mg/mL MMC solutions without additional shaking or heating. However, MMC solutions of this concentration tend to crystallize, especially during refrigerated storage. At room temperature, the 2 mg/mL MMC solutions are physicochemically stable for 8 hours (MMC concentration > 90% of the initial concentration). For 1 mg/mL MMC solutions, the risk of crystallization is reduced. Solutions stored refrigerated are physicochemically stable for 2 days. Diluted 0.4 mg/mL and 0.2 mg/mL MMC solutions do not tend to crystallize when stored refrigerated and revealed to be physicochemical stable for a period 3 and 5 days, respectively.

mito-medac® is marketed as bladder instillation set that allows safe reconstitution and subsequent intravesical instillation in a closed system device at the point-of-care. 0.9% NaCl solution in a prefilled, pre-connected infusion bag is used as solvent. The physicochemical stability of the urea-containing MMC products mitomycin medac and mito-medac® as well as

two other licensed MMC bladder instillation solutions (Urocin®, Mitem®) were studied. The preparations were dissolved either with WFI (mitomycin medac, Mitem®, Urocin®) or with the pre-connected 0.9% NaCl solution (mito-medac®, Mitem®, Urocin®) to a nominal concentration of 1 mg/mL. Samples were taken immediately after reconstitution and after 24 hours of storage at room temperature. The initial pH values of the test solutions reconstituted with 0.9% NaCl solution (5.2-5.6) were significantly lower than those of the solutions reconstituted with WFI (6.6-7.4). Results of the validated RP-HPLC assay revealed that MMC concentrations fell below the 90% minimum limit in the 24-hour period in all MMC solutions reconstituted with the pre-connected 0.9% NaCl solution. When mitomycin medac and Urocin® were reconstituted with WFI, the MMC concentrations remained above the 90% limit after 24 hours.

Today, monoclonal antibodies (mAbs) belong to the standard armamentarium in systemic anti-cancer therapy. Since mAbs have a complex glycoprotein structure, sophisticated chromatography methods are used to determine the physicochemical stability of the concentrated and ready-to-use solutions.

To study the physicochemical stability of the monoclonal PD-L1 antibody durvalumab, licensed as Imfinzi® 50 mg/mL concentrate solution after first opening, vials were punctured with microspikes and stored protected from light at 2-8 °C and at 20-25 °C. Physicochemical stability was determined at predefined time points over a period of 28 days by ion-exchange and size-exclusion high-performance liquid chromatography (IE-, SE-HPLC) with diode array detection (DAD) and pH measurement. In addition, changes in color, clarity, and visible particle formation were examined. The chromatography assays were chosen according to the literature, implemented and adapted. The stability indicating nature of the assays were proven by forced degradation experiments and the assays validated according to *ICH Guideline Q2 (R1)*.

No signs of instability got obvious over the study period of 28 days. pH, color, and clarity of the durvalumab concentrate remained unchanged. Visible particles were not detected. In SE-HPLC chromatograms the area of durvalumab monomer peak remained unchanged. No secondary peaks indicating aggregates, oligomers, and/or fragments were detected in the chromatograms. IE-HPLC chromatograms showed no changes of the peak area ratios of the main peak and the basic/acidic charge variants of durvalumab. The physicochemical stability of durvalumab concentrate was demonstrated by orthogonal analytical methods independent from the storage temperature over a period of 28 days. From a microbiological point of view, refrigerated storage is recommended.

To determine the microbiological stability of aseptically prepared parenterals, knowledge about the growth potential of RTA preparations is of interest. To increase this knowledge, the viability of facultative pathogenic microorganisms (MO; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*) in 20 new medicinal products (small molecule drugs, biologics) for systemic anti-cancer therapy was investigated. For this purpose, the RTA preparations were inoculated with the test strains to simulate low inadvertent contamination (concentration:  $10^4$ - $10^5$  MO/mL). The test solutions were stored at 22 °C for up to 6 days and samples were taken at predefined time points, diluted and transferred to agar plates. Plates were incubated for 24 hours (bacterial strains) or 72 hours (*C. albicans*) at 37 °C and colony forming units (CFU) were counted.

The viability of the selected facultative pathogenic MOs was maintained in most of the tested RTA preparations imitating worst case conditions for the preparations. Pronounced nutritive properties of the biologics were not detected. In contrast, some small molecule drugs revealed species-specific bacteriostatic and even bactericidal activity.

Results of the experimental studies provide essential information to the responsible pharmacist for determining the shelf-life of ready-to-use parenteral preparations. Various types and concentrations of urea-containing MMC preparations are physicochemically stable over defined periods and can be prepared in advance in centralized cytotoxic preparation units. Leftovers of durvalumab concentrate can be used for up to 28 days after first opening of the vial, preferably stored refrigerated. Knowledge about the viability of MOs in various innovative oncology products allows a sound risk evaluation regarding microbiological instability of related preparations. Overall, results are appropriate to gain economic and ecological benefit in systemic anti-cancer therapy.

# 1 Einleitung

## 1.1 Parenterale (Zytostatika-) Zubereitungen

Bei der Anwendung von Parenteralia ist das Risiko für Medikationsfehler sowohl bei der Vorbereitung zur Anwendung als auch bei der Applikation groß. An erster Stelle wird zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit (AMTS) von Parenteralia immer der Einsatz von ready-to-use (RTU) und ready-to-administer (RTA) Produkten empfohlen [1,2]. Da aber nur die wenigsten intravenös applizierten Arzneimittel (AM) als RTA-Fertigspritze oder -infusion verfügbar sind, müssen Rekonstitution und Verdünnung (Überführung in die anwendungsfähige Form in einer Standarddosierung/-konzentration oder in der patientenindividuellen Dosierung) durch medizinisches oder pharmazeutisches Personal erfolgen. Besonders kritische AM wie Tumortherapeutika, NotfallAM, Analgetika, Antimykotika, Dauerinfusionen für Intensivpatienten, Mischinfusionen zur parenteralen Ernährung und neuerdings ATMP (Advanced therapy medicinal products) werden bereits vielfach aus den entsprechenden Fertigarzneimitteln (FAM) unter kontrollierten Bedingungen in der Krankenhausapotheke applikationsfertig zubereitet. Die Produktpalette der Parenteraliazubereitung erweitert sich stetig, wobei in Deutschland insbesondere komplexe und risikobehaftete Zubereitungen in der Krankenhausapotheke hergestellt werden. Dies erfolgt einerseits zur Verbesserung der AMTS und andererseits zur Entlastung der Pflege von pflegefremden Tätigkeiten. Während die Rekonstitution durch medizinisches Personal der Fachinformation (FI; Summary of Product Characteristics, SmPC) entsprechend erfolgen muss, kann die Herstellung mit zugelassenen FAM als Ausgangsmaterial durch pharmazeutisches Personal über die Angaben in der FI hinausgehen [3]. Zudem wird die Qualität und Sicherheit der in der Apotheke hergestellten applikationsfertigen Parenteraliazubereitungen durch technologische Entwicklungen wie Digitalisierung und Automatisierung der Herstellung, Dokumentation und Qualitätskontrolle gefördert und verbessert [4].

Die Zubereitung/Herstellung von AM (RezepturAM, DefekturAM, AM zur parenteralen Anwendung) in der Apotheke unterliegt den einschlägigen pharmazeutischen Gesetzen und Regularien [1,5,6]. Das Verwendbarkeitsdatum ist vom verantwortlichen Apotheker in Kenntnis der physikalisch-chemischen, mikrobiologischen und pharmakologischen Qualität und Stabilität festzulegen [7-10]. Für die als Ausgangsmaterialien eingesetzten FAM müssen Stabilitätsdaten vom Zulassungsinhaber im Rahmen der Zulassung vorgelegt werden. Für die applikationsfertigen Zubereitungen können freiwillig Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität vorgelegt und in die FI aufgenommen werden. In der Regel muss der Apotheker auf Stabilitätsdaten aus publizierten experimentellen Untersuchungen zurückgreifen und diese auf

die infrage stehende pharmazeutische Zubereitung übertragen. Von besonderer Relevanz sind Daten über die Verwendbarkeit von (rekonstituierten) Stammlösungen und applikationsfertigen Zubereitungen, wenn die Herstellung im Voraus in Serie, in Chargen in Standarddosierungen (z.B. Dose banding [11]) oder mittels Standardkonzentrationen erfolgt [12,13], oder hochpreisige Stammlösungen kosteneffektiv eingesetzt werden sollen.

Stabilität ist definiert als Ausmaß, in dem ein Produkt in spezifizierten Grenzen bleibt [14-16]. Die Haltbarkeit wird im Wesentlichen bestimmt von der physikalisch-chemischen und der mikrobiologischen Stabilität der AM-Zubereitung, die von internen und externen stabilitätsdeterminierenden Faktoren beeinflusst wird (vgl. Abb. 1).

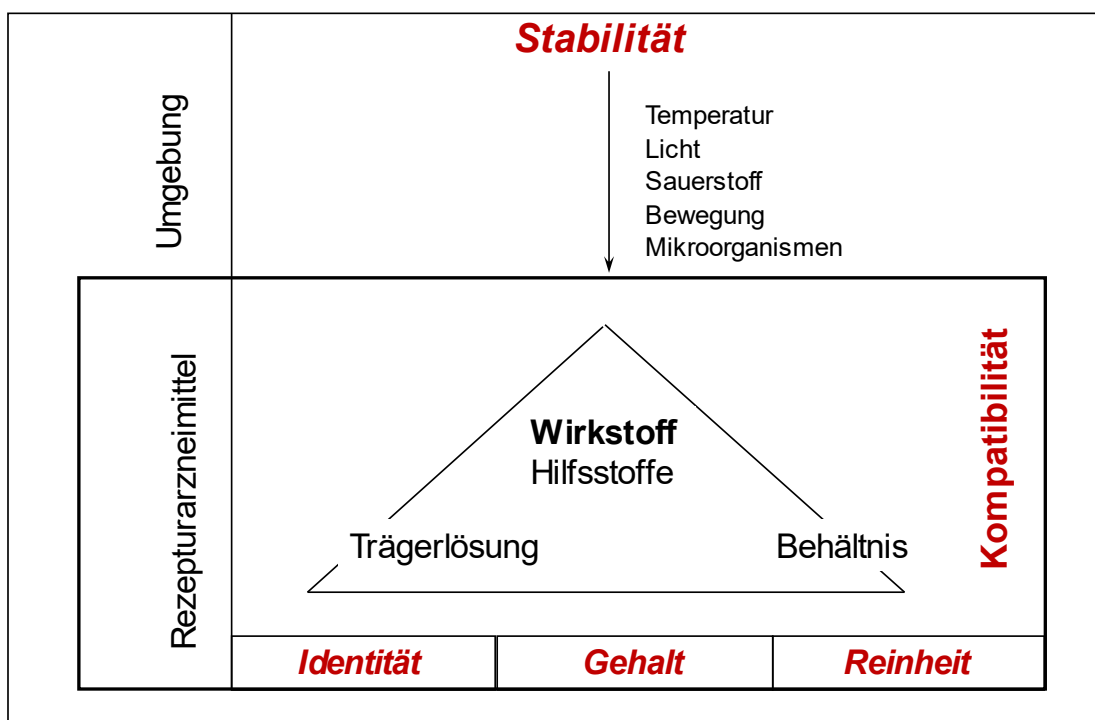


Abb. 1: Schematische Darstellung von internen und externen stabilitätsdeterminierenden Faktoren für Parenteraliazubereitungen

## **1.2 Gute Praxis der Stabilitätsuntersuchung aseptisch hergestellter applikationsfertiger Parenteralia**

Applikationsfertige Parenteralia müssen den Anforderungen der Ph. Eur Monographie 2619 [17] „Pharmazeutische Zubereitungen“ entsprechen. Der Begriff Zubereitung beinhaltet, dass das AM nicht der Zulassungspflicht unterliegt und durch eine Apotheke oder andere Einrichtung im Gesundheitsbereich hergestellt wird. Detaillierte Hinweise zur Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia in der Apotheke finden sich in § 35 ApBetrO (in Verbindung mit §7, 8, 14 [6]), nationalen [18,19] und internationalen Leitlinien [1,5,20]. In den Dokumenten wird auf die Notwendigkeit des Risikomanagements sowie der Qualitätssicherung des Zubereitungsprozesses hingewiesen.

Nachfolgend soll speziell auf die Anforderung der Stabilität und Haltbarkeitsdeterminierung der Zubereitungen eingegangen werden. In der Ph. Eur. 2619 wird angegeben, dass „die Anforderungen an die Stabilität von pharmazeutischen Zubereitungen von der beabsichtigten Verwendung und der gewünschten Lagerdauer abhängen“ [17]. Für die Stabilitätsuntersuchungen von FAM sind internationale ICH Guidelines, z.B. ICH Q1A (R2) Stability Testing of new drugs and products [21], ICH Q1C Stability Testing: Requirements for New Dosage Forms [22], maßgeblich. Empfehlungen zu Stabilitätsuntersuchungen von applikationsfertigen Parenteraliazubereitungen, hergestellt aus FAM, wurden insbesondere von den pharmazeutischen Fachgesellschaften entwickelt und publiziert [14,23-27].

In der United States Pharmacopoeia (USP) finden sich Angaben zur Stabilität von pharmazeutischen Zubereitungen zur parenteralen Anwendung in den Monographien USP <797> Pharmaceutical Compounding – Sterile Preparations [20] und USP <1191> Stability Considerations in Dispensing Practice [28]. Zur „Guten Praxis von Stabilitätsuntersuchungen“ für Parenteraliazubereitungen zählen die Untersuchung und Dokumentation der in Tabelle 1 aufgeführten Parameter.



Tab. 1: Relevante Inhalte der „Guten Praxis von Stabilitätsuntersuchungen“ in Anlehnung an [24,25,29]

Relevante Inhalte, Angaben in Publikationen von Stabilitätsuntersuchungen
<b>Art des Wirkstoffs:</b> Chemisch hergestellt, Biologikum
<b>Eingesetztes FAM:</b> Name, Zusammensetzung (Wirkstoff (-e), Hilfsstoffe), Charge (-n)
<b>Rekonstituens, Trägerlösung:</b> Wasser für Injektionszwecke, NaCl 0,9%, G5, vorgefüllte Trägerlösung, Rationale für die Auswahl
<b>Eingesetztes Primärpackmittel:</b> Glas (insbesondere Stammlösung), Infusionsbeutel Polyolefin, Polyethylen, Polypropylen, Plastikspritzen, Rationale für die Auswahl
<b>Testkonzentrationen:</b> Basierend auf Fachinformation, Rationale für die Auswahl, z.B. konzentrationsabhängige Stabilität (oberes und unteres, klinisch relevantes Konzentrationslimit verwenden)
<b>Anzahl der Testlösungen:</b> Mindestens 3 für jede Konstellation der stabilitätsdeterminierenden Faktoren
<b>Anzahl der Analysen:</b> Mindestens zweifache (besser dreifache) Analyse jeder Testlösung
<b>Lagerbedingungen:</b> Temperatur (2-8 °C, 20-25 °C, 32 °C für Wirkstoffe, die über Elastomerpumpen appliziert werden, ggf. Tiefkühltemperaturen), Lichteinfluss, Rationale für die Auswahl
<b>Lagerdauer (Stunden, Tage):</b> In der Regel max. 28 Tage bei RezepturAM
<b>Anzahl der Probenahme Zeitpunkte:</b> Mindestens 5 Analysenzeitpunkte (inklusive t0) über die Dauer der Untersuchung verteilt
<b>Zeitpunkte der Probenahme:</b> In Abhängigkeit von erwarteter Stabilität (z.B. resultierend aus Angaben aus der FI (CAVE: hier oft nur mikrobiologische Stabilität angegeben), basierend auf Daten aus Publikationen ähnlicher/verwandter Wirkstoffe)
<b>Probenvolumen:</b> Methodenabhängig
<b>Analysenmethoden zu Gehalt und Reinheit von Wirkstoffen/Hilfsstoffen:</b> z.B. HPLC, Kapillarelektrophorese, Gelelektrophorese, Rationale für die Auswahl
<b>Inhalte der Validierung der analytischen Methode:</b> Nachweis der Methodeneignung (Bestimmung des Analyten bei Anwendung von forcierten, stabilitätsdeterminierenden Bedingungen (pH, Temperatur, Oxidantien, Licht) in Anwesenheit von sonstigen Bestandteilen der Zubereitung und neben möglichen Abbauprodukten/potentiellen Verunreinigungen)
<b>Weitere Bestimmungen:</b> pH-Wert, Osmolarität, Aussehen (z.B. Färbung, Klarheit der Lösung), sichtbare Partikel, nicht-sichtbare Partikel, „extractables, leachables“ aus Primärpackmittel (z.B. Lösungsvermittler), Hilfsstoffe (z.B. Permeabilitätsvermittler), Sterilität/mikrobiologische Stabilität
<b>Bereitstellung der Untersuchungsergebnisse:</b> Einleitung (Literaturdiskussion), Material und Methoden (genaue Beschreibung), Ergebnisse (detaillierte Auflistung aller Ergebnisse als prozentualer Anteil der initialen Konzentration), Diskussion (kritische Auseinandersetzung mit den verwendeten Methoden und Ergebnissen; Stellungnahme zu potentiellen Schwachstellen in der Untersuchung sowie zu möglichen Out of Specification (OOS)-Ergebnissen und deren Einfluss/Interpretation)

RTA- und RTU-Parenteralia werden in der Regel aus FAM als Ausgangsmaterial hergestellt. Im Rahmen der Zulassung werden vom pharmazeutischen Unternehmer umfangreiche Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität für das originalverschlossene FAM während der Lagerung vorgelegt [14]. Zusätzliche Stabilitätsdaten zu punktierten Infusionslösungskonzentraten oder rekonstituierten Lyophilisaten/Trockensubstanzen, die über 24 Stunden hinausgehen, werden in der Regel nicht angegeben. Des Weiteren fehlen oftmals Daten zur Verwendbarkeit von patientenindividuellen Zubereitungen, die durch Verdünnung mit geeigneter Trägerlösung oder Überführung des Konzentrats aus einem FAM in der Krankenhausapotheke applikationsfertig zubereitet werden. Wegen des Risikos der mikrobiologischen Instabilität wird in vielen FI die unverzügliche Verwendung der hergestellten Infusionslösung empfohlen. Sollten applikationsfertige Zubereitungen nicht unmittelbar angewendet werden, liegen die Lagerungszeit und -bedingungen in der Verantwortung des Anwenders und die Verwendbarkeit beträgt „normalerweise nicht länger als 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C“ [30]. Bei Zubereitung unter kontrollierten und validierten aseptischen Bedingungen kann der verantwortliche Apotheker bei gegebener physikalisch-chemischer Stabilität eine längere Haltbarkeit deklarieren.

Eine geeignete Methode zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Stabilität muss geeignet, robust und validiert sein [14,16,24,25,31,32]. Spezifität und Sensitivität der Methode müssen ausreichen, um Veränderungen der Zubereitung in Art und Menge über die Zeit zu detektieren. Dabei müssen Wirkstoff (WS), mögliche Verunreinigungen aus dem Herstellprozess und potentielle Abbauprodukte qualitativ und quantitativ analysiert werden. Die ausgewählten Methoden müssen entsprechend den ICH Guidelines validiert werden [33]. Um die Eignung einer Analysemethode für Stabilitätsuntersuchungen zu belegen, wird die Untersuchungslösung unterschiedlichen Stressbedingungen (Säure, Lauge, erhöhte Temperatur, Oxidationsmittel, Licht) ausgesetzt und geprüft, ob die Zersetzungsprodukte qualitativ und quantitativ analysiert werden können. Die gewählten Stressbedingungen sollten zu einem partiellen Abbau des WS führen (Faustregel: gewünschter WS-Abbau ca. 20% [24]). Eine geeignete Methode muss ausreichend spezifisch und sensitiv sein, um Abbauprodukte auch bei gemäßigten Stressbedingungen detektieren zu können.

Bei einem FAM muss zum Zeitpunkt der Freigabe der WS-Gehalt zwischen 95% und 105% des deklarierten Gehalts betragen (Freigabegrenze) [34]. Diese Grenzen können für applikationsfertige Zubereitungen übernommen werden. Wenn Arzneibuchmonographien für das AM vorliegen, können Spezifikationen (z.B. für Verunreinigungen, Abbauprodukte) aus diesen übernommen werden. Die Haltbarkeitsgrenze beträgt in der Regel 90% des deklarierten Gehalts ( $T_{90}$ -Wert) [14]. Je nach Risikoprofil der Zubereitung ist eine Anpassung auf  $T_{95}$  oder  $T_{85}$  zu prüfen [14]. Daneben können toxische Abbauprodukte stabilitätslimitierend

sein, auch wenn der untere Grenzwert des WS-Gehalts noch nicht erreicht wurde. Die Auswertung der analytischen Daten zur Festlegung der physikalisch-chemischen Stabilität erfolgt analog der ICH Guideline ICH Q1E Evaluation of Stability Data [35]. Dabei werden die Daten einer analytischen Regressionsanalyse unterzogen und die untere einseitige 95% (85%, 90%)-Konfidenzgrenze bestimmt. Die Anzahl der Messpunkte einer Untersuchung sollte dabei ausreichend sein, um statistisch valide auswerten zu können (mindestens 5 Messzeitpunkte inklusive  $t_0$  [25]).

Geeignete Methoden zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität von rezeptur- oder defekturnmäßig hergestellten pharmazeutischen Zubereitungen können auf Basis von wissenschaftlichen Publikationen [24,36] oder WS-Monographien und/oder AM-Monographien von Pharmakopöen etabliert werden.

### 1.3 Physikalisch-chemische Stabilität von applikationsfertigen Parenteraliazubereitungen – Small molecules

Small molecule drugs (=chemisch hergestellte Arzneistoffe mit geringem Molekulargewicht) sind durch eine molekulare Masse von <2000 Da charakterisiert [25]. Vorteile sind die chemische Synthese, die häufig gute orale Verfügbarkeit und niedrige Herstellungskosten [37]. Für die Stabilitätsuntersuchungen sollen bevorzugt separative Verfahren eingesetzt werden, die eine Trennung von WS, HS, Abbauprodukten und Verunreinigungen ermöglichen. Geeignet sind Flüssig-Chromatographie und Kapillarelektrophorese. Bei kleinen, chemisch synthetisierten WS wird wegen der hydrophoben Eigenschaften bevorzugt die **Reversed-phase High-performance liquid chromatography, RP-HPLC** eingesetzt [24,25,36]. Die Detektion erfolgt meist mit UV-VIS- oder Diodenarray-Detektoren (DAD). Eine Weiterentwicklung der HPLC stellt die Ultra-HPLC (UHPLC) dar, welche gegenüber der konventionellen HPLC eine höhere Effizienz und Trennleistung aufweist. Aufgrund geringerer Probenvolumina und kürzerer Analysenzeiten ist die UHPLC vor allem für teure und besonders instabile Verbindungen interessant. Kombiniert wird die UHPLC mit konventionellen Detektoren (UV-VIS, DAD), allerdings auch immer häufiger mit Massenspektrometern (MS). MS können in Reihe geschaltet werden (UHPLC-MS-MS) und ermöglichen eine zeitliche und räumliche Trennung chemischer Verbindungen. Aufgrund der höheren Anschaffungs-, Wartungs- und Zubehörkosten stehen diese Methoden allerdings selten Apotheken zur Verfügung. Stabilitätsuntersuchungen mittels Gaschromatographie (GC) sind nur für flüchtige, nicht thermolabile WS einsetzbar.

## **Physikalische Instabilität**

### *Präzipitation*

Auf Ausfällungen werden gemäß Ph. Eur. mit den Prüfungen auf sichtbare Partikel Ph. Eur. 2.9.20 „Particulate contamination: Visible particles“ [38], Ph. Eur. 5.17.2. „Recommendations on testing of particulate contamination: Visible particles“ [39] sowie auf nicht-sichtbare Partikel nach Ph. Eur. 2.19.19. „Particulate contamination: Sub-visible particles“ mittels light obscuration Tests und/oder mikroskopischer Partikelzählung [40] geprüft.

Die Veränderungen von Klarheit und Partikelgehalt einer parenteralen pharmazeutischen Zubereitung können stabilitätslimitierend sein, besonders wenn es zur Bildung sichtbarer Partikel kommt. Die Präzipitation kann WS und HS betreffen. Die Instabilität wird durch unterschiedliche Parameter beeinflusst und kann zu jeder Zeit auftreten.

Parameter, die Präzipitationen begünstigen können:

- Überschreiten der Sättigungskonzentration
- Verdünnung von Lösungsvermittlern/Solubilisierungsmitteln (z.B. Ethanol, Polyethylenglykole) → Löslichkeit↓
- Veränderung der Konzentration hydrotroper HS (z.B. Harnstoff) im Verhältnis zu WS und Lösungsmittel → Löslichkeit↓
- Verdünnung von Pufferlösungen; Überschreiten der Kapazität eines Puffersystems → Polarität↓ → Löslichkeit↓
- Binäre oder Mehrkomponenten-AM-Mischungen unbekannter Kompatibilität → Bildung unlöslicher Salze, Komplexbildung
- Änderung der Elektrolytkonzentration oder des pH-Werts einer Lösung → Löslichkeit von WS↓

### *Adsorption, Absorption*

Sowohl bei Adsorptions- als auch bei Absorptionsreaktionen handelt es sich um Wechselwirkungen zwischen dem/den WS und/oder HS einer Zubereitung mit verschiedenen Kontaktflächen. Die Inhaltsstoffe applikationsfertiger Zubereitungen kommen bei der Zubereitung und Applikation mit den Oberflächen verschiedenster Artikel in Kontakt (z.B. Spritze, Kanüle, Spike, Primärpackmittel, Filter, Infusionssystem, etc.).

Die Adsorption beruht auf ionischen Interaktionen zwischen funktionellen Gruppen gasförmiger oder flüssiger WS-/HS-Moleküle mit freien Bindungsstellen auf den Oberflächen der für die Zubereitung und Applikation verwendeten Materialien. Die Anzahl möglicher Bindungsstellen an unterschiedlichen Oberflächen ist limitiert, weshalb die Ausgangskonzentration des WS bei dieser Art der physikalischen Instabilität besonders relevant ist. Für sehr niedrig konzentrierte Lösungen besteht ein höheres Risiko für klinisch relevante Adsorptionsphänomene. Bestrebungen zur Reduktion möglicher Bindungsstellen

(z.B. durch Blockade von Silanolfunktionen an Glasoberflächen) sind wirksam, können jedoch nicht alle Interaktionen verhindern (z.B. hydrophobe Wechselwirkungen).

Von Absorption spricht man, wenn WS/HS in die vorhandenen Ausgangsmaterialien migrieren. Diese Instabilität ist vor allem bei lipophilen WS zu beobachten, wenn sie mit amorphen Strukturen (z.B. Polyvinylchlorid (PVC)) in Verbindung kommen. Absorptionsphänomene entwickeln sich in der Regel langsamer und sind schwieriger zu kontrollieren.

Die Detektion von Adsorption/Absorption erfolgt passiv über Ausschlussverfahren. Wenn eine geeignete Methode zur Untersuchung von WS-Konzentration und Abbauprodukten verwendet wird und es zu einem WS-Verlust ohne Bildung von Abbauprodukten kommt und auch andere physikalisch-chemische Parameter (Partikelbildung, Trübung, pH, Osmolarität) unverändert bleiben, ist von einer Wechselwirkung zwischen WS und Behältnis auszugehen [25]. Die Untersuchungen können mit alternativen Behältnismaterialien fortgesetzt werden.

#### *Leaching von Bestandteilen der Primärverpackung, Applikationssystemen*

Primärverpackungen und Medizinprodukte, die für die Zubereitung und Applikation pharmazeutischer Zubereitungen verwendet werden, können eine Vielzahl von Additiven (z.B. Gleitmittel, Weichmacher, Stabilisatoren, etc.) enthalten. Das Migrieren dieser Substanzen (Leachables) in die AM-Zubereitung wird als Leaching bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit und das Ausmaß der Migration von Additiven ist unter anderem abhängig von der Art und Menge der enthaltenen Leachables, der Größe der Kontaktflächen, der Kontaktzeit sowie von Art und Volumen der pharmazeutischen Zubereitung. Ein bekanntes Beispiel für die Migration sind Weichmacher, die aus PVC-Behältnissen herausgelöst werden, oder Silikonöle (zur Verbesserung der Gleitfähigkeit des Spitzenstempels bei dreiteiligen Spritzen), die in den Spritzeninhalt migrieren. Die Leachables können toxisch sein oder physikalisch-chemische Instabilität bewirken.

Die Detektion von Leachables ist anspruchsvoll und erfordert die Analyse mittels LC-MS, GC-MS und ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) [41]. Bei wässrigen Zubereitungen ist die Gefahr der Migration grundsätzlich als gering einzustufen und kann über die Auswahl geeigneter Primärpackmittel minimiert werden [25]. Des Weiteren wird die Qualität von Plastik-Primärverpackungen in Guidelines streng reguliert (CPMP/QWP/4359/03 [42]).

## **Chemische Instabilität**

### *Hydrolyse*

Viele Arzneistoffe sind hydrolyseempfindliche, chemische Moleküle wie Ester, Amide und Lactame. Ausmaß und Geschwindigkeit der in wässrigen Lösungen ablaufenden Hydrolyse werden wesentlich beeinflusst durch den pH-Wert der Lösung und die Temperatur.

### *Oxidation*

Oxidationsreaktionen können an unterschiedlichen Stellen in WS-/HS-Molekülen auftreten. Besonders empfindlich sind Phenol-, Olefin-, Endiol-, Ether-, Hydroxymethylketon- und Aminstrukturen [43]. Bei pharmazeutischen Formulierungen treten sie in der Regel spontan als Autoxidation auf [43]. Bei sehr oxidationsempfindlichen AM erfolgt eine Begasung mit Inertgas (z.B. Stickstoff) oder die Zugabe von Komplexbildnern (EDTA) und Antioxidantien [24].

### *Photolyse*

Bei der Photolyse (auch: photochemische Bindungsspaltung) werden chemische Bindungen in WS durch die energiereichen UV-Strahlen (280 nm – 400 nm) der optischen Strahlung hetero- oder homolytisch gespalten. Die resultierenden Photolyseprodukte können unwirksam, aber auch toxisch sein. Zusätzlich kann Tageslichtenergie sowohl Hydrolyse- als auch Oxidationsreaktionen katalysieren. Durch die Verwendung geeigneter Sekundärverpackungen können Photolysereaktionen vermieden werden.

### *Racemisierung und Epimerisierung*

Die Racemisierung betrifft WS mit einem und die Epimerisierung WS mit mehreren stereogenen Zentren. Bei der Racemisierung kommt es zu einer Angleichung der Konzentration zweier Enantiomere bis nach vollständiger Racemisierung ein Racemat vorliegt. Bei der Epimerisierung kommt es zur Konfigurationsumkehr an einem asymmetrischen Kohlenstoffatom in einem Molekül, das zwei oder mehr stereogene Zentren besitzt. Diese Phänomene sind selten, können aber die Pharmakodynamik und -kinetik eines WS beeinflussen [24].

### *Färbung, pH-Wert, Osmolalität*

Chemische Reaktionen von WS/HS können Veränderungen der Färbung, Klarheit und dem Grad der Opaleszenz von Lösungen bedingen. Diese Veränderungen werden in Anlehnung an Ph. Eur. Monographie 2.2.1. „Clarity and degree of opalescence of liquids“ [44] und 2.2.2. „Degree of coloration of liquids“ [45] untersucht.

Auf Abbaureaktionen kann auch die Veränderung des pH-Werts einer Zubereitung über die Zeit hinweisen. Die Prüfung findet analog Ph. Eur. Monographie 2.2.3. „Potentiometric determination of pH“ [46] statt.

Ob die Prüfung der Osmolalität entsprechend Ph. Eur. Monographie 2.2.35. „Osmolality“ [47] eine geeignete Methode zur Stabilitätsuntersuchung ist, wird neuerdings bezweifelt [48]. In einer Untersuchung von Vigneron et al. konnte bei elf von 13 AM-Zubereitung kein Zusammenhang zwischen chemischem Abbau und einer Änderung der Osmolalität beobachtet werden [48].

Externe und interne stabilitätsdeterminierende Faktoren und korrespondierende Instabilitätsreaktionen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Stabilitätsdeterminierende Faktoren und korrespondierende Instabilitätsreaktionen bei Zubereitungen aus chemisch hergestellten Arzneistoffen

Stabilitätsdeterminierende Faktoren	Instabilitätsreaktionen
<b>pH-Wert</b>	Abweichung vom pH-Optimum: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verstärkte chemische Abbaureaktion, insbesondere Hydrolyse, Oxidation</li> <li>• Verringerte WS-Solubilisierung → Präzipitation</li> </ul>
<b>Temperatur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperaturerniedrigung: Verringerte Löslichkeit v.a. in gesättigten Zubereitungen → Präzipitation</li> <li>• Temperaturerhöhung: Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit von Hydrolyse, Oxidation</li> </ul>
<b>Licht</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Photolyse lichtempfindlicher WS</li> </ul>
<b>Sauerstoff</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidative Zersetzung oxidationsempfindlicher Strukturen in WS-/HS-Molekülen</li> </ul>
<b>Tenside</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einschluss der WS-Moleküle in Mizellen</li> </ul>
<b>Behältnismaterial</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adsorption, Absorption von WS, HS</li> <li>• Sauerstoff-Permeation → oxidative Zersetzung</li> <li>• CO<sub>2</sub> Permeation → pH-Wert-Erniedrigung</li> <li>• Feuchtigkeitspermeation → Konzentrationsänderungen</li> </ul>



## 1.4 Physikalisch-chemische Stabilität von applikationsfertigen Parenteraliazubereitungen – Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAbs) sind hochmolekulare Glykoproteine, deren Proteinanteil aus vier Aminosäureketten (zwei leichte („light chain“, L), zwei schwere („heavy chain“, H)) bestehen, welche durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [49] (s. Abb. 2).

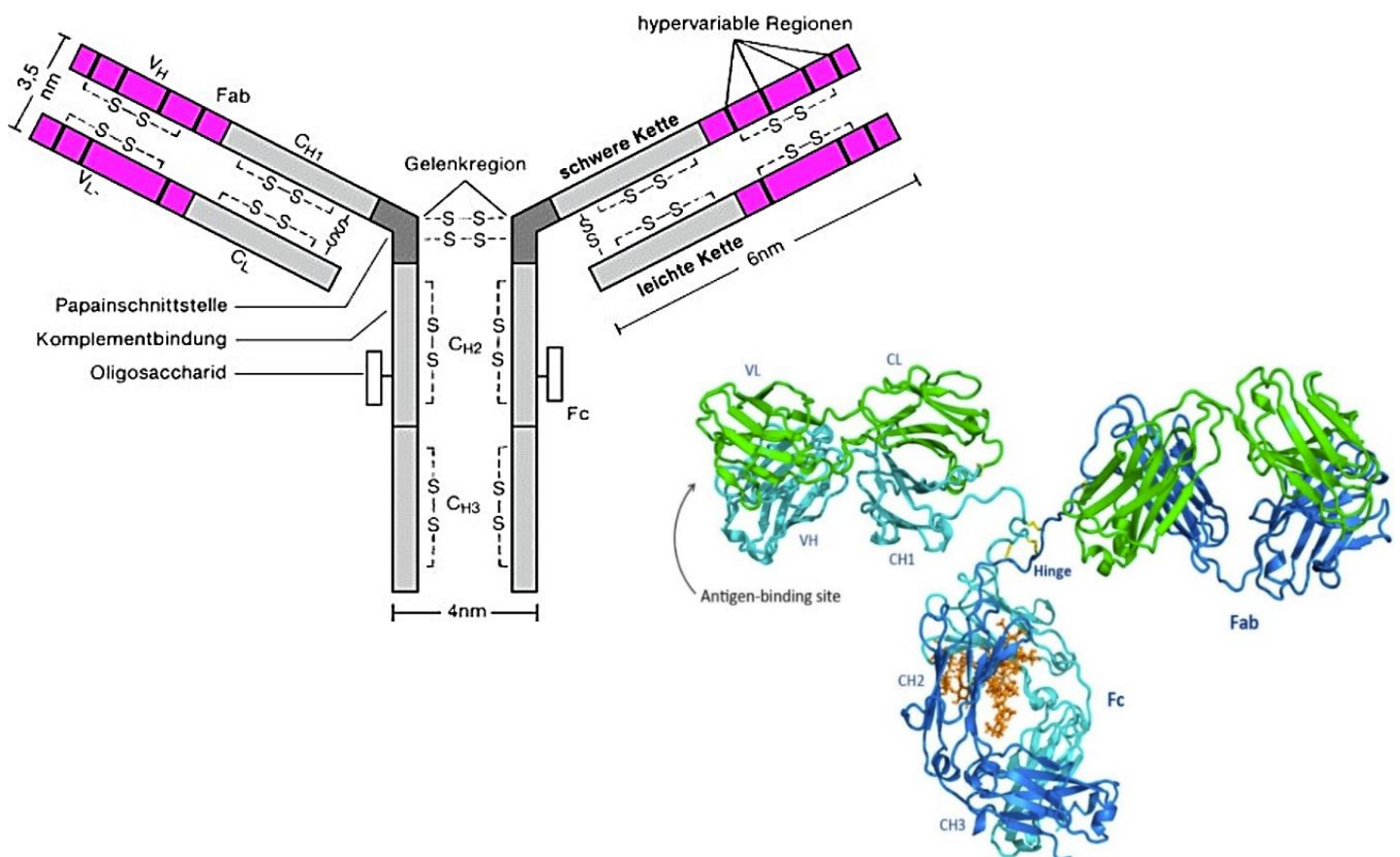


Abb. 2: Schematische (links) und dreidimensionale Darstellung (rechts) eines intakten IgG-Antikörpers [50,51]; Leichte Ketten grün, schwere Ketten blau, Oligosaccharide orange, Disulfidbrücken gelb

Innerhalb der Ketten befinden sich variable (V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>) und konstante (C<sub>H</sub>, C<sub>L</sub>) Domänen. Die variablen Domänen am Ende einer schweren und einer leichten Kette bilden die Antigenbindungsstellen („antigen-binding fragments“, Fab). Jede dieser variablen Domänen besitzt hypervariable Regionen („complementary determining regions“, CDR), die verantwortlich für die Bindungsspezifität eines mAbs sind. Die beiden schweren Ketten bilden das kristallisierbare Fragment („crystallizable fragment“, Fc), das den Isotyp des mAbs und die funktionellen Eigenschaften bestimmt.

Fc-vermittelte Funktionen von mAbs sind (s. Abb. 3):

- Bindung an Fc-Rezeptoren unterschiedlicher Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen, dendritische Zellen, Epithelzellen) → Phagozytose des Antikörpers („antibody-dependent cellular phagocytosis“, ADCP); Aktivierung von Immunzellen („antibody-dependent cellular cytotoxicity“, ADCC); Aktivierung der Zytokinproduktion
- Bindung an C1q des Komplementfaktors C1 → Aktivierung des Komplementsystems („complement dependent cytotoxicity“, CDC)
- Beeinflussung der Halbwertszeit von Antikörpern des IgG-Isotyps

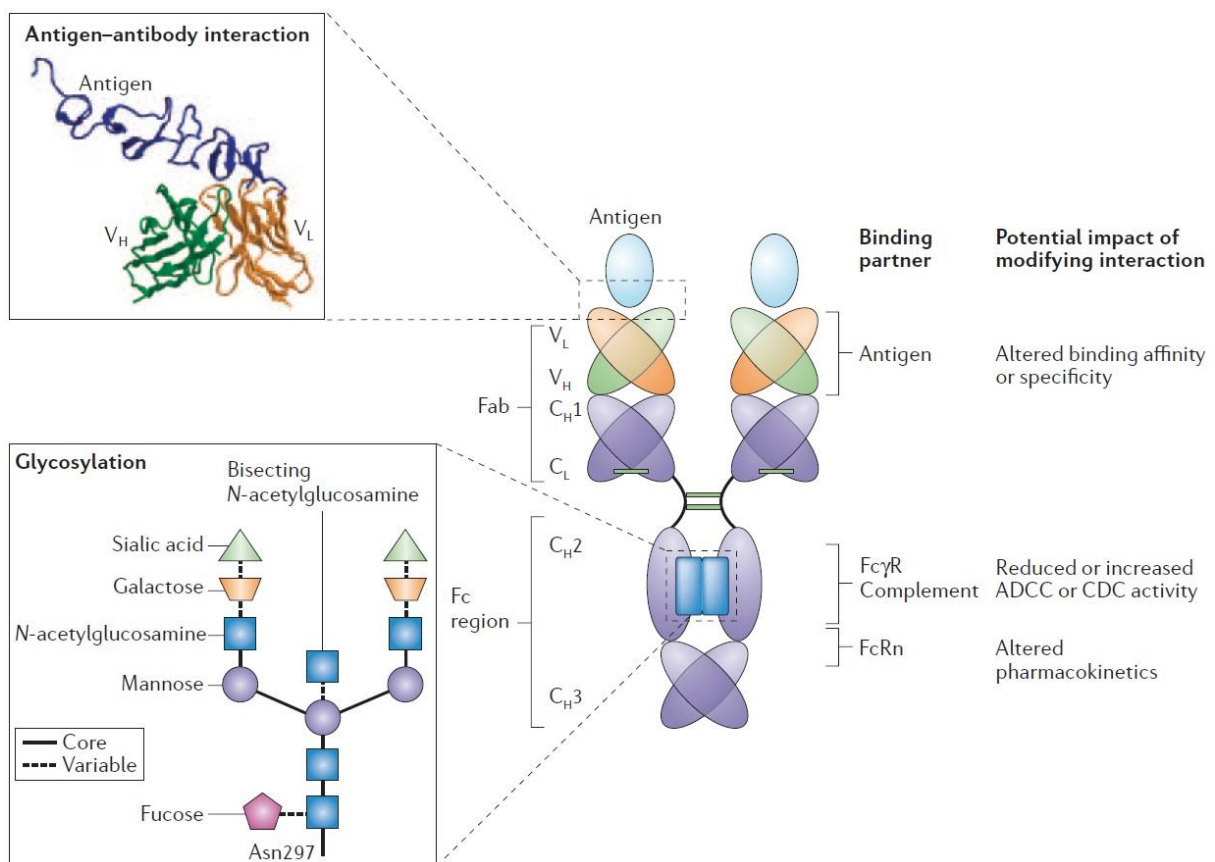


Abb. 3: Struktur und Funktion eines IgG-Antikörpers [52]

Therapeutisch werden Antikörper vom IgG-Typ genutzt, die in vier Subklassen (IgG1-IgG4) unterteilt werden. mAbs vom Subtyp IgG1 werden aufgrund ihrer hohen Stabilität und der potenten Effektor-Funktionen (ADCC, CDC, C1q-Bindung) am häufigsten therapeutisch eingesetzt [49]. mAbs werden biologisch hergestellt, ausgehend von einer zugelassenen Master-Cell-Bank mit Säugetierzellen als Wirtszellen. mAbs werden mittlerweile in einer Vielzahl von Indikationen eingesetzt, wobei die meisten Zulassungen im Bereich der Therapie von Autoimmunerkrankungen und malignen Erkrankungen zu finden sind [15]. Nach Ablauf

der Patentlaufzeit der Originator-Produkte können Biosimilar-Zulassungen (Nachfolgeprodukte von Biologika) beantragt werden. Die Nachfolgeprodukte werden mit einer anderen Wirt-Vektor-Kombination produziert, die auch Teil der Zulassung ist. Geringfügige Unterschiede (z.B. unterschiedliche post-translationale Glykosylierung, unterschiedliche Produktionsverfahren) können nicht ausgeschlossen werden [53]. Übliche HS in der Formulierung von mAbs sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Übliche Hilfsstoffe für mAb-Formulierungen und deren Funktion analog [54]

Hilfsstoffgruppe	Funktion	Beispiele
Puffersubstanzen	Sicherstellung des pH-Werts	Histidin-, Citrat-, Acetat- und Phosphatpuffer
Säuren, Laugen	pH-Einstellung	Salzsäure, Natriumhydroxid
Zucker	Isotonisierung, Stabilisierung, Kryoprotektion, Lyoprotektion	Saccharose, Trehalose
Salze	Isotonisierung, Stabilisierung	Natriumchlorid
Aminosäuren	Isotonisierung, Stabilisierung	Glycin, Arginin, Leucin, Prolin
Polyalkohole	Isotonisierung, Stabilisierung	Mannitol, Sorbitol
Konservierungsmittel	Konservierung	Benzylalkohol
Antioxidantien	Oxidationsschutz	Methionin
Tenside	Stabilisierung	Polysorbat 20, Polysorbat 80
Lösungsmittel	Lösungsvermittlung	Wasser für Injektionszwecke (WFI)
Sonstige	Stabilisierung	Humanes Serumalbumin

mAb-haltige FAM müssen in Europa der EMA Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products (EMA/CHMP/BWP/532517/2008 [55]) entsprechen. In der Guideline werden zum Beispiel Anforderungen an die physikalisch-chemische Charakterisierung, aber auch an die biologische Aktivität von mAbs aufgeführt. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität („d. h. die spezifische Fähigkeit oder Kapazität eines Produkts, eine bestimmte biologische Wirkung zu erzielen“ [55]) sollen geeignete in-vitro- (seltener in-vivo-) Tests durchgeführt werden. Der Wirkmechanismus und die Bedeutung von Effektor-Funktionen (ADCC, CDC, ADCP) des mAbs müssen im Hinblick auf Sicherheit und Wirksamkeit beschrieben werden. Anforderungen an biosimilare mAbs sind durch die EMA in der Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Monoclonal Antibodies – Non-clinical and Clinical Issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010 [56]) reguliert.

Auch bei mAb-haltigen Infusionslösungskonzentraten oder rekonstituierten Lyophilisaten/Trockensubstanzen wird die Aufbrauchfrist oftmals auf 24 – 48 Stunden limitiert.

Valide Stabilitätsdaten von Anbrüchen und RTA-Zubereitungen verringern Verwürfe und ermöglichen die Wiederverwendung von nicht applizierten Zubereitungen. Bei den hohen Kosten von mAb-haltigen FAM wird so die finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem massiv reduziert.

Die Untersuchung der Stabilität von mAb-Zubereitungen während der Zubereitung, Lagerung und Applikation ist hochkomplex und erfordert spezifisches Wissen, umfangreiches Equipment und beträchtliche finanzielle Ressourcen [15].

Methoden zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität von mAb-Zubereitungen müssen ausreichend spezifisch und sensitiv sein, um Veränderungen der Zubereitung in Art und Menge über die Zeit zu detektieren. Die Methodvalidierung erfolgt entsprechend den Vorgaben der ICH Guidelines [33].

Die Untersuchung der Stabilität von mAb-haltigen FAM wird von pharmazeutischen Unternehmen entsprechend der ICH Guideline ICH Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products durchgeführt [57]. Auch für Stabilitätsuntersuchungen biopharmazeutischer Zubereitungen (inklusive mAb-Zubereitungen) liegen Empfehlungen von pharmazeutischen Expertengruppen vor [15,24,26]. Als Spezifikationen wurden Akzeptanzkriterien wie zum Beispiel der Verlust von aktivem Protein  $\leq 5\%$ , Fläche der Peaks von AP  $\leq 2\%$  relativ zum Hauptpeak und Änderung des pH-Werts  $\leq 0,5$  Einheiten definiert [26]. Informationen über spezifische Parameter geeigneter Methoden (z.B. Art der HPLC-Säule, Fließmittelzusammensetzung, Fließmittelgradient, Detektionswellenlänge) können den Originalpublikationen entnommen werden. In WS-Monographien und/oder AM-Monographien aus Pharmakopöen kann ebenfalls nach geeigneten Methoden recherchiert werden [58].

Die Effektivität und Toxizität von mAb-AM hängt nicht nur von der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) sondern auch von ihrer dreidimensionalen Struktur (Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur; s. Abb. 4) ab [15].

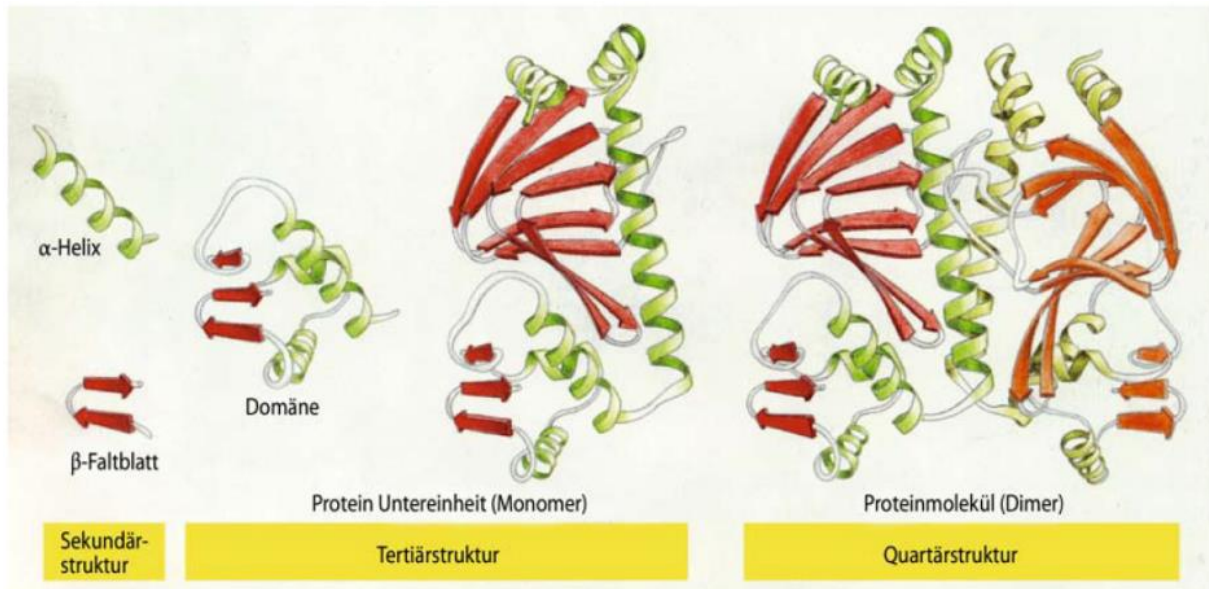


Abb. 4.: Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur von mAbs [59]

Sie können einer Vielzahl von Instabilitätsreaktionen unterliegen, die in physikalische und chemische Instabilitäten unterteilt werden. Unterschiedliche Bedingungen (pH-Wechsel, Licht (vor allem UV-Licht), Temperaturschwankungen, Sauerstoffexposition, mechanischer Stress, Exposition hydrophober Oberflächen, Verdünnung stabilisierender HS) verursachen unterschiedliche Abbaureaktionen [49,60-64]. Bereits milder physikalischer/chemischer Stress ist ausreichend, um Konformationsänderungen zu erzeugen. Im Rahmen einer Stabilitätsuntersuchung müssen alle Instabilitäten mit geeigneten Methoden erfasst werden.

## **Physikalische Instabilität**

Physikalische Instabilitätsreaktionen treten bei komplexen mAbs mit höherer Wahrscheinlichkeit auf als bei chemisch hergestellten WS [14]. Die wichtigsten physikalischen Instabilitätsreaktionen sind Aggregation, Denaturierung, Präzipitation und Adsorption an Oberflächen [14,15,49,60]. Laut Expertenkonsens sollen zur Bestimmung der physikalischen Stabilität von mAb-Zubereitungen unterschiedliche, komplementäre Methoden angewendet werden, die mindestens die Turbidimetrie und die Größenausschlusschromatographie (size-exclusion chromatography, SEC) beinhalten [14].

### *Aggregation*

Bei der Aggregation entstehen neue Spezies mit höherem Molekulargewicht aus nativen und gefalteten Proteinen [65]. Anhand der zugrunde liegenden Bindungstypen können zwei Arten von Aggregaten unterschieden werden. Selbst-assoziiierende/physikalische Aggregate entstehen unter Erhalt der Primärstruktur durch nicht-spezifische Bindungen wie Van-der-Waals Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophoben und elektrostatischen Interaktionen. Kovalente Aggregate entstehen durch kovalente Bindungen wie Disulfidbindungen [65,66]. In beiden Fällen können lösliche Aggregate oder nicht-lösliche, präzipitierende Aggregate entstehen. Aggregatbildung wird zum Beispiel begünstigt durch mechanischen Stress, Erniedrigung/Erhöhung der Temperatur, Verdünnung stabilisierender/protektiver HS, hohe Proteinkonzentrationen oder Materialien mit Weichmachern und Silikonölen, aber auch durch chemische Instabilitäten wie Veränderung des pH-Werts [14,15,24,26,49].

Aggregatbildung in applikationsfertigen mAb-Zubereitungen haben massive Auswirkungen auf die Sicherheit und Wirksamkeit [14,49,60,61]. Es können immunologische Reaktionen wie Hypersensitivität und Anaphylaxie resultieren. Das Ausmaß der Reaktion ist dabei abhängig von der Aggregatgröße, dem Glykosylierungsmuster, dem mAb-Ursprung und der Anwesenheit von Verunreinigungen [67]. Aggregate können zusätzlich als Antigene erkannt werden und die Bildung von antidrug antibodies (ADAs) verursachen. ADAs können zum Beispiel den Verlust der Wirksamkeit und eine erhöhte Toxizität bedingen [68].

Die Tendenz zur Aggregation ist abhängig von der Hydrophobizität des Monomers sowohl im nativ gefalteten Zustand als auch nach Entfaltung. In wässrigen Lösungen sind hydrophile Komponenten von Proteinen üblicherweise nach außen und hydrophobe nach innen gerichtet. Stabilisiert wird dieser Zustand durch den Zusatz nichtionischer Tenside, Histidin, Arginin und Salzen [69,70]. Bei der Entfaltung von Proteinen gelangen hydrophobe Reste an die Oberfläche und sind so anfällig für Wechselwirkungen mit benachbarten Monomeren, mit Luft sowie Oberflächen von Primärbehältnissen, Spritzen und Applikationsvorrichtungen. Daraus resultieren Aggregate in unterschiedlichen Strukturen und in Größen von 10 nm bis 25 µm

[15]. Somit müssen unterschiedliche Verfahren kombiniert werden, um Aggregate jeder Größe zu erfassen [14].

### *Denaturierung*

Bei der Denaturierung verlieren Proteine durch Verlust stabilisierender Bindungswechselwirkungen [26] ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur. Die strukturellen Änderungen können bei mAbs zu einem kompletten Verlust ihrer Wirksamkeit, zu verringerter Flexibilität in der Gelenkregion und zu einer verstärkten Aggregationstendenz führen [63].

Die Denaturierung von mAb-Zubereitungen kann durch pH-Wert-Änderungen oder Temperaturschwankungen induziert werden. Dabei können sowohl sehr hohe als auch sehr niedrige Temperaturen wie beim Einfrieren die Denaturierung von mAb-Zubereitungen hervorrufen [49]. Des Weiteren wurde Denaturierung vermehrt beobachtet, wenn mAbs nach der Adsorption an Oberflächen wieder desorbiert sind [71,72]. Auch protektive HS wie Polysorbate, die mAbs vor Aggregation und Adsorptionsphänomenen schützen, können durch Bindung der Fab-Region das Denaturierungsrisiko für mAbs erhöhen [73].

### *Präzipitation*

Unter bestimmten Umständen (z.B. pH-Wert-, Temperatur-Abweichungen, Verdünnung protektiver HS) können Aggregate präzipitieren und nicht lösliche Partikel bilden. Diese können rein aus Protein bestehen oder heterogen zusammengesetzt (mit HS, leachables, Verunreinigungen) sein [49]. Für pharmazeutische Zubereitungen sind wegen der Toxizität Grenzwerte für Partikel  $\geq 10 \mu\text{m}$  und  $\geq 25 \mu\text{m}$  in der Ph. Eur. festgelegt [40].

### *Adsorption*

Adsorptionsphänomene können in applikationsfertigen mAb-Zubereitungen sowohl das therapeutische Protein als auch HS wie Puffer, Tenside und Konservierungsmittel betreffen. Aus Adsorption resultierende, verminderte HS-Konzentrationen können die Stabilität von mAb-Zubereitungen verringern [49]. mAbs selbst besitzen als oberflächenaktive Moleküle die Tendenz besonders an hydrophobe Oberflächen und Grenzflächen zu adsorbieren [74,75]. Diese Form der Instabilität betrifft mAbs sowohl in ihrem nativen als auch partiell entfaltetem Zustand. Da durch Entfaltung hydrophobe Reste von Aminosäureseitenketten exponiert werden, ist die Adsorption in diesem Zustand energetisch begünstigt [60]. Nach initialer Adsorption können Oberflächenspannungskräfte an unterschiedlichen Grenzflächen entstehen. Diese begünstigen die Aggregation von mAbs durch die Beeinträchtigung ihrer strukturellen Integrität [60]. Die Adsorption als Instabilität ist vor allem relevant bei stark verdünnten mAb-Zubereitungen mit niedrigen mAb-Konzentrationen, da hier ein inakzeptabler WS-Verlust und eine daraus resultierende Unterdosierung schneller auftreten können [69,76].

Je nach verwendeten Materialien sind Adsorptionsreaktionen unterschiedlich stark ausgeprägt. Als Primärpackmittel für AM werden üblicherweise Vials aus Typ I Glas (Borosilikat) verwendet. Obwohl dieses Material nahezu inert ist, kann es durch elektrostatische Interaktionen zur Bindung größerer Proteinmengen kommen [75]. Bei der Herstellung patientenindividueller Zubereitungen werden mAbs applikationsfertig in geeigneten Trägerlösungen verdünnt oder unverdünnt aufgezogen/portioniert [77,78]. Infusionsbeutel und Administrationsvorrichtungen aus Polyolefin (PO) sollten dabei PVC-haltigen Materialien vorgezogen werden, da sie ein geringeres Adsorptionspotential aufweisen [79]. Das Adsorptionspotential PVC-haltiger Materialien kann durch Zugabe von Polysorbat 20 reduziert werden. Allerdings begünstigen Polysorbate die Migration (leaching) von Weichmachern aus PVC [80]. Leaching kann weiterhin durch Temperaturschwankungen und Photodegradation verstärkt werden [81]. Die daraus resultierenden, neuen Oberflächen erhöhen das Risiko von mAb-Verlusten durch Adsorption.

Das Risiko von Adsorptionsreaktionen besteht in mAb-haltigen Zubereitungen ebenfalls an der Luft-Wasser Grenzfläche. Da Luft stärker hydrophob ist als Wasser, kommt es zur Ausbildung einfacher Proteinschichten [66]. Eine Zerstörung dieser Schicht (z.B. durch mechanischen Stress) kann zu Proteinaggregationen führen [74]. Dieses Risiko kann durch die Entfernung überschüssiger Luft aus den fertigen Infusionsbeuteln reduziert werden [82].

Organische Substanzen wie Silikonöl (Spritzengleitmittel) können mit mAbs viskoelastische Gelschichten durch nicht-kovalente Wechselwirkungen ausbilden [49]. Die Entwicklung der Proteinschichten wird mit steigender Proteinkonzentration beschleunigt. Eine Zerstörung fördert die Bildung von Aggregaten und nicht-sichtbaren Partikeln [74,83].

Um Patienten vor potentiell sichtbaren und nicht-sichtbaren Aggregaten und Partikeln zu schützen, erfolgt die Applikation patientenindividueller mAb-Zubereitungen oftmals über In-Line-Filter. Die verwendeten Filtersysteme besitzen hydrophile Polyethersulfon (PES)-Filtermembranen mit niedriger Proteinbindungskapazität. Proteinadsorption an Filtern stellt bei der Verwendung geeigneter Filter kein Risiko dar [84].

Eine Strategie zur Verhinderung von Adsorptionsreaktionen an Oberflächen von Behältern/Materialien stellt das sogenannte Coating/Oberflächenneutralisierung dar. Dabei werden Oberflächen mit Polymeren (z.B. Oligo(ethylene glycol), poly(ethylene oxide)) behandelt und dadurch für Adsorptionsreaktionen inaktiviert [85].



## **Chemische Instabilitäten**

Die wichtigsten chemischen Instabilitätsreaktionen von mAbs sind Deaminierung, Oxidation, Hydrolyse, Glykierung und die Spaltung von Disulfidbrücken [14,15,49,60]. In Abhängigkeit von der Lokalisation können sie Konformationsänderungen und Protein-Aggregationen verursachen [86]. Laut Expertenkonsens soll die chemische Stabilität von mAb-Zubereitungen mindestens durch drei separate Techniken wie Ionenaustauschchromatographie (ion-exchange chromatography, IEC), SEC und Peptid-Mapping mit vorgeschalteter Separation mittels HPLC bestimmt werden [14]. Alternative Methoden wie CE oder MS können ebenfalls angewendet werden.

### *Deaminierung*

Die Deaminierung stellt die wichtigste, temperaturabhängige Abbaureaktion von Proteinen dar [15]. Dabei werden Amidfunktionen vor allem von Asparagin- und weniger von Glutaminresten hydrolysiert [26,49]. Die daraus resultierende Asparaginsäure kann zyklisieren und anschließend isomerisieren oder wieder hydrolysiert werden. Aufgrund der sinkenden negativen Gesamtladung erniedrigt sich durch Deaminierung der isoelektrische Punkt (pI) von mAbs [87], was eine veränderte Pharmakokinetik zur Folge haben kann [88]. Neben erhöhten Temperaturen [66,89] sind erhöhte pH-Werte für eine vermehrte Deaminierung verantwortlich und verstärken ferner das Aggregationspotential von mAbs [66,89-91].

Je nach Lokalisation haben Deaminierungsreaktionen unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Sicherheit und Wirksamkeit von mAbs. Im Fc-Fragment scheinen negative Auswirkungen relativ gering, wohingegen Deaminierung in den CDR-Regionen der Fab-Fragmente zu einer Reduktion der Bindungsaffinität und verminderter Wirksamkeit führen können [92].

### *Oxidation*

Bei der Oxidation handelt es sich um eine der häufigsten chemischen Abbaureaktionen [49]. Auslöser für Oxidationsreaktionen sind zum Beispiel pH-Wert-Änderungen und Oxidantien wie Peroxide, Licht und Metalle oder eine spontane Autoxidation [63,66,93]. Licht und Sauerstoff oxidieren vor allem Methionin-, Cystein-, Lysin-, Histidin- und Tryptophanreste. Eine durch Licht induzierte Oxidation wird als Photooxidation bezeichnet und findet bevorzugt an aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan statt. Photooxidationen können Radikalbildung, Fragmentierung und Quervernetzungen in mAbs verursachen [94]. In Lösungen mit inadäquatem pH-Wert werden überwiegend Methionin- und Tryptophanreste oxidiert [26]. Oxydierte Methioninreste können mAb-Sekundärstrukturen destabilisieren [95] und die Bildung und Zerstörung von Disulfidbindungen begünstigen [66]. In beiden Fällen entstehen

Fragmente oder entfaltete/fehlgefaltete mAbs, die eine veränderte Konformation und/oder ein erhöhtes Aggregationspotential aufweisen können [49].

Im Gegensatz zur Deaminierung führen Oxidationen in mAbs zu einem Anstieg der positiven Gesamtladung und damit zu einer Erhöhung des pI [49]. Analog zur Deaminierung können Oxidationsreaktionen in der CDR-Region von Fab-Fragmenten ebenfalls die Bindungsaffinität und Wirksamkeit reduzieren [49]. Darüber hinaus können Änderungen in Fc-Fragmenten eine verminderte Affinität von Makrophagen und erhöhte mAb-Passivierung verursachen [86,96]. Zum Schutz vor Oxidation sollten applikationsfertige mAb-Zubereitungen in Behältnissen mit geringer Sauerstoffpermeabilität hergestellt und überschüssige Luft aus den fertigen Zubereitungen entfernt werden.

### *Hydrolyse*

Von hydrolytischer Spaltung sind in mAb-Zubereitungen vor allem Asparagin und Asparaginsäurereste betroffen. Die Reaktion erfolgt vermutlich über ein intermediär gebildetes Succinimid [49]. Hydrolysereaktionen entstehen in mAb-Zubereitungen überwiegend spontan bei Bedingungen, die stark von der Norm abweichen (z.B. bei sehr hohen Temperaturen, in stark saurem Milieu) [15,63,87]. Durch eine geeignete Formulierung sind mAbs ausreichend vor Hydrolyse geschützt [87].

### *Glykierung*

Von Glykierung, auch bekannt als Maillard-Reaktion, sind in mAbs überwiegend Lysinreste betroffen [26]. Bei der Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und mAbs bildet sich über eine Schiff'sche Base ein stabiles Ketoamin, das die Struktur und Funktion des betroffenen mAbs beeinflussen kann [66,97]. Zur Vermeidung dieser Instabilität werden mittlerweile überwiegend nicht-reduzierende Zucker als HS verwendet, die jedoch zu reduzierenden Zuckern abgebaut werden können [98].

### *Disulfidbrückenspaltung/-bildung*

Disulfidbrücken beeinflussen entscheidend das Faltpattern und die strukturelle Stabilität von mAbs [99]. Durch Spaltung oder Neubildung von Disulfidbrücken kann die mAb-Stabilität erheblich vermindert werden.

Instabilitäten in Disulfidbrücken werden vor allem durch Licht (Photodegradation) und Sauerstoff induziert [26]. Die Spaltung von Disulfidbrücken führt zu Fragmentierung, bei der leichte und schwere Ketten des mAb komplett voneinander getrennt sein können [63]. Eine Neubildung kann durch die Oxidation von Cysteinresten über die Bildung eines Thiolatanion-Zwischenproduktes erfolgen [66]. Eine daraus resultierende Neuordnung von Disulfidbrücken kann wiederum Fragmentierung verursachen [26].

Geeignete Methoden zur Stabilitätsbestimmung von mAbs und Abbauprodukten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tab. 4: Auswahl an Methoden zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität von punktierten/rekonstituierten mAb-FAM und RTA mAb-Zubereitungen basierend auf [14,15,24,26,49]

Analysenmethode	Analyseprinzip	Detektierbare Instabilitäten	Besonderheiten
<b>Farbe und Klarheit</b>			
Turbidimetrie	Messung der Abnahme der Lichtintensität (Extinktion) eines Lichtstrahls beim Durchdringen einer Lösung bei 350 nm, 550 nm.	Mikroaggregate (Bildung häufig lagerungsbedingt).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einfach implementierbar</li> <li>• Nur für leicht opaleszierende Lösungen geeignet</li> </ul>
<b>Sichtbare Partikel</b>			
Sichtprüfung analog „Particulate contamination: Visible particles“; Ph. Eur. 2.9.20.	Beobachtung einer Lösung vor einer weißen und einer schwarzen Platte.	Partikel $\geq 100 \mu\text{m}$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einfach implementierbar</li> <li>• Stark abhängig von der durchführenden Person</li> </ul>
<b>Nicht-sichtbare Partikel</b>			
Laserlichtblockade (light obscuration particle count; Ph. Eur. 2.9.19.)	Abschwächung eines Lichtstrahls, der durch eine Durchflussküvette auf eine Photozelle fällt, durch Partikel. Spannungsabnahme durch Lichtblockade proportional zur Fläche des Partikelschattens.	Partikel 1 – 150 $\mu\text{m}$ (üblicherweise $\geq 10 \mu\text{m}$ , $\geq 25 \mu\text{m}$ ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Großes Probenvolumen</li> <li>• Nach USP &lt;787&gt; Durchführung mit geringeren Volumina möglich</li> </ul>
Lichtmikroskopische Verfahren (microscopic particle count test; Ph. Eur. 2.9.19.)	Messung des Kreisdurchmessers (projected area diameter). Größenklassifizierung durch Okularmikrometer mit Fadenkreuz-Zählfeld.	Partikel 1 – 150 $\mu\text{m}$ (üblicherweise $\geq 10 \mu\text{m}$ , $\geq 25 \mu\text{m}$ ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morphologische Charakterisierung von Aggregaten</li> <li>• Nur geringe Volumina testbar</li> </ul>
Dynamische Lichtstreuung (dynamic light scattering, DLS)	Messung des hydrodynamischen Durchmessers durch die optische Detektion der Brownschen Molekularbewegung von Partikeln in einer Flüssigkeit;	Bildung löslicher, nicht-löslicher Aggregate mit hohem Molekulargewicht (0,3 nm -10 $\mu\text{m}$ ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedriges Probenvolumen</li> <li>• Sehr schnell</li> <li>• Große Bandbreite an Partikelgrößen, -konzentrationen detektierbar</li> </ul>

	Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit von der Zeit detektierbar.		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ungeeignet für sehr hohe/sehr niedrige Partikelkonzentrationen</li> </ul>
Durchflussmikroskopie (Flow imaging microscopy, FIM, auch Microflow Imaging)	Aufnahme von Hellfeldbildern bei kontinuierlichem Probenstrom durch eine Durchflusszelle. Quantifizierung von Partikeln nach Größe und Anzahl durch Analysesoftware.	Partikel $\geq 1 \mu\text{m}$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedriges Probenvolumen</li> <li>• Detektion durchsichtiger Partikel</li> <li>• Ermöglicht Partikelcharakterisierung (rein proteinös, gemischt mit Verunreinigungen)</li> <li>• Proben sind Scherkräften ausgesetzt</li> <li>• Nach USP &lt;1787&gt; orthogonale Technik zur Laserlichtblockade</li> </ul>
<b>Aggregatdetektion</b>			
Größenausschlusschromatographie (SEC)	Trennung von Molekülen anhand ihres hydrodynamischen Volumens; Gelöste Moleküle durchlaufen eine HPLC-Säule mit Gel-Matrix. Größere Moleküle diffundieren weniger in Poren und werden früher eluiert.	Fragmente, Aggregate (Lösliche Dimere/Oligomere).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualifizierung/Quantifizierung von Protein-Monomeren neben Abbauprodukten</li> <li>• Kompatibel mit vielen Detektoren</li> <li>• Änderungen des Molekulargewichts <math>\leq 10\%</math> nicht detektierbar</li> <li>• Nicht verwendbar für große Aggregate</li> </ul>
SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	Denaturierte Polypeptidketten wandern entlang einer elektrischen Spannung durch ein Polyacrylamid-Gel. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der jeweiligen Größe und Ladung der Polypeptidketten und führt zu einer Auftrennung. Die Polypeptidketten können abschließend durch Färbung	Unspezifische Detektion von mAb-Abbau.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualifizierung, Reinheitsbestimmung, Größenmessung</li> <li>• Sensitivität abhängig von der Proteinfärbung (Färbung mit Silber besser als mit Coomassie Blau)</li> </ul>

	(Coomassie, Silber) oder immunologisch (Western Blot) sichtbar gemacht werden.		
Second-derivative UV spectroscopy	Messung der UV-Absorption von aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan). Detektion der Änderung des Emissionsspektrums (z.B. Tryptophan 332 nm (gefaltet); 352 nm (voll entfaltet)).	Kleine Modifikationen der Tertiärstruktur (z.B. Entfaltung).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einfach implementierbar</li> <li>• Nicht Separative Technik</li> <li>• Störende HS in mAb-FAM erschweren Interpretation der Ergebnisse</li> </ul>
<b>Chemische Stabilität</b>			
Ionenaustausch-chromatographie (IEC), in Proteinanalytik überwiegend Kationenaustausch-chromatographie (CIEX)	Trennung anhand von elektrostatischen Wechselwirkungen der Probenmoleküle mit der stationären Phase. Trennung bei Proteinspezies wegen unterschiedlicher pI. Saure Ladungsvarianten eluieren vor dem Hauptpeak und basischen Varianten.	Abbau von Aminosäureseitenketten z.B. durch Deaminierung (Peaks saurer Ladungsvarianten↑), Oxidation (Peaks basischer Ladungsvarianten↑).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Goldstandard der Proteinanalytik</li> <li>• Separative Technik</li> <li>• Nicht kompatibel mit MS</li> </ul>
Peptid-Mapping	Enzymatische Spaltung von mAbs in spezifische Peptide. Anschließend Separation mittels HPLC.	Veränderungen der Primärstruktur durch Deaminierung, Oxidation.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Separative Technik</li> <li>• Empfindlich gegenüber Umweltveränderungen</li> </ul>
<p>Weitere Untersuchungsmethoden:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pH-Wert-Bestimmung</li> <li>• HS-Konzentration (wenn HS relevant für die Wirkung wie z.B. Penetrationsvermittler bei subkutan zu applizierenden mAbs)</li> </ul> <p>Weitere Untersuchungen (falls durch individuelles Risikoprofil der Zubereitung erforderlich)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Feuchtigkeitsverlust (bei RTA-Zubereitungen)</li> <li>• Leachables</li> </ul>			

## 1.5 Mikrobiologische Stabilität von applikationsfertigen Parenteraliazubereitungen

Mikrobiologische Stabilität applikationsfertiger Parenteraliazubereitungen bedeutet, dass die Sterilität der Ausgangssubstanzen über den Zeitraum der aseptischen Zubereitung, der Lagerung und der Applikation erhalten bleibt. Mit Mikroorganismen (MO) oder Endotoxinen kontaminierte Zubereitungen können zu Infektionen, SIRS (Systemic Inflammatory Response-Syndrom)/Sepsis und einer erhöhten Sterblichkeit bei Patienten führen. Um dies zu vermeiden, sind die strikte Einhaltung der „Good Preparation Practice“ (GPP) und die aseptische Zubereitung unter kontrollierten Bedingungen notwendig. Das Risiko einer mikrobiellen Kontamination ist von intrinsischen (z.B. Nährstoffgehalt, Wasseraktivität, pH-Wert) und extrinsischen Faktoren (z.B. Zubereitungsprozess, Reinraumumgebung, Qualifikation des Personals) abhängig. Die Komplexität einer Zubereitung (z.B. multiple Ausgangsmaterialien, multiple Manipulationen, Mischen großer Volumina), manuelle Zubereitung, zeitlicher Abstand zwischen Zubereitung und Applikation sowie die individuellen, wachstumsfördernden Eigenschaften der verwendeten Komponenten sind weitere Risikofaktoren mikrobieller Kontamination.

### *Wachstumseigenschaften von Parenteraliazubereitungen*

Die wachstumsfördernden oder wachstumshemmenden Eigenschaften parenteraler Zubereitungen (z.B. Zytostatikazubereitungen, Katecholaminzubereitungen, Mischinfusionslösungen zur parenteralen Ernährung) lassen sich durch mikrobielle Belastungstests bestimmen. Dazu wird die Viabilität (Lebensfähigkeit) und Vermehrungsfähigkeit von Mikroorganismen in den pharmazeutischen Zubereitungen untersucht. Die Untersuchung kann analog zur Prüfung auf ausreichende antimikrobielle Konservierung (Ph. Eur. 5.1.3 [100]) durchgeführt werden. Die infrage gestellten Zubereitungen, die frei von Konservierungsmitteln sind, werden mit ausgewählten, fakultativ pathogenen Keimen in niedrigen Konzentrationen ( $10^2$ - $10^5$ /mL, entsprechend einer versehentlichen Kontamination) inokuliert. Zu festgelegten Zeitpunkten werden Proben entnommen und die Zahl der vermehrungsfähigen koloniebildende Einheiten (KBE) bestimmt. Nach Metcalfe [101] soll die Ausgangskonzentration bei diesen Untersuchungen  $\leq 100$  KBE/mL Testkeime betragen und alle Zu-/Abnahmen  $\geq 0.5$  log evaluiert werden. In umfangreichen Untersuchungen [102-119] konnte festgestellt werden, dass nur wenige Zubereitungen antimikrobielle Eigenschaften haben. In vielen Zubereitungen bleiben die Keime lebensfähig, vermehren sich aber nicht mehr als in den Kontrolllösungen bestehend aus 0,9% NaCl Lösung oder G5. Dies gilt auch für Antikörper- und sonstige proteinhaltige Zubereitungen [15,102]. Eine rasche Vermehrung der inokulierten Mikroorganismen zeigt sich

erwartungsgemäß in Lipidemulsionen und lipidhaltigen Zubereitungen [107,120]. Am ehesten vermehren sich gram-negative Bakterien in Parenteralia. Am häufigsten stand *B. cepacia* im Zusammenhang mit AM-Rückrufen [121].

Die mikrobiologische Stabilität der applikationsfertigen Zubereitungen ist von der Dichtheit der Primärbehältnisse abhängig. Neben der primären Kontamination während des Zubereitungsprozesses kann Undichtigkeit Ursache einer sekundären Kontamination sein. In der Regel werden sterile, leere oder vorgefüllte Infusionsbeutel und leere Plastikspritzen, die mit einem Kombiverschluss versehen werden, als Primärbehältnisse eingesetzt. Die Integrität der Behältnisse kann mit mikrobiologischen Methoden (Füllen mit Nährmedien und Eintauchen in Bakteriensuspensionen) und/oder mit physikalischen Methoden (Eintauchen in Farblösungen) untersucht werden [122]. Ergebnisse von experimentellen Untersuchungen dürfen übernommen werden, wenn die gleiche Spritzen-Verschluss-Kombination eingesetzt wird. Die Dichtigkeit von Infusionsbeuteln kann auch mit Farblösungen (z.B. Toluidinblau) geprüft werden. Diese Methode ist auch für Routinekontrollen geeignet.

#### *Sterilitätsprüfung von Parenteraliazubereitungen*

Die Prüfung auf Sterilität nach Ph. Eur. 2.6.1 [123] ist eine qualitative Methode auf An- oder Abwesenheit von Mikroorganismen, die durch wachstumsbedingte Veränderungen in einem Kulturmedium nachgewiesen wird. Diese Prüfung ist als zerstörende Prüfung zur Qualitätskontrolle von aseptisch hergestellten Einzelzubereitungen nicht geeignet. Zudem ist der Chargenbegriff im Hinblick auf die Homogenität der Produkte und die Mindestanzahl der zu prüfenden Einheiten nicht übertragbar. Ein weiteres Problem stellt die 14-tägige Inkubationszeit der Kulturmedien dar. Die verzögerte Verfügbarkeit der Untersuchungsergebnisse kollidiert mit der zeitnahen Verwendung und teilweise sehr kurzen Verwendbarkeit der patientenbezogenen Zubereitungen. Zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität und der Chance, früher Ergebnisse für Korrekturmaßnahmen zu erhalten, können entsprechend Ph. Eur. 5.1.6 [124] alternative Methoden eingesetzt werden, die zu validieren sind. Die Methoden werden auch als Rapid Microbiological Methods bezeichnet, was auf die raschere Verfügbarkeit der Ergebnisse hindeutet. Eine im Rahmen der Parenteraliazubereitung häufig genutzte alternative Methode ist die Aliquotmethode (5 mL, 10 mL) mit Direktbeschickung von Blutkulturflaschen (parallel aerob, anaerob), die in Automaten bebrütet werden und Wachstum durch Bildung von CO<sub>2</sub> und dessen Detektion angezeigt wird. Erste Ergebnisse stehen nach 24-48 Stunden zur Verfügung. Die maximale Bebrütungszeit beträgt 14 Tage, um auch langsam wachsende Mikroorganismen identifizieren zu können. In Krankenhäusern weit verbreitete Systeme sind BacT/Alert und BACTEC. Deren Eignung als Sterilitätskontrolle ist beschrieben [125-127], allerdings ist die statistische Validität wegen des Standardprobevolumens und der niedrigen KBE-Konzentrationen, die aus der



versehentlichen Kontamination resultieren, eingeschränkt. Das Ergebnis der Sterilitätsprüfung als Freigabekriterium spielt bei der aseptischen Parenteraliazubereitung nur eine Rolle, wenn auf Vorrat hergestellt wird und lange Aufbewahrungszeiten vorgesehen sind.

Die Prüfung auf Endotoxine ist für Parenteraliazubereitungen als Endproduktkontrolle nicht routinemäßig erforderlich, da in der Regel auf Endotoxine geprüfte FAM als Ausgangsmaterialien eingesetzt werden.

#### *Nährmediensimulation bei der Parenteraliazubereitung*

Zur Sicherung der mikrobiologischen Stabilität müssen Personal- und Prozessvalidierungen mit Nährmedien durchgeführt werden. Anstelle der üblichen Ausgangsmaterialien wird der Zubereitungsprozess mit flüssigen Nährmedien simuliert und diese anschließend inkubiert. Die Nährmediensimulation kann auf unterschiedliche Art durchgeführt werden [vgl. 18,19,27].

## 1.6 Gute Praxis der Haltbarkeitsdeterminierung aseptisch hergestellter applikationsfertiger Parenteralia

Gemäß der Ph. Eur. Monographie 2619 muss für pharmazeutische Zubereitungen im Rahmen der Risikobeurteilung die Stabilität evaluiert werden. Der Apotheker ist für die Qualität der hergestellten applikationsfertigen Parenterialiazubereitungen verantwortlich und muss gewährleisten, dass die Zubereitung *„während der Haltbarkeitsdauer von angemessener Qualität und für ihren Zweck geeignet bleibt“*. Für auf Vorrat hergestellte Zubereitungen (DefekturAM) müssen Lagerungsbedingungen und Haltbarkeitsdauer auf Basis von analytischen Daten oder fachlicher Expertise, die durch Literaturnachweise gestützt sein kann, begründet werden [17]. Wenn Ergebnisse von experimentellen Untersuchungen zur Haltbarkeit vergleichbarer Zubereitungen publiziert sind, können diese zur Festlegung des Verwendbarkeitsdatums herangezogen werden [128]. In §14 ApBetrO ist die Kennzeichnung der Zubereitungen konkretisiert und vorgegeben, dass eine Verwendbarkeitsfrist mit dem Hinweis „verwendbar bis“ unter Angabe von Tag, Monat und Jahr erfolgen muss.

Außer in der USP [28] gibt es keine regulatorischen Festlegungen zur generellen Begrenzung der Haltbarkeit der Parenterialiazubereitungen. In der Praxis wird die Haltbarkeit der Zubereitungen risikoadaptiert empirisch festgelegt. Wenn die physikalisch-chemische Stabilität experimentell belegt ist, ist die mikrobiologische Stabilität für die empirische Festlegung des Verwendbarkeitsdatums entscheidend. Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität werden für rezepturmäßig hergestellte Parenterialiazubereitungen meistens über maximal 28 Tage durchgeführt. Für chargenmäßig hergestellte Zubereitungen sind auch längere Zeiträume wie 3, 6 oder 12 Monate von Interesse. Zur Evaluierung der mikrobiologischen Stabilität können die Ergebnisse der Prozessvalidierung (Nährmedienabfüllungen, Sterilitätsprüfungen) und der Integritätstests während der Validierungsphase herangezogen werden. Wenn eine chargenmäßige Zubereitung aus derselben Bulklösung erfolgt, soll für jede Charge eine Sterilitätsprüfung durchgeführt werden. Wenn eine Einzelzubereitung oder Zubereitung in Serie erfolgt, sollen Sterilitätsprüfungen von Dummy-Zubereitungen oder Nährmediensimulationen am Ende des Zubereitungsprozesses durchgeführt werden. Bei der empirischen Festlegung des Verwendbarkeitsdatums kann die mikrobiologische Stabilität, wie folgt, berücksichtigt werden:

- Für Niedrigrisiko-Zubereitungen (validierte Prozesse in Reinräumen, begrenzte Anzahl von Handhabungen bei der Zubereitung und weniger als drei sterile Ausgangsprodukte, Integrität der Behältnisse gegeben, keine wachstumsfördernden Eigenschaften der Zubereitung, i.v. oder loko-regionale Applikation) werden bei Raumtemperaturlagerung 2-7 Tage und bei Kühlschranklagerung 14 Tage, 28 Tage als vertretbar erachtet [27,28,129,130].

- Für Hochrisiko-Zubereitungen (validierte Prozesse in Reinräumen, aufwendige Zubereitung und mehr als drei sterile Ausgangsprodukte, Integrität der Behältnisse gegeben, wachstumsfördernde Eigenschaften der Zubereitung, z.B. Lipidemulsionen) werden bei Raumtemperaturlagerung 24, 30 Stunden und bei Kühlschrankschlagerung 3 Tage, 7 Tage, 9 Tage als vertretbar erachtet [27,28,129,130].
- Die Haltbarkeit von Zubereitungen für die intrathekale Applikation ist auf 24 Stunden zu begrenzen und für die Zubereitung müssen frische Stammlösungen verwendet werden.
- In der USP <797> wird die Haltbarkeit bei tiefgefrorener Lagerung (-10 °C bis -25 °C) auf 45 Tage begrenzt.

In den heute üblichen Herstellungsprogrammen wird durch entsprechende Stammdatenpflege das Verwendbarkeitsdatum für die Kennzeichnung der Zubereitungen automatisch generiert. Wenn die Zubereitungen am Herstellungstag appliziert werden, ist eine Festlegung des Verwendbarkeitsdatums und der Lagerbedingungen nicht erforderlich [96]. Bei Rekonstitution unter nicht-kontrollierten Bedingungen gilt die Einstundenregel [128].

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Gewinnung von Daten zur physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Stabilität ausgewählter Fertigarzneimittel und ready-to-administer (RTA)-Zubereitungen, die in der systemischen Krebstherapie angewendet werden. Bei Kenntnis der Stabilität kann die Haltbarkeit der applikationsfertigen Zubereitungen sicherer festgelegt und der Herstellungsprozess in der zentralen Zytostatikazubereitung effizienter gestaltet werden. Des Weiteren können Wartezeiten für die Patienten verkürzt und die finanzielle Belastung des Gesundheitssystems reduziert werden.

### 1. Physikalisch-chemische Stabilitätsuntersuchungen

#### **Physikalisch-chemische Stabilität von Mitomycin C-haltigen Fertigarzneimitteln in unterschiedlichen Konzentrationen, Primärbehältnissen und Formulierungen, nach Rekonstitution mit Wasser für Injektionszwecke oder NaCl 0,9% Infusionslösung**

Mitomycin C (MMC)-haltige Parenteralia werden wegen des karzinogenen, mutagenen und reproduktionstoxischen (CMR) Potentials applikationsfertig in der zentralen Zytostatikazubereitung der Krankenhausapotheke zubereitet. Als Ausgangsmaterial stehen MMC-Fertigarzneimittel unterschiedlicher Hersteller zur Verfügung, die in verschiedenen Indikationen und Applikationsarten (i.v., intraokular, intravesikal) angewendet werden. Durch neu formulierte MMC-Fertigarzneimittel und neue Anwendungsformen besteht Bedarf, weitere Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität der applikationsfertigen Zubereitungen durchzuführen. Diese wurden mit Mitomycin medac (Pulver zur Herstellung einer Injektions- bzw. Infusionslösung oder einer Lösung zur intravesikalen Anwendung) sowie mito medac®, Mitem® und Urocin® (Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Lösung zur intravesikalen Anwendung) durchgeführt. Das reformulierte, harnstoffhaltige Mitomycin medac wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln (Wasser für Injektionszwecke, NaCl 0,9%) zu unterschiedlichen Konzentrationen (2,0 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL) rekonstituiert/verdünnt, in verschiedenen Behältnissen (Glas Vials, PP-Spritzen) bei Kühlschranks- und Raumtemperatur gelagert und die Stabilität untersucht. Die Bestimmung der Stabilität erfolgte mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD), Messung von pH und Osmolalität und Prüfung auf sichtbare Partikel oder Farbveränderungen.

### **Physikalisch-chemische Stabilität von Durvalumab Infusionslösungskonzentrat**

In den letzten beiden Dekaden wurden überwiegend und viele monoklonale Antikörper (mAb) zur systemischen Krebstherapie zugelassen. Diese stellen hinsichtlich der Zubereitungsprozesse und Stabilität eine neue Herausforderung dar. Die Instabilität von monoklonalen Antikörpern als Glykoproteine bezieht sich auf die chemische Stabilität der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) und die physikalische Stabilität der höhergradigen Strukturen (Entfaltung, Aggregation, Präzipitation). mAb-haltige Fertigarzneimittel sind mit Hilfsstoffen stabilisiert. Temperatur, Sauerstoff und Scherkräfte gehören zu den externen stabilitätsdeterminierenden Faktoren.

Für den PDL-1 Antikörper Durvalumab fehlen bisher Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität nach Erstanbruch. Dementsprechend wurde Durvalumab (Imfinzi®) 50 mg/mL Infusionslösungskonzentrat punktiert, bei 2-8 °C und bei 20-25 °C lichtgeschützt gelagert und über einen Zeitraum von 28 Tagen mit orthogonalen analytischen Methoden auf Intaktheit untersucht. Dazu wurden geeignete Ionenaustausch- und Größenausschluss-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (IE-, SE-HPLC) Methoden mit Diodenarray-Detektion (DAD) etabliert. Ergänzend wurden pH-Messungen sowie die Arzneibuchprüfungen auf sichtbare Partikel, Farbe und Klarheit durchgeführt.

## **2. Mikrobiologische Stabilitätsuntersuchungen**

### **Viabilität fakultativ pathogener Mikroorganismen in applikationsfertigen Zubereitungen für die systemische Krebstherapie**

Die Haltbarkeit von aseptisch hergestellten Parenteraliazubereitungen ist gleichzeitig von der physikalisch-chemischen und der mikrobiologischen Stabilität abhängig. Die mikrobiologische Stabilität ist unter anderem von den wachstumsfördernden Eigenschaften der Zubereitungen abhängig. Viele Mikroorganismen bleiben in wässrigen Zubereitungen lebensfähig und können nosokomiale Infektionen bei den oftmals immunsupprimierten onkologischen Patienten hervorrufen. In Ergänzung zu früheren Untersuchungen sollte die Viabilität ausgewählter klinisch relevanter, fakultativ pathogener Mikroorganismen in Zubereitungen aus 20 neu zugelassenen Arzneimitteln (chemisch hergestellt, Biologika) zur systemischen Krebstherapie geprüft werden. Damit sollte das mikrobiologische Risiko der untersuchten Zubereitungen besser beurteilt und bei der Haltbarkeitsdeterminierung berücksichtigt werden können.

### 3 Physikalisch-chemische Stabilitätsuntersuchungen

#### Physikalisch-chemische Stabilität harnstoffhaltiger Mitomycin C Zubereitungen in Glasbehältnissen (1,0 mg/mL) und Plastikspritzen (2,0 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL)

##### Zusammenfassung

**Zielsetzung:** Vor einigen Jahren wurde das Mitomycin C (MMC)-haltige Fertigarzneimittel Mitomycin medac zur Verbesserung der Löslichkeit mit Harnstoff reformuliert. Für die neue Formulierung fehlen wesentliche Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität der applikationsfertigen Zubereitungen in unterschiedlichen Konzentrationen und Primärbehältnissen. Ziel der Untersuchung war es, die physikalisch-chemische Stabilität klinisch relevanter MMC-Konzentrationen (1 mg/mL zur i.v. Injektion, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL zur intraokularen Injektion) bei Lagerung unter verschiedenen Bedingungen in verschiedenen Primärbehältern zu bestimmen. Zusätzlich sollte die Löslichkeit und Stabilität von MMC 2 mg/mL zur Anwendung bei der transarteriellen Chemoembolisation untersucht werden.

**Material und Methoden:** Mitomycin medac wurde mit Wasser für Injektionszwecke zu MMC-Konzentrationen von 1 mg/mL und 2 mg/mL rekonstituiert. Die 1 mg/mL MMC-Lösungen wurden mit NaCl 0,9% zu Lösungen der nominellen Konzentration 0,2 mg/mL und 0,4 mg/mL verdünnt. Wie in der klinischen Praxis üblich, wurden die 1 mg/mL-Lösungen in den Original-Vials und die 2 mg/mL, 0,2 mg/mL und 0,4 mg/mL-Lösungen in Plastikspritzen als Primärbehältnis aufbewahrt. Alle Lösungen wurden lichtgeschützt entweder bei 2-8 °C oder bei 20-25 °C bis zu 8 Tage gelagert. Unmittelbar nach der Rekonstitution oder Verdünnung und zu vorher festgelegten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die physikalisch-chemische Stabilität mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD), pH- und Osmolalitätsmessung sowie Prüfung auf sichtbare Partikel oder Farbveränderungen geprüft.

**Ergebnisse:** Harnstoffhaltiges Mitomycin medac konnte bei Raumtemperatur ohne zusätzliche Erwärmung oder Schütteln zu einer Konzentration von 2 mg/mL rekonstituiert werden. Die physikalisch-chemische Stabilität war unabhängig von der Lagertemperatur für 8 Stunden gegeben. Nach 8 bis 12 Stunden Lagerung kam es bei fast allen Testlösungen zur Auskristallisation von MMC. In 1 mg/mL MMC-Testlösungen wurden bei 2-8 °C Lagertemperatur Auskristallisationen in 2 von 3 Vials nach 2- beziehungsweise 4-tägiger Lagerung beobachtet. In Vials ohne Anzeichen von Auskristallisation betrug die MMC-Konzentration nach 6 Tagen Lagerung > 90% der initial gemessenen Konzentration. In Testlösungen, die bei 20-25 °C gelagert wurden, kam es nicht zur Auskristallisation, aber die

MMC-Konzentration sank nach etwa 15 Stunden unter die Stabilitätsgrenze von 90 %. In 0,4 mg/mL und 0,2 mg/mL MMC-Testlösungen gab es keine Hinweise auf Auskristallisation. Die physikalisch-chemische Stabilität konnte für bei 2-8 °C gelagerten Testlösungen für 3 (0,4 mg/mL) beziehungsweise 5 Tage (0,2 mg/mL) nachgewiesen werden. Bei 20-25 °C gelagerten MMC-Testlösungen war die physikalisch-chemische Stabilität unabhängig von der MMC-Konzentration für mindestens 6 Stunden gegeben.

**Schlussfolgerung:** Mit Harnstoff formuliertes Mitomycin medac ermöglicht die Herstellung von 2 mg/mL MMC-Lösungen ohne zusätzliches Erhitzen und Schütteln aufgrund der hydrotropen Aktivität des Harnstoffs. Bei den 2 mg/mL MMC-Lösungen ist die Auskristallisation der stabilitätsbegrenzende Faktor, insbesondere bei Kühlung. Daher wird für diese Konzentration eine Lagerung bei Raumtemperatur empfohlen. In 1 mg/mL MMC-Lösungen ist die Gefahr der Auskristallisation weniger stark ausgeprägt. Um einen verstärkten chemischen Abbau von MMC bei Raumtemperatur zu vermeiden, wird eine Lagerung bei 2-8 °C empfohlen. Sowohl 2 mg/mL als auch 1 mg/mL-Lösungen sollten vor der Verwendung stets auf potentielle MMC-Kristalle überprüft werden. In verdünnten MMC-Lösungen der Konzentration 0,4 mg/mL und 0,2 mg/mL war die Auskristallisation kein Problem. Bei Kühlung beträgt die physikalisch-chemische Stabilität 3 beziehungsweise 5 Tage.

**Weiterführende Literatur:**

**Siehe Anhang**

**Physicochemical stability of urea-containing Mitomycin C preparations  
in glass vials (1.0 mg/mL) and plastic syringes (2.0, 0.4, 0.2 mg/mL)**

**Almasi J, Thiesen J, Krämer I.**

## **Physikalisch-chemische Stabilität von applikationsfertigen Mitomycin C-haltigen Lösungen zur Blaseninstillation**

### **Zusammenfassung**

**Zielsetzung:** Ziel dieser Studie war die Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität von Mitomycin (MMC)-haltigen Arzneimitteln zur Blaseninstillation, die mit Harnstoff als Hilfsstoff formuliert wurden (mito-medac®, Mitomycin medac). Zum Vergleich wurde die Stabilität von zwei weiteren, in Deutschland verfügbaren MMC-Blaseninstillationslösungen (Urocin®, Mitem®) nach Rekonstitution mit dem beige-packten NaCl 0,9% oder Wasser für Injektionszwecke untersucht.

**Material und Methoden:** MMC-haltige Arzneimittel zur Blaseninstillation wurden entweder mit der beiliegenden NaCl 0,9%-Lösung, nominales Volumen 20 mL (mito-medac®, Mitem®, Urocin®) oder mit 20 mL Wasser für Injektionszwecke (Mitomycin medac, Mitem®, Urocin®) zu einer Nennkonzentration von 1 mg/mL rekonstituiert und bei Raumtemperatur (20-25 °C) gelagert. Die Probenahme erfolgte unmittelbar nach Rekonstitution und nach 24 Stunden Lagerung. Die physikalisch-chemische Stabilität wurde mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD), Messung des pH-Werts und der Osmolalität sowie durch Prüfung auf sichtbare Partikel und Farbveränderungen bestimmt.

**Ergebnisse:** Die initialen pH-Werte der mit NaCl 0,9% rekonstituierten Testlösungen (5,2-5,6) waren signifikant niedriger als die der mit Wasser für Injektionszwecke rekonstituierten Lösungen (6,6-7,4). In den applikationsfertigen Blaseninstillationslösungen lagen die MMC-Konzentrationen bereits nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur unterhalb des 90%-Limits. In mit Wasser für Injektionszwecke rekonstituierten Lösungen lagen die MMC-Konzentrationen bei Mitomycin medac und Urocin® nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur noch oberhalb des 90%-Limits.

**Schlussfolgerungen:** Nach Rekonstitution der MMC-Blaseninstillation mit den beige-packten NaCl 0,9%-Lösungen in vorgefüllten PVC-Beuteln beträgt die physikalisch-chemische Stabilität der applikationsfertigen 1 mg/mL MMC-Lösungen weniger als 24 Stunden bei Raumtemperatur. Die ungünstigen pH-Werte der beige-packten Lösungsmittel bedingen den raschen chemischen Abbau von MMC. MMC-haltige Blaseninstillationslösungen sollen im geschlossenen System unmittelbar vor der Applikation rekonstituiert werden. Lagerung soll vermieden werden, um den MMC-Abbau und einen damit einhergehenden Wirkungsverlust zu vermeiden. Der Zusatz von Harnstoff als Hilfsstoff in MMC-haltigen Arzneimitteln führt nicht zu einem beschleunigten Abbau.



**Weiterführende Literatur:**

**Siehe Anhang**

**Physicochemical stability of ready-to-administer mitomycin C solutions for intravesical instillation**

**Almasi J, Erdnütz F, Thiesen J, Krämer I.**

## **Physikalisch-chemische Stabilität von Durvalumab Infusionslösungskonzentrat nach Erstanbruch**

### **Zusammenfassung**

**Zielsetzung:** Durvalumab (Imfinzi®) ist ein monoklonaler PD-L1-Antikörper (mAb), der als Konzentrat (50 mg/mL) zur Herstellung einer Infusionslösung zugelassen ist. Die Fachinformation des Arzneimittels gibt Auskunft über die physikalisch-chemische Stabilität der applikationsfertigen, verdünnten Durvalumab-Zubereitungen (Trägerlösung NaCl 0,9%, G5%), jedoch nicht über das Konzentrat nach Erstanbruch. Ziel dieser Studie war die Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität von Imfinzi® 50 mg/mL Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung nach Erstanbruch über einen Zeitraum von 28 Tagen.

**Methoden:** Imfinzi®-Vials wurden punktiert und lichtgeschützt bei 2-8 °C oder bei 20-25 °C gelagert. Zu vordefinierten Zeitpunkten (Tag 0, 7, 14, 21, 28) wurde die physikalisch-chemische Stabilität der konzentrierten Lösung mittels Ionenaustausch-, Größenausschluss-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (IE-, SE-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD) und pH-Messung bestimmt. Die Vials wurden zu jedem Zeitpunkt auf Veränderungen der Farbe, der Klarheit und auf die Bildung sichtbarer Partikel untersucht.

**Ergebnisse:** Unabhängig von der Lagertemperatur blieben Durvalumab 50 mg/mL Lösungen in punktierten Vials 28 Tage physikalisch-chemisch stabil. Die Ergebnisse der SE-HPLC zeigten keine Konzentrationsänderungen des Durvalumab-Monomers. In Chromatogrammen der SE-HPLC wurden keine sekundären Peaks detektiert, die auf Instabilitätsreaktionen wie Fragmentierung oder Aggregation hingedeutet hätten. Die Ergebnisse der IE-HPLC zeigten keine wesentlichen Veränderungen der Peakflächen des Hauptpeaks oder der sauren und basischen Ladungsvarianten während des gesamten Untersuchungszeitraums. Aussehen und pH-Wert der Testlösungen blieben bis zum Ende der Untersuchung unverändert.

**Schlussfolgerung:** Unabhängig von den Lagerungsbedingungen deutete keine der analytischen Methoden auf eine physikalisch-chemische Instabilität des intakten Durvalumab-Monomers während der 28-tägigen Lagerung bei Kühlschrank- oder Raumtemperatur hin. Um mikrobiologische Instabilität zu vermeiden, wird die Lagerung bei 2-8 °C empfohlen.

**Weiterführende Literatur:**

**Siehe Anhang**

**Physicochemical stability of Durvalumab (Imfinzi®) concentrate for  
solution in original vials after first opening.**

**Almasi J, Thiesen J, Krämer I.**

## 4 Mikrobiologische Stabilitätsuntersuchung

### Viabilität fakultativ pathogener Mikroorganismen in applikationsfertigen Zubereitungen für die systemische Krebstherapie

#### Zusammenfassung

**Hintergrund:** Zu den Risikofaktoren für die aseptische Zubereitung von parenteralen Arzneimitteln gehört der potentiell wachstumsfördernde Charakter der Arzneimittelzubereitung. Obwohl viele wässrige parenterale Zubereitungen keine wachstumsfördernden Eigenschaften haben, können versehentlich eingebrachte Mikroorganismen (MO) lebensfähig bleiben. Kenntnisse über die Viabilität von MO in parenteralen Zubereitungen sind von Interesse bei der Haltbarkeitsdeterminierung von patientenindividuellen Zubereitungen zur Behandlung von Krebspatienten.

**Ziel:** Ziel der Studie war die Untersuchung der Viabilität von 4 fakultativ pathogenen MO in 20 verschiedenen applikationsfertigen parenteralen Zubereitungen zur systemischen Krebstherapie.

**Methoden:** Es wurden Testlösungen von 20 neueren Biologika und chemisch hergestellten Arzneimitteln für die systemische Krebstherapie zubereitet und mit ausgewählten Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*) oder mit einer *Candida albicans*-Suspension inokuliert. Die resultierenden Testkonzentrationen betragen  $10^4$ - $10^5$  MO pro mL. Proben der Testlösungen wurden nach 0, 4, 24, 48 und 144 Stunden dreifach verdünnt und Aliquote jeder Verdünnung zweifach auf Agarplatten (tryptic soy agar) ausgestrichen. Die Platten wurden für 24 Stunden (Bakterienstämme) oder 72 Stunden (*C. albicans*) bei 37 °C bebrütet und anschließend die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt.

**Ergebnisse:** In den meisten Testlösungen, insbesondere in Lösungen mit monoklonalen Antikörpern (mAbs), wurden erhöhte KBE von *P. aeruginosa* und unveränderte oder erhöhte KBE von *E. faecium* und *S. aureus* registriert. Ausgeprägte nutritive Eigenschaften der Biologika (mAbs, Filgrastim) wurden nicht festgestellt. Azacitidin-, Pixantron- und Vinflunin-haltige Testlösungen zeigten eine speziesspezifische bakterio-statische und sogar bakterizide Wirkung. Alle Testlösungen, mit Ausnahme von Nivolumab- und Pixantron-haltigen Lösungen, zeigten nach der Inkubation konstante oder steigende KBE von *C. albicans*.

**Schlussfolgerung:** Die ausgewählten, fakultativ pathogenen MO blieben in den meisten der getesteten Zubereitungen viabel, unabhängig davon, ob es sich um biologisch oder chemisch hergestellte Arzneistoffe zur Behandlung von Krebspatienten handelte. Daher sollten in den Apotheken strenge aseptische Bedingungen eingehalten und die fehlende antimikrobielle

Aktivität bei der Festlegung der Haltbarkeitsdauer von applikationsfertigen parenteralen Zubereitungen berücksichtigt werden.

**Weiterführende Literatur:**

**Siehe Anhang**

**Viability of selected microorganisms in parenteral preparations for novel systemic anti-cancer therapy.**

**Almasi J, Knoll L, Thiesen J, Krämer I.**

## 5 Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Bestimmung der physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Stabilität von ausgewählten Arzneimitteln zur systemischen Krebstherapie und deren RTA-Zubereitungen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen zur Verlängerung von Haltbarkeiten verwendet werden, um die Zubereitung in der Krankenhausapotheke im Voraus zu ermöglichen und Anbrüche weiterverwenden zu können. Dadurch sollen Abläufe optimiert, die AMTS gesteigert, Wartezeiten für Patienten verkürzt und das Gesundheitssystem finanziell entlastet werden.

Die experimentellen Untersuchungen belegen, dass Harnstoff als HS die Löslichkeit von MMC verbessert und so die Herstellung von 2 mg/mL MMC-Lösungen ohne Anwendung von Wärme bei Raumtemperatur ermöglicht. Da die physikalisch-chemische Stabilität bei RT für 8 Stunden gegeben ist, können die Lösungen vorab in der Krankenhausapotheke hergestellt und den interventionellen Radiologen anwendungsfertig in dreiteiligen PP-Spritzen (Omnifix® 5 mL Luer Lock Solo, B. Braun) für die TACE zur Verfügung gestellt werden. Weitere Untersuchungen zum Mischungsverhältnis, der optimalen Mischtechnik und der Stabilität von 2 mg/mL MMC/Lipiodol-Emulsionen müssen folgen. Die physikalisch-chemische Stabilität von 1 mg/mL MMC-Lösungen in Original Glasvials ist bei 2-8 °C für mindestens 2 Tage gegeben. Ohne Anzeichen von Auskristallisation beträgt die chemische Stabilität 6 Tage und Anbrüche können entsprechend weiterverwendet werden. Die physikalisch-chemische Stabilität von 0,4 mg/mL und 0,2 mg/mL MMC-Lösungen wurde in zweiteiligen, silikonfreien PP-Spritzen (Injekt®-F 1 mL Luer Solo, B. Braun) bei 2-8 °C für 3 beziehungsweise 5 Tage nachgewiesen. Die Spritzen zur Anwendung an Glaukompatienten nach Trabekulektomie können im Voraus hergestellt und dem Augen-OP applikationsfertig zur Verfügung gestellt werden.

Die Rekonstitution von MMC in Blaseninstillationssets mit der beigepackten NaCl 0,9%-Lösung in PVC-Beuteln führte zu schwach-sauren pH-Werten, die den chemischen Abbau von MMC beschleunigten. Die Blaseninstillationslösungen waren bei RT weniger als 24 Stunden stabil und müssen unmittelbar nach der Rekonstitution appliziert werden. Bei der Rekonstitution mit WFI resultierten günstigere pH-Werte und die MMC-Konzentration lag bei Mitomycin medac und Urocin® nach 24 Stunden Lagerung bei RT oberhalb des 90% Stabilitätslimits. Eine Umstellung des Lösungsmittels oder eine Erhöhung des pH-Werts der beigepackten NaCl 0,9%-Lösung könnte mit längerer physikalisch-chemischen Stabilität einhergehen und die Zubereitung im Voraus in der zentralen Zytostatikazubereitung ermöglichen.

Die physikalisch-chemische Stabilität von Durvalumab (Imfinzi®) 50 mg/mL Infusionslösungskonzentrat wurde in den Original Glasvials unabhängig von der Lagertemperatur für 28 Tage nachgewiesen. Anbrüche können somit über diesen Zeitraum

weiterverwendet werden. Bei Temperaturentgleisungen, zum Beispiel durch den Ausfall von Kühlschränken am Wochenende, müssen die gelagerten Vials nicht verworfen werden. Bei den hohen Kosten von mAb-FAM kann das Gesundheitssystem durch Weiterverwendung finanziell entlastet werden.

Die Viabilität fakultativ pathogener MOs blieb in den meisten der getesteten RTA-Zubereitungen unterschiedlicher Arzneistoffe zur systemischen Krebstherapie erhalten. Insbesondere in mAb-Zubereitungen kam es zu einer Spezies-spezifischen Erhöhung der KBE, ausgeprägte nutritive Eigenschaften wurden jedoch nicht detektiert. Um das kritische Patientenkollektiv zu schützen, müssen in den Zubereitungsbereichen der Apotheken kontrollierte aseptische Bedingungen eingehalten und die fehlende antimikrobielle Aktivität bei der Haltbarkeitsdeterminierung von RTA-Zubereitungen berücksichtigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

[1] Council of Europe. Committee of Ministers. Resolution CM/Res(2016)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients.

<https://statements.eahp.eu/sites/default/files/resources/resource%20statement%203.3-compounding.pdf>, letzter Zugriff Mai 2023.

[2] Council of Europe. Committee of Ministers. Resolution CM/Res(2016)2 on good reconstitution practices in health care establishments for medicinal products for parenteral use.

<https://www.edqm.eu/en/d/162941>, letzter Zugriff Mai 2023.

[3] Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P. Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation and Use of Medicinal products. Springer Verlag 2015.

[4] Savelli M, Roche M, Curti C, et al. Methods to control anticancer chemotherapy preparations ranked by risk analysis. Pharmazie. 2018;73(5):251-259.

[doi: 10.1691/ph.2018.7205] [PMID: 29724289].

[5] Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme (PIC/S) PE 010-4 Guide to Good Practices for the preparation of medicinal products in health-care establishments. March 2014.

<https://picscheme.org/docview/3443>, letzter Zugriff Mai 2023.

[6] Verordnung über den Betrieb von Apotheken, Apothekenbetriebsordnung (ApBetrO). 2022.

[https://www.gesetze-im-internet.de/apobetro\\_1987/BJNR005470987.html](https://www.gesetze-im-internet.de/apobetro_1987/BJNR005470987.html), letzter Zugriff Mai 2023.

[7] Vigneron J, D'Huart E, Demoré B. Stability studies in oncology: A marketing tool for pharmaceutical companies, a scientific mission for hospital pharmacists. Eur J Oncol Pharm. 2019;2(2). [DOI: 10.1097/OP9.000000000000012].

[8] Vigneron J. Stability Studies: A Scientific Mission of the Hospital Pharmacist Pharm Technol Hosp Pharm. 2017;2(4):143-144. [doi.org/10.1515/ptph-2017-0032].

[9] Thiesen J, Sarakbi I, Krämer I. Die STABIL-Liste© 7. Auflage 2015. Krankenhauspharmazie 2016;37:485-496.

[10] de Lemos ML, Hamata L. Stability issues of parenteral chemotherapy drugs. J Oncol Pharm Pract. 2007;13(1):27-31. [doi: 10.1177/1078155206075236] [PMID: 17621564].

[11] Krämer I, Federici M. Implementation and microbiological stability of dose-banded ganciclovir infusion bags prepared in series by a robotic system. Eur J Hosp Pharm. 2020;27(4):209-215. [doi: 10.1136/ejhpharm-2018-001745] [PMID: 32587079].



- [12] Kreysing L, Waydhas C, Ittner KP, et al. Standardkonzentrationen für Dauerinfusionen – Ergebnisse einer bundesweiten Befragung auf deutschen Erwachsenenintensivstationen. *Med Klein Intensivmed Notfmed*. 2022. [DOI:10.1007/s00063-022-00940-6].
- [13] Mohr A, Bodenstein M, Sagoschen I, et al. Verordnung und Applikation von Dauerinfusionen in Standardkonzentrationen bei erwachsenen Intensivpatienten. Ein Meilenstein zur Verbesserung der Arzneimitteltherapiesicherheit. *Anesthesiol Intensivmed*. 2021;62:314–322. [DOI: 10.19224/ai2021.314].
- [14] Bardin C, Astier A, Vulto A, et al. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: a European consensus conference. *Eur J Hosp Pharm*. 2012;19:278-285. [<http://dx.doi.org/10.1136/ejhpharm-2012-000112>].
- [15] Krämer I, Thiesen J, Astier A. Formulation and Administration of Biological Medicinal Products”. *Pharm Res*. 2020;37:159. [<https://doi.org/10.1007/s11095-020-02859-z>].
- [16] Kaur M, Kaur G, Kaur H, et al. Overview on stability studies. *Int J Pharm Chem Biol Sci*. 2013;3(4):1231-1241.
- [17] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Pharmazeutische Zubereitungen. 11.0/2619.
- [18] ADKA-Leitlinie Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia. *Krankenhauspharmazie* 2013;34:93-106.
- [19] ABDA Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände, Leitlinie der Bundesapothekerkammer zur Qualitätssicherung: Aseptische Herstellung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia, Stand der Revision: 13.11.2019.  
[https://www.abda.de/fileadmin/user\\_upload/assets/Praktische\\_Hilfen/Leitlinien/Parenteraliaherstellung/LL\\_Parenteralia.pdf](https://www.abda.de/fileadmin/user_upload/assets/Praktische_Hilfen/Leitlinien/Parenteraliaherstellung/LL_Parenteralia.pdf), letzter Zugriff Mai 2023.
- [20] Pharmaceutical Compounding – Sterile Preparations (General Chapter <797>). In: The United States Pharmacopeia, 44th rev., and The national formulary, 39th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2021.
- [21] International Conference on Harmonization. Harmonized Tripartite Guidelines for Stability Testing of New Drugs Substances and Products Q1A(R2). 2004.  
[https://www.gmp-navigator.com/files/guidemgr/Q1A\(R2\)%20Step4%20\(2\).pdf](https://www.gmp-navigator.com/files/guidemgr/Q1A(R2)%20Step4%20(2).pdf), letzter Zugriff Mai 2023.
- [22] International Conference on Harmonization. Harmonized Tripartite Guidelines for Stability Testing for New Dosage Forms. Annex to the ICH Harmonised Tripartite Guideline on Stability Testing for New Drugs and Products Q1C. 1996.

<https://www.gmp-navigator.com/files/guidemgr/MEDIA413.pdf>, letzter Zugriff Mai 2023.

[23] Vigneron J, Astier A, Trittler R, et al. French Society of Hospital Pharmacists; European Society of Oncology Pharmacists. SFPO and ESOP recommendations for the practical stability of anticancer drugs: an update. *Ann Pharm Fr.* 2013;71(6):376-89. [doi: 10.1016/j.pharma.2013.06.002] [PMID: 24206590].

[24] GERPAC (European Society of Hospital Pharmaceutical Technologies): Methodological guidelines for stability studies of hospital pharmaceutical preparations. 1<sup>st</sup> ed. 2013.

[https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide\\_stabilite\\_anglais.pdf](https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide_stabilite_anglais.pdf), letzter Zugriff Mai 2023.

[25] NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. A Standard Protocol for Deriving and Assessment of Stability Part 1-Aseptic Preparations (Small Molecules), 5th ed. 2019.

<https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2013/12/Stability-part-1-small-molecules-5th-Ed-Sept-19.pdf>, letzter Zugriff Mai 2023.

[26] A standard protocol for deriving the chemical stability, Part 2 - aseptic preparations (Biopharmaceuticals) Incorporating addendum on antibody drug conjugates, 5th ed. 2021.

<https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2017/03/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v5.pdf>, letzter Zugriff Mai 2023.

[27] Crauste-Manciet S, Krämer I, Lagarce F, et al. GERPAC Consensus Conference – Guidance on the Assignment of Microbiological Shelf-life for Hospital Pharmacy Aseptic Preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2020;5(1): 20200001. [doi.org/10.1515/pthp-2020-0001].

[28] Stability Considerations in Dispensing Practice (General Chapter <1191>). In: The United States Pharmacopeia, 44th rev., and The national formulary, 39th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2021.

[29] Trissel LA. Avoiding Common Flaws in Stability and Compatibility Studies of Injectable Drugs. *Am J Hosp Pharm.* 1983;40(7):1159–1160. [doi.org/10.1093/ajhp/40.7.1159].

[30] AstraZeneca GmbH. Imfinzi 50 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, 2018.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imfinzi-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imfinzi-epar-product-information_de.pdf), letzter Zugriff Juli 2023.

[31] Bajaj S, Singla D, Sakhuja N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *J Appl Pharm Sci.* 2012;2(3):129-138. [DOI: [10.7324/JAPS.2012.2322](https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2322)].

[32] Pranker R. Compounded Products - Stability Studies in Hospital Pharmacy Departments. *J Pharm Pract Res.* 2009;39:5-7. [DOI: [10.1002/j.2055-2335.2009.tb00693.x](https://doi.org/10.1002/j.2055-2335.2009.tb00693.x)].

[33] International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ICH Q2(R1). 1995.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf), letzter Zugriff Mai 2023.

[34] Möller H. Spezifikation von Wirkstoffen und Fertigarzneimitteln. PZ. 1999;15.

<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/inhalt-15-1999/pharm5-15-1999/>, letzter Zugriff Juni 2023.

[35] International Conference on Harmonization. Evaluation of Stability Data Q1E. 2003.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-e-evaluation-stability-data-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-e-evaluation-stability-data-step-5_en.pdf), letzter Zugriff Juni 2023.

[36] Bakshi M, Singh S. Development of stability-indicating assay methods-A critical review. J. Pharm Biomed Anal. 2002;28:1011-1040. [DOI: [10.1016/s0731-7085\(02\)00047-x](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00047-x)] [PMID: 12049968] .

[37] Zhong L, Li Y, Xiong L, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Sig Transduct Target Ther. 2021;6, 201. [doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w].

[38] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Partikelkontamination – sichtbare Partikel. 11.0/2.9.20.

[39] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Empfehlungen zur Prüfung auf Partikelkontamination – sichtbare Partikel. 11.0/5.17.2.

[40] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Partikelkontamination – Nicht sichtbare Partikel. 11.0/2.9.19.

[41] Sautou V, Lagarce F. Methods for the Study of Physical and Chemical Stability and Container-Content Interactions: Report of a GERPAC Workshop. Pharm Technol HospPharm. 2019;4(2):95-97. [doi.org/10.1515/pthp-2019-0009].

[42] European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP); Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP). Guideline on plastic immediate packaging materials. 2005.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-plastic-immediate-packaging-materials\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-plastic-immediate-packaging-materials_en.pdf), letzter Zugriff Mai 2023.

[43] Schiffer-Weinle HA. Die Oxidation im Griff. So klappt es mit Dithranol in der Rezeptur. Deutsche Apotheker Zeitung 2016;8:44.

<https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2016/daz-8-2016/die-oxidation-im-griff#:~:text=Mechanismus%20der%20Oxidation,an%20der%20Reaktion%20beteiligt%20ist>, letzter Zugriff Mai 2023.

[44] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Klarheit und Opaleszenz von Flüssigkeiten. 11.0/2.2.1.

[45] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Grad der Färbung von Flüssigkeiten. 11.0/2.2.2.

[46] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie pH-Wert – Potentiometrische Methode. 11.0/2.2.3.

[47] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Osmolalität. 11.0/2.2.35.

[48] Vigneron J, Sacrez M, D'Huart É, et al. Assessment of the relevance of osmolality measurement as a criterion for the stability of solutions. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2023;8(1): 20220008. [[doi.org/10.1515/pthp-2022-0008](https://doi.org/10.1515/pthp-2022-0008)].

[49] Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, et al. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci*. 2020;109(1):169-190. [doi: 10.1016/j.xphs.2019.08.009] [PMID: 31465737].

[50] Hanser H, Scholtyssek C. Immunglobuline. In: *Lexikon der Neurowissenschaft*. Spektrum akademischer Verlag.

<https://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/immunglobuline/5996>, letzter Zugriff 07.2023.

[51] Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(4):55. [doi: 10.3390/antib8040055] [PMID: 31816964].

[52] Carter, P. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:343–357. [[doi.org/10.1038/nri1837](https://doi.org/10.1038/nri1837)]. [53] European Medicines Agency 2012. Similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies: non-clinical and clinical issues.

[Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues \(europa.eu\)](https://www.europa.eu), letzter Zugriff Mai 2023.

[54] Ruberg EM, Frieß W. Proteinarzneistoffe. Sensibel und stressanfällig. *PZ*. 2011;50.

<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-502011/sensibel-und-stressanfaellig/>, letzter Zugriff Juli 2023.

[55] European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP); Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products. 2016.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-production-characterisation-specification-monoclonal-antibodies-related\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-production-characterisation-specification-monoclonal-antibodies-related_en.pdf), letzter Zugriff Juli 2023.

[56] European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP); Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues. 2012.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical_en.pdf), letzter Zugriff Juli 2023.

[57] International Conference on Harmonization. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C. 1996.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnological/biological-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnological/biological-products_en.pdf), letzter Zugriff Juni 23.

[58] Albanese JA, Wiggins JM. Biologic Standards in the Pharmacopoeias: An Update. *Pharm. Tech.* 2022;46(10):46-48.

[59] Krämer I. Peptid und Proteinstruktur. In: Krämer I, Jelkmann W, Hrsg. *Rekombinante Arzneimittel – medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie*. 2. Auflage. Springer; 2008. S. 4.

[60] Manning MC, Chou DK, Murphy BM, et al. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res.* 2010;27(4):544–75.

[61] Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm.* 1999;185(2):129–88.

[62] Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci.* 2007;96(1):1–26.

[63] Shire SJ. Stability of monoclonal antibodies (mAbs). In: *Monoclonal Antibodies*. Amsterdam: Elsevier; 2015. p. 45–92. [doi.org/10.1016/B978-0-08-100296-4.00003-8].

[64] Uchiyama S. Liquid formulation for antibody drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1844(11):2041–52. *Biophys Acta.* 2014;1844(11):2041–52.

[65] Mahler H-C, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci.* 2009;98(9):2909-2934.

[66] Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm.* 2005;289(1-2):1-30.

[67] Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* 2006;8(3):E501-E507.

[68] van Brummelen EM, Ros W, Wolbink G, et al. Antidrug Antibody Formation in Oncology: Clinical Relevance and Challenges. *Oncologist.* 2016;21(10):1260-1268. [doi: 10.1634/theoncologist.2016-0061] [PMID: 27440064].

[69] Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2924-35. [doi: 10.1002/jps.21190. PMID: 17973307].

[70] Lyutova EM, Kasakov AS, Guvrits BYa. Effects of arginine on kinetics of protein aggregation studied by dynamic laser, light scattering and turbidimetry techniques. *Biotechnol Prog* 2007;23:1411–1416.

[71] Perevozchikova T, Nanda H, Nesta DP, Roberts CJ. Protein adsorption, desorption, and aggregation mediated by solid-liquid interfaces. *J Pharm Sci.* 2015;104(6):1946-1959.

[72] Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(3):233-244.

[73] Singh SM, Bandi S, Jones DNM, Mallela KMG. Effect of polysorbate 20 and polysorbate 80 on the higher-order structure of a monoclonal antibody and its Fab and Fc fragments probed using 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Sci.* 2017;106(12):3486-3498.

[74] Mehta SB, Lewus R, Bee JS, Randolph TW, Carpenter JF. Gelation of a monoclonal antibody at the silicone oil-water interface and subsequent rupture of the interfacial gel results in aggregation and particle formation. *J Pharm Sci.* 2015;104(4):1282-1290.

[75] Wei Q, Becherer T, Angioletti-Uberti S, et al. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(31):8004-8031.

[76] Kuelz LA, Wang W, Randolph TW, Carpenter JF. Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *J Pharm Sci.* 2008;97(5):1801-1812.

[77] Janssen-Cilag GmbH. Darzalex® 1800 mg Injektionslösung, 2023.

<https://static.janssen-emea.com/sites/default/files/Germany/SMPC/DE-PL-0063.pdf>, letzter Zugriff Juni 2023.

[78] Merck Europe B.V. Erbitux® 5 mg/mL Infusionslösung, 2022.

<https://www.fachinfo.de/pdf/008483>, letzter Zugriff Juni 2023.

- [79] Kumru OS, Liu J, Ji JA, et al. Compatibility, physical stability, and characterization of an IgG4 monoclonal antibody after dilution into different intravenous administration bags. *J Pharm Sci.* 2012;101(10):3636-3650.
- [80] Bee JS, Randolph TW, Carpenter JF, Bishop SM, Dimitrova MN. Effects of surfaces and leachables on the stability of biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2011;100(10):4158-4170.
- [81] Bee JS, Chiu D, Sawicki S, et al. Monoclonal antibody interactions with microand nanoparticles: adsorption, aggregation, and accelerated stress studies. *J Pharm Sci.* 2009;98(9):3218-3238.
- [82] Sreedhara A, Glover ZK, Piros N, Xiao N, Patel A, Kabakoff B. Stability of IgG1 monoclonal antibodies in intravenous infusion bags under clinical in-use conditions. *J Pharm Sci.* 2012;101(1):21-30.
- [83] Krayukhina E, Tsumoto K, Uchiyama S, Fukui K. Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):527-535.
- [84] Sun Hee K, Stollhof B, Krämer I. Auswahl und Umgang mit In-Line-Filtern zur parenteralen Applikation von Tumorthérapeutika. *Krankenhauspharmazie* 2018;39:11-18.
- [85] Chen H, Yuan L, Song W, Wu Z, Li D. Biocompatible polymer materials: role of protein surface interactions. *Prog Polym Sci.* 2008;33(11):1059-1087.
- [86] Li S, Nguyen TH, Schoneich C, Borchardt RT. Aggregation and precipitation of human relaxin induced by metal-catalyzed oxidation. *Biochemistry.* 1995;34(17):5762-5772.
- [87] Berrill A, Biddlecombe J, Bracewell D. Product quality during manufacture and supply. In: *Peptide and Protein Delivery.* Amsterdam, the Netherlands: Elsevier; 2011:313-339. [[doi.org/10.1016/B978-0-12-384935-9.10013-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384935-9.10013-6)].
- [88] Khawli LA, Goswami S, Hutchinson R, et al. Charge variants in IgG1: isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *MAbs.* 2010;2(6):613-624.
- [89] Mahler H-C, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci.* 2009;98(9):2909-2934.
- [90] Usami A, Ohtsu A, Takahama S, Fujii T. The effect of pH, hydrogen peroxide and temperature on the stability of human monoclonal antibody. *J Pharm Biomed Anal.* 1996;14(8-10):1133-1140.
- [91] Lu X, Nobrega RP, Lynaugh H, et al. Deamidation and isomerization liability analysis of 131 clinical-stage antibodies. *MAbs.* 2019;11(1):45-57.

- [92] Du Y, Walsh A, Ehrick R, Xu W, May K, Liu H. Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *MAbs*. 2012;4(5):578-585.
- [93] Mahler H-C, Friess W, Grauschopf U, et al. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci*. 2009;98(9):2909-2934.
- [94] Lei M, Quan C, Wang YJ, Kao Y-H, Sch€oneich C. Light-induced covalent buffer adducts to histidine in a model protein. *Pharm Res*. 2018;35(3):67.
- [95] Burkitt W, Domann P, O'Connor G. Conformational changes in oxidatively stressed monoclonal antibodies studied by hydrogen exchange mass spectrometry. *Protein Sci*. 2010;19(4):826-835.
- [96] Yang R, Jain T, Lynaugh H, et al. Rapid assessment of oxidation via middledown LCMS correlates with methionine side-chain solvent-accessible surface area for 121 clinical stage monoclonal antibodies. *MAbs*. 2017;9(4):646-653.
- [97] Leblanc Y, Bihoreau N, Jube M, Andre M-H, Tellier Z, Chevreux G. Glycation of polyclonal IgGs: effect of sugar excipients during stability studies. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;102:185-190.
- [98] Fischer S, Hoernschemeyer J, Mahler H-C. Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;70(1):42-50.
- [99] Tang P, Tan Z, Ehamparanathan V, et al. Optimization and kinetic modeling of interchain disulfide bond reoxidation of monoclonal antibodies in bioprocesses. *MAbs*. 2020;12(1):1829336. [doi: 10.1080/19420862.2020.1829336] [PMID: 33031716].
- [100] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Prüfung auf ausreichende antimikrobielle Konservierung. 11.0/5.1.3.
- [101] Metcalf JW. Microbiological Quality of Drug Products after Penetration of the Container System for Dose Preparation Prior to Patient Administration. *Am Pharm Rev*. 2009.  
<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/114491-Microbiological-Quality-of-Drug-Products-after-Penetration-of-the-Container-System-for-Dose-Preparation-Prior-to-Patient-Administration/>, letzter Zugriff Mai 2023.
- [102] Almasi J, Knoll L, Thiesen J, et al. Viability of selected microorganisms in parenteral preparations for novel systemic anti-cancer therapy. *J Oncol Pharm Pract*. 2023:10781552231179185. [doi: 10.1177/10781552231179185] [PMID: 37272015].
- [103] Bruenke J, Riemann T, Kessler P, et al. Epidural infections, bacteriostatic drug effects and technical strategies for prevention. *Reg Anesth Pain Med* 2022; 47(2): 128-130.



- [104] Matheron A, Guerault M N, Vazquez R, et al. Microbiological stability tests with simulated broth preparations and integrity testing for sterile standard cytotoxic preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2020; 5(1): 20200002.
- [105] Sangnier M, Bouguéon G, Berroneau A, et al. Removal of bacterial growth inhibition of anticancer drugs by using complexation materials. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2019; 5(1): 20190018.
- [106] Cancanelli L, Selmin F, Camuffo L, et al. Storage of nivolumab, pembrolizumab and daratumumab for 14 days after compounding in the hospital pharmacy: a microbial stability study. *EAHP Congress, Poster N°3PC-021*.
- [107] Sarakbi I, Heeb R, Thiesen J, et al. Viability of Selected Microorganisms in Non-Cytotoxic Aseptic Preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2016; 1(1): 9-20.
- [108] Sarakbi I, Federici M, Krämer I. Viability of microorganisms in novel chemical and biopharmaceutical anticancer drug solutions. *Eur J Hosp Pharm* 2015; 20(1): 5-12.
- [109] Karstens A and Krämer I. Viability of micro-organisms in novel chemical and biopharmaceutical drug solutions for cancer treatment. *Eur J Hosp Pharm Science* 2007; 13(2): 27-32.
- [110] Krämer I and Wenchel H M. Viability of microorganisms in antineoplastic drug solutions. *Eur J Hosp Pharm Science* 1991; 1(1): 14-19.
- [111] Krämer I and Wenchel H M. Wachstumsverhalten ausgewählter Mikroorganismen in Zytostatika-Zubereitungen. *Krankenhauspharmazie* 1988; 11: 439-442.
- [112] Krämer I. Viability of microorganisms in novel antineoplastic and antiviral drug solutions. *J Oncol Pharm Practice* 1998; 4(1): 32-37.
- [113] Favier B, Latour JF, Fuhrmann C. Viability of microorganisms in bags of cytotoxic drugs. *J Oncol Pharm Pract* 2001; 6: 167–71.
- [114] Patel K, Craig SB, McBride MG, Palepu NR. Microbial inhibitory properties and stability of topotecan hydrochloride injection. *Am J Health Syst Pharm* 1998; 55: 1584–7.
- [115] Jacobson PA, West NJ, Spadoni V, et al. Sterility of filgrastim (G-CSF) in syringes. *Ann Pharmacother* 1996; 30(11): 1238-42.
- [116] Holmes CJ, Kubey WY, Love DI. Viability of microorganisms in fluorouracil and cisplatin small-volume injections. *Am J Hosp Pharm* 1988; 45: 1089–91.
- [117] Calame W, Van der Waals R, Douwes-Idema N, et al. Antibacterial effect of etoposide in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1456–7.

- [118] Bodet CA, Jorgensen JH, Drutz DJ. Antibacterial activities of antineoplastic agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 437–9.
- [119] Hammilton-Miller JMT. Antimicrobiological activity of 21 antineoplastic agents. *Br J Canc* 1984; 49: 367–9.
- [120] Austin PD, Hand KS, Elia M. Systematic review and meta-analyses of the effect of lipid emulsion on microbial growth in parenteral nutrition. *J Hosp Infect* 2016; 94: 307-319.
- [121] Jimenez L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2007;61(5):383-99. [PMID: 18047177].
- [122] Crauste-Manciet S, Krämer I, Lagarce F, et al. GERPAC Consensus Conference – Guidance on the Assignment of Microbiological Shelf-life for Hospital Pharmacy Aseptic Preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2020;5(1): 20200001. [[doi.org/10.1515/pthp-2020-0001](https://doi.org/10.1515/pthp-2020-0001)].
- [123] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Prüfung auf Sterilität. 11.0/2.6.1.
- [124] Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Monographie Alternative Methoden zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität. 11.0/5.1.6.
- [125] Parveen S, Kaur S, David SA, et al. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. *Vaccine*. 2011;29(45):8012-23. [doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.055] [PMID: 21871516].
- [126] Matheron A, Guerault M, Vazquez R, et al. Microbiological stability tests with simulated broth preparations and integrity testing for sterile standard cytotoxic preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2020;5(1):20200002. [[doi.org/10.1515/pthp-2020-0002](https://doi.org/10.1515/pthp-2020-0002)].
- [127] Sangnier M, Bouguéon G, Berroneau A, et al. Removal of bacterial growth inhibition of anticancer drugs by using complexation materials. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2020;5(1):20190018. [[doi.org/10.1515/pthp-2019-0018](https://doi.org/10.1515/pthp-2019-0018)].
- [128] Auslegungshilfe für die Überwachung der erlaubnisfreien Herstellung von sterilen Arzneimitteln, insbesondere Parenteralia, durch Ärzte oder sonst zur Heilkunde befugte Personen gemäß § 13 Abs. 2b Arzneimittelgesetz (AMG). 2018.  
<https://www.zlg.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=649&token=da199309acfdabfc73ad406c45c27971fb17cfc>, letzter Zugriff Mai 2023.
- [129] Ricci MS, Frazier M, Moore J, et al. In-use physicochemical and microbiological stability of biological parenteral products. *Am J Health Syst Pharm*. 2015;72(5):396-407. [doi: 10.2146/ajhp140098] [PMID: 25694415].

[130] Dutch GMP-Hospital Pharmacy chapter H3.

## 7 Anhang

### **Physicochemical stability of urea-containing Mitomycin C preparations in glass vials (1.0 mg/mL) and plastic syringes (2.0, 0.4, 0.2 mg/mL)**

Almasi J, Erdnüß F, Thiesen J, Krämer I.

Pharm Technol Hosp Pharm. 2023 July 17. <https://doi.org/10.1515/pthp-2023-0003>

Eigenanteil: Literaturrecherche, Planung und Durchführung der Stabilitätsuntersuchung, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse, Verfassung und Korrektur des Manuskripts



Jannik Almasi\*, Frank Erdnüß, Judith Thiesen and Irene Krämer

# Physicochemical stability of urea-containing Mitomycin C preparations in glass vials (1.0 mg/mL) and plastic syringes (2.0, 0.4, 0.2 mg/mL)

<https://doi.org/10.1515/ptph-2023-0003>

Received March 31, 2023; accepted June 29, 2023;

published online July 17, 2023

## Abstract

**Objectives:** To date, there is only one study investigating the physicochemical stability of diluted mitomycin (MMC) solutions prepared by using urea-containing Mitomycin medac as starting material. The aim of the study was to test the solubility of the new MMC formulation with regard to highly concentrated solutions and determine the physicochemical stability of clinically relevant MMC concentrations stored under different conditions in various primary containers.

**Methods:** Mitomycin medac was dissolved with water for injection to achieve MMC concentrations of 1 mg/mL and 2 mg/mL. Additionally, 1 mg/mL MMC solutions were further diluted with normal saline to obtain 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL solutions. According to clinical practice, 1 mg/mL solutions were stored in original glass vials and 2 mg/mL, 0.2 mg/mL, and 0.4 mg/mL solutions were stored in plastic syringes. All solutions were stored either refrigerated or at 20–25 °C light protected for up to 8 days. Samples were taken immediately after dissolution or dilution and at pre-determined time points. Physicochemical stability was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with photodiode array detection, pH and osmolality measurement, and inspection for visible particles or color changes.

**Results:** 2 mg/mL MMC solutions were achieved at room temperature and physicochemical stability was given for 8 h, independent of the storage temperature. Between 8 and 12 h of storage, crystallization occurred in almost all samples. In 1 mg/mL MMC test solutions, stored under refrigeration, crystallization occurred in 2 of 3 vials after 2 and

4 days of storage, respectively. In the vial without signs of crystallization, MMC concentration amounted to >90 % of the initial measured concentration after 6 days. When stored at room temperature, crystallization was not seen, but MMC concentration declined below the 90 % stability limit at about 15 h of storage. In 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL MMC test solutions crystallization was not observed at all. When stored refrigerated, preparations were physicochemically stable for 5 and 3 days, respectively. When stored light protected at room temperature, physicochemical stability was given for at least 6 h, irrespective of the MMC concentration.

**Conclusions:** Mitomycin medac enables the preparation of 2 mg/mL MMC solutions without additional heating and shaking due to the hydrotropic activity of urea contained as excipient. However, in 2 mg/mL MMC solutions crystallization is the most dominant stability limiting factor, especially under refrigerated storage. Hence, storage at room temperature is recommended for this concentration. In 1 mg/mL MMC solutions crystallization is less prominent. To avoid increased chemical degradation at room temperature, refrigerated storage is recommended. Both, 2 mg/mL and 1 mg/mL MMC solutions should always be checked for the formation of crystals before use. In diluted 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL MMC solutions, crystallization was not an issue and refrigerated storage extends physicochemical stability to maximum 5 and 3 days, respectively.

**Keywords:** high-performance liquid chromatography (HPLC) assay; Mitomycin C; physicochemical stability; plastic syringes; solubility; urea-containing formulation

## Introduction

Mitomycin C (MMC) is a potent agent for various systemic and local antineoplastic therapies. Depending on the specific indication and treatment protocol, different routes of administration are used, i.e. intravenous, intravesical [1, 2], intraarterial [3, 4], intraocular [5, 6], and intraperitoneal [7]. MMC doses, volumes, and concentrations to be used vary accordingly [1, 2, 6].

MMC containing medicinal products with doses of 2 mg, 10 mg, 20 mg, and 40 mg MMC per vial are marketed as

\*Corresponding author: Jannik Almasi, Department of Pharmacy, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany, Phone: 49 6131 174463, Fax: 49 6131 172262, E-mail: Jannik.almasi@unimedizin-mainz.de  
Frank Erdnüß, Judith Thiesen and Irene Krämer, Department of Pharmacy, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

sterile lyophilized powder for solution for injection/infusion. Mostly, mannitol and sodium chloride are contained as excipients to achieve iso-osmolarity after dissolution. Since 2017, the brand product Mitomycin medac [1] contains urea (instead of sodium chloride) as excipient to facilitate the manufacturing and reconstitution process. Urea is an effective non-micellar hydrotropic solubilizer for the poorly water-soluble MMC [8]. Generally, MMC lyophilized powders are dissolved with an appropriate amount of sterile water for injection (WFI) or 0.9 % NaCl solution (normal saline (NS)) to achieve 1 mg/mL MMC solutions for administration or further dilution. The reconstituted product should be used immediately, and any unused solution must be discarded [1].

Literature describing the solubility and in-use stability of ready-to-administer urea-containing MMC preparations is scarce. To our knowledge, there are only two studies reporting stability data of urea containing Mitomycin medac, studying reconstituted and diluted preparations for intravesical or intraocular use [9, 10]. However, the in-use stability of MMC formulations containing NaCl or Mannitol as excipients has been the subject of numerous investigations [11–22]. Results indicate that the physicochemical stability of MMC solutions depends on pH [17–20], temperature [16, 17], MMC concentration [16, 17], and concentration of buffer ions [16]. pH values between 7 and 8 are most favorable for MMC stability, while chemical degradation is accelerated at lower and higher pH values [16, 18–20]. Degradation rates of MMC preparations parallel the acidity of the media used for dissolution and dilution (e.g., NS, glucose 5 %, ringer-lactate infusion solutions) [17, 21]. Concerning temperature, contrary effects have been found. While chemical degradation of MMC solutions is reduced at lower temperatures, physical instability is enhanced and recognizable as crystallization [10, 17]. Under refrigerated storage, MMC solutions  $\geq 0.8$  mg/mL (solvent WFI) tend to crystallize and if buffers are used for dissolution, even MMC solutions  $\geq 0.6$  mg/mL are at risk for crystallization [16]. When Myers et al. [11] investigated the in-use stability of 1 mg/mL and 2 mg/mL MMC solutions the poor solubility turned out as stability limiting factor. Using NS as solvent, solubilization to MMC 2 mg/mL solutions was only achieved by incubation at 50 °C for 50 min in a water bath. Solutions remained physicochemically stable for up to 5 h when stored at 37 °C [11].

In our university medical center, different types of MMC preparations and concentrations are prepared in a centralized cytotoxic preparation unit of the pharmacy department. 1 mg/mL MMC solutions are used as stock solutions to prepare 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL solutions in 1 mL plastic syringes as primary containers. These are provided to the ophthalmic clinic to be administered during

trabeculectomy in glaucoma surgery [5]. MMC 0.2 mg/mL solutions prepared in pre-filled 0.9 % NaCl infusion bags (nominal volume 100 mL) are provided to the department of surgery for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC).

1 mg/mL MMC solutions dissolved with 20 mL NS are normally used for intravesical instillation. Mitomycin finished medicinal products are marketed as bladder instillation kits enabling safe reconstitution in a closed-system procedure at the point of care.

1 mg/mL MMC solutions dissolved with water for injection prepared in syringes as primary containers are mainly used for intravenous bolus injection and for transarterial chemoembolization (TACE) in hyperarterialized liver tumors or liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors [23]. During TACE, the oily-based radio-opaque contrast agent Lipiodol is mixed with a chemotherapeutic agent through a 3-way stopcock prior to administration. The chemotherapeutic agent and lipiodol are usually mixed together in a ratio of 1:1 [24], but according to Deschamps et al., a higher portion of Lipiodol (e.g., 1:2) results in more stable emulsions [25]. The volume of injected Lipiodol is calculated in dependence of the tumor volume, but should not exceed 20 mL due to the risk of life-threatening adverse events [23]. For TACE with MMC, 10 mg of MMC are usually applied at a concentration of 1 mg/mL [24]. MMC solutions with a concentration  $>1$  mg/mL allow reduced Lipiodol volumes and are therefore advantageous especially for the therapy of smaller tumors.

The objective of our study was to investigate the in-use stability of MMC preparations of different concentrations (2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL) under different storage conditions and in different types of primary containers using urea-containing Mitomycin medac as starting material. In addition, we investigated whether urea as an excipient increases the solubility of MMC and enables the preparation of MMC 2 mg/mL solutions without heating.

## Materials and methods

### Medicinal products

MMC test solutions: Mitomycin medac 10 mg powder for solution for injection (medac GmbH, Wedel, Germany; batch B190039AA, G200394AB, D210131BB, A220013AB). Dissolution solvent: WFI solution 100 mL (B. Braun, Melsungen, Germany; batch 214138091). Diluent for test solutions, samples: pre-filled 0.9 % NaCl 250 mL freeflex<sup>®</sup> polyolefin infusion bags (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany; batch 14RK7330). Mobile phase and flushing solution: water HPLC grade (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), methanol HPLC grade

(Fischer Chemicals AG, Zürich, Switzerland), Potassium dihydrogen phosphate (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany).

### Preparation of test solutions and samples

**2 mg/mL MMC solution:** Six MMC 10 mg vials were dissolved with 5 mL WFI each and transferred to 5 mL three-piece polypropylene (PP) syringes (Omnifix® 5 mL Luer Lock Solo, B. Braun, Melsungen, Germany). Three syringes each were stored at 2–8 °C or at 20–25 °C over a 24 h period. All test solutions were stored protected from light.

At predetermined time points (see Table 1) 1.0 mL samples were transferred into 1.5 mL PP tubes (Eppendorf Safe-Lock® Tubes, Eppendorf GmbH, Wesseling, Germany). Prior to HPLC analysis samples were diluted in HPLC vials to a final concentration of 0.2 mg/mL by mixing 100 µL aliquots with 900 µL water HPLC grade.

**1 mg/mL MMC solution:** Six MMC 10 mg vials were dissolved with 10 mL WFI each. Three vials each were stored light protected either at 2–8 °C in the refrigerator or at 20–25 °C for 6 and 3 days, respectively.

At predetermined time points (see Table 1) 1.0 mL samples were transferred into 1.5 mL PP tubes. Prior to HPLC analysis samples were diluted in HPLC vials to a final concentration of 0.2 mg/mL by mixing 200 µL aliquots with 800 µL water HPLC grade.

**0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL MMC solutions:** 10 mL of freshly dissolved 1 mg/mL MMC solution were diluted with 40 and 15 mL NS in 50 mL PP syringes (Original Perfusor® Syringe 50 mL, B. Braun, Melsungen, Germany) to achieve 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL solutions, respectively. Diluted solutions were transferred into 1 mL silicone free PP (barrel), polyethylene (plunger) syringes (Injekt®-F 1 mL Luer Solo, B. Braun, Melsungen, Germany) and stored light protected either at 2–8 °C in the refrigerator or at 20–25 °C for 8 and 4 days, respectively.

At predetermined time points (see Table 1) 1.0 mL samples of each storage condition and concentration (0.2 and 0.4 mg/mL) were transferred into 1.5 mL PP tubes. MMC 0.2 mg/mL samples were analyzed without further dilution, whereas samples of MMC 0.4 mg/mL were diluted in HPLC vials prior to HPLC analysis to a final concentration of 0.2 mg/mL by mixing 500 µL aliquots with 500 µL NS.

### Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) assay

For analysis of MMC and degradation products a known RP-HPLC method with photodiode array detection (PDA) was used as before [9]. The HPLC method was adopted from Briot et al. and proven as a stability indicating method [10, 12]. The absence of interference with urea was proven [10]. Figure 1 shows freshly prepared MMC and degraded MMC after 3 days of storage at room temperature with the corresponding degradation products, well separated from the MMC parent peak.

The HPLC system consisted of a Waters Alliance 2,695 pump connected to a Waters Photodiode Array Detector 996 (Waters, Eschborn, Germany). Waters Empower Pro, Empower 2 Software, Version 6.10.01.00 (Waters, Eschborn, Germany) was used for instrument operation, data collection and processing.

Detailed information regarding the characteristics of the HPLC assay are given in Table 2. Test solutions were considered to be stable when the measured MMC concentration was ≥90 % of the initially measured concentration (100 %). Degradation products were detected at 254 nm wavelength.

### Validation of the RP-HPLC assay

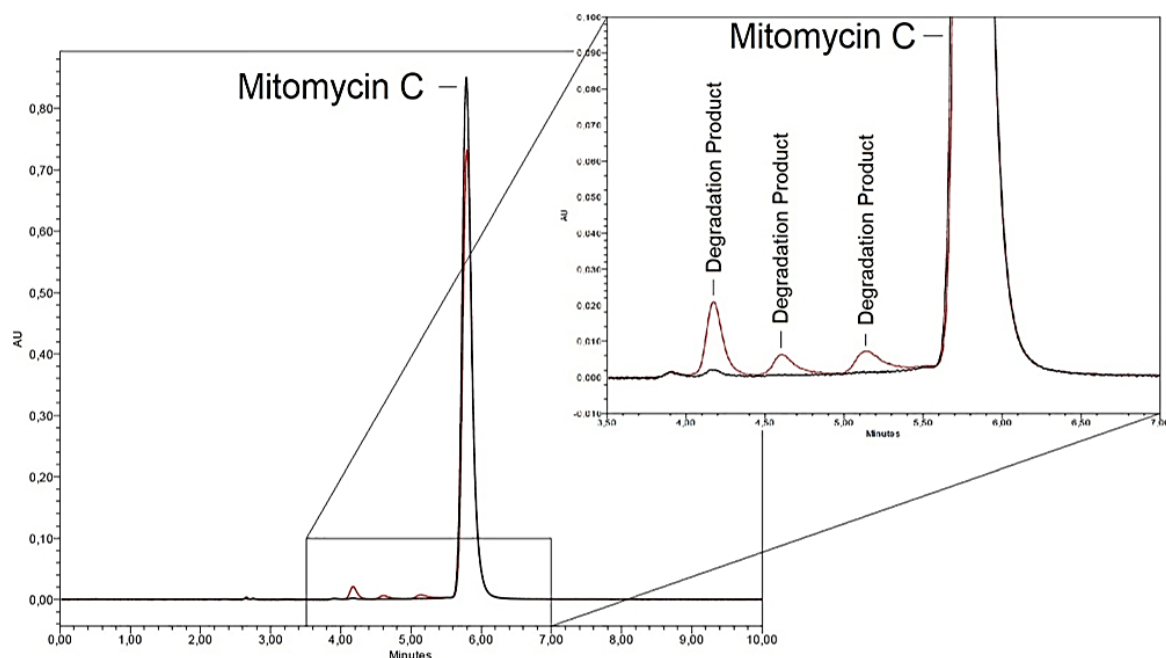
Assay validation was performed in accordance with the “ICH Harmonized Tripartite Guideline for Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1) [26]. Linearity testing was performed with a stock solution received by reconstitution of 10 mg MMC with 10 mL WFI. The calibration curve was established with seven MMC standards (0.10 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.18 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.22 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.30 mg/mL) received by further dilution with water HPLC grade. Aliquots of the standards were injected in triplicate. The measured peak areas were plotted against the nominal MMC concentrations to obtain the calibration curve.

Intra- and inter-day accuracy and precision were validated by analyzing MMC solutions on five consecutive days. Stock solutions were freshly prepared on each day as described above. Eight test solutions of the nominal concentration 0.2 mg/mL were obtained by adding 200 µL stock solution in each HPLC vial prefilled with 800 µL

**Table 1:** Time points of sampling for the different Mitomycin (MMC) concentrations and storage conditions.

MMC test solution	Storage temperature	Sampling times points												
		Hours					Days							
		0	4	6	8	12	1	2	3	4	5	6	7	8
2 mg/mL <sup>a</sup> reconstituted with WFI	2–8 °C	X	–	–	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
	20–25 °C	X	X	–	X	X	X	–	–	–	–	–	–	–
1 mg/mL <sup>b</sup> reconstituted with WFI	2–8 °C	X	–	–	–	–	X	X	X	X	X	X	–	–
	20–25 °C	X	–	X	–	–	X	X	X	–	–	–	–	–
0.4 mg/mL <sup>a</sup> diluted with NS	2–8 °C	X	–	–	–	–	X	X	X	X	X	X	X	X
	20–25 °C	X	–	X	–	–	X	X	X	X	–	–	–	–
0.2 mg/mL <sup>a</sup> diluted with NS	2–8 °C	X	–	–	–	–	X	X	X	X	X	X	X	X
	20–25 °C	X	–	X	–	–	X	X	X	X	–	–	–	–

<sup>a</sup>Stored in plastic syringes. <sup>b</sup>Stored in original glass vials.



**Figure 1:** Overlaid HPLC chromatogram of Mitomycin C; black line, immediately after dissolution; red line, degraded by room temperature over 72 h.

**Table 2:** Characteristics of the RP-HPLC assay.

Parameter	Condition/set value
Column	Hypersil ODS C18, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm, thermoscientific
Column temperature	25 °C
Sample temperature	5 °C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 μL
Run time	10 min
Retention time	About 6 min
Detection wavelength	216 nm (assay)
Detection wavelength	254 nm (detection of degradation products)
Mobile phase	65 % 10 mM potassium dihydrogen phosphate pH 6.5 buffer and 35 % methanol HPLC grade
Flushing solution	95 % water HPLC grade and 5 % methanol HPLC grade
Pump mode	Isocratic

water HPLC Grade. Samples from test vials 1 and 8 were injected sixfold on five consecutive days. Samples from test vials 2 to 7 were injected once on the same days.

#### pH measurement

pH-values were measured using a pH 210 Microprocessor pH meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany) with an InLab Micro

pH glass electrode (Mettler Toledo, Greifensee, Germany). The pH meter was calibrated with a five-point calibration (pH 2.00, 4.01, 7.00, 9.21, 11.00) with standard buffer solutions (Technical Buffer Solution, Mettler-Toledo AG, Germany). pH of each sample was measured in triplicate without further dilution at predetermined time points (see Table 1).

#### Osmolality

Osmolality of MMC 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL test solutions was measured in triplicate with the Osmomat 3000 D (Gonotec GmbH, Berlin, Germany) at predetermined time points (see Table 1).

#### Visual inspection

Test solutions were examined by the unaided eye against a dark and a light background whenever samples were taken. Test solutions without color changes and signs of crystallization/precipitation were defined as physicochemically stable.

## Results

### Validation of the RP-HPLC assay

All HPLC chromatograms were consistently characterized by a well-defined and symmetric MMC peak, with a retention time of approximately 6 min (compare Figure 1). The



correlation coefficient amounted to  $R^2=0.999$  and proved linearity over the defined concentration range. The inter-day and intra-day precision tests revealed a mean MMC concentration of  $0.195 \text{ mg/mL}$  ( $97.7\% \pm 1.8\%$  relative standard deviation (RSD) and  $0.196 \text{ mg/mL}$  ( $98.0\% \pm 0.8\%$  RSD, respectively. The results met the acceptance criteria based on ICH Q2 (R1) and proved reproducibility.

### Physicochemical stability of MMC solutions

Remaining MMC concentrations of ready-to-administer MMC test solutions over 96 h of storage are summarized in Figure 2 and detailed results of the stability tests are shown in Tables 3–5.

#### 2 mg/mL MMC solution (Table 3)

By dissolving the MMC lyophilized powder formulated with hydrotropic urea, 2 mg/mL solutions were attained without heating. Solutions revealed to be physicochemically stable for 8 h at both storage temperatures. After 8 h, crystallization occurred in almost all test solutions, especially when stored refrigerated. In solutions showing no evidence of

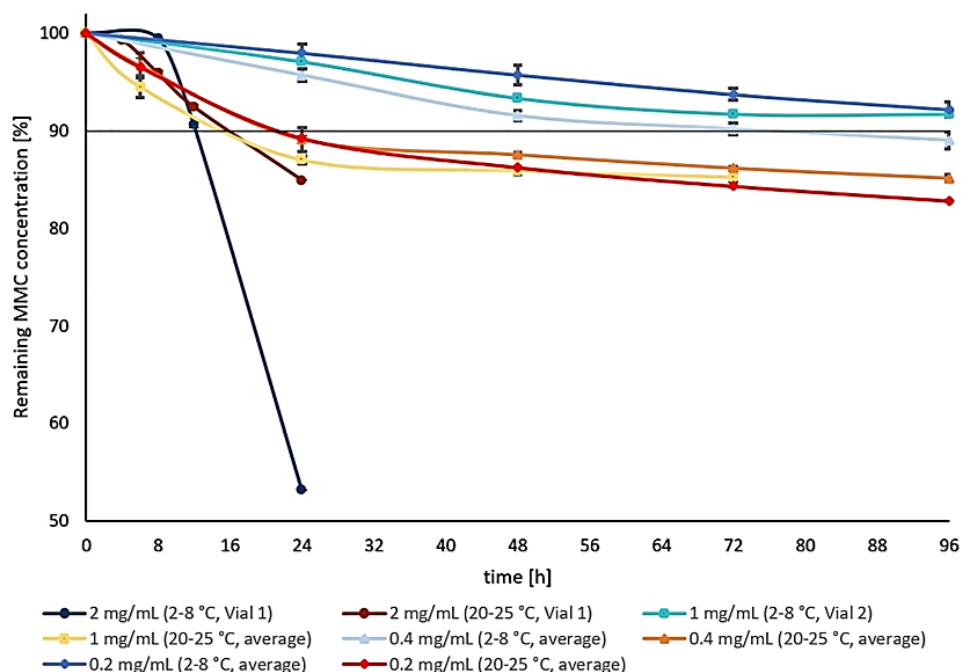
crystallization, loss of MMC was less than 5% after 24 h storage at room temperature.

#### 1 mg/mL MMC solution (Table 4)

Solutions stored refrigerated or at room temperature were physicochemically stable for at least 2 days and at least 6 h, respectively. Under refrigerated storage crystallization was detected in two of the test solutions, starting at day 3. The third test solution showed no crystallization and loss of MMC was less than 10% after 6 days. When stored light protected at room temperature no crystallization occurred for up to 3 days. However, MMC concentrations rapidly declined below the 90% limit between 6 and 24 h of storage (after about 15 h, compare Figure 2, yellow line).

#### 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL MMC solutions (Table 5)

0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL MMC solutions stored refrigerated were physicochemically stable for 5 and 3 days, respectively. In contrast, at room temperature solutions were physicochemically stable only for 6 h independent of the concentration. Crystallization did not occur during the whole observation period.



**Figure 2:** Remaining Mitomycin C (MMC) concentration in dissolved and diluted Mitomycin medac solutions over a period of 96 h (mean  $\pm$  standard deviation). For 2 mg/mL MMC solutions and 1 mg/mL MMC solutions (storage at 2–8 °C) the concentration of one exemplary chosen vial is illustrated (n=3). Other concentrations are resulting from three test solutions (n=9).

**Table 3:** Stability of dissolved Mitomycin medac 2 mg/mL in ready-to-administer syringes. Concentrations in test solutions in which crystallization occurred are given in red italic numbers. MMC=Mitomycin C.

Storage temp.	Test solution	Initial MMC-concentration [mg/mL] ± RSD [%] (n=3)		MMC concentration [%] ± RSD [%] (n=3); Concentration at t=0 h is taken as 100 %			
		Nominal	Measured	4 h	8 h	12 h	24 h
2–8 °C	1	2	1.88 ± 0.4	–	99.5 ± 0.0	<i>90.6 ± 0.3</i>	<i>53.2 ± 0.0</i>
	2	2	1.83 ± 0.0	–	101.6 ± 0.4	<i>88.5 ± 0.5</i>	<i>48.5 ± 0.5</i>
	3	2	1.91 ± 0.2	–	99.5 ± 0.7	<i>94.8 ± 0.3</i>	<i>67.4 ± 0.0</i>
25 °C	1	2	1.94 ± 0.2	99.3 ± 0.0	95.9 ± 0.3	<i>92.5 ± 0.3</i>	<i>84.9 ± 0.0</i>
	2	2	1.89 ± 0.5	101.2 ± 0.4	99.8 ± 0.3	95.9 ± 0.0	95.1 ± 0.3
	3	2	1.94 ± 1.5	96.7 ± 0.5	96.0 ± 1.4	<i>92.4 ± 0.3</i>	<i>87.6 ± 0.5</i>

**Table 4:** Stability of dissolved Mitomycin medac 1 mg/mL in original vials. Concentrations in test solutions in which crystallization occurred are given in red italic numbers. MMC=Mitomycin C.

Storage temp.	Test solution	Initial MMC concentration [mg/mL] ± RSD [%] (n=3)		MMC concentration [%] ± RSD [%] (n=3); Concentration at t=0 h is taken as 100 %						
		Nominal	Measured	6 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
2–8 °C	1	1	1.025 ± 0.3	–	97.6 ± 0.3	94.3 ± 0	<i>67.6 ± 0.4</i>	<i>52.9 ± 0.5</i>	<i>46.9 ± 0</i>	<i>43.5 ± 0</i>
	2	1	1.025 ± 0	–	97.1 ± 0	93.3 ± 0.6	91.7 ± 1.1	91.7 ± 0	<i>86.3 ± 0</i>	<i>76.7 ± 0.4</i>
	3	1	0.985 ± 0.3	–	99.7 ± 0.3	94.4 ± 0.3	95.8 ± 0.5	95.9 ± 0.3	94.8 ± 0	93.2 ± 0
25 °C	1	1	1.115 ± 0	93.3 ± 0	85.4 ± 0.3	84.3 ± 0	83.9 ± 0	–	–	–
	2	1	1.085 ± 0.3	95.4 ± 0.3	87.4 ± 0.5	86.3 ± 0.3	85.3 ± 0.3	–	–	–
	3	1	1.07 ± 1.0	94.9 ± 0.3	88.3 ± 0.3	87.1 ± 0	86.6 ± 0	–	–	–

**Table 5:** Stability of diluted Mitomycin medac 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL in ready-to-administer syringes. MMC=mitomycin C.

Storage temp.	Initial MMC concentration [mg/mL] ± RSD [%] (n=9)		MMC concentration [%] ± RSD [%] (n=9); Concentration at t=0 h is taken as 100 %								
	Nominal	Measured	6 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
2–8 °C	0.2	0.217 ± 1.0	–	98.0 ± 1.0	95.7 ± 1.1	93.7 ± 0.6	92.2 ± 0.9	91.1 ± 0.6	89.8 ± 0.6	88.7 ± 0.6	88.0 ± 0.6
	0.4	0.439 ± 0.9	–	95.7 ± 0.7	91.5 ± 0.6	90.2 ± 0.7	89.0 ± 1.0	88.2 ± 0.8	87.6 ± 0.6	87.3 ± 0.8	86.9 ± 0.9
25 °C	0.2	0.214 ± 0.5	96.5 ± 1.0	89.2 ± 0.3	86.2 ± 0.2	84.3 ± 0.2	82.8 ± 0.2	–	–	–	–
	0.4	0.432 ± 1.4	96.7 ± 1.4	89.1 ± 1.4	87.5 ± 0.4	86.1 ± 0.2	85.1 ± 0.5	–	–	–	–

Overall, concentrated MMC preparations (2 mg/mL, 1 mg/mL) were less prone to chemical degradation than diluted MMC preparations (<1 mg/mL). Results also indicate a positive correlation between temperature and chemical degradation. In contrast, refrigerated solutions and concentrated solutions are more prone to physical instability caused by poor solubility of MMC and crystallization. While the 2 mg/mL MMC preparations were at risk for crystallization regardless of storage temperature, 1 mg/mL

preparations only showed evidence of crystallization under refrigerated storage.

### pH, osmolality, and visual inspection

Tables 6–8 show the measured pH values of the MMC test solutions. In MMC 1 mg/mL and diluted solutions (0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL) initial pH values were in the range of 6.2–7.0 and

increased over time related to the known formation of the basic degradation products. Along with these elevated pH-values, MMC degradation slowed down (compare Figure 2). Whenever MMC crystallization occurred, no increase in pH was seen. In MMC 2 mg/mL solutions initial pH values amounted to pH 7.8 on average with little changes over the observation period of 24 h.

Osmolality of the diluted solutions initially averaged to 266 mOsm/kg (0.2 mg/mL) and 276 mOsm/kg (0.4 mg/mL) and remained almost unchanged over the study period (data not shown).

During visual inspection, MMC crystals appeared as thin, black needles, easily to detect in the bluish solution. Color changes were not observed.

## Discussions

The in-use stability of ready-to-administer Mitomycin medac preparations commonly used in our university medical center was investigated related to MMC concentration, storage condition, and type of primary container. The limit set for stability was  $\geq 90\%$  of the initial MMC concentration determined by a stability indicating HPLC assay.

Degradation of MMC is known to be strongly pH-dependent [17–20]. Of note, different pH values of commonly used infusion solutions significantly influence the rate of MMC degradation. When dextrose 5% infusion solution is used as solvent, the acidic initial pH (pH 4–5 caused by the sterilization process) leads to an increased

**Table 6:** pH values of dissolved Mitomycin medac 2 mg/mL in ready-to-administer syringes. pH values of test solutions in which crystallization occurred are given in red italic numbers.

Storage temp.	Test solution	pH-values $\pm$ RSD [%] (n=3)				
		0 h	4 h	8 h	12 h	24 h
2–8 °C	1	7.78 $\pm$ 0.3	–	7.69 $\pm$ 0.5	<i>7.49 <math>\pm</math> 0.5</i>	<i>7.25 <math>\pm</math> 0.3</i>
	2	7.81 $\pm$ 0.3	–	7.52 $\pm$ 0.3	<i>7.89 <math>\pm</math> 0.6</i>	<i>7.34 <math>\pm</math> 0.3</i>
	3	7.87 $\pm$ 0.4	–	7.80 $\pm$ 0.2	<i>7.61 <math>\pm</math> 0.3</i>	<i>7.27 <math>\pm</math> 0.3</i>
25 °C	1	8.01 $\pm$ 0.2	7.66 $\pm$ 0.2	7.51 $\pm$ 0.3	<i>7.47 <math>\pm</math> 0.4</i>	<i>7.65 <math>\pm</math> 0.3</i>
	2	7.42 $\pm$ 0.5	7.37 $\pm$ 0.3	7.41 $\pm$ 0.2	<i>7.71 <math>\pm</math> 0.3</i>	<i>7.63 <math>\pm</math> 0.1</i>
	3	7.90 $\pm$ 0.5	7.75 $\pm$ 0.3	7.88 $\pm$ 0.3	<i>7.79 <math>\pm</math> 0.3</i>	<i>7.80 <math>\pm</math> 0.2</i>

**Table 7:** pH values of dissolved Mitomycin medac 1 mg/mL in original vials. pH values of test solutions in which crystallization occurred are given in red italic numbers.

Storage temp.	Test solution	pH-values $\pm$ RSD [%] (n=3)							
		0 h	6 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
2–8 °C	1	6.36 $\pm$ 0.2	–	6.37 $\pm$ 0.2	6.45 $\pm$ 0.1	<i>6.59 <math>\pm</math> 0.1</i>	<i>6.45 <math>\pm</math> 0.1</i>	<i>6.36 <math>\pm</math> 0.2</i>	<i>6.36 <math>\pm</math> 0.1</i>
	2	6.39 $\pm$ 0	–	6.40 $\pm$ 0	6.37 $\pm$ 0.1	6.54 $\pm$ 0.2	6.57 $\pm$ 0	<i>6.63 <math>\pm</math> 0</i>	<i>6.48 <math>\pm</math> 0.1</i>
	3	6.45 $\pm$ 0.1	–	6.49 $\pm$ 0.1	6.50 $\pm$ 0.1	6.54 $\pm$ 0	6.57 $\pm$ 0.2	6.60 $\pm$ 0	6.65 $\pm$ 0.1
25 °C	1	6.40 $\pm$ 0.1	6.45 $\pm$ 0.1	6.80 $\pm$ 0	6.93 $\pm$ 0.1	7.10 $\pm$ 0.1	–	–	–
	2	6.43 $\pm$ 0.1	6.49 $\pm$ 0.2	6.73 $\pm$ 0	6.94 $\pm$ 0	7.08 $\pm$ 0	–	–	–
	3	6.21 $\pm$ 0	6.47 $\pm$ 0.2	6.70 $\pm$ 0	6.91 $\pm$ 0.1	7.09 $\pm$ 0.1	–	–	–

**Table 8:** pH values of diluted Mitomycin medac 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL in ready-to-administer syringes. MMC=mitomycin C.

Storage temp.	Nominal MMC-conc.	pH-values $\pm$ RSD [%] (n=9)									
		0 h	6 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
2–8 °C	0.2	6.49 $\pm$ 0.3	–	6.55 $\pm$ 0.1	6.58 $\pm$ 0.1	6.58 $\pm$ 0.1	6.61 $\pm$ 0.1	6.60 $\pm$ 0.1	6.57 $\pm$ 0.4	6.60 $\pm$ 0.4	6.62 $\pm$ 0.1
	0.4	7.02 $\pm$ 0.2	–	7.05 $\pm$ 0.6	7.11 $\pm$ 0.5	7.13 $\pm$ 0.4	7.17 $\pm$ 0.5	7.18 $\pm$ 0.1	7.20 $\pm$ 0.1	7.19 $\pm$ 0.2	7.19 $\pm$ 0.1
25 °C	0.2	6.51 $\pm$ 0.2	6.55 $\pm$ 0.3	6.66 $\pm$ 0.2	6.66 $\pm$ 0.3	6.76 $\pm$ 0.5	6.76 $\pm$ 0.2	–	–	–	–
	0.4	7.03 $\pm$ 0.2	7.05 $\pm$ 0.3	7.08 $\pm$ 0.1	7.15 $\pm$ 0.1	7.18 $\pm$ 0.2	7.19 $\pm$ 0.2	–	–	–	–

acid catalyzed hydrolysis of MMC [17, 21, 27]. pH values of NS prefilled in infusion bags usually lie between 5 and 6. In our study, the pH values of the solvent and diluent were almost neutral (WFI 7.4, NS 6.7), thereby favoring chemical stability of MMC. Moreover, WFI is to be used as solvent according to the SmPC.

## 2 mg/mL MMC solutions for liver TACE

The current formulation of Mitomycin medac clearly improves MMC solubility and allows to prepare MMC 2 mg/mL solutions in plastic syringes to be used in conventional liver TACE. No additional shaking or heating was necessary indicating that hydrotropic solubilization of MMC by urea has been successful. The new formulation was established in a ratio of urea to solvent (water) and solute (MMC) to achieve stable 1 mg/mL MMC solutions. As crystallization of MMC 2 mg/mL solutions occurred already after 12 h of storage in almost all test solutions the urea, MMC and water ratio might not be optimal (see Table 3). In addition, the hydrotropic activity of urea was demonstrated to be temperature dependent, with higher temperature leading to higher activity and thus better solubility [28]. This provides an explanation for the increased MMC crystallization in refrigerated solutions.

Noteworthy, 2 mg/mL solutions of Mitomycin for Injection USP (Accord Healthcare) could only be achieved by heating (50 min, 50 °C), resulting in a clearly diminished stability period of 5 h [11]. After dissolution with WFI, the initial pH of the MMC 2 mg/mL solution amounted to 7.8. The lower initial pH reported by Meyers et al. (pH 7.0) might be related to the different solvent used (slight acidic NS) [11].

Regarding TACE, MMC concentrations >1 mg/mL are more suitable because of smaller corresponding volumes of the required MMC dose and smaller volumes of Lipiodol needed. Higher volume ratios of Lipiodol/anticancer drug solution (preferred ratio 2:1 or 3:1) help the interventional radiologists to prepare a stable emulsion by repetitive pumping of two 10 mL syringes via a 3-way stopcock [23, 25]. Moreover, smaller total injection volumes are related to a better benefit-risk ratio of TACE, as the total volume of Lipiodol should not exceed 15 mL per treatment session [23]. According to our results, 2 mg/mL MMC solutions are physicochemically stable for at least 8 h, allowing pharmacy-based preparation and same day use by interventional radiologists. Storage at room temperature should be preferred, but all solutions must be carefully checked for signs of crystals prior to use. Further studies are necessary to explore the optimum mixing technique and the stability

of the MMC/Lipiodol emulsions, since to date further investigations are only available for doxorubicin/lipiodol emulsions [25].

## 1 mg/mL MMC solution

Meanwhile, stability data for 1 mg/mL MMC solutions are available for formulations containing NaCl, mannitol and urea as excipients. When Briot et al. investigated the stability of Ametycine® dissolved with WFI and stored at 25 °C in glass vials, pH values and the loss of intact MMC were very similar to our results [12]. In both studies  $t_{95}$  (time when 95 % of the initially measured concentration is remaining) was in the range of 6–8 h. According to these study results, MMC 1 mg/mL preparations should be used within a few hours and residual volumes of concentrated solutions are to be discarded. When Beijnen et al. did stability tests of Mitomycin-C Kyowa® in glass vials solved with WFI, storage under refrigeration resulted in prompt crystallization [16]. However, we found 1 mg/mL Mitomycin medac solutions stored refrigerated to be physicochemically stable for up to 6 days without signs of crystallization. Therefore, 1 mg/mL MMC solutions stored refrigerated must be carefully checked for signs of crystals prior to use. Storage at room temperature is not recommended since chemical stability is only given for about 15 h. This time span, when 90 % of the initially measured concentration is remaining ( $t_{90}$ ) can be deduced from Figure 2 (yellow line). This result matches with our previous finding for urea-containing mitomycin medac reconstituted with WFI: After 24 h of storage at room temperature approximately 92 % of the initial MMC concentration remained intact [9]. In contrast, reconstitution with 0.9 % NaCl solution accelerated the degradation rate of MMC [9].

## 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL MMC solutions for glaucoma surgery

Diluted (0.1 mg/mL up to 0.4 mg/mL) MMC solutions are primarily used in glaucoma surgery [6]. Published in-use stability studies were performed with varying MMC concentrations, diluents of different pH values, and various finished medicinal products and thus revealed different results [10, 13–15]. In accordance with previous investigations [15–17], our results highlight that the stability of diluted MMC preparations is strongly dependent on the storage temperature, with refrigerated storage being beneficial for stability. Storage at room temperature

should be avoided, due to faster degradation of MMC. Crystallization was not an issue in diluted 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL MMC solutions. Nisse et al. investigated the stability of Mitomycin medac and Ametycine® diluted with NS or WFI to a MMC concentration of 0.2 mg/mL. After 63 days of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , precipitation was observed in Ametycine® samples but not in Mitomycin medac samples, indicating improved MMC solubilization by hydrotropic urea [10].

### Limitations of the study

During the study period, peaks of degradation products appeared clearly separated from the MMC parent peak and increased over time. Further identification and quantification of degradation products, mainly resulting from acid hydrolysis and aziridine ring opening [16], were not performed. According to the literature [11, 12], degradation products are not believed to be cytotoxic and there are no limits set in the pharmacopoeia [29, 30].

Regarding the experimental setup, sampling time points were chosen according to the known instability of MMC solutions and the guidelines for stability testing of pharmaceutical preparations [31]. Nevertheless, determination of  $t_{90}$  is limited by the random occurrence of crystallization. However, lack of crystallization indicates physicochemical stability over the experimentally determined periods.

In 2 mg/mL MMC solutions the initially measured concentrations deviated from the nominal concentrations (on average 5%, see Table 3). This is most probably not caused by immediate MMC degradation, but by the preparation process of test solutions and the used sampling technique.

Regarding the limited solubility of MMC and the risk of crystallization, measurement of sub-visible particles would have been reasonable, but was not feasible due to technical reasons. Further studies with larger volumes of test solutions are necessary to address this issue.

Today, differently formulated finished medicinal products containing different types and amounts of excipients (e.g. urea, NaCl, mannitol) are available on the market. As published in-use stability studies were performed with different brand products and pH values of NS used as diluent are different or not reported, comparison of studies and the applicability of the results often proved difficult. More systematic stability studies of MMC preparations are needed, addressing the impact of specific formulations used as starting material and checking the pH of NS used as diluent.

### Conclusions

MMC lyophilized powder formulated with urea as hydrotropic agent has significantly increased solubility of MMC, which allows the preparation of solutions with MMC concentrations up to **2 mg/mL** without additional heating or shaking. MMC 2 mg/mL solutions remain chemically stable for 24 h and can be utilized in liver TACE, where smaller volumes of higher concentrated MMC solutions are more appropriate to prepare stable MMC/Lipiodol emulsions. However, crystallization is stability limiting, especially when stored refrigerated. Storage at room temperature is strongly recommended and all MMC solutions must be checked for signs of crystallization before use.

For **1 mg/mL** MMC solutions the risk of crystallization is lower and refrigerated storage for up to 2 days can be utilized. When solutions are free from visible particles, chemical stability is given for up to 6 days. Solutions should be carefully checked for signs of crystallization before use.

In MMC solutions diluted to a concentration of **0.2 mg/mL** and **0.4 mg/mL** chemical degradation is the most prominent stability limiting factor. Since crystallization was not observed at all, refrigerated storage is strongly recommended and feasible for maximum 5 days (0.2 mg/mL) and 3 days (0.4 mg/mL).

**Research funding:** None declared.

**Author contributions:** All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

**Competing interests:** Authors state no conflict of interest.

**Informed consent:** Not applicable.

**Ethical approval:** Not applicable.

### References

1. Medac-GmbH. Mitomycin medac 1 mg/ml Pulver zur Herstellung einer Injektions- bzw. Infusionslösung oder einer Lösung zur intravesikalen Anwendung; 2021. Available online: [https://www.medac.eu/fileadmin/user\\_upload/medac-eu/SPCs/Germany/spc-de-Mitomycin\\_medac.pdf](https://www.medac.eu/fileadmin/user_upload/medac-eu/SPCs/Germany/spc-de-Mitomycin_medac.pdf).
2. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Witjes JA. The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials. *Eur Urol* 2008;53:709–19.
3. Brown DB, Geschwind JF, Soulen MC, Millward ST, Sacks D. Society of interventional radiology position statement on chemoembolization of hepatic malignancies. *J Vasc Intervent Radiol* 2006;17:217–23.
4. Ramsey DE, Kernagis LY, Soulen MC, Geschwind JF. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *J Vasc Intervent Radiol* 2002;13:S211–21.

5. Desai MA, Gedde S, Feuer WJ, Shi W, Chen PP, Parrish RK. 2nd practice preferences for glaucoma surgery. A survey of the American glaucoma society in 2008. *Ophthalmic Surg Laser Imag* 2011;42: 202–8.
6. Al Habash A, Aljasim LA, Owaidhah O, Edward DP. A review of the efficacy of Mitomycin C in glaucoma filtration surgery. *Clin Ophthalmol* 2015;9:1945–51.
7. Murono K, Kawai K, Hata K, Emoto S, Kaneko M, Sasaki K, et al. Regimens of intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Anticancer Res* 2018;38: 15–22.
8. Dhapte V, Mehta P. Advances in hydrotropic solutions: an updated review. *St Petersburg Polytech Univ J Phys Math* 2015;1:424–35.
9. Almasi J, Thiesen J, Kraemer I. Physicochemical stability of ready-to-administer Mitomycin C solutions for intravesical instillation. *Eur J Hosp Pharm* 2023;30. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2023-003743>.
10. Nisse YE, Vigneron J, Zenier H, D'Huart E, Demoré B. Stability of mitomycin in polypropylene syringes for use in glaucoma surgery. *Eur J Oncol Pharm* 2021;4:28–33.
11. Myers AL, Zhang YP, Kawedia JD, Zhou X. Solubilization and stability of Mitomycin C solutions prepared for intravesical administration. *Drugs R* 2017;17:297–304.
12. Briot T, Truffaut C, Quay LL, Lebreton A, Lagarce F. Stability of reconstituted and diluted Mitomycin C solutions in polypropylene syringes and glass vials. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2016;1:83–9.
13. Kinast RM, Akula KK, de Barber AE, Barker GT, Gardiner SK, Whitson E, et al. The degradation of Mitomycin C under various storage methods. *J Glaucoma* 2016;25:477–81.
14. Francoeur AM, Assalian A, Lesk MR, Morin I, Tétreault F, Calleja K, et al. A comparative study of the chemical stability of various Mitomycin C solutions used in glaucoma filtering surgery. *J Glaucoma* 1999;8:242–6.
15. Velpandian T, Saluja V, Ravi AK, Kumari SS, Mathur R, Ranjan N, et al. Evaluation of the stability of extemporaneously prepared ophthalmic formulation of mitomycin C. *J Ocul Pharmacol Therapeut* 1997;6:33–6.
16. Beijnen JH, van Gijn R, Underberg WJM. Chemical stability of the antitumor drug Mitomycin C in solutions for intravesical instillation. *J Parenter Sci Technol* 1990;44:332–5.
17. Dorr RT, Liddil JD. Stability of Mitomycin C in different infusion fluids: compatibility with heparin and glucocorticosteroids. *J Oncol Pharm Pract* 1995;1:19–24.
18. Beijnen JH, Underberg WJM. Degradation of Mitomycin C in acidic solution. *Int J Pharm* 1985;24:219–29.
19. Beijnen JH, den Hartigh J, Underberg WJM. Quantitative aspects of the degradation of Mitomycin C in alkaline solution. *J Pharm Biomed Anal* 1985;3:59–69.
20. Underberg WJM, Lingeman H. Aspects of the chemical stability of mitomycin and porfiromycin in acidic solution. *J Pharmaceut Sci* 1983; 72:549–53.
21. Beijnen JH, Rosing H, Underberg WJM. Stability of mitomycins in infusion fluids. *Arch Pharm Chem Sci* 1985;13:58–66.
22. Quebbeman EJ, Hoffmann NE, Ausman RK, Hamid AAR. Stability of mitomycin admixtures. *Am J Hosp Pharm* 1985;42:1750–4.
23. de Baere T, Arai Y, Lencioni R, Geschwind JF, Rilling W, Salem R, et al. Treatment of liver tumors with lipiodol TACE: technical recommendations from experts opinion. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2016;39:334–43.
24. Gaba RC. Chemoembolization practice patterns and technical methods among interventional radiologists: results of an online survey. *AJR Am J Roentgenol* 2012;198:692–9.
25. Deschamps F, Moine L, Isoardo T, Tselikas L, Paci A, Mir LM, et al. Parameters for stable water-in-oil lipiodol emulsion for liver trans-arterial chemo-embolization. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2017;40:1927–32.
26. European Medicines Agency. International conference on harmonization. Harmonized tripartite guidelines for stability testing of new drugs substances and products Q1A(R2); 1994. [https://www.gmp-navigator.com/files/guidemgr/Q1A\(R2\)%20Step4%20\(2\).pdf](https://www.gmp-navigator.com/files/guidemgr/Q1A(R2)%20Step4%20(2).pdf) [Accessed Jun 2023].
27. Benvenuto JA, Anderson RW, Kerkof K, Smith RG. Stability and compatibility of antitumor agents in glass and plastic containers. *Am J Hosp Pharm* 1981;38:1914–8.
28. Beig A, Lindley D, Miller JM, Agbaria R, Dahan A. Hydrotropic solubilization of lipophilic drugs for oral delivery: the effects of urea and nicotinamide on carbamazepine solubility-permeability interplay. *Front Pharmacol* 2016;7:379–86.
29. Council of Europe. 1655 monograph mitomycin in European pharmacopoeia 10.0. Strasbourg, France: European Medicines Agency; 2020.
30. The United States Pharmacopeial Convention. Monograph mitomycin for injection. In: *United States Pharmacopeia-National Formulary*. North Bethesda, MD, USA: The United States Pharmacopeial Convention; 2021.
31. NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. A standard protocol for deriving and assessment of stability Part 1-aseptic preparations (Small Molecules), 5th ed.; 2019. Available online: <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2013/12/Stability-part-1-small-molecules-5th-Ed-Sept-19.pdf>.

**Physicochemical stability of ready-to-administer mitomycin C solutions for intravesical instillation**

Almasi J, Thiesen J, Krämer I.

Eur J Hosp Pharm. 2023 May 9. doi: 10.1136/ejhpharm-2023-003743.

Eigenanteil: Literaturrecherche, Planung und Durchführung der Stabilitätsuntersuchung, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse, Verfassung und Korrektur des Manuskripts

# Physicochemical stability of ready-to-administer mitomycin C solutions for intravesical instillation

Jannik Almasi , Judith Thiesen, Irene Kraemer

Pharmacy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Rheinland-Pfalz, Germany

**Correspondence to**  
Jannik Almasi, Pharmacy, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz 55131, Germany; jannik.almasi@unimedizin-mainz.de

Received 27 February 2023  
Accepted 9 May 2023

EAHP Statement 3:  
Production and  
Compounding.

## ABSTRACT

**Objective** The aim of the study was to investigate the physicochemical stability of mitomycin-containing medicinal products for bladder instillation, formulated with urea as excipient (mito-medac®, Mitomycin medac). For comparison, the stability of reconstituted Urocin® and Mitem® bladder instillation was studied.

**Methods** Mitomycin-containing medicinal products were either reconstituted with the prepackaged 0.9% NaCl solution, nominal volume 20 mL (mito-medac®, Mitem®, Urocin®) or with 20 mL water for injection (Mitomycin medac, Mitem®, Urocin®) to a nominal concentration of 1 mg/mL and stored at room temperature (20–25°C). Samples were taken immediately after reconstitution and after 24 hours. Physicochemical stability was determined by reverse-phase high performance liquid chromatography with photodiode array detection, measurement of pH and osmolarity, and inspection for visible particles or colour changes.

**Results** The initial pH values of the test solutions reconstituted with prepackaged 0.9% NaCl (5.2–5.6) were significantly lower than those reconstituted with water for injection (6.6–7.4). Solutions reconstituted with 0.9% NaCl solutions rapidly degraded and concentrations fell below the 90% limit after 24 hours of storage. When reconstituted with water for injection, degradation was less rapid. Concentrations of Mitomycin medac and Urocin remained above the 90% limit after 24 hours.

**Conclusions** The physicochemical stability of mitomycin 1 mg/mL bladder instillation prepared with prepackaged 0.9% NaCl in prefilled PVC bags is less than 24 hours at room temperature. Unfavourable pH values of the solvents cause rapid degradation of mitomycin. Mitomycin solutions reconstituted at the point of care should be administered immediately to avoid degradation and loss of efficacy. Urea added as excipient did not accelerate degradation.

## INTRODUCTION

The antitumor drug mitomycin C (MMC) is indicated after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder carcinoma. In general, this adjuvant chemotherapy consists of 20–40 mg MMC instilled into the bladder.<sup>1,2</sup> Specific bladder instillation kits containing vials with 20 mg/40 mg MMC lyophilisate and 20 mL/40 mL 0.9% sodium chloride solution (NS) in prefilled PVC bags with a pre-connected vial adapter are licensed. Currently, three 20 mg MMC brand products for intravesical administration with prepackaged NS solvent solution are shown in table 1 (product MMC A1, B and C).

## WHAT IS ALREADY KNOWN ON THIS TOPIC

- ⇒ The physicochemical stability of mitomycin solutions is limited.
- ⇒ The degradation of reconstituted mitomycin depends on pH and temperature.

## WHAT THIS STUDY ADDS

- ⇒ Urea added as excipient in mitomycin medicinal products does not accelerate degradation.
- ⇒ The low pH of prepackaged 0.9% NaCl solutions in mitomycin bladder instillation kits causes rapid mitomycin degradation.
- ⇒ At room temperature, reconstituted solutions should be used immediately after preparation to avoid loss of efficacy.

## HOW THIS STUDY MIGHT AFFECT RESEARCH, PRACTICE OR POLICY

- ⇒ Reconstitution of intravesical instillations has to be carried out at the point of care.

In 2017, mito-medac® (intravesical instillation kit, product MMC A1) and Mitomycin medac (powder for injection or intravesical use, product MMC A2) were re-formulated by the addition of urea as excipient to facilitate the manufacturing and reconstitution process. Information regarding the impact of the addition of urea on the physicochemical properties and stability of the reconstituted solution has not yet been published.

MMC is sparingly soluble in water and relatively unstable in aqueous solution. Stability is known to be strongly pH dependent, with optimum pH 7–8.<sup>3,4</sup> At lower and higher pH values, MMC degradation rates increase proportionally to the concentration of [H<sup>+</sup>] and [OH<sup>-</sup>] ions.<sup>5</sup> In slightly acidic solutions the methoxy group is cleaved and the aziridine ring opened, which leads to the formation of two diastereomeric diamino-mitosenes (figure 1). The alkaline degradation products raise the pH, thereby decreasing the degradation rate of MMC.<sup>6</sup>

For intravesical administration, MMC lyophilisates marketed as instillation kits are dissolved with the enclosed NS solution and immediately instilled. Detailed information on the stability of the ready-to-administer solutions is not given.<sup>7–9</sup> There are few studies on the physicochemical stability of MMC 1 mg/mL bladder instillation.<sup>5,10,11</sup> Beijnen *et al* stated that 0.6–0.8 mg/mL MMC bladder instillations dissolved in water for injection (WFI) are stable for 4 days at ambient temperature. Dissolution and storage in NS or phosphate buffer pH 7.4 is not recommended because, in these media, more rapid degradation and/or precipitation occur. The



© European Association of Hospital Pharmacists 2023. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

**To cite:** Almasi J, Thiesen J, Kraemer I. *Eur J Hosp Pharm* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/ejpharm-2023-003743



## Original research

**Table 1** Characteristics of mitomycin C (MMC)-containing medicinal products for intravesical instillation according to the Summary of Product Characteristics

	MMC A1 mito-medac® 20 mg <sup>a,7</sup>	MMC A2 Mitomycin medac 20 mg <sup>†20</sup>	MMC B Mitem® 20 mg <sup>†8</sup>	MMC C Urocin® 20 mg <sup>†9</sup>
Excipients	Urea	Urea	Mannitol (calculated 40 mg) HCl 36% for pH adjustment NaOH for pH adjustment	Mannitol (calculated 240 mg) HCl for pH adjustment
Solvent	20 mL NS prepackaged PVC bag	20 mL NS for intravesical administration 20 mL WFI for IV administration	20 mL NS prepackaged PVC bag 40 mL WFI for IV administration	20 mL NS prepackaged PVC bag 40 mL WFI for IV administration

<sup>a</sup>Licensed for intravesical and intravenous administration.  
<sup>†</sup>Licensed for intravesical administration.  
 IV, intravenous; NS, sodium chloride solution; WFI, water for injection.

degradation rates of reconstituted solutions are lower at refrigerated temperatures, but solubility is substantially reduced at lower temperatures and precipitation may occur.<sup>5</sup>

The aim of our study was to investigate the physicochemical stability of urea-containing MMC formulations when reconstituted with prepackaged NS (mito-medac®) or WFI (Mitomycin medac) and stored for 24 hours at room temperature. In addition, the stability of reconstituted Urocin® and Mitem® bladder instillation after reconstitution with prepackaged NS or WFI was studied.

## MATERIALS AND METHODS

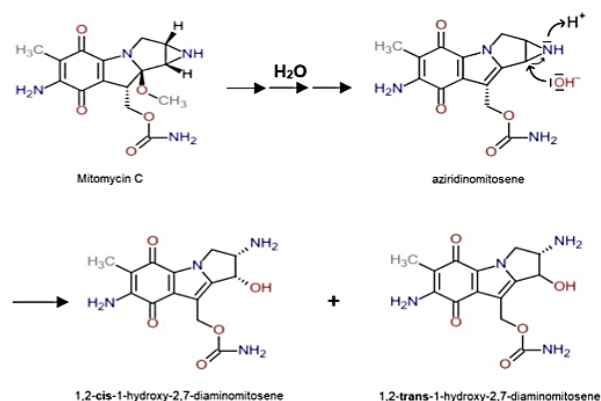
### Medicinal products

MMC A1: mito-medac®, 20 mg, powder and solvent for intravesical solution, NS 20 mL PVC bag (pH 4.1); medac GmbH, Wedel, Germany.

MMC A2: Mitomycin medac, 20 mg, 1 mg/mL powder for solution for injection/infusion or intravesical use; medac GmbH, Wedel, Germany.

MMC B: Mitem®, 20 mg, powder for solution for injection/infusion or intravesical use, NS 20 mL PVC bag, type enclosed until 02/2021 (pH 4.6); Substipharma Ltd, London, UK (Distributor: Dr Pflieger, Bamberg, Germany).

MMC C: Urocin®, 20 mg, powder for solution for injection/infusion or intravesical use, NS 20 mL PVC bag (pH 4.3); Apogepha Arzneimittel GmbH, Dresden, Germany.



**Figure 1** Abbreviated degradation pathway of mitomycin C in acidic solution adapted from Beijnen *et al.*<sup>6</sup> and McClelland *et al.*<sup>21</sup>

WFI: Aqua ad iniectabilia Braun, 100 mL glass injection bottle; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany.

### Preparation of test solutions

#### MMC reconstituted with NS

MMC A1, B and C 20 mg, three vials each, were reconstituted with the prepackaged NS, nominal volume 20 mL. According to the Summary of Product Characteristics (SmPC), the entire volume was transferred via adapter. The reconstituted solutions were stored at room temperature (20–25°C) protected from light.

#### MMC reconstituted with WFI

MMC A2, B and C 20 mg, three vials each, were reconstituted with 20 mL WFI using a Codan spike (CODAN, Lensahn, Germany) and 20 mL disposable plastic syringes (BD Plastipak, Becton Dickinson, Drogheda, Ireland). The resulting 1 mg/mL MMC solutions were stored at room temperature (20–25°C) protected from light.

### Sample preparation

Immediately after reconstitution (0 hours) and after 24 hours of storage, 5 mL samples were withdrawn in duplicate from each MMC test solution. 200 µL aliquots were diluted with 800 µL water HPLC grade (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) and homogenised for 10 s using a vortex mixer.

### HPLC assay

A known reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method<sup>12,13</sup> with photodiode array detection was used for quantitative analysis of MMC and degradation products. The HPLC system consisted of a Waters Alliance 2695 pump connected to a Waters Photodiode Array Detector 996 (Waters, Eschborn, Germany). Waters Empower Pro, Empower 2 Software, Version 6.10.01.00 was used for instrument operation, data collection and processing. Separation was performed with a C18 column Hypersil ODS C18, 250 mm × 460 mm, 5 µm (MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany) at 25°C. The mobile phase consisted of 65% 10 mM buffer solution (potassium dihydrogen phosphate; AppliChem, Darmstadt, Germany) dissolved in water HPLC grade (AppliChem) and 35% methanol HPLC grade (Fisher Scientific, Loughborough, UK). The flow rate was set to 1 mL/min, the detection wavelength to 216 nm (quantification of MMC)<sup>12,13</sup> and 254 nm (detection of degradation products).<sup>14</sup> Run time was 10 min. From each sample 10

$\mu\text{L}$  aliquots were injected in triplicate by an autosampler. Under these conditions the MMC retention time was about 6 min. The washing solution consisted of 95% water HPLC grade and 5% methanol HPLC grade. Test solutions were considered to be stable when the measured MMC concentration was  $\geq 90\%$  of the initially measured concentration (100%).

Peak areas of degradation products  $>0.5\%$  of the main peak area were manually integrated and calculated as a percentage of the main peak area.

#### Validation of the RP-HPLC assay

Assay validation was performed in accordance with the ICH Harmonised Tripartite Guideline for Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1).<sup>8</sup> Linearity testing was performed with a stock solution obtained by reconstitution of 10.0 mg mitomycin C CRS substance (EDQM, Strasbourg, France) with 10 mL WFI. The calibration curve was established with seven MMC standards (0.10 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.18 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.22 mg/mL, 0.24 mg/mL and 0.30 mg/mL) obtained by further dilution with water HPLC grade. Aliquots of the standards were injected in triplicate. The measured peak areas were plotted against the nominal MMC concentrations to obtain the calibration curve.

Intra- and inter-day accuracy and precision were validated by analysing MMC solutions on five consecutive days. Stock solutions were freshly prepared on each day, as described above. Eight test solutions of the nominal concentration 0.2 mg/mL were obtained by adding 200  $\mu\text{L}$  stock solution in each HPLC vial pre-filled with 800  $\mu\text{L}$  water HPLC grade. Samples from test vials 1 and 8 were injected sixfold on five consecutive days. Samples from test vials 2–7 were injected once on the same days.

#### pH

pH values were measured using a calibrated Seven Compact Duo pH/Conductivity S213 instrument (Mettler Toledo, Büttelborn, Germany). Undiluted samples withdrawn at 0 and 24 hours were measured once when reconstituted with WFI or in triplicate when reconstituted with NS.

#### Osmolality

Osmolality was measured with the Osmomat 3000 (Gonotec, Berlin, Germany) in triplicate for each undiluted sample withdrawn at 0 and 24 hours.

#### Visual inspection

Whenever samples were withdrawn, aliquots and the residual solution in the original vials were examined for colour changes and particle formation with the unaided eye. Test solutions with no colour change or any precipitation were defined as physico-chemically stable.

## RESULTS

#### Validation of the RP-HPLC assay

The HPLC method was adopted from Briot *et al* and proven as a stability indicating method.<sup>12,13</sup> The absence of interference with urea was proven.<sup>13</sup> The MMC parent peak and the peaks of degradation products were clearly separated. The equation of the standard curve was  $y = 4.08E + 07x + 8.07E + 04$ . The correlation coefficient amounted to  $>0.999$  and proved linearity over the defined concentration range. Accuracy was  $97.0 \pm 2.4\%$  relative standard deviation (RSD) for MMC 1 mg/mL samples. The intra-day and inter-day precision tests showed a mean MMC concentration of  $97.0 \pm 2.5\%$  RSD and  $97.5 \pm 2.5\%$  RSD, respectively. The results met the acceptance criteria based on ICH Q2 (R1)<sup>15</sup> and proved reproducibility.

#### Stability of MMC reconstituted with NS or WFI

The MMC concentrations measured immediately after reconstitution and after 24 hours of storage are shown in table 2.

Reconstitution of MMC A1, B, C with prepackaged NS resulted in MMC concentrations lower than the nominal concentration of 1 mg/mL. This was most obvious for MMC B, which had a concentration of only 0.79 mg/mL immediately after reconstitution. During the 24-hour storage period at room temperature, MMC concentrations rapidly declined below the 90% limit in each test solution (see table 2). Comparative testing of MMC-containing medicinal products A2, B and C dissolved with 20 mL of WFI had initial MMC concentrations corresponding to the nominal concentration. After 24 hours of storage at room temperature, loss of MMC was lower than 10% for MMC A2 and MMC C and about 18% for MMC B.

Irrespective of the solvent used, degradation products were detected in the HPLC chromatograms immediately after reconstitution. The area under the curve (AUC) of the degradation products significantly increased over the 24-hour period (see figure 2) and are shown in table 3 for both time points.

**Table 2** Stability of MMC A1, A2, B and C solutions 1 mg/mL reconstituted with prepackaged NS or 20 mL WFI stored for 24 hours at room temperature, protected from light

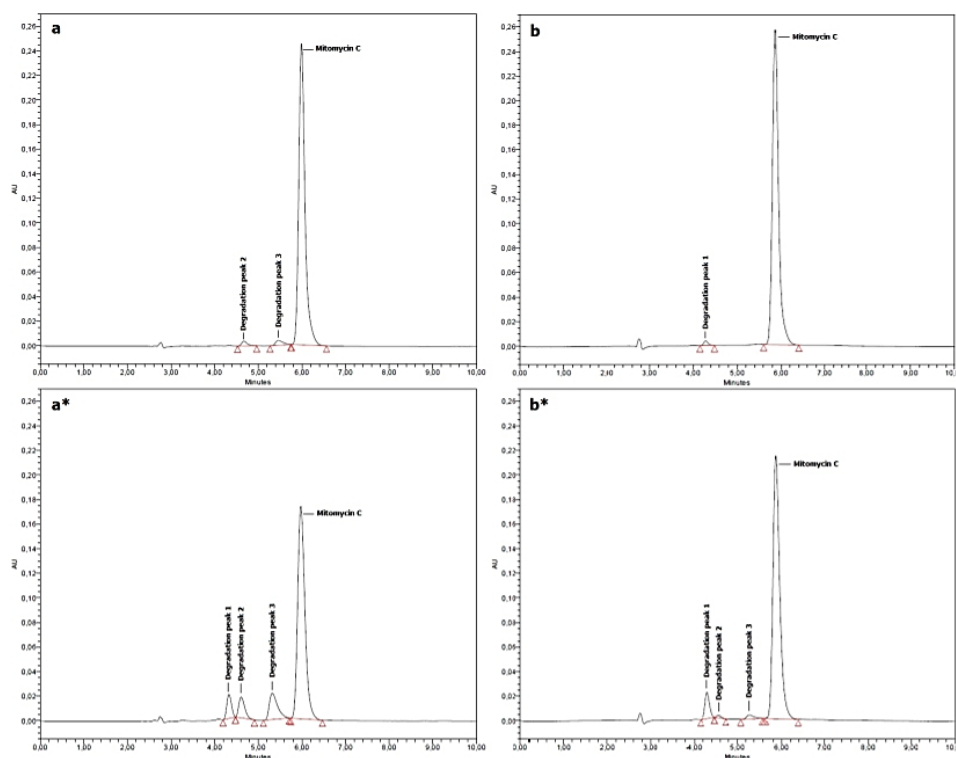
Solvent	Medicinal product	Initial MMC concentration $\pm$ RSD, mg/mL (n=18)		MMC concentration $\pm$ RSD, mg/mL (n=18)		% Initial concentration remaining $\pm$ RSD (n=18)
		Nominal	Measured 0 hours	24 hours	24 hours	
NS	A1	(1)*	0.932 $\pm$ 1.2	0.765 $\pm$ 1.3	82.1 $\pm$ 1.3	
NS	B	(1)*	0.793 $\pm$ 4.7	0.691 $\pm$ 3.7	87.1 $\pm$ 3.7	
NS	C	(1)*	0.903 $\pm$ 1.2	0.772 $\pm$ 2.2	85.8 $\pm$ 2.2	
WFI	A2	1	0.974 $\pm$ 0.9	0.894 $\pm$ 1.0	91.8 $\pm$ 0.2	
WFI	B	1	1.017 $\pm$ 1.4	0.833 $\pm$ 1.2	81.9 $\pm$ 2.2	
WFI	C	1	0.965 $\pm$ 1.0	0.887 $\pm$ 1.2	91.9 $\pm$ 1.4	

Measured MMC concentrations and calculated remaining MMC concentrations are expressed as mean  $\pm$  RSD (%) and percentage rate  $\pm$  RSD (n=18).

\*The nominal concentration refers to the declared concentration when 20 mL NS is used for reconstitution. In the experiments the total volume of the prepackaged NS was added as given in the Summary of Products Characteristics.

MMC, mitomycin C; NS, sodium chloride solution; RSD, relative standard deviation; WFI, water for injection.

## Original research



**Figure 2** Representative chromatograms of mitomycin C (MMC) A1 dissolved with sodium chloride solution after (a) 0 hours and (a\*) 24 hours and MMC A2 dissolved with water for injection after (b) 0 hours and (b\*) 24 hours of storage at room temperature. Degradation products 1–3 are shown as separate peaks; detection wavelength 254 nm.

In MMC solutions reconstituted with NS and WFI, a maximum of four and three additional peaks due to degradation products were detected, respectively. In test solutions prepared with the acidic NS, mostly degradation product 3 was formed, while in test solutions prepared with WFI degradation product 1 was predominant.

Percentage rates of degradation products differed between the brand products investigated. Immediately after reconstitution we detected the lowest numbers/percentage rates in the urea-containing formulations MMC A1 and A2 (see table 3).

#### pH, osmolality and visual inspection

Table 4 shows the pH and osmolality of the test solutions. Initial pH values correspond to the solvent used, with acidic NS solutions showing lower pH values (5.2–5.6) than WFI solutions (6.6–7.4).

After 24 hours, increased pH values were measured (NS solutions 6.4–6.5; WFI solutions 6.9–7.4).

Osmolality of the MMC 1 mg/mL solutions dissolved with NS amounted to 525 mOsm/kg for the urea-containing MMC A1 and to about 300 mOsm/kg for MMC B and C. No changes were observed after 24 hours. When WFI was used as the solvent, MMC A2 was 250 mOsm/kg while MMC B and C were distinctly hypo-osmolar (15 mOsm/kg and 69 mOsm/kg).

No visible particles or colour changes were detected in any of the samples at any time of observation.

#### DISCUSSION

The reformulation of mito-medac® (intravesical instillation kit) and Mitomycin medac (powder for injection or intravesical

use) by the addition of urea as excipient forced us to study the in-use stability. According to the SmPC, the ready-to-administer instillation solutions are prepared with enclosed PVC infusion bags prefilled with NS. Because of the closed system procedure and low occupational risk, reconstitution can be done at the point of care followed by immediate use. Therefore, we tested in-use stability immediately after reconstitution and after 24 hours storage at room temperature. Refrigeration was avoided because there is evidence of precipitation in 1 mg/mL solutions.<sup>5</sup> For comparison, we tested the physicochemical stability of two other MMC instillation kits marketed in Germany. Each product is differently formulated, and the instillation kits come with different PVC bags prefilled with nominally 20 mL NS. The exact solvent volume plays a minor role as the total volume and thereby the intended dose is instilled.

Different initial MMC concentrations measured in MMC bladder instillation A1, B and C can be explained by overfills of the PVC bags and/or immediately starting rapid degradation related to the low pH values of the pure NS solvent (measured pH 4.1–4.6). Initial pH values of the MMC bladder instillations were 5.2–5.6, and increased to pH 6.4 after 24 hours storage at room temperature. In parallel, the MMC concentrations decreased by about 15% in each product and the percentage rates of basic degradation products increased.

In contrast, when WFI (pH 7.4) was used as solvent, the pH values of the MMC solutions were 6.6–7.4, which is favourable for MMC stability. Despite the initial pH value of 6.6, the degradation in MMC B solutions was much higher (18.1%) than in MMC A2 and C solutions (about 9%). Most probably, the low MMC concentration determined in MMC bladder instillation

**Table 3** Percentage rates of degradation products related to the area under the curve (AUC) of the MMC parent peak immediately after reconstitution (0 hours) with NS or WFI and after 24 hours storage at room temperature, protected from light

Solvent	Medicinal product	Degradation peak number	Mean percentage rate of degradation peak related to the AUC of the MMC parent peak	
			0 hours	24 hours
NS	A1	1	–	5.72±0.06
		2	1.28±0.12	6.08±0.05
		3	1.68±0.11	10.68±0.13
		4	–	–
NS	B	1	1.75±0.19	5.89±0.06
		2	0.87±0.06	6.75±0.36
		3	1.13±0.11	10.70±0.61
		4	–	–
NS	C	1	1.15±0.16	6.22±0.39
		2	1.38±0.05	4.77±0.68
		3	1.37±0.13	5.88±0.29
		4	–	1.23±0.58
WFI	A2	1	0.57±0.19	6.17±0.07
		2	–	0.55±0.04
		3	–	1.24±0.14
		4	–	–
WFI	B	1	1.26±0.30	7.24±0.06
		2	–	0.59±0.03
		3	–	1.25±0.08
		4	–	–
WFI	C	1	2.59±0.18	7.73±0.09
		2	1.01±0.06	0.78±0.07
		3	1.00±0.05	1.32±0.06
		4	–	–

Values expressed as mean±SD (n=18).  
MMC, mitomycin C; NS, sodium chloride solution; WFI, water for injection.

B directly after dissolution is related to overfill of the NS PVC bags. It can be concluded that formulation with urea as excipient does not affect stability.

Direct comparison with published stability data is difficult since different marketed medicinal products, different solvents/infusion solutions and different storage conditions were applied

**Table 4** pH values and osmolality measured in 1.0 mg/mL MMC solutions immediately after reconstitution (0 hours) with NS or WFI and after 24 hours storage at room temperature, protected from light

Solvent	Medicinal product	Mean pH±RSD (n=9)		Mean osmolality±RSD, mOsm/kg (n=9)	
		0 hours	24 hours	0 hours	24 hours
NS	A1	5.2±0.5	6.5±0.5	528±0.8	525±0.6
NS	B	5.2±1.0	6.4±0.1	310±1.0	311±0.9
NS	C	5.6±2.5	6.4±1.1	343±0.6	345±0.7
WFI	A2	6.6±3.8*	6.9±0.4*	249±1.9	249±0.6
WFI	B	6.6±2.7*	6.9±0.3*	14±9.8	13±3.8
WFI	C	7.4±1.4*	7.4±0.3*	69±1.0	70±1.2

Values expressed as mean±RSD (%)  
\*n=3.  
MMC, mitomycin C; NS, sodium chloride solution; RSD, relative standard deviation; WFI, water for injection.

in the experiments. While Beijnen *et al*<sup>5</sup> reported 4 days stability under refrigeration for MMC 0.6 mg/mL solutions dissolved with NS (pH unknown), Briot *et al*<sup>12</sup> reported 10 hours stability at room temperature for MMC 1 mg/mL when WFI was used as solvent. Meyers *et al*<sup>10</sup> reported stability for up to 5 hours for MMC 1 mg/mL bladder instillations stored at 37°C following initial incubation at 50°C in a hot water bath. MMC diluted in 5% dextrose solution (pH 5) and stored at room temperature is only stable for 2.6 hours ( $t_{90}$ ).<sup>16</sup> Therefore, it can be concluded that the stability of MMC bladder instillations prepared with acidic NS is only for a few hours. Decreased MMC content may result in clinically relevant underdosing, especially with respect to the fact that 40 mg MMC/week is more effective than 20 mg MMC/week.<sup>17</sup> Moreover, dosing is affected by parameters such as the residual urine volume, urine production, urinary pH (the respective SmPCs of the bladder instillation solutions recommend a pH >6 before instillation) and the dwell time of the active substance in the bladder.<sup>17–19</sup> Hence, initial MMC degradation should be as low as possible to ensure effective dosing, especially when using the 20 mg MMC bladder instillation solution.

HPLC chromatograms of the test solutions showed additional peaks next to the MMC parent peak, with increasing peak areas over time (see figure 2). These peaks correspond to the degradation peaks resulting from forced degradation.<sup>13</sup> MMC degradation products are mostly formed by solvolysis during manufacturing (eg, lyophilisation) and the reconstitution process of the medicinal products. This assumption is supported by the fact that the AUC of the MMC peak decreased to a similar extent as the AUCs of the additional peaks increased. Further characterisation of the degradation peaks was not an objective of our study. No threshold for acceptance of degradation products was set because particular risks of degradation products are unknown.<sup>12</sup> Another limitation of our study is that we did not examine kinetics and determine shelf life. Additional measurement time points within the 24-hour period would have to have been investigated.

## CONCLUSION

The physicochemical stability of MMC 1 mg/mL bladder instillation prepared with prepackaged NS in prefilled PVC bags is less than 24 hours at room temperature. Unfavourable pH values of the solvents are known to cause rapid degradation of MMC. Urea added as excipient does not accelerate degradation but results in hyperosmolar bladder instillation solutions. However, the osmolality of MMC instillation solutions seems to be negligible due to dilution with residual urine in the bladder. When reconstitution takes place at the point of care, solutions should be administered immediately to avoid degradation and loss of efficacy. Manufacturers should consider optimising the pH of the prepackaged NS solutions.

**Acknowledgements** We would like to thank Frank Erdnüb for the linguistic revision of the manuscript.

**Contributors** JA is the guarantor, carried out the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. IK supervised the project and checked the manuscript together with JT.

**Funding** The laboratory tests were funded by a specific grant from medac GmbH, Wedel, Germany. The company had no influence on the results presented in the manuscript.

**Competing interests** None declared.

**Patient consent for publication** Not applicable.

**Ethics approval** Not applicable.

## Original research

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Data availability statement** Data are available upon reasonable request. All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information.

## ORCID iD

Jannik Almasi <http://orcid.org/0000-0002-9923-7109>

## REFERENCES

- Sylvester RJ, Oosterlinck W, Witjes JA. The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials. *Eur Urol* 2008;53:709–19.
- Malmström P-U, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009;56:247–56.
- Beijnen JH, Underberg WJM. Degradation of mitomycin C in acidic solution. *Int J Pharmaceut* 1985;24:219–29.
- Beijnen JH, Den Hartigh J, Underberg WJM. Quantitative aspects of the degradation of mitomycin C in alkaline solution. *J Pharm Biomed Anal* 1985;3:59–69.
- Beijnen JH, Gijn R, Underberg WJM. Chemical stability of the antitumor drug mitomycin C in solutions for intravesical instillation. *J Parent Sci Techn* 1990;44:332–5.
- Quebbeman EJ, Hoffman NE, Ausman RK, et al. Stability of mitomycin admixtures. *Am J Hosp Pharm* 1985;42:1750–4.
- Mito-Medac® 20 mg, Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung Einer Lösung zur Intravesikalen Anwendung. 2022. Available: [https://www.medac.eu/fileadmin/user\\_upload/medac-eu/SPCs/Germany/spc-de-mito-medac.pdf](https://www.medac.eu/fileadmin/user_upload/medac-eu/SPCs/Germany/spc-de-mito-medac.pdf)
- Dr. Pfleger Arzneimittel GmbH. Mitem® 20 mg, Pulver zur Herstellung Einer InjektionsbzW. Infusionslösung Oder Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung Einer Lösung zur Intravesikalen Anwendung. 2022. Available: [www.fachinfo.de/api/fachinfo/pdf/022220](http://www.fachinfo.de/api/fachinfo/pdf/022220)
- Apogepha Arzneimittel. Urocin® 20 mg, Pulver zur Herstellung Einer InjektionsbzW. Infusionslösung Oder Einer Lösung zur Intravesikalen Anwendung. 2022. Available: <https://www.apogepha.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=443&token=cb99f2e9e1dd2e865b7b44d541d8b66d415133e>
- Myers AL, Zhang Y-P, Kawedia JD, et al. Solubilization and stability of mitomycin C solutions prepared for intravesical administration. *Drugs R D* 2017;17:297–304.
- Dorr RT, Liddil JD. Stability of mitomycin C in different infusion fluids: compatibility with heparin and glucocorticosteroids. *J Oncol Pharm Pract* 1995;1:19–24.
- Briot T, Truffaut C, Quay LL, et al. Stability of reconstituted and diluted mitomycin C solutions. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2016;1:83–9.
- Nisse Y-E, Vigneron J, Zenier H, et al. Stability of mitomycin in polypropylene syringes for use in glaucoma surgery. *Eur J Oncol Pharmacy* 2021;4:e028.
- Council of Europe. *European Pharmacopoeia*. 2020.
- International Conference on Harmonisation. *Harmonized tripartite guidelines for validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. 1994.
- Beijnen JH, Rosing H, Underberg WJM. Stability of mitomycins in infusion fluids. *Arch Pharm Chem Sci* 1985;13:58–66.
- Au JL, Badalament RA, Wientjes MG, et al. Methods to improve efficacy of intravesical mitomycin C: results of a randomized phase III trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:597–604.
- Zargar H, Aning J, Ischia J, et al. Optimizing intravesical mitomycin C therapy in non-muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2014;11:220–30.
- Wientjes MG, Badalament RA, Au JL. Use of pharmacologic data and computer simulations to design an efficacy trial of intravesical mitomycin C therapy for superficial bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32:255–62.
- Medac-GmbH. Mitomycin Medac 1 mg/ml Pulver zur Herstellung Einer Injektions-BZW. Infusionslösung Oder Einer Lösung zur Intravesikalen Anwendung. 2021. Available: [https://www.medac.eu/fileadmin/user\\_upload/medac-eu/SPCs/Germany/spc-de-Mitomycin\\_medac.pdf](https://www.medac.eu/fileadmin/user_upload/medac-eu/SPCs/Germany/spc-de-Mitomycin_medac.pdf)
- McClelland RA, Lam K. Kinetics and mechanism of the acid hydrolysis of mitomycins. *J Am Chem Soc* 1985;107:5182–6.

**Physicochemical stability of Durvalumab (Imfinzi®) concentrate for solution in original vials after first opening.**

Almasi J, Thiesen J, Krämer I.

Pharm Technol Hosp Pharm. 2023 July 17. <https://doi.org/10.1515/pthp-2023-0008>.

Eigenanteil: Literaturrecherche, Planung und Durchführung der Stabilitätsuntersuchung, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse, Verfassung und Korrektur des Manuskripts



Jannik Almasi\*, Judith Thiesen and Irene Krämer

# Physicochemical stability of durvalumab (Imfinzi®) concentrate for solution in original vials after first opening

<https://doi.org/10.1515/ptph-2023-0008>

Received May 6, 2023; accepted June 29, 2023;

published online July 17, 2023

## Abstract

**Objectives:** Durvalumab (Imfinzi®), a PD-L1 monoclonal antibody (mAb) medication is available as concentrate (50 mg/mL) for solution for infusion. The summary of product characteristics provides information about the physicochemical stability of ready-to-administer durvalumab preparations (vehicle solution 0.9 % NaCl, G5%), but not about the concentrate after first opening. The objective of this study was to determine the physicochemical stability of durvalumab concentrate for solution after first opening over a period of 28 days.

**Methods:** Imfinzi® vials were punctured and stored refrigerated (2–8 °C) or at room temperature (20–25 °C) light protected. At predefined time points (day 0, 7, 14, 21, 28) the physicochemical stability of the concentrated solution was determined by ion-exchange/size-exclusion high-performance liquid chromatography (IE-/SE-HPLC) with photodiode array detection and pH measurement. Vials were inspected with regard to changes of color, clarity, and visible particles at any time point.

**Results:** Regardless of the storage temperature, durvalumab 50 mg/mL solutions remained physicochemically stable for 28 days in punctured vials. The concentrations of durvalumab monomer remained unchanged and no secondary peaks (fragments, aggregates) were observed in any of the SE-HPLC chromatograms. The IE-HPLC test results showed no substantial changes of the peak areas of the main peak and of the acidic and basic charge variants during the whole storage period. Appearance and pH of the test solutions remained unchanged until the end of the study.

**Conclusions:** Regardless of storage conditions none of the analytical methods indicated physicochemical instability of

the intact durvalumab monomer over the 28 days of the study. To avoid microbiological instability storage under refrigeration is recommended.

**Keywords:** concentrate for solution; durvalumab; IE-HPLC; physicochemical stability; SE-HPLC; temperature

## Introduction

Durvalumab is a fully humanized immunoglobulin G1-kappa (IgG1κ) monoclonal antibody (mAb) approved or under clinical investigation in various solid tumors. The checkpoint inhibitor specifically binds to programmed cell death ligand 1 (PD-L1), selectively blocking the interaction of PD-L1/PD-1 as well as PD-L1/CD80, resulting in increased T-cell activation and improved antitumor immune response [1]. Antibodies are large glycoproteins consisting of four polypeptide chains (2 large, 2 short) with two antigen binding sites. Due to their high complexity, antibodies can be subject to a variety of degradation reactions. Instabilities can occur simultaneously on various structures and are influenced by different factors, such as light, temperature, hydrophobic surfaces, and shear stress [2–8].

Durvalumab (Imfinzi®) is marketed as concentrate for solution for infusion (50 mg/mL) and available in 120 mg (2.4 mL) and 500 mg (10 mL) vials. The finished medicinal product consists of 26 mM histidine/histidine-HCL (buffer), 275 mM trehalose dihydrate (isotonization), 0.02 % (w/v) polysorbate 80 (nonionic surfactant stabilizer) and water for injection as excipients. Recommended durvalumab doses are fixed doses of 1,500 mg administered every 3 or 4 weeks or body weight adjusted doses of 10 mg/kg given every 2 weeks or 20 mg/kg given every 3 or 4 weeks. In the first version of the SmPC was given that chemical and physical in-use stability of the diluted solutions have been demonstrated for up to 24 h at 2–8 °C and for up to 4 h at room temperature (up to 25 °C) from the time of preparation [9]. In October 2021 [10], physicochemical in-use stability has been extended to 30 days at 2–8 °C and to 24 h when stored at 25 °C [1].

However, in-use stability was not enlarged for the concentrated solution. Therefore, any residues of the concentrate left in the original vial must be discarded [1, 9].

\*Corresponding author: Jannik Almasi, PharmD, Department of Pharmacy, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany, Phone: 49 6131 174463, Fax: 49 6131 172262, E-mail: Jannik.almasi@unimedizin-mainz.de  
Judith Thiesen and Irene Krämer, Department of Pharmacy, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

Additional data on the physicochemical stability and biological activity of concentrated durvalumab solutions are only available as non-peer-reviewed poster presentations [11, 12]. Since weight-based doses result in residues in the original vials, the objective of our study was to determine physicochemical in-use-stability of the punctured concentrate in order to allow vial sharing and to avoid wasting. We determined the physicochemical stability of durvalumab concentrate for solution via size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC), ion-exchange high-performance liquid chromatography (IE-HPLC), pH analyses, and visible inspection.

## Materials and methods

### Reagents

Disodium hydrogen phosphate, sodium sulfate, hydrochloric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); Sodium hydroxide solution, water HPLC Grade from AppliChem (Darmstadt, Germany); sodium dihydrogen phosphate, 2-(N-morpholine)ethanesulfonic acid (MES), isopropanol from Carl Roth (Karlsruhe, Germany); hydrogen peroxide, sodium chloride from Caelo (Hilden, Germany); acetonitrile HPLC Grade from Honeywell (Offenbach, Germany). All reagents used were of analytical grade.

### Test solutions

Stability tests were performed with durvalumab (Imfinzi®) 50 mg/mL concentrate for solution for infusion provided by AstraZeneca GmbH (batch AADS, AARM). Fourteen vials were punctured with a Codan microspike (CODAN GmbH & Co KG, Lensahn, Germany) and stored. Seven vials each were stored refrigerated (2–8 °C) and at room temperature (20–25 °C) protected from light. Out of these, three vials each were assayed by SE-HPLC and IE-HPLC. One vial each was used for pH measurements. Samples were withdrawn on day 0, 7, 14, 21, 28 via the spike continuously inserted into the rubber stopper of each vial.

### Sample preparation for SE-HPLC

200 µL samples of the test solutions were diluted with 9.8 mL 0.9 % NaCl infusion solution (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) and homogenized. Afterwards, 400 µL were diluted with 600 µL 0.9 % NaCl solution in HPLC vials (final concentration 0.4 mg/mL), to fit the calibration curve. 20 µL aliquots were injected by an autosampler in triplicate.

### Sample preparation for IE-HPLC

100 µL samples of the test solutions were diluted with 900 µL buffer A (see Table 1) in HPLC vials (final concentration 5 mg/mL). 25 µL aliquots were injected by an autosampler in triplicate.

### pH measurement

400 µL aliquots of undiluted solution were used for pH measurement.

### HPLC assay

The HPLC system consisted of a Waters Alliance 2,695 pump connected to a Waters photodiode array detector 2,990 (Waters, Eschborn, Germany). Waters Empower Pro, Empower 2 Software, Version 6.10.01.00 was used for instrument operation, data collection and processing. For IE-HPLC, individual peak areas were calculated as a percentage of the total peak area.

### Size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC), ion-exchange high-performance liquid chromatography (IE-HPLC)

Acceptance criteria were set to a 5 % maximum loss in active protein and maximum increase of secondary species of 2 % [8]. Detailed information on the SE-HPLC assay and the IE-HPLC assay is given in Table 1.

### Method validation

To prove the stability indicating nature of the SE-HPLC assay and the IE-HPLC assay forced degradation experiments were performed by subjecting durvalumab solutions to heat, oxidant, acidic, and alkaline solution. In addition, accuracy, intra- and inter-day precision, and linearity were determined. Because a chemical reference substance (CRS) was not available when the tests were performed, the finished medicinal product (Imfinzi® (durvalumab) 50 mg/mL concentrate for solution for infusion, AstraZeneca GmbH, Germany) was used as reference.

### SE-HPLC

For linearity testing, durvalumab concentrate was diluted with 0.9 % NaCl infusion solution (freeflex®, Fresenius Kabi, Germany) to achieve seven calibration standards (0.20 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.36 mg/mL, 0.40 mg/mL, 0.44 mg/mL, 0.48 mg/mL, 0.60 mg/mL). Aliquots of these standards were injected in triplicate. The calibration curve was constructed by plotting the peak area vs. the nominal concentration of durvalumab. Accuracy, inter-day and intra-day precision of the method were validated by preparing and analyzing 1 mg/mL and 5 mg/mL durvalumab standard solutions. Prior to measurement, durvalumab standard solutions were diluted with 0.9 % NaCl to a concentration of 0.4 mg/mL to fit the calibration curve. To determine accuracy, standard solutions were prepared onefold, diluted and aliquots were injected tenfold (per concentration). For inter-day precision, duplicate standard solutions were prepared on five consecutive days, diluted and aliquots were injected onefold each. To determine intra-day precision, ten standard solutions each were prepared on the same day, diluted and aliquots were injected onefold each.



**Table 1:** Characteristics of the SE-HPLC assay and the IE-HPLC assay.

	SE-HPLC assay (based on Vats et al. [13])	IE-HPLC assay (based on Vieillard et al. [14])
Column	TSKgel® G3000SW <sub>XL</sub> , 7,8 × 300 mm (Tosoh Bioscience, Japan)	ProPac™ WCX-10, 4 × 250 mm (Thermo Fisher Scientific, USA)
Guard column	TSKgel® SW <sub>XL</sub> Guard column, 6 × 40 mm (Tosoh Bioscience, Japan)	ProPac™ WCX-10G, 4 × 50 mm (Thermo Fisher Scientific, USA)
Column temperature	25 °C	35 °C
Sample temperature	5 °C	5 °C
Flow rate	1.0 mL/min	0.8 mL/min
Injection volume	20 µL	25 µL
Injections per vial	3	3
Runtime	15 min	50 min
Detection wavelength	280 nm	280 nm
Mobile phase	0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0.1 M phosphate buffer solution R (pH 6.7)	Buffer A: 20 mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) + 60 mM NaCl (adjusted to pH 6) Buffer B: 20 mM MES + 180 mM NaCl (adjusted to pH 6)
Gradient profile	Isocratic	Gradient 0 min → 30 min: starting with 100 % buffer A, 0 % buffer B linearly decreasing/increasing to 40 % buffer A, 60 % buffer B 30 min → 40 min: 0 % buffer A, 100 % buffer B (purge) 40 min → 50 min: 100 % buffer A, 0 % buffer B (equilibrium period)
Retention time	About 8 min	About 22 min

SE-HPLC, size-exclusion high-performance liquid chromatography; IE-HPLC, ion-exchange high-performance liquid chromatography.

## IE-HPLC

Inter- and intra-day accuracy and precision of the method were validated by preparing and analyzing 5 mg/mL durvalumab standard solutions. Ten standard solutions were prepared per day by diluting durvalumab concentrate with buffer A (see Table 1) on five consecutive days. Aliquots of standard solutions 1 and 10 were injected in triplicate and aliquots of standard solution 2–9 were injected onefold.

## Appearance

Durvalumab concentrate is a clear to opalescent, colorless to slightly yellow solution, free from visible particles [1]. At each sampling time point, the test solutions were checked for any changes with the unaided eye. Test solutions without any changes were characterized as physicochemically stable.

## pH

The pH measurements were carried out with a pH 210 Microprocessor pH meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany) equipped with an InLab Micro pH glass electrode (Mettler Toledo, Greifensee, Germany). The pH meter was calibrated with a five-point calibration (pH 2.00, 4.01, 7.00, 9.21, 11.00) with standard buffer solutions (Technical Buffer Solution, Mettler-Toledo AG) at each time point of measurement. Each sample was measured once. According to SmPC, specification was pH 6.0.

## Results

### Validation of the SE-HPLC assay

Figure 1 shows a representative chromatogram of durvalumab concentrate immediately after puncturing the vial with a microspike. In Figure 2a–d the resulting chromatograms of the forced degradation tests are given. Acidic and alkaline forced degradation led to major changes in the chromatograms (Figure 2a, b), e.g. broadening of the monomer peak, appearance of secondary peaks, total loss of the monomer peak. Moderate heating and oxidant use (Figure 2c, d) resulted in less significant changes. The lack of secondary peaks resulting from forced degradation and interfering with the durvalumab monomer peak indicates the suitability of the method.

The correlation coefficient of the assay amounted to  $R^2=0.999$  and proved linearity over the concentration range. The accuracy was  $98.2\% \pm 0.50$  standard deviation (SD) for 1 mg/mL and  $99.1\% \pm 0.37$  SD for 5 mg/mL solutions. The mean durvalumab concentration of the inter-day precision test was 0.987 mg/mL ( $98.7\% \pm 0.01$ ) for 1 mg/mL and 4.895 mg/mL ( $97.9\% \pm 0.12$ ) for 5 mg/mL solutions. The intra-day precision tests revealed a mean durvalumab concentration of 0.981 mg/mL ( $98.1\% \pm 0.01$ ) for 1 mg/mL and 4.971 mg/mL ( $99.4\% \pm 0.10$ ) for 5 mg/mL solutions.

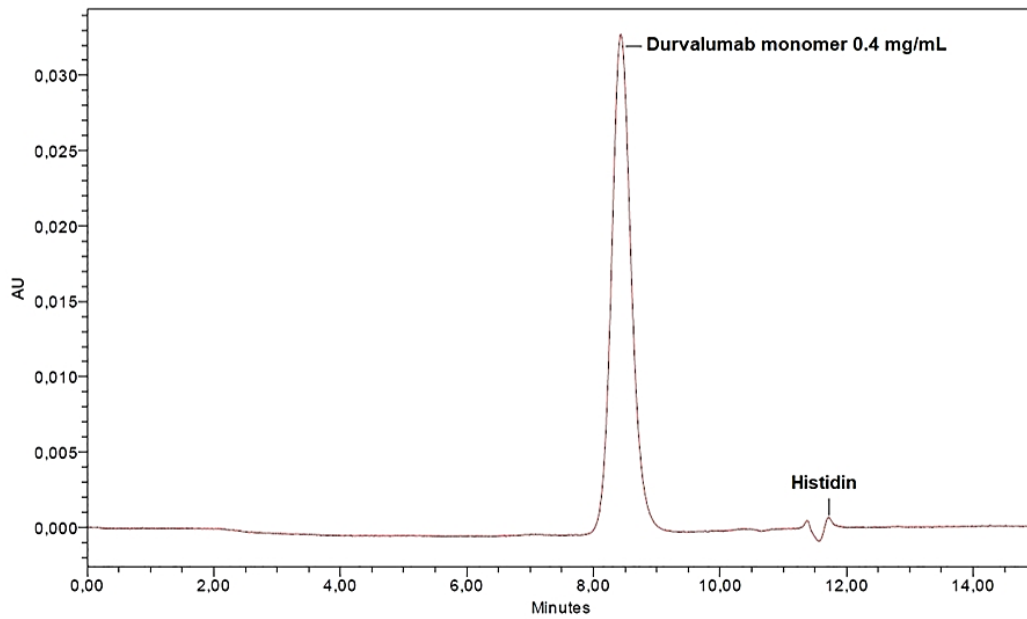


Figure 1: Representative SE-HPLC chromatogram of freshly prepared 0.4 mg/mL durvalumab solution (Imfinzi®); detection wavelength 280 nm.

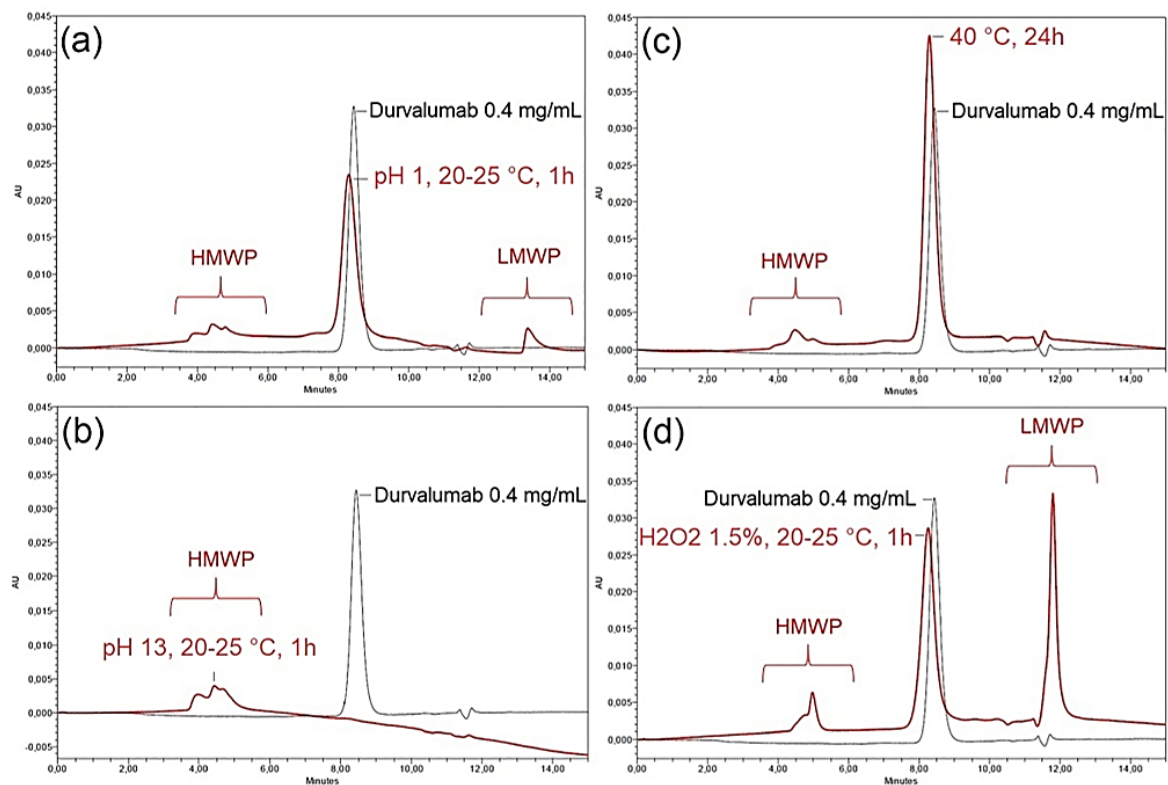


Figure 2: a-d: Overlay of SE-HPLC chromatograms of freshly prepared 0.4 mg/mL (black line) and degraded durvalumab (red line) samples; a: pH 1, 20–25 °C, 1 h; b: pH 13, 20–25 °C, 1 h; c: 40 °C, 24 h; d: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.5%, 20–25 °C, 1 h; HMWP: high molecular weight protein, LMWP: low molecular weight protein.

### Validation of the IE-HPLC assay

Figure 3 shows a representative chromatogram of durvalumab concentrate immediately after puncturing the vial with a microspike. In Figure 4a–d the resulting chromatograms of the forced degradation tests are given. Acidic conditions (Figure 4a) led to minor changes of the peak areas representing basic charge variants, whereas alkaline conditions (Figure 4b) resulted in total loss of the main peak. Pure heat (Figure 4c) caused minor changes of the peak pattern and oxidation (Figure 4d) induced major changes in the peak pattern and decrease of the main peak areas. Secondary peaks resulting from forced degradation conditions did not interfere with the durvalumab main peak and thereby demonstrate the suitability of the assay.

Results of interday- and intraday-precision tests are summarized in Table 2. Subsequent injections resulted in incremental overlapping of peak 2 and the main peak (see Figure 5). Therefore, the standard deviation of the percentage peak area of peak 2 is higher for inter-day precision than for intra-day precision (see Table 2). The decrease of the ratio of peak 2 corresponds to the increase of the ratio of the main peak, confirming the increasing overlap of peak 2 and the main peak.

### Durvalumab 50 mg/mL analyzed by SE-HPLC

All chromatograms were checked for secondary peaks (e.g., high molecular weight (HMW) protein forms, low

molecular weight (LMW) protein forms) or changes of the monomer peak area. In none of the test solutions stored either refrigerated or at room temperature, systematic or substantial changes got obvious over time. Besides the durvalumab monomer peak (retention time ( $R_t$ ) approximately 8.5 min) only one second peak (relative retention time (rR<sub>t</sub>) about 1.4) referring to histidine (identification by assaying pure histidine; data not shown) was present in the SE-HPLC chromatogram. Detailed results of the quantitative analyses of the durvalumab monomer peak area are shown in Table 3. When stored at 2–8 °C durvalumab monomer concentration remained unchanged over the 28 day-period. The slight increase of the durvalumab monomer concentration in test solutions stored at room temperature lies within the 5% acceptance limit.

### Durvalumab 50 mg/mL analyzed by IE-HPLC

The assay resulted in five durvalumab peaks, with peak 1 and 2 corresponding to the acidic charge variants and peak 4 and 5 corresponding to the basic charge variants of the main peak 3 (see Figure 3). Peak areas of the main peak and charge variants are given in Table 4 as percentage rates of the total peak area. Similar to the validation measurements, peak 2 increasingly overlapped with the main peak as the number of injections increased. Resulting from the overlap, the peak 2 area decreased about the same amount as the main peak area increased, indicating declining column performance. For verification, day 28

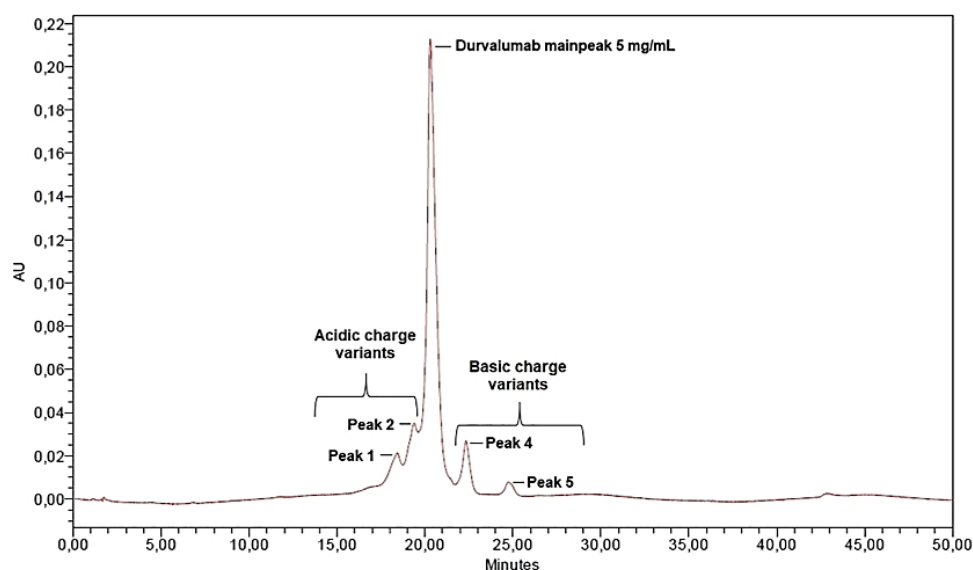
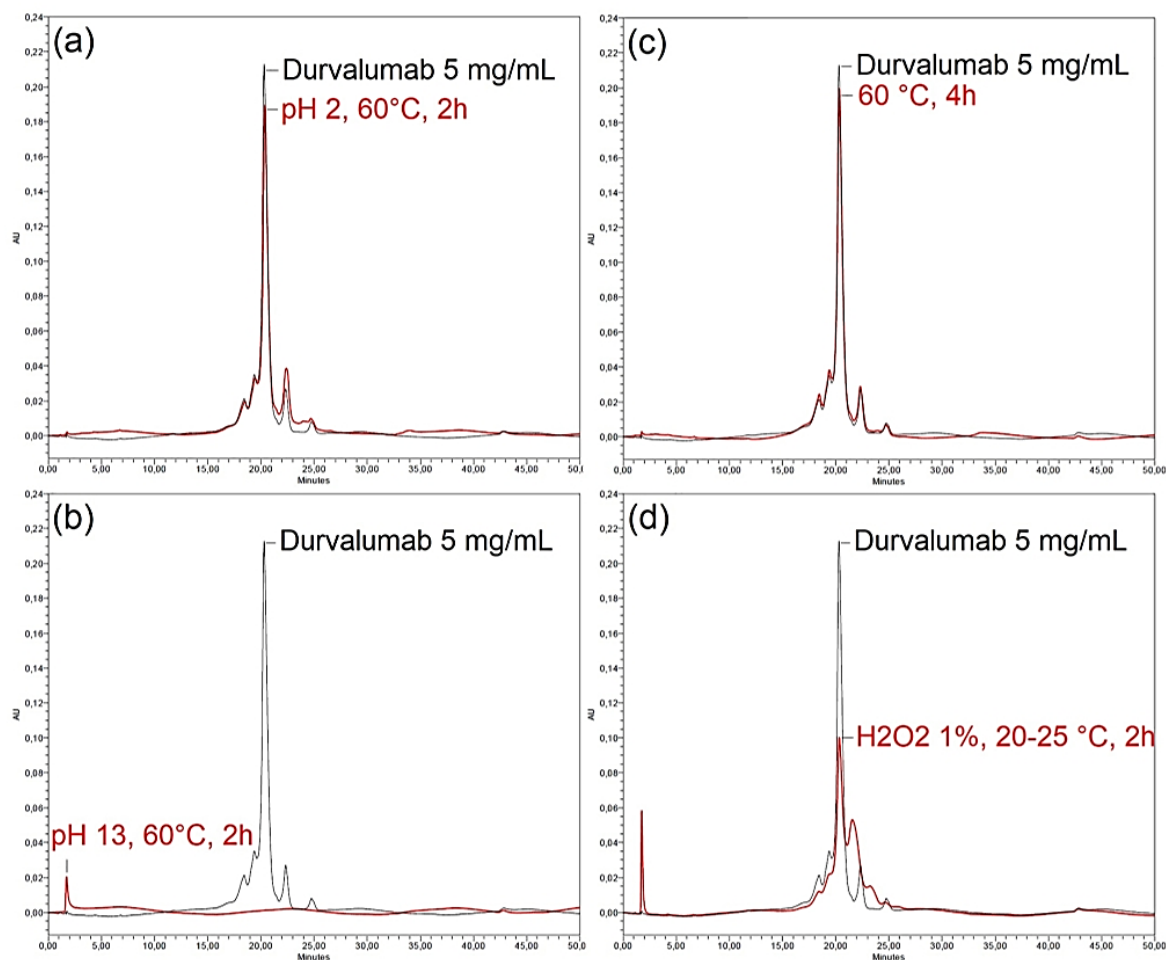


Figure 3: Representative IE-HPLC chromatogram of freshly prepared 5 mg/mL durvalumab solution (Imfinzi®); detection wavelength 280 nm.



**Figure 4:** a–d: Overlay of IE-HPLC chromatograms of freshly prepared 5 mg/mL (black line) and degraded durvalumab (red line) samples; a: pH 2, 60 °C, 2 h; b: pH 13, 60 °C, 2 h; c: 60 °C, 4 h; d: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%, 20–25 °C, 2 h

**Table 2:** Inter-day- and intra-day-precision of the IE-HPLC assay; peak areas calculated as percentage rate of the total peak area expressed as mean  $\pm$  SD.

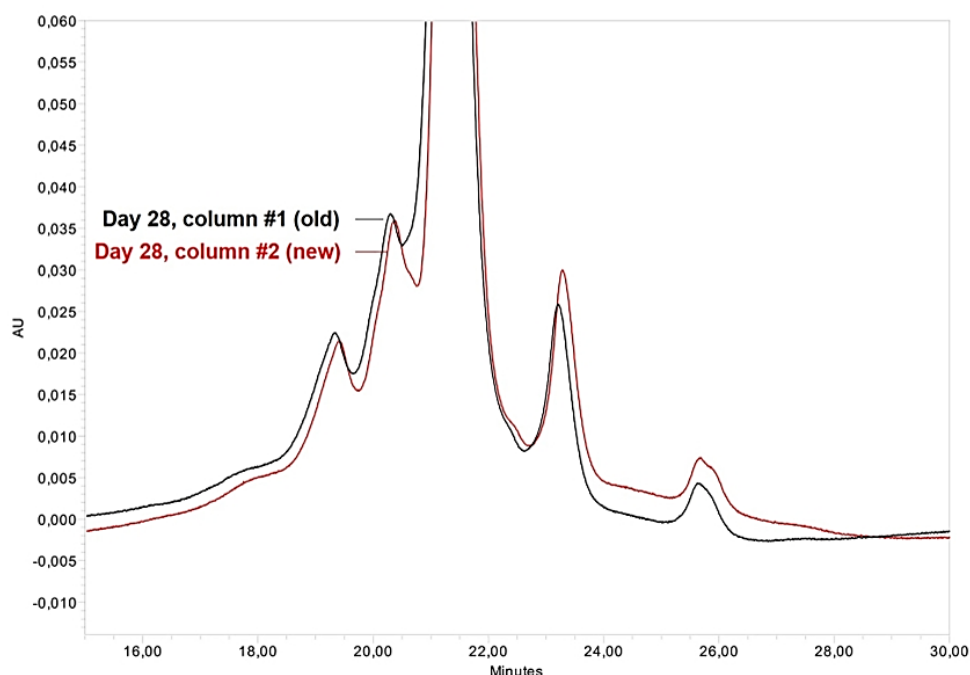
	IE-HPLC assay				
	% peak 1 $\pm$ SD	% peak 2 $\pm$ SD	% Main peak $\pm$ SD	% peak 4 $\pm$ SD	% peak 5 $\pm$ SD
Intra-day precision <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.02	2.75 $\pm$ 0.03	83.97 $\pm$ 0.04	7.68 $\pm$ 0.02	2.30 $\pm$ 0.01
Inter-day precision <sup>b</sup>	3.28 $\pm$ 0.02	2.58 $\pm$ 0.24	84.14 $\pm$ 0.23	7.70 $\pm$ 0.03	2.30 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup>10 individual durvalumab 5 mg/mL standard solutions assayed on the same day, <sup>b</sup>10 individual durvalumab 5 mg/mL standard solutions assayed on 5 consecutive days. IE-HPLC, ion-exchange high-performance liquid chromatography; SD, standard deviation.

samples were re-measured with a new column on the same day resulting in values similar to the initial values (compare Table 4). Overall, peak area ratios met the acceptance criteria (main peak deviation  $\leq 5\%$ ) regardless of storage conditions.

### Durvalumab 50 mg/mL appearance and pH

The appearance of durvalumab test solutions remained unchanged during the observation period. There was no formation of visible particles, cloudiness or discoloration.



**Figure 5:** Overlay of IE-HPLC chromatograms of the same 5 mg/mL durvalumab samples on day 28, obtained with the new (red) or old (black) column.

**Table 3:** Stability of 50 mg/mL durvalumab concentrate in the punctured vial when stored light protected for 28 days at 2–8 °C or 20–25 °C. Results of the SE-HPLC assay are given in percent of the initial concentration (mean  $\pm$  SD; n=9); one pH measurement per time point (n=1).

	Storage temperature	Initial durvalumab monomer concentration [mg/mL] $\pm$ SD		Durvalumab monomer concentration remaining $\pm$ SD; measured concentration day 0=100 %			
		Nominal	Measured (day 0)	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
SE-HPLC assay	2–8 °C	50.0	49.38 ( $\pm$ 2.52)	100.4 ( $\pm$ 1.02)	100.6 ( $\pm$ 0.98)	100.3 ( $\pm$ 1.21)	100.0 ( $\pm$ 0.71)
	20–25 °C	50.0	50.39 ( $\pm$ 1.12)	99.5 ( $\pm$ 0.62)	99.9 ( $\pm$ 0.55)	101.1 ( $\pm$ 1.39)	101.1 ( $\pm$ 1.55)
pH	2–8 °C	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	20–25 °C	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

SE-HPLC, size-exclusion high-performance liquid chromatography; SD, standard deviation.

**Table 4:** Stability of 50 mg/mL durvalumab concentrate in the punctured vial determined by IE-HPLC stored for 28 days at 2–8 °C or 20–25 °C, protected from light. Peak areas calculated as percentage rates of the total peak area expressed as mean  $\pm$  SD of nine measurements per time point (n=9).

Storage temperature	Days	IE-HPLC assay				
		% peak 1 $\pm$ SD	% peak 2 $\pm$ SD	% main peak $\pm$ SD	% peak 4 $\pm$ SD	% peak 5 $\pm$ SD
2–8 °C	0	3.32 ( $\pm$ 0.05)	4.02 ( $\pm$ 0.05)	81.77 ( $\pm$ 0.09)	8.24 ( $\pm$ 0.03)	2.65 ( $\pm$ 0.02)
	7	3.32 ( $\pm$ 0.01)	3.56 ( $\pm$ 0.14)	82.31 ( $\pm$ 0.13)	8.16 ( $\pm$ 0.02)	2.65 ( $\pm$ 0.01)
	14	3.32 ( $\pm$ 0.02)	3.05 ( $\pm$ 0.05)	82.85 ( $\pm$ 0.07)	8.13 ( $\pm$ 0.03)	2.66 ( $\pm$ 0.01)
	21	3.32 ( $\pm$ 0.02)	2.71 ( $\pm$ 0.10)	83.31 ( $\pm$ 0.11)	8.01 ( $\pm$ 0.03)	2.65 ( $\pm$ 0.01)
	28	3.31 ( $\pm$ 0.04)	2.46 ( $\pm$ 0.03)	83.61 ( $\pm$ 0.07)	7.98 ( $\pm$ 0.02)	2.65 ( $\pm$ 0.03)
	28 <sup>a</sup>	3.53 ( $\pm$ 0.10)	4.60 ( $\pm$ 0.08)	80.99 ( $\pm$ 0.22)	8.24 ( $\pm$ 0.04)	2.64 ( $\pm$ 0.02)
20–25 °C	0	3.33 ( $\pm$ 0.02)	3.94 ( $\pm$ 0.05)	81.83 ( $\pm$ 0.05)	8.25 ( $\pm$ 0.01)	2.65 ( $\pm$ 0.01)
	7	3.42 ( $\pm$ 0.04)	3.50 ( $\pm$ 0.05)	82.27 ( $\pm$ 0.06)	8.16 ( $\pm$ 0.01)	2.65 ( $\pm$ 0.01)
	14	3.48 ( $\pm$ 0.04)	3.06 ( $\pm$ 0.03)	82.69 ( $\pm$ 0.06)	8.13 ( $\pm$ 0.01)	2.65 ( $\pm$ 0.01)
	21	3.61 ( $\pm$ 0.04)	2.72 ( $\pm$ 0.04)	82.98 ( $\pm$ 0.05)	8.04 ( $\pm$ 0.02)	2.65 ( $\pm$ 0.01)
	28	3.62 ( $\pm$ 0.03)	2.48 ( $\pm$ 0.05)	83.24 ( $\pm$ 0.08)	8.02 ( $\pm$ 0.01)	2.64 ( $\pm$ 0.02)
	28 <sup>a</sup>	3.97 ( $\pm$ 0.03)	4.98 ( $\pm$ 0.04)	80.16 ( $\pm$ 0.05)	8.25 ( $\pm$ 0.02)	2.64 ( $\pm$ 0.03)

<sup>a</sup>Results obtained with new column. IE-HPLC, ion-exchange high-performance liquid chromatography; SD, standard deviation.

The pH values of the concentrate remained unchanged at pH 6, regardless of the storage conditions (see Table 3).

## Discussion

The physicochemical stability of durvalumab (Imfinzi®) concentrate was analyzed by orthogonal methods over a prolonged period of 28 days, in order to demonstrate extended in-use stability of the original vials after first opening. Overall the study demonstrated that durvalumab was physicochemically stable in punctured vials regardless of storage conditions. Appearance and pH remained unchanged, impurities and degradation products were not detected.

The analytical methods used were selected according to the recommendations of a European consensus group [15]. Within the recommended methods, SE-HPLC and IE-HPLC are considered to be the most stability indicating assays [16]. By SE-HPLC chain fragmentation and the formation of aggregates and oligomers are assessed qualitatively and quantitatively [8]. By IE-HPLC different charge related variants of monoclonal antibodies are separated according to their isoelectric points (pI) [2] and chemical degradation, like deamidation of asparagine residues, is visualized.

The shelf-life of unopened Imfinzi® vials is set to three years [1]. Since the concentration of the stabilizing excipients as well as the adjusted pH were not changed by dilution with vehicle solution, a strong impairment of the stability of the finished medicinal product appears unlikely. Therefore, additional investigations of the higher order structures and physical stability (e.g. measurement of subvisible particles over time, turbidity measurement) were not applied. The sample numbers, sampling time points, and temperature conditions were chosen according to the specifications of the NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee [8] while the sampling technique (via syringes and spikes) was chosen according to clinical practice.

In SE-HPLC chromatograms, no secondary peaks were found at any time point, indicating the absence of fragmentation or aggregation. A decrease in peak height, increase in peak width, and increasing system pressure over the operating life of the HPLC column was observed and can be explained by the deleterious interaction of the surfactant (polysorbate 80) and the column packing [17]. To minimize the polysorbate 80 load and thereby the deterioration, we injected highly diluted samples and retrogradely rinsed the column with 20 % isopropanol.

The chromatographic profile of the IE-HPLC assay revealed minor changes over the assay period. Peak heights of acidic and basic variants did not increase over time proving no formation of more acidic variants (e.g. by deamidation)

and more basic variants (e.g. by oxidation) regardless of the storage temperature. The observed changes are related to the deteriorated column performance, as shown by the results of re-measurement at day 28.

The results of our stability study regarding durvalumab concentrate are in accordance with extended stability data given in the Imfinzi® SmPC for diluted solutions [1]. Moreover, physicochemical stability of diluted durvalumab solutions and durvalumab concentrate for 3 weeks at 4 °C following 3 days at 25 °C, was reported by Bros et al. [11]. Acramel et al. demonstrated the unchanged biological activity of diluted durvalumab solutions and durvalumab concentrate for 28 days at 4 °C and for 7 days at room temperature [12]. Study results and the prolonged stability data given in the SmPC consistently indicate high physicochemical stability of durvalumab solutions, regardless of concentration.

Moreover, several other studies have demonstrated the stability of various mAbs inhibiting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. For instance, Hui et al. investigated the PD-L1 inhibitor atezolizumab and demonstrated stability of various concentrations stored for 24 h at 30 °C followed by 3 months at 2–8 °C [18]. Le Guyader et al. studied diluted and undiluted solutions of the PD-1 inhibitor nivolumab and demonstrated stability for one month and for seven days at 2–8 °C and at 40 °C, respectively. Slight changes occurred after an observation period of three months at 2–8 °C [19]. Furthermore, Sundaramurthi et al. demonstrated physicochemical stability of diluted solutions of the PD-1 inhibitor pembrolizumab at 5 °C and room temperature for a period of at least one week [20].

All these studies indicate a physicochemical stability of mAb solutions exceeding the stability information provided in the respective SmPCs, demonstrating a tremendous progress in the field of protein stabilization [5].

In a recent study, microbiological stability of durvalumab solutions was tested by intended contamination with various facultative pathogenic microorganisms [21]. Tested strains remained viable in diluted durvalumab solutions, but pronounced growth supporting activity was not given. To inhibit growth of any contaminating mesophilic microorganisms, refrigerated storage is recommended for durvalumab residues. However, if cold chain interruption of unpunctured vials occurs for a few days, physicochemical stability is assured and wasting can be avoided.

## Conclusions

Physicochemical stability of Durvalumab 50 mg/mL concentrate for solution for infusion in punctured vials was

demonstrated by stability-indicating assays. During the observation period of 28 days, no substantial changes were observed by any analytical method, regardless of the storage temperature. Therefore, leftovers can be used for up to 28 days after first opening. From a microbiological point of view, refrigerated storage is recommended. Results are appropriate to gain economic and ecological benefit by vial sharing.

**Acknowledgments:** We would like to thank Frank Erdnüs for the linguistic revision of the manuscript.

**Research funding:** Imfinzi<sup>®</sup> finished medicinal product was granted by AstraZeneca Germany GmbH, Hamburg, Germany. The company had no influence on the results presented in the manuscript.

**Author contributions:** All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

**Competing interests:** Authors state no conflict of interest.

**Informed consent:** Not applicable.

**Ethical approval:** Not applicable.

## References

- European Medicines Agency. Imfinzi®: summary of product characteristics in EPAR-product information; 2023. [www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imfinzi-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imfinzi-epar-product-information_en.pdf) [Accessed 17 Apr 2023].
- Krämer I, Thiesen J, Astier A. Formulation and administration of biological medicinal products. *Pharm Res* 2020;37:159.
- Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review. *J Pharm Sci* 2020;109:169–90.
- Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1999;185:129–88.
- Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res* 2010;27:544–75.
- Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci* 2007;96:1–26.
- Uchiyama S. Liquid formulation for antibody drugs. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844:2041–52.
- NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. A standard protocol for deriving and assessment of stability, part 2 aseptic preparations (Biopharmaceuticals); 2021. <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2017/03/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v5.pdf> [Accessed 30 Apr 2023].
- European Medicines Agency. Imfinzi®: assessment report; 2018. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/imfinzi-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/imfinzi-epar-public-assessment-report_en.pdf) [Accessed 18 Apr 2023].
- European Medicines Agency. Imfinzi®: procedural steps taken scientific information after authorization; 2023. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/procedural-steps-after/imfinzi-epar-procedural-steps-taken-scientific-information-after-authorisation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/procedural-steps-after/imfinzi-epar-procedural-steps-taken-scientific-information-after-authorisation_en.pdf) [Accessed 18 Apr 2023].
- Bros A, Le Guyader G, Doillet H, Viellard V, Paul M, Jaskowiec C, et al. Stability study of durvalumab solutions in its opened vials and after dilution and storage in 0.9 % NaCl infusion polyolefin bags. Poster presentation at the 23rd Gerpac conference Hyère, Fance; 2020. <https://www.gerpac.eu/stability-study-of-durvalumab-solutions-in-its-opened-vials-and-after-dilution-and-storage-in-0-9-nacl-infusion-polyolefin-bags> [Accessed 18 Apr 2023].
- Acramel A, Le Guyader G, Avrillon K, Guyonnet L, Denizeau J, Escalup L, et al. Biological stability of durvalumab solutions in its opened vials and after dilution and storage in 0.9 % NaCl infusion polyolefin bags. Poster presentation at the 25th Gerpac conference Hyère, Fance; 2022. <https://www.gerpac.eu/biological-stability-of-durvalumab-solutions-in-its-opened-vials-or-after-dilution-and-storage-in-0-9-nacl-infusion-polyolefin-bags> [Accessed 18 Apr 2023].
- Vats B, Goyal P, Mathew Z, Ghosh R, Babu MN, Jadav RS, et al. Evaluation of physicochemical and biological properties of nonreconstituted MYL-14010 vials, reconstituted MYL-14010 suspension in vial, and diluted MYL-14010 suspension in infusion bags (0.9% saline) for extended duration. *Exp Opin Biol Ther* 2022;22:299–311.
- Vieillard V, Astier A, Paul M. Extended stability of a biosimilar of trastuzumab (CT-P6) after reconstitution in vials, dilution in polyolefin bags and storage at various temperatures. *GaBI J* 2018;7:101–10.
- Bardin C, Astier A, Vulto A, Sewell G, Vigneron J, Trittler R, et al. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: a European consensus conference. *Ann Pharm Fr* 2011;69:221–31.
- Halley J, Chou YR, Cicchino C, Huang M, Sharma V, Tan NC, et al. An industry perspective on forced degradation studies of biopharmaceuticals. *Surv Outcome Recomm* 2020;109:6–21.
- Senadheera SN, Zhao L, Lucas D. Separation and analysis of polysorbate 80 in the presence of human serum immunoglobulin G using agilent bond Elut lipid extraction SPE cartridges; 2020. [https://lcms.labrulez.com/labrulez-bucket-strap-h3hsga3/application\\_analysis\\_of\\_polysorbate\\_bond\\_elut\\_5994\\_2205en\\_agilent\\_16bd01b0ccd/application-analysis-of-polysorbate-bond-elut-5994-2205en-agilent.pdf](https://lcms.labrulez.com/labrulez-bucket-strap-h3hsga3/application_analysis_of_polysorbate_bond_elut_5994_2205en_agilent_16bd01b0ccd/application-analysis-of-polysorbate-bond-elut-5994-2205en-agilent.pdf) [Accessed 17 Apr 2023].
- Hui A, Yin J, Liu W, Zheng K. Prolonged in-use stability of diluted atezolizumab in commercial intravenous bags. *Int J Pharm Compd* 2021;25:246–57.
- Le Guyader G, Vieillard V, Mouraud S, Do B, Marabelle A, Paul M. Stability of nivolumab in its original vials after opening and handing in normal saline bag for intravenous infusion. *Eur J Cancer* 2020;135:192–202.
- Sundaramurthi P, Chadwick S, Narasimhan C. Physicochemical stability of pembrolizumab admixture solution in normal saline intravenous infusion bag. *J Oncol Pharm Pract* 2020;26:641–6.
- Almasi J, Knoll L, Thiesen J, Krämer I. Viability of selected microorganisms in parenteral preparations for novel systemic anti-cancer therapy. *J Oncol Pharm Pract* 2023;29:10781552231179185.

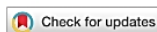
**Viability of selected microorganisms in parenteral preparations for novel systemic anti-cancer therapy.**

Almasi J, Knoll L, Thiesen J, Krämer I.

J Oncol Pharm Pract. 2023 June 4. DOI: 10.1177/10781552231179185.

Eigenanteil: Literaturrecherche, Planung und Durchführung der Viabilitätsuntersuchung, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse, Verfassung und Korrektur des Manuskripts





# Viability of selected microorganisms in parenteral preparations for novel systemic anti-cancer therapy

J Oncol Pharm Practice

1–8

© The Author(s) 2023

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/10781552231179185

journals.sagepub.com/home/opp



Jannik Almasi , Laura Knoll, Judith Thiesen and Irene Krämer



## Abstract

**Background:** Risk factors for aseptic preparation of parenteral medicines encompass the growth-promoting nature of the preparation. Although many aqueous parenteral preparations do not have growth-promoting properties, inadvertently introduced microorganisms may remain viable. Knowledge about the viability of microorganisms in parenteral preparations can add useful information for assigning shelf life to preparations used to treat cancer patients.

**Aim:** The aim of the study was to assess the viability of four different facultative pathogenic microorganisms in 20 ready-to-administer parenteral preparations aseptically prepared in hospital pharmacies.

**Methods:** Samples of 20 different biologics and small molecules for systemic anti-cancer therapy were inoculated either with different bacteria (i.e., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*) or with *Candida albicans* suspension. The resulting test concentrations were  $10^4$ – $10^5$  microorganisms per mL. Aliquots of inoculated test solutions were transferred in duplicate to tryptic soy agar plates at the time points 0, 4, 24, 48, 144 h. The plates were incubated for 24 h (bacterial strains) and 72 h (*C. albicans*) at 37 °C and colony forming units (CFUs) were counted.

**Results:** In most test solutions, especially in monoclonal antibody solutions, increased CFU counts of *P. aeruginosa* and unchanged or increased CFU counts of *E. faecium* and *S. aureus* were registered. Pronounced nutritive properties of monoclonal antibodies and filgrastim were not registered. Azacitidine, pixantrone and vinflunine containing test solutions revealed species-specific bacteriostatic and even bactericidal activity. All test solutions, except nivolumab and pixantrone containing solutions, showed constant or increasing CFU counts of *C. albicans* after incubation.

**Conclusion:** Viability of the selected pathogenic microorganisms was retained in most of the tested biological and small molecule preparations used to treat cancer patients. Therefore, in pharmacy departments strict aseptic conditions should be regarded and the lack of antimicrobial activity should be considered when assigning shelf life to RTA parenteral preparations.

## Keywords

Viability, antimicrobial activity, parenteral preparations, systemic anti-cancer therapy

Date received: 9 February 2023; revised: 15 May 2023; accepted: 15 May 2023

## Introduction

Today, hospital pharmacies provide a wide range of parenteral preparations for systemic anti-cancer therapy (SACT) with numerous active substances, diverse formulations, and various primary containers. In-use stability of the ready-to-administer (RTA) preparations depend on physicochemical and microbiological stability.<sup>1–3</sup> Since many patients treated with SACT are immunocompromised, microbiological contamination of RTA preparations can easily lead to severe infections and has to be detected. The detrimental consequences of any microbiological

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

### Corresponding authors:

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

Email: Jannik.almasi@unimedizin-mainz.de

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

Email: laura.knoll@unimedizin-mainz.de

contamination introduced during preparation are more severe if preparations are susceptible to microbiological growth and not used immediately.<sup>1</sup> Hence, microbiological stability of aseptically prepared pharmaceutical preparations is assessed by a combination of validation tests, i.e., environmental monitoring, operators qualification by broth transfer or end-of-session broth tests, integrity testing of the final container, and sterility tests.

Knowledge about the viability (i.e., ability of microorganisms to survive) of inadvertent microbial contamination can be useful information for the assignment of shelf life to the RTA preparations. The GERPAC expert panel suggests consideration of literature data in comparable hospital pharmacy aseptic preparations or the performance of particular viability studies.<sup>1</sup> Experimental studies to determine the growth supporting or growth inhibiting potential of preparations are performed by inoculation of the final preparations imitating contamination by facultative pathogenic microorganisms. The test conditions should simulate the worst possible conditions for patients and optimal circumstances for the growth of microorganisms.<sup>4</sup> Based on the pharmacopoeia monographs of antimicrobial efficacy tests (USP <51>, Ph. Eur. 5.1.3)<sup>5,6</sup> and on clinical experience the four most relevant microorganisms were selected for the tests, i.e., *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, and *C. albicans*. Several studies regarding the potential of microbial growth in cytotoxic and non-cytotoxic RTA parenteral preparations have been published.<sup>4,7-22</sup> Viability tests are missing for numerous recently licensed monoclonal antibodies (mAb), filgrastim, and few small molecules introduced in anti-cancer therapy in recent years. The aim of this viability study was to investigate the potential growth promoting nature of 20 RTA parenteral preparations used for SACT.

## Materials and methods

Viability tests were performed in two consecutive series inoculating four different types of microorganisms. Test solutions of eleven (atezolizumab, avelumab, bevacizumab, blinatumomab, cemiplimab, daratumumab, durvalumab, elotuzumab, nivolumab, pembrolizumab, obinutuzumab), and nine (azacitidine, carfilzomib, filgrastim, mogamulizumab, ocrelizumab, pertuzumab, pixantrone, ramucirumab, vinflunine) medicinal products were investigated in series 1 and 2, respectively. Details about the medicinal products used, characteristics of test solutions, and acknowledged physicochemical stability data are given in Table 1. Pure vehicle solutions, i.e., sodium chloride infusion solution (0.9% NaCl) and glucose 5% solution (G5 = D5) served as control solutions.

## Preparation of inocula

The four microorganisms selected for the study were *Staphylococcus aureus* ATCC strain 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC strain 15442, *Enterococcus faecium*

ATCC strain 6057 and *Candida albicans* ATCC strain 10231. The strains were cultivated at the Department for Hygiene and Infection Prevention, University Medical Center Mainz, Germany on tryptic soy agar plates (CASO/TSA-Agar, Thermo Fisher scientific, Schwerte, Germany, batch 3134251, expiry date 05.03.2021) at 37 °C for 24 h (bacterial strains) and 72 h (*C. albicans*).

Subsequently, the cultures were harvested and suspended in 0.9% NaCl solution. The concentration of microorganisms was adjusted by matching the turbidity of the suspension with McFarland standards. The McFarland standards used to achieve a microorganism concentration of 10<sup>8</sup> colony forming units (CFU)/mL were 0.5 for *S. aureus* and *E. faecium*, 0.2 for *P. aeruginosa*, and 2.5 for *C. albicans*. The suspensions were further diluted with 0.9% NaCl solution to achieve inocula of approximately 10<sup>5</sup>/mL viable microorganisms.

## Sample preparation

The licensed medicinal products were reconstituted under aseptic conditions according to the manufacturers' recommendations in the centralized cytotoxic drug preparation unit of the Pharmacy Department, University Medical Center Mainz, Germany. Container material and vehicle solutions were selected in order to guarantee physicochemical stability. Samples of the predetermined concentrations were prepared by injecting the appropriate calculated amount of each concentrated solution either into a polyolefin bag containing a nominal volume of 50 mL 0.9% NaCl infusion solution (freeflex<sup>®</sup> Isotonische Kochsalzlösung, Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Germany, batch 13PKS021, expiry date 30.09.2022; batch 13PLS281, expiry date 31.10.2022) or into a polyolefin bag containing a nominal volume of 100 mL 5% glucose solution (freeflex<sup>®</sup>, Glucosteril<sup>®</sup> 5% Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Germany, batch 13PIS053, expiry date 31.08.2022). The final concentrations were the lowest prescribed by our physicians. Azacitidine suspension (Azacitidin Hexal) and filgrastim s.c. injection solution (Filgrastim Hexal 30 Mio.E./0.5 mL) were inoculated without further dilution.

Aliquots of 9 mL or 6 mL (azacitidine suspension, filgrastim injection solution) were withdrawn from the test solutions in quadruplicate and transferred to sterile empty centrifuge tubes with screw caps (Sarstedt<sup>™</sup> Tube 15 mL, 120×17 mm, SARSTEDT AG & Co. KG, Germany, batch 0043721).

## Inoculation

Prior to inoculation, bacteria or yeast suspensions were carefully homogenized with an automatic shaker for 1 min in order to suspend CFU adhering to surfaces and to ensure the uniformity of the suspensions. Subsequently, 1 mL of

**Table 1.** Characteristics of the medicinal products and test solutions inoculated with selected microorganisms in series 1 and 2.

	Active drug substance	Brand name	Manufacturer	Lot No	Solvent	Vehicle solution	Active substance concentration [mg/mL]	Physicochemical stability at room temperature <sup>a</sup> (25 ± 2 °C)	
<b>Series 1</b>	Atezolizumab	Tecentriq <sup>®</sup>	Roche	B0020H03	–	0.9% NaCl	3.36	24 h	
	Avelumab	Bavencio <sup>®</sup>	Merck Serono	AU29765	–	0.9% NaCl	3.2	24 h	
	Bevacizumab	Avastin <sup>®</sup>	Roche	N7427H18	–	0.9% NaCl	2.5	28 d	
	Blinatumomab	Blinctyo <sup>®</sup>	Amgen	1119706	Water for injection	0.9% NaCl	0.032 µg/mL	96 h	
	Cemiplimab	Libtayo <sup>®</sup>	Sanofi	9F001F	–	0.9% NaCl	3.5	8 h	
	Daratumumab	Darzalex <sup>®</sup>	Janssen-Cilag	KGS4203	–	0.9% NaCl	0.4	15 h	
	Durvalumab	Imfinzi <sup>®</sup>	AstraZeneca	BAEF	–	0.9% NaCl	2.0	8 h	
	Elotuzumab	Empliciti <sup>®</sup>	Celgene	ABQ7329	–	0.9% NaCl	2.0	8 h	
	Nivolumab	Opdivo <sup>®</sup>	BMS	ABQ5596	–	0.9% NaCl	1.0	7 d	
	Pembrolizumab	Keytruda <sup>®</sup>	MSD	T024402	–	0.9% NaCl	2.0	7 d	
	Obinutuzumab	Gazyvaro <sup>®</sup>	Roche	H0136	–	0.9% NaCl	1.0	48 h	
	<b>Series 2</b>	Azacitidine	Azacitidin Hexal <sup>®</sup>	Hexal	CSA08005B	Water for injection	–	25	4 h <sup>b</sup>
		Carfilzomib	Kyprolis <sup>®</sup>	Amgen	1117814A	Water for injection	5% Glucose	0.3	10 d
		Filgrastim	Filgrastim Hexal <sup>®</sup>	Hexal	KS2299	–	–	600 µg/mL	72 h
Mogamulizumab		Poteligeo <sup>®</sup>	Kyowa Kirin	B24051	–	0.9% NaCl	0.5	24 h	
Ocrelizumab		Ocrevus <sup>®</sup>	Roche	H0043	–	0.9% NaCl	1.2	8 h	
Pertuzumab		Perjeta <sup>®</sup>	Roche	H0409H12	–	0.9% NaCl	1.68	24 h	
Pixantrone		Pixuvri <sup>®</sup>	CTI	6017728	0.9% NaCl	0.9% NaCl	0.3	24 h	
Ramucirumab		Cyramza <sup>®</sup>	Lilly	D069147G	–	0.9% NaCl	1.6	4 h	
Vinflunine		Javlor <sup>®</sup>	Pierre Fabre Pharma	10P023_A	–	0.9% NaCl	4.8	24 h <sup>c</sup>	

<sup>a</sup>according to the current summaries of product characteristics (SmPCs).

<sup>b</sup>when reconstituted with cold (2–8 °C) water for injection.

<sup>c</sup>when stored light protected.

the suspension was added to the previously prepared 9 mL test samples to achieve concentrations of approximately 10<sup>4</sup> microorganisms per mL. As an exception, 6 mL of reconstituted azacitidine or filgrastim was inoculated with 0.6 mL of bacteria and yeast suspension, to achieve the target concentration of microorganisms. The inoculated preparations were stored at room temperature and protected from light.

### Sampling, incubation, analysis

In both series, samples (1.0 mL) were taken at 0, 4, 24, 48, and 144 h after inoculation and diluted consecutively three times 1:10 (USP <51>) or 1:100 by using tubes prefilled with nine milliliters of peptone salt solution (Oxoid Deutschland GmbH, Kochsalz-Pepton-Lösung, batch 3137248, expiry date 10.09.2021). CFU counting was facilitated in series 2 by adjusting the dilution scheme for test solutions incubated with *C. albicans*, *P. aeruginosa* and *E. faecium* as follows: Whenever high CFU counts were found in test solutions at 24 h and/or 48 h, the respective solutions were diluted three times 1:100 instead of three times 1:10 at 48 h and/or 144 h.

After homogenization with an automatic shaker, 0.1 mL aliquots of the diluted samples were transferred to tryptic soy agar plates (details see above) in duplicate. The plates

were incubated at 37°C for 24 h (bacterial strains) and 72 h (*C. albicans*) and CFUs were counted. Mean CFU log/mL was calculated for each species and time interval. All microorganisms recovered were checked to confirm their identity with the organisms initially inoculated.

### Results

Results, expressed as CFU log/mL, for each of the four selected test organisms in 20 particular preparations used in anti-cancer therapy are given in Table 2–5.

In pure vehicle solutions the CFU counts of *C. albicans* increased (see Table 2), *S. aureus* increased (0.9% NaCl solution) or decreased (G5) (see Table 3), and *E. faecium* decreased over the 6-day observation period (see Table 5). The numbers of viable *P. aeruginosa* distinctly increased in the pure vehicle solutions serving as control solutions (see Table 4).

Growth inhibition of *C. albicans* was only obvious in nivolumab and pixantrone containing test solutions. In vinflunine test solutions, CFU counts of *C. albicans* remained unchanged. In all other tested solutions CFU counts of *C. albicans* increased (see Table 2). Numbers of viable *S. aureus* remained unchanged (blinatumomab, nivolumab,

ramucirumab) or increased in the mAb test solutions and slightly decreased in carfilzomib and filgrastim solutions. However, bactericidal activity was registered after inoculation in azacitidine, pixantrone, and vinflunine test solutions (see Table 3). *P. aeruginosa* was able to grow in all test solutions prepared from biological products (mAb, filgrastim), but lost viability in pixantrone and vinflunine preparations immediately after inoculation and after four hours, respectively (see Table 4, Figure 1(b),(c)). Numbers of viable *E. faecium* remained unchanged or increased in almost all test solutions, while in obinutuzumab, azacitidine, and filgrastim containing test solutions CFU counts decreased (see Table 5).

In summary, CFU counts of the four facultative pathogenic microorganisms remained unchanged or increased in almost all mAb test solutions. Growth curves of the different microorganisms in pertuzumab test solutions are exemplarily illustrated in Figure 2(a). The test solutions, containing proteinaceous filgrastim (G-CSF) inhibited growth of *E. faecium* and *S. aureus*, but not of *P. aeruginosa* and *C. albicans* (see Figure 2(b)).

Species-specific bacteriostatic and even bactericidal activity was found in azacitidine, pixantrone, and vinflunine

containing test solutions. Numbers of viable *C. albicans* slightly increased, decreased, or remained unchanged over time in azacitidine, pixantrone, and vinflunine containing test solutions, respectively (compare Figure 1(a)-(c)).

## Discussion

The growth of microorganisms in RTA parenteral preparations depends on various factors. Among these are type and concentration of the active substances, temperature, pH, osmolality, redox potential, nutritive and water activity. This study was conducted to obtain a better understanding of the growth potential of selected facultative pathogenic microorganisms in RTA preparations commonly used for SACT. Most pathogens are mesophilic microorganisms growing in a temperature range of 8–45°C (optimum at about 20°C).<sup>23</sup> Thus, to inhibit growth of any contaminating organism, preparations should be kept refrigerated whenever possible. Here we wanted to simulate worst-case conditions for patients and chose low drug concentrations (implying poor antimicrobial activity) and missing refrigerated storage conditions, thereby promoting growth of microorganisms. Of note, most of the selected medicinal products (except bevacizumab, carfilzomib) undergo physicochemical degradation at room temperature and the

**Table 2.** Viability of *C. albicans* in test solutions and control solutions.

Series	Test/control solution	<i>C. albicans</i> (CFU log/mL)					
		0 h	4 h	24 h	48 h	144 h	
Series 1	0.9% NaCl	4.51	4.86	4.36	5.57	5.83	
	Atezolizumab	4.50	4.58	5.17	5.91	7.45	
	Avelumab	4.36	4.58	5.90	6.90	>8.5	
	Bevacizumab	4.52	4.61	5.26	6.09	>8.5	
	Blinatumomab	4.51	4.41	4.59	4.73	7.10	
	Cemiplimab	4.49	4.68	5.80	6.62	6.93	
	Daratumumab	4.36	4.60	5.70	6.41	>8.5	
	Durvalumab	4.44	4.43	5.01	5.47	>8.5	
	Elotuzumab	4.28	4.42	4.59	5.57	7.73	
	Nivolumab	4.65	4.66	4.64	4.01	3.79	
	Pembrolizumab	4.57	4.49	5.26	6.06	7.54	
	Obinutuzumab	4.52	4.41	5.04	5.71	6.97	
	Series 2	0.9% NaCl	4.42	4.56	4.36	4.72	n.a.
		5% Glucose	4.33	4.53	5.58	7.23	7.87*
		Azacitidine	4.42	4.19	5.14	6.10	7.74*
Carfilzomib		4.59	4.47	5.48	6.90	7.40*	
Filgrastim s.c.		4.23	4.56	5.47	7.51	7.66*	
Mogamulizumab		4.53	4.66	4.56	5.07	6.62*	
Ocrelizumab		4.39	4.48	4.84	6.02	7.64*	
Pertuzumab		4.37	4.78	4.97	5.62	6.33*	
Pixantrone		4.32	4.43	4.01	3.30	3.00	
Ramucirumab		4.58	4.44	4.70	5.29	5.58*	
Vinflunine	4.46	4.46	4.45	4.43	4.91		

n.a. = not available because of growth of a species not identical with the inoculated species; \*adjusted dilution scheme (1:100)

**Table 3.** Viability of *S. aureus* in test solutions and control solutions.

Series	Test/control solution	<i>S. aureus</i> (CFU log/mL)					
		0 h	4 h	24 h	48 h	144 h	
Series 1	0.9% NaCl	5.46	5.43	5.37	5.81	6.99	
	Atezolizumab	5.18	5.49	5.33	5.23	6.39	
	Avelumab	5.42	5.33	4.17	3.73	6.55	
	Bevacizumab	5.33	5.38	5.39	5.70	7.39	
	Blinatumomab	5.35	5.29	4.95	4.27	5.82	
	Cemiplimab	5.23	5.29	4.79	3.63	6.52	
	Daratumumab	5.27	5.39	5.35	5.17	6.78	
	Durvalumab	5.16	5.29	4.96	4.45	6.27	
	Elotuzumab	5.21	5.38	4.71	4.99	>8.5	
	Nivolumab	5.32	5.33	5.18	4.59	5.75	
	Pembrolizumab	5.21	5.21	4.96	4.95	>8.5	
	Obinutuzumab	5.29	5.42	5.49	5.83	>8.5	
	Series 2	0.9% NaCl	5.39	5.35	5.09	5.06	6.49
		5% Glucose	5.31	5.21	4.88	4.63	3.87
		Azacitidine	5.24	5.30	5.07	4.92	0
Carfilzomib		5.31	5.23	5.16	5.30	4.46	
Filgrastim s.c.		5.26	4.85	5.28	5.28	4.57	
Mogamulizumab		5.44	5.29	5.56	5.12	6.68	
Ocrelizumab		5.35	5.34	5.37	5.13	6.48	
Pertuzumab		5.46	5.32	5.61	5.36	6.85	
Pixantrone		5.26	5.24	4.90	4.69	0	
Ramucirumab		5.47	5.42	5.46	5.41	5.72	
Vinflunine	5.36	0.50	0	0	0		

**Table 4.** Viability of *P. aeruginosa* in test solutions and control solutions.

	Test/control solution	<i>P. aeruginosa</i> (CFU log/mL)					
		0 h	4 h	24 h	48 h	144 h	
Series 1	0.9% NaCl	5.23	4.98	6.91	>8.5	>8.5	
	Atezolizumab	5.17	5.06	6.71	>8.5	>8.5	
	Avelumab	5.24	5.05	7.42	>8.5	>8.5	
	Bevacizumab	5.38	5.26	7.37	>8.5	>8.5	
	Blinatumomab	5.30	5.40	7.85	>8.5	>8.5	
	Cemiplimab	5.34	5.29	>8.5	>8.5	>8.5	
	Daratumumab	5.27	5.19	6.44	>8.5	>8.5	
	Durvalumab	5.28	5.15	7.42	>8.5	>8.5	
	Elotuzumab	5.12	5.33	>8.5	>8.5	>8.5	
	Nivolumab	5.12	5.34	7.41	>8.5	>8.5	
	Pembrolizumab	5.02	5.15	7.62	>8.5	>8.5	
	Obinutuzumab	5.22	5.24	7.14	>8.5	>8.5	
	Series 2	0.9% NaCl	5.24	4.91	6.35	8.66*	9.39*
		5% Glucose	5.04	4.99	5.48	8.46*	9.67*
Azacididine		5.06	5.12	4.73	4.70	4.63	
Carfilzomib		5.19	4.94	5.45	8.78*	9.42*	
Filgrastim s.c.		4.95	4.88	4.88	>8.5*	9.30*	
Mogamulizumab		5.13	5.10	7.48	9.04*	9.20*	
Ocrelizumab		5.03	4.93	5.94	8.65*	9.34*	
Pertuzumab		5.03	5.10	6.16	8.54*	9.52*	
Pixantrone		0.50	0.67	0.83	0.50	0	
Ramucirumab		5.05	4.97	6.85	8.65*	9.52*	
Vinflunine		4.68	0.82	0	0	0	

\*adjusted dilution scheme (1:100).

impact of the resulting degradation products on the viability of microorganisms is difficult to predict.

The rather high inoculum level ( $10^3$ – $10^5$  CFU/mL) was chosen according to the pharmacopoeia antimicrobial effectiveness tests and our previous experiments.<sup>4,11–15</sup> In a recently published study the level of intended microbial contamination was also  $10^5$  CFU/mL.<sup>7</sup> Less detrimental experimental conditions are achieved, when the inoculum level is adjusted to  $10^2$  CFU/mL to simulate inadvertent touch contamination (i.e., low-level contamination).<sup>24,25</sup> For medicinal products not containing preservatives, in-use stability tests might be the better option. However, it is not yet an official pharmacopoeia test. It should also be noted, that depending on the biological test method and the test conditions results can vary substantially.

In contrast to our previous studies where we used pure 0.9% sodium chloride solution, samples were diluted with peptone salt solution as maximum recovery diluent. The increased CFU levels observed in the inoculated test solutions and pure vehicle solutions might be aided by the growth promoting activity of the peptone salt diluent. The incubation temperature used for the agar plates was 37°C for bacteria and yeast corresponding to our earlier test conditions but deviating from the incubation temperatures defined in the pharmacopoeia.

In any case, the comparison and interpretation of the absolute increase of CFU counts over time is difficult. According to the USP monograph <51>, “No increase in counts is defined as not more than 0.5 log<sub>10</sub> unit higher than the previous value measured”. Related to this specification, in our microbial challenge experiments in most of the test solutions increase of microorganisms occurred. Moreover, CFU counts increased in pure vehicle solutions in similar degrees. The interpretation could be that the tested medicinal preparations do not possess nutritive activity. It is worthwhile to check the growth curve and growth trending over an adequate period.<sup>24</sup> Thereby the start and the end of the log-phase becomes obvious and allows further interpretation.

### Monoclonal antibodies

Special emphasis was put on the investigation of the potential growth supporting nature of biological products. Lolas et al. postulate that “biological products generally promote growth of microorganisms because they are derived from living systems. This is especially true of proteins in buffer matrices”.<sup>25</sup> Ricci et al. also mention that “protein drug product solutions have been shown to promote microbiological growth following contamination”.<sup>2</sup> In line with our previous results,<sup>12,13</sup> the selected microorganisms remained viable and CFU trending in the mAb containing test solutions was

mostly similar to the control solutions (see Table 2–4, Figure 2(a)). Comparable CFU growth rates were recently described for nivolumab, pembrolizumab and daratumumab.<sup>10</sup> The degree of growth promotion appears to be species-specific. Hence, the biggest increase in CFU counts was obtained for *P. aeruginosa*, a species able to use a diversity of substances as nutrients and even grows in distilled water. However, in mAb test solutions the growth rates of the

selected microorganisms are significantly lower than in 20% lipid emulsions, which unambiguously serve as nutritive media for microorganisms.<sup>11,26</sup>

### Filgrastim

Filgrastim s.c. is a biotechnologically produced variant of human granulocyte colony-stimulating factor. Despite the proteinaceous structure and granulocyte growth promoting activity of filgrastim, growth of the selected bacteria and *C. albicans* in filgrastim containing test solutions was similar to the growth rates in control solutions (see Tables 2–5). Lack of growth promoting activity was also reported by Jacobson et al.<sup>18</sup> investigating the sterility of filgrastim in syringes with similar species but under different test conditions.

### Small molecules

In carfilzomib containing test solutions viability of the selected microorganisms was similar to the viability in G5 control solutions. In contrast, species-specific antibacterial but not antifungal activity was observed for azacitidine, and vinflunine (see Figure 1(a),(c)). As azacitidine suspension is physicochemically stable for a period of only 4 h at room temperature, the species-specific antimicrobial activity is considered to be related to the degradation products. Despite different chemical structures and pharmacological principles, pixantrone and vinflunine showed similar antimicrobial activity for *P. aeruginosa* and *S. aureus*. In previous studies, mitoxantrone, which is structurally related to pixantrone, revealed strong antibacterial and antifungal activity.<sup>14</sup> Further vinca alkaloids proved species-specific antibacterial but not antifungal activity.<sup>4,14</sup>

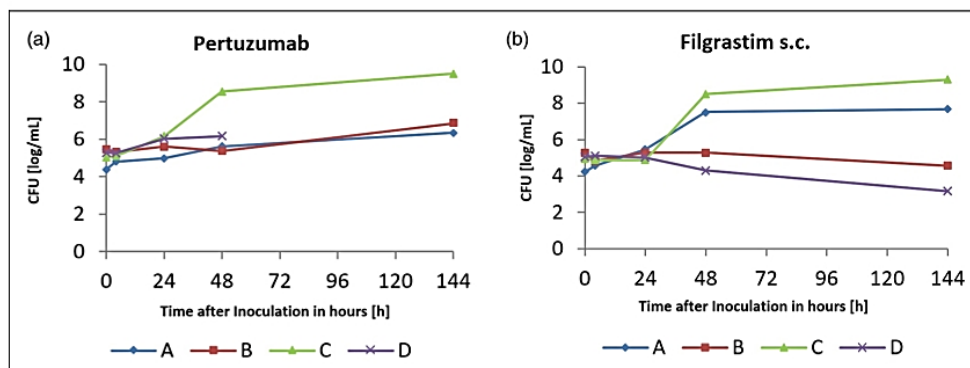
### Allocation of shelf life

Microbiological and physicochemical stability data are to be considered concurrently when determining the shelf life of RTA parenteral preparations. As the growth-

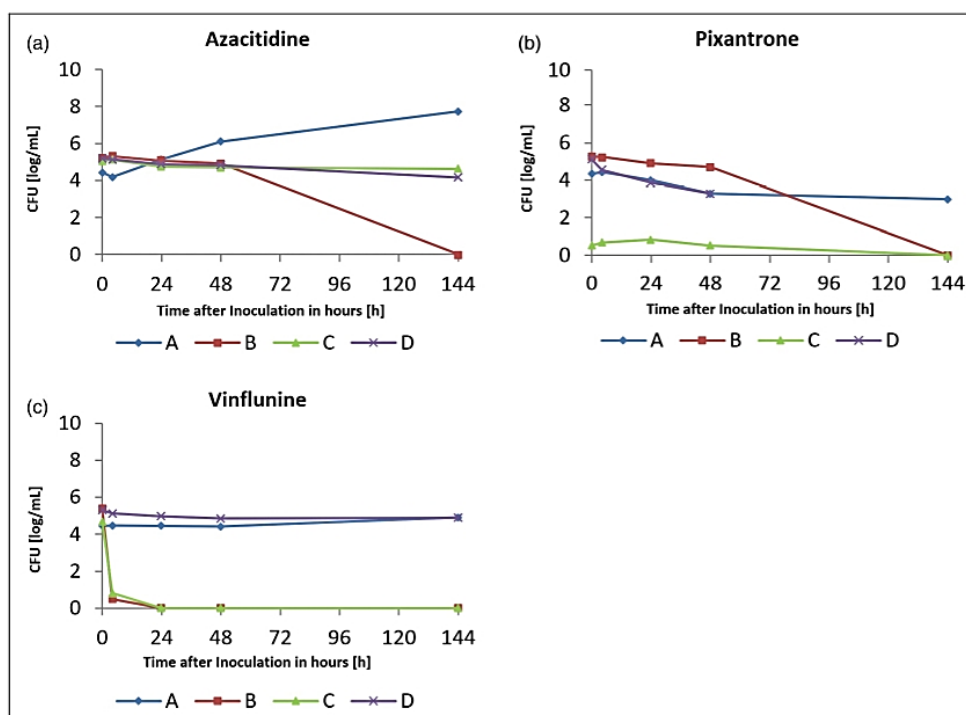
**Table 5.** Viability of *E. faecium* in test solutions and control solutions.

Series	Test/control solution	<i>E. faecium</i> (CFU log/mL)				
		0 h	4 h	24 h	48 h	144 h
Series 1	0.9% NaCl	5.30	5.46	5.77	5.26	4.40
	Atezolizumab	5.22	5.62	6.34	6.55	6.46
	Avelumab	5.17	5.41	7.74	8.04	8.25
	Bevacizumab	5.36	5.50	6.31	6.07	6.10
	Blinatumomab	5.33	5.39	7.28	7.43	7.25
	Cemiplimab	5.34	5.56	7.39	7.51	6.81
	Daratumumab	5.36	5.57	6.47	6.03	6.85
	Durvalumab	5.36	5.67	7.71	8.11	8.50
	Elotuzumab	5.20	5.53	7.34	7.49	7.16
	Nivolumab	5.28	5.49	5.88	6.20	6.81
	Pembrolizumab	5.27	5.52	7.36	7.51	7.29
Series 2	Obinutuzumab	5.29	5.65	5.78	5.35	4.46
	0.9% NaCl	5.13	5.17	5.99	n.a.*	n.a.
	5% Glucose	5.21	5.25	5.09	4.52	3.35
	Azacitidine	5.16	5.13	4.86	4.82	4.16
	Carfilzomib	5.19	5.14	5.11	5.12	5.03
	Filgrastim s.c.	5.04	5.11	5.01	4.31	3.15
	Mogamulizumab	5.35	5.18	6.90	6.95*	>10.0
	Ocrelizumab	5.26	5.32	6.07	n.a.*	n.a.
	Pertuzumab	5.28	5.25	6.03	6.17*	n.a.
	Pixantrone	5.12	4.55	3.87	3.30	n.a.
	Ramucirumab	5.17	5.43	7.10	7.40*	n.a.
Vinflunine	5.30	5.11	4.97	4.85	4.90	

n.a. = not available because of growth of a species not identical with the inoculated species; \*adjusted dilution scheme (1:100).



**Figure 1.** (a,b) viability of the four selected test organisms (A: *C. albicans*, B: *S. aureus*, C: *P. aeruginosa*, D: *E. faecium*) in diluted Pertuzumab (1a) or undiluted Filgrastim s.c. (1b) test solutions. CFU=colony forming units.



**Figure 2.** (a–c) viability of the four selected test organisms (A: *C. albicans*, B: *S. aureus*, C: *P. aeruginosa*, D: *E. faecium*) in undiluted Azacitidine (2a) or diluted Pixantrone (2b), Vinflunine (2c) test solutions. CFU = colony forming units.

promoting activity of the specific preparation represents a crucial risk factor for microbiological instability, knowledge about its growth-promoting activity is useful for the empirical allocation of shelf life. At the same time, a proper controlled environment and validated aseptic processing are to be ensured. In order to diminish microbiological instability, refrigerated storage should always be preferred, except when physicochemical stability is affected under refrigeration.

### Limitations

The results of microbial challenge studies are heavily depending on the chosen experimental conditions. Test conditions used were originally based on the pharmacopoeia antimicrobial effectiveness tests and our previous studies. However, absolute CFU counts are different from our previous studies and interpretation of the results needs comparison with the CFU counts in pure vehicle solutions and observation of data trending. Additional experiments, using lower contamination rates, pure 0.9% NaCl solution as diluent for the test solutions and longer test periods, are necessary to achieve test conditions more adapted to microbial in-use viability tests. Further studies should also focus on extended storage (for up to 6 months) of batch

prepared standard infusions and investigate the effect of cycling storage temperatures, i.e., when refrigerated preparations are delivered to the clinic and then returned to refrigerated storage for later use. Results of microbial viability tests represent only one single risk factor for the stability of parenteral preparations. Thus, empirical allocation of shelf life of pharmacy preparations should be based on the whole bundle of risk factors.<sup>1</sup>

### Conclusion

Viability and growth of the selected microorganisms were retained in most of the tested parenteral preparations. Monoclonal antibodies and filgrastim did not reveal pronounced nutritive properties. However, the lack of antimicrobial activity should be considered when assigning shelf life to RTA parenteral preparations. Furthermore, a validated quality assurance program must be available and continuously monitored in order to achieve sterile aseptic preparations.

### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the technical assistance of T. Brand and B. Rabas at the Department for Hygiene and

Infection prevention, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Germany, Mainz.

### Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### Autho Contributions


J.A., L.K.: investigation, data curation, writing-original draft preparation. J.T., I.K.: resources, conceptualization, writing-review and editing, supervision, project administration, funding acquisition. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

### Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

### ORCID iDs

Jannik Almasi  <https://orcid.org/0000-0002-9923-7109>

Irene Krämer  <https://orcid.org/0000-0002-7576-3665>

### References

- Crauste-Manciet S, Krämer I, Lagarce F, et al. GERPAC Consensus conference – guidance on the assignment of microbiological shelf-life for hospital pharmacy aseptic preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2020; 5: 20200001.
- Ricci MS, Frazier M, Moore J, et al. In-use physicochemical and microbiological stability of biological parenteral products. *Am J Health Syst Pharm* 2015; 72: 396–407.
- Chavda H. In-use stability studies: guidelines and challenges. *Drug Dev and Ind Pharm* 2021; 47: 1373–1391.
- Krämer I. Viability of microorganisms in novel antineoplastic and antiviral drug solutions. *J Oncol Pharm Practice* 1998; 4: 32–37.
- Antimicrobial effectiveness testing (General Chapter <51>). In: *The United States Pharmacopeia, 44th rev., and The national formulary*. 39th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2021, pp. 111–114.
- Efficacy of antimicrobial preservation (General Chapter 5.1.3.). In: *European Pharmacopeia 11.0; 2022*. EDQM Council of Europe, 7 allée Kastner, CS 30026, F-67081 Strasbourg, France.
- Bruenke J, Riemann T, Kessler P, et al. Epidural infections, bacteriostatic drug effects and technical strategies for prevention. *Reg Anesth Pain Med* 2022; 47: 128–130.
- Matheron A, Guerault MN, Vazquez R, et al. Microbiological stability tests with simulated broth preparations and integrity testing for sterile standard cytotoxic preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2020; 5: 20200002.
- Sangnier M, Bouguéon G, Berroneau A, et al. Removal of bacterial growth inhibition of anticancer drugs by using complexation materials. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2019; 5: 20190018.
- Cancanelli L, Selmin F, Camuffo L, et al. Storage of nivolumab, pembrolizumab and daratumumab for 14 days after compounding in the hospital pharmacy: a microbial stability study. *EAFP Congress*, Poster N°3PC-021.
- Sarakbi I, Heeb R, Thiesen J, et al. Viability of selected microorganisms in non-cytotoxic aseptic preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2016; 1: 9–20.
- Sarakbi I, Federici M and Krämer I. Viability of microorganisms in novel chemical and biopharmaceutical anticancer drug solutions. *Eur J Hosp Pharm* 2015; 20: 5–12.
- Karstens A and Krämer I. Viability of microorganisms in novel chemical and biopharmaceutical drug solutions for cancer treatment. *Eur J Hosp Pharm Science* 2007; 13: 27–32.
- Krämer I and Wenchel HM. Viability of microorganisms in antineoplastic drug solutions. *Eur J Hosp Pharm Science* 1991; 1: 14–19.
- Krämer I and Wenchel HM. Wachstumsverhalten ausgewählter Mikroorganismen in Zytostatika-Zubereitungen. *Krankenhauspharmazie* 1988; 11: 439–442.
- Favier B, Latour JF and Fuhrmann C. Viability of microorganisms in bags of cytotoxic drugs. *J Oncol Pharm Pract* 2001; 6: 167–171.
- Patel K, Craig SB, McBride MG, et al. Microbial inhibitory properties and stability of topotecan hydrochloride injection. *Am J Health Syst Pharm* 1998; 55: 1584–1587.
- Jacobson PA, West NJ, Spadoni V, et al. Sterility of filgrastim (G-CSF) in syringes. *Ann Pharmacother* 1996; 30: 1238–1242.
- Holmes CJ, Kubey WY and Love DI. Viability of microorganisms in fluorouracil and cisplatin small-volume injections. *Am J Hosp Pharm* 1988; 45: 1089–1091.
- Calame W, Van der Waals R, Douwes-Idema N, et al. Antibacterial effect of etoposide in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1456–1457.
- Bodet CA, Jorgensen JH and Drutz DJ. Antibacterial activities of antineoplastic agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 437–439.
- Hammilton-Miller JMT. Antimicrobiological activity of 21 antineoplastic agents. *Br J Canc* 1984; 49: 367–369.
- Lolas A. The role of microbiology in the design and development of pharmaceutical manufacturing processes. *Pharm Bioprocess* 2014; 2: 125–128.
- Metcalf JW. Microbiological Quality of Drug Products after Penetration of the Container System for Dose Preparation Prior to Patient Administration. *American Pharmaceutical Review* 2009.
- Lolas AG and Metcalfe JW. Evaluation of the microbial growth potential of pharmaceutical drug products and quality by design. *PDA J Pharm Sci Technol* 2011; 65: 63–70.
- Austin PD, Hand KS and Elia M. Systematic review and meta-analyses of the effect of lipid emulsion on microbial growth in parenteral nutrition. *J Hosp Infect* 2016; 94: 307–319.



## Danksagung

Ohne die Unterstützung vieler lieber Menschen, die mich während der Routinearbeit in der Apotheke, den experimentellen Untersuchungen und dem Schreiben der Paper und der Dissertation auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben, hätte diese Doktorarbeit nicht realisiert werden können. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt [REDACTED], die alle Projekte meiner Promotion mit großem Engagement, Herzblut, fachlicher Expertise und viel Umsicht betreut hat. Jede Diskussion hat maßgeblich dazu beigetragen, mein Wissen zu erweitern und meine Arbeit zu verbessern. Des Weiteren möchte ich mich für die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Ich danke [REDACTED] für die freundliche Unterstützung und die Erstellung des Zweitgutachtens. Ebenso gebührt mein Dank [REDACTED].

Bei [REDACTED] möchte ich mich für die tolle Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner experimentellen Arbeiten sowie bei deren Verschriftlichung bedanken. Ihre Ideen und Einschätzungen waren sehr wertvoll.

Den Kolleg\*innen aus der Apotheke der Universitätsmedizin Mainz gebührt ebenfalls mein Dank. Besonders natürlich den Kolleg\*innen der Zytostatika-Abteilung, die mich in die pharmazeutische Onkologie eingeführt und mir für notwendige Arbeiten an der Promotion immer den Rücken freigehalten haben. Bei meinen Mitdoktorand\*innen möchte ich mich für die schöne gemeinsame Zeit und für den fachlichen Austausch bei den monatlichen Freitagfortbildungen bedanken.

Von Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden bedanken.

Ganz besonders hervorheben will ich meine Frau, die mich in jeder Phase meiner Promotion unglaublich selbstlos unterstützt hat und die vor allem in schwierigen Zeiten für mich da war.

## Lebenslauf

### Jannik Almasi

---

Geburtsdatum 05.04.1991  
Geburtsort Siegen  
Staatsangehörigkeit Deutsch  
Anschrift Gänsmarkt 12, 55128 Mainz  
Telefon +49 176 70176346  
E-Mail jannik.almasi@mail.de

### Beruflicher Werdegang

---

Seit 08/2017 Johannes Gutenberg-Universität Mainz – Promotion  
Fach: Klinische Pharmazie  
Betreuung: Prof. Dr. rer. nat. Irene Krämer

08/2017 – 07/2023 Apotheke der Universitätsmedizin Mainz  
*Zentrale Zytostatikazubereitung*

11/2016 – 04/2017 Schwanenapotheke Mainz  
*Pharmazeut im Praktikum*

05/2016 – 10/2016 Apotheke der Universitätsmedizin Mainz  
*Pharmazeut im Praktikum*

08/2010 – 07/2011 Basketballkreis Südwestfalen e.V.  
*Freiwilliges Soziales Jahr*

### Ausbildung

---

06/2017 Approbation als Apotheker

11/2011 – 04/2016 Philipps-Universität Marburg  
*Studium der Pharmazie*

2001 – 2010 Gymnasium Netphen, Abitur