

**Untersuchungen zur physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Stabilität
ausgewählter Arzneimittel zur parenteralen Tumorthherapie**

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

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

Laura Caroline Kirsch
geb. in Heidelberg

Mainz, 2025

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2025

InC-1.0

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Zusammenfassung	V
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Haltbarkeitsdeterminierung von applikationsfertigen parenteralen Zubereitungen ..	2
1.2 Physikalisch-chemische Stabilität Small Molecules	4
1.3 Physikalisch-chemische Stabilität Monoklonale Antikörper	8
1.4 Gute Praxis der Stabilitätstestung Small Molecules und Monoklonale Antikörper .	16
1.5 Mikrobiologische Stabilität von applikationsfertigen parenteralen Zubereitungen .	22
2 Zielsetzung	25
3 Stabilitätsuntersuchungen	28
3.1 Physikalisch-chemische Stabilität carmustinhaltiger Arzneimittel	28
3.2 Physikalisch-chemische Stabilität subkutaner Daratumumab- Injektionslösung	30
3.3 Physikalisch-chemische Stabilität des Trastuzumab Biosimilars SB3 (Ontruzant®) nach Rekonstitution im Originalvial	32
3.4 Viabilität fakultativ pathogener Mikroorganismen in parenteralen Zubereitungen zur Tumorthherapie	34
4 Schlussfolgerung	36
5 Literaturverzeichnis	38
6 Anhang	44

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	Antibody-dependent cellular phagocytosis
ApBetrO	Apothekenbetriebsordnung
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CDR	Complementary determining regions
CFU	Colony forming unit
CIEC	Cation-exchange chromatography
DAD	Diodenarray-Detektion
DLS	Dynamic light scattering
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FcRn	Fragment crystallizable receptor neonatal
GPP	Good Pharmacy Practice
HMW	High molecular weight
HS	Hilfsstoff
icIEF	Imaged capillary isoelectric focusing
IEC	Ion-exchange chromatography
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
IE-HPLC	Ion-exchange high-performance liquid chromatography
Ig	Immunglobulin
KBE	Koloniebildende Einheit
LMW	Low molecular weight
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
mAb	Monoclonal Antibody
MO	Microorganism
MS	Massenspektrometrie
NHS	National Health System
pI	Isoelektrischer Punkt
p.o.	Peroral
PO	Polyolefin
PE	Polyethylen

PP	Polypropylen
PVC	Polyvinylchlorid
RNS	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reversed-phase high-performance liquid chromatography
RTA	Ready-to-administer
SACT	Systemic anti-cancer therapy
s.c.	Subkutan
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Size-exclusion chromatography
SE-HPLC	Size-exclusion high-performance liquid chromatography
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SmPC	Summary of Product Characteristics
UHPLC	Ultra high-performance liquid chromatography
UV	Ultraviolett
WFI	Wasser für Injektionszwecke
WS	Wirkstoff

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Carmustin (1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff, BCNU)(19).

Abbildung 2: Schematische zweidimensionale (a) und dreidimensionale (b) Darstellung eines IgG Antikörpers (29).

Abbildung 3: Fc-Fragment vermittelte Effektorfunktionen monoklonaler Antikörper (CDC, ADCC, ADCP, Bindung an FcRn) (34).

Abbildung 4: Mikroheterogenität zwischen Referenzarzneimittel (Originator) und Biosimilar (36).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Empirische Haltbarkeitsdeterminierung nach Risikopotential der Zubereitung (niedrig, mittel, hoch) und Lagerbedingung (17, 18).

Tabelle 2: Physikalische und chemische Instabilitätsreaktionen kleiner Moleküle (9).

Tabelle 3: Ausgewählte analytische Methoden zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität monoklonaler Antikörper basierend auf (8, 11, 32, 46, 47).

Tabelle 4: Studiendesign physikalisch-chemischer Stabilitätsstudien von Small Molecules und monoklonalen Antikörpern (9-11).

Zusammenfassung

Arzneimittel zur systemischen Tumortherapie werden heute regelhaft in der Apotheke aseptisch und applikationsfertig zubereitet. Rekonstituierte Stammlösungen und applikationsfertige Zubereitungen müssen mit einer angemessenen Verwendbarkeitsdauer gekennzeichnet werden. Die Verwendbarkeitsdeterminierung erfolgt basierend auf physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Stabilitätsdaten. Wenn diese Daten in den Fachinformationen der Fertigarzneimittel nicht enthalten sind, kann der verantwortliche Apotheker bzw. die verantwortliche Apothekerin auf publizierte Daten zurückgreifen, um die Verwendbarkeit der Zubereitung festzulegen. Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die physikalisch-chemische und mikrobiologische Stabilität ausgewählter Tumorarzneimittel zu untersuchen, um damit eine valide Grundlage für deren Verwendbarkeitsdeterminierung zu schaffen. Die Ergebnisse führen zu effizienteren und ökonomischeren Herstellungsprozessen und verbessern die Arzneimitteltherapiesicherheit.

Knapp vier Jahrzehnte war Carmubris (Tillomed Pharma GmbH) Pulver und Lösungsmittel (Ethanol) zur Herstellung einer Infusion das einzige, zugelassene carmustinhaltige Arzneimittel auf dem Markt. Für Carmubris Stamm- und Infusionslösungen liegen wissenschaftliche Publikationen zur physikalisch-chemischen Stabilität vor. Im Jahr 2018 folgte die Zulassung des ersten Carmustin Generikums namens Carmustin Obvius (Medac GmbH). Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität von rekonstituiertem und verdünntem Carmustin Obvius fehlten. Demzufolge wurde die physikalisch-chemische Stabilität beider Carmustin-Fertigarzneimittel vergleichend untersucht. Die als Pulver vorliegenden Fertigarzneimittel wurden gemäß der jeweiligen Fachinformation rekonstituiert und die konzentrierten Lösungen bei 2-8 °C über 48 Stunden lichtgeschützt gelagert. Applikationsfertige Infusionslösungen der Konzentrationen 0,2 mg/ml und 1,0 mg/ml wurden in mit Glucose 5% Lösung vorgefüllten Infusionsbeuteln zubereitet und 11 Stunden bei 22 °C oder 60 Stunden bei 2-8 °C (Kühlschrank) lichtgeschützt gelagert. Zur Simulation der anschließenden Applikation wurden Carmustin-Infusionslösungen 0,2 mg/ml im Anschluss an die Kühlagerung für weitere 3 und 6 Stunden bei 22 °C lichtgeschützt gelagert. Die Stabilität aller Carmustin-Testlösungen wurde zu vordefinierten Zeitpunkten mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit Diodearray-Detektion (DAD), pH-Messung, Osmolaritäts-Messung und Prüfung auf sichtbare Partikel oder Farbveränderungen analysiert. In den konzentrierten Stammlösungen und verdünnten Infusionslösungen beider Fertigarzneimittel nahm die Carmustin-Konzentration in gleichem Maß ab. Die Abbaukinetik erwies sich als unabhängig von der Carmustin-Ausgangskonzentration, jedoch als stark temperaturabhängig. Carmustin-Stammlösungen sind bei Kühl-schranklagerung (2-8 °C) für 48 Stunden physikalisch-chemisch stabil. Die applikationsfertigen

Carmustin-Infusionslösungen erfüllen die Stabilitätskriterien bei lichtgeschützter Kühlschranklagerung (2-8 °C) bzw. bei 22 °C für 60 bzw. 8,5 Stunden.

Therapien mit monoklonalen Antikörpern (mAbs) machen heute einen wesentlichen Anteil der systemischen Tumortherapie aus. Die komplexe Glycoprotein-Struktur der mAbs bringt neue Herausforderungen für die Untersuchungen der physikalisch-chemischen Stabilität und für die sichere Anwendung dieser Arzneimittel mit sich. Die Stabilität von mAb-Zubereitungen muss mit orthogonalen Methoden nachgewiesen werden. In der Fachinformation von DARZALEX® 1800 mg Injektionslösung (Wirkstoff: Daratumumab) wird als physikalisch-chemische Stabilität für die applikationsfertigen Injektionszubereitungen 24 Stunden bei 2-8 °C unter Lichtschutz und weitere 12 Stunden bei 15-25 °C ohne Lichtschutz angegeben. Der kurze angegebene Stabilitätszeitraum erlaubt keine aseptische Zubereitung der Injektionslösungen in der Apotheke im Voraus. Als Basis für eine Prozessoptimierung in der Apotheke wurde die physikalisch-chemische Stabilität der applikationsfertigen Daratumumab-Injektionslösung in verschiedenen Typen von Einmal-Plastikspritzen und Lagertemperaturen über einen Zeitraum von 28 Tagen bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten mittels neu entwickelter Ionenaustausch- und Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (IE-, SE-HPLC)-Methoden, pH-Messung und Prüfung auf sichtbare Partikel oder Farbveränderungen. Die mittels SE-HPLC gemessenen Daratumumab-Monomer-Konzentrationen nahmen über den gesamten Untersuchungszeitraum um weniger als 5% ab. Es wurden zu keinem Zeitpunkt Aggregate mit hohem Molekulargewicht (high molecular weight, HMW) oder Fragmente von Daratumumab in den Chromatogrammen detektiert. Die mittels IE-HPLC ermittelten Peakflächen der Daratumumab Ladungsvarianten (sauer, basisch, neutral) zeigten keine signifikanten Größenänderungen über den gesamten Untersuchungszeitraum von 28 Tagen. Die pH-Werte blieben unverändert. Es wurden weder Farbveränderungen noch sichtbare Partikel detektiert. Da alle vordefinierten Spezifikationen erfüllt wurden, ist die physikalisch-chemische Stabilität applikationsfertiger Daratumumab-Injektionslösungen in Einmalspritzen über einen Zeitraum von 28 Tagen unabhängig von der Art des Sprizentyps und der Lagertemperatur gegeben.

Physikalisch-chemische Stabilitätsdaten dürfen weder vom Referenzarzneimittel eines mAbs auf die nach Patentablauf zugelassenen Nachfolgeprodukte, die sogenannten Biosimilars, noch von einem Biosimilar auf ein anderes Biosimilar übertragen oder extrapoliert werden. Im Jahr 2017 wurde das Trastuzumab Biosimilar SB3 (Ontruzant®) von der European Medicines Agency (EMA) zugelassen. Laut Fachinformation ist Trastuzumab SB3 nach aseptischer Rekonstitution 7 Tage bei 2-8 °C stabil. Für verdünnte Trastuzumab SB3-Infusionslösungen wird in der Fachinformation als physikalisch-chemische Stabilität 28 Tage bei Kühlschranklagerung angegeben. Um Verwürfe rekonstituierter SB3 Lösungen vermeiden zu können, war eine

experimentelle Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität der rekonstituierten Trastuzumab SB3-Lösung über den verlängerten Zeitraum von 28 Tagen von Interesse. Dazu wurde handelsübliches Ontruzant®-Lyophilisat entsprechend der Fachinformation rekonstituiert und nach Erstanbruch bei 2-8 °C und bei Raumtemperatur (15-25 °C) unter Lichtschutz über 28 Tage in den Originalvials gelagert. Zu vordefinierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels SE-HPLC mit Diodenarraydetektion (DAD), Ultraviolett (UV)-Spektrometrie, pH-Messung und Prüfung auf sichtbare Partikel oder Farbveränderungen geprüft. Die Trastuzumab-Monomer-Konzentrationen lagen während des gesamten Untersuchungszeitraums über 95 % der gemessenen Ausgangskonzentrationen. Die pH-Werte und die mittels UV-Spektrometrie ermittelten Trastuzumab-Konzentrationen blieben unverändert. Es wurden keine Farbveränderungen oder sichtbare Partikel festgestellt. Aus den Untersuchungsergebnissen kann geschlossen werden, dass rekonstituierte Trastuzumab-SB3-Lösungen bei lichtgeschützter Lagerung in den Originalbehältnissen unabhängig von der Lagertemperatur über 28 Tage physikalisch-chemisch stabil sind. Die Ergebnisse sollten durch Untersuchung der Trastuzumab SB3 Ladungsvarianten mittels IE-HPLC oder icIEF untermauert werden.

Zur Bewertung der mikrobiologischen Stabilität von aseptisch zubereiteten, applikationsfertigen Parenteralia-Zubereitungen, sind Kenntnisse zur Viabilität (Überlebensfähigkeit) von Mikroorganismen (MOs) in den Arzneimittelzubereitungen von Interesse. Für 20 noch nicht untersuchte Arzneimittel zur Tumorthherapie (Biologika, chemische Moleküle) wurde die Viabilität vier verschiedener fakultativ pathogener Krankheitserreger (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*) in applikationsfertigen Testzubereitungen untersucht. Für jedes Arzneimittel wurden Testlösungen in praxisüblichen Konzentrationen aseptisch zubereitet, mit definierten Mengen MO-Suspension (Simulation einer low-level-Kontamination) inokuliert und bei 22 °C lichtgeschützt gelagert. Nach 4, 24, 48 und 144 Stunden wurden Proben entnommen, auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Nach 24 bzw. 72 Stunden wurden die koloniebildenden Einheiten (KBEs) der Bakterien bzw. von *C. albicans* gezählt. Die gewählten MOs blieben in den meisten Testlösungen über 144 Stunden viabel. Ausgeprägte wachstumsfördernde Eigenschaften konnten den Biologika-Testlösungen nicht zugesprochen werden. Die Testlösungen einiger chemisch hergestellter Moleküle zeigten speziesspezifisch bakterio-statische und bakterizide Wirkung. Die mikrobiologischen Untersuchungen bringen neue Erkenntnisse zur Viabilität fakultativ pathogener MOs in neuen Arzneimitteln zur Tumorthherapie, welche bei der empirischen Festlegung der mikrobiologischen Stabilität von Nutzen sind.

Abstract

Ready-to-administer (RTA) preparations for systemic anti-cancer therapy (SACT) are generally prepared aseptically and patient-individually in hospital pharmacies. Reconstituted stock solutions and RTA preparations must be labeled with an appropriate shelf life. Shelf life determination is based on physicochemical and microbiological stability data. In the case of missing data in the Summary of Product Characteristics (SmPC) of the finished medicinal product, the responsible pharmacist can refer to published data to determine the shelf life of the preparation. The aim of this thesis was to investigate physicochemical and microbiological stability of selected medicinal products and RTA preparations and thus create a valid basis for determining their shelf life. The results lead to more efficient and economical manufacturing processes and improve medication safety.

For almost four decades, Carmubris (Tillomed Pharma GmbH) was the only approved carmustine containing medicinal product on the market. In 2018 the first generic carmustine medicinal product, i.e. Carmustin Obvius (Medac GmbH) was licensed and brought to the market. While physicochemical stability data of Carmubris are published, extended stability data of reconstituted and diluted Carmustin Obvius are lacking. In order to compare the degradation rates of Carmubris and Carmustin Obvius and to determine the physicochemical stability of the generic product Carmustin Obvius, reconstituted and diluted preparations of both licensed products were experimentally tested in parallel. Powders of both finished medicinal products were reconstituted according to the SmPCs and stored at 2-8 °C for 48 hours protected from light. RTA infusion solutions of the nominal concentration 0.2 mg/mL and 1.0 mg/mL were prepared by dilution in infusion bags prefilled with glucose 5% infusion solution. Test solutions were stored at 22 °C for 11 hours or at 2-8 °C for 60 hours protected from light. For test solutions of the concentration 0.2 mg/mL refrigerated storage was followed by light protected storage at room temperature for 3 and 6 hours to simulate the infusion process. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with diode array detection (DAD), measurement of pH and osmolarity, and test of visible particles or color changes were used as test methods. Identical concentration losses were observed in the stock solutions and diluted infusion solutions of both medicinal products. Degradation kinetics proved to be independent from the initial carmustine concentrations, but strongly dependent on temperature. Carmustine stock solutions proved to be physicochemically stable for 48 hours when stored at 2-8 °C. Carmustine RTA infusion solutions fulfill stability criteria when stored refrigerated (2-8 °C) and at 22 °C protected from light for 60 and 8.5 hours, respectively.

Today, monoclonal antibodies (mAbs) are a mainstay of systemic anticancer therapy. The complex glycoprotein structure of mAbs poses new challenges for investigation of

physicochemical stability and safe parenteral administration of these preparations. In the SmPC of DARZALEX® 1800 mg solution for injection, physicochemical stability of RTA preparations is specified as 24 hours at 2-8 °C under light protection and a further 12 hours at 15-25 °C without light protection. To be able to prepare RTA syringes in advance, physicochemical stability of daratumumab injection solution was determined in different plastic syringes over a period of 28 days. Investigations were carried out using newly developed ion-exchange- and size-exclusion-HPLC (IE-, SE-HPLC) methods with DAD, pH measurement and testing for visible particles or color changes. Daratumumab monomer concentrations measured by SE-HPLC decreased less than 5% over the entire study period. No high molecular weight products or fragments were detected in the chromatograms. Peak areas of daratumumab charge variants (acidic, basic, neutral) determined by IE-HPLC and the charge variant profile showed no significant changes over the entire study period of 28 days and pH values remained unchanged. Neither color changes nor visible particles were detected. Physicochemical stability of the RTA daratumumab injection solution was demonstrated using orthogonal methods over a period of 28 days, independent from syringe type and storage temperature.

Physicochemical stability data of the reference medicinal product cannot be transferred or extrapolated to the corresponding biosimilar product or from a biosimilar to another biosimilar product. In 2017, the trastuzumab biosimilar SB3 (Ontruzant®) was approved by the European Medicines Agency (EMA). According to the SmPC, trastuzumab SB3 reconstituted solution (21 mg/mL) is physicochemically stable for 7 days at 2-8 °C. For diluted infusion solutions, the SmPC states physicochemical stability for 28 days at 2-8 °C. In order to avoid wastage of residues of reconstituted trastuzumab SB3 solution, physicochemical stability of the reconstituted solution was tested over 28 days. For this purpose, commercially available Ontruzant® powder for solution was reconstituted according to the SmPC and stored in the original vials at 2-8 °C and at room temperature (15-25 °C) light protected for 28 days. The stability study was carried out using SE-HPLC with DAD, ultraviolet (UV) spectrometry and pH measurement. Particles and color changes were visually examined. Trastuzumab SB3 monomer concentrations exceeded 95% of the initially measured concentrations over the entire study period. Trastuzumab concentrations measured by UV spectrometry and pH values remained unchanged. No color changes or visible particles were detected. Physicochemical stability of reconstituted trastuzumab SB3 Ontruzant® solution in original glass vials is given over a period of 28 days either stored refrigerated or at room temperature. Results have to be substantiated by IE-HPLC or imaged capillary isoelectric focusing (icIEF).

To evaluate microbiological stability of aseptically prepared, RTA parenteral preparations, information on the viability of microorganisms (MOs) in the corresponding solution is useful.

Therefore, viability of four different facultative pathogenic microorganisms (i.e. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*) was investigated in 20 different antitumor infusion solutions containing biologics or small molecules as active substances. Test solutions were prepared aseptically according to clinical practice, inoculated with MO suspension and stored at 22 °C protected from light. Samples were taken after 4, 24, 48, and 144 hours, transferred to agar plates and incubated at 37 °C. After 24 hours CFUs of bacteria and after 72 hours CFUs of *C. albicans* were counted. Viability of the tested MOs was maintained in most of the test solutions. No pronounced growth-promoting properties could be detected in the biologics test solutions. The test solutions of some small molecules showed species-specific bacteriostatic and bactericidal effects.

1 Einleitung

Zytostatika zählen zu den KMR-Stoffen (krebserzeugend, keimzellmutagen, reproduktionstoxische Gefahrstoffe) (1) und sind natürlichen, chemischen oder zunehmend auch biologischen Ursprungs. Sie werden in verschiedenen Applikationsformen von den Herstellern auf den Markt gebracht wie z.B. zur peroralen (p.o.), intravenösen (i.v.), subkutanen (s.c.), intramuskulären (i.m.) oder intraokularen Injektion oder Infusion. Perorale Arzneiformen wie Tabletten und Kapseln sind auf dem Markt in verschiedensten Dosierungen zur direkten Einnahme verfügbar. Viele Fertigarzneimittel zur Injektion oder Infusion stehen jedoch nicht applikationsfertig zur Verfügung und müssen durch Rekonstitution und/oder Verdünnung zunächst in die applikationsfertige Form überführt werden. Die Dosierung erfolgt patientenindividuell nach Körperoberfläche, nach Körpergewicht oder in fixen Dosen (2-4).

Patientenindividuelle Zytostatikazubereitungen werden aus Gründen der Arbeitssicherheit und der Arzneimitteltherapiesicherheit seit vielen Jahren standardmäßig in Krankenhausapotheken zubereitet. Jede rezepturmäßige patientenindividuelle Verordnung einer Zytostatikazubereitung muss vor der Herstellung von dem verantwortlichen Apotheker bzw. der verantwortlichen Apothekerin nach §7 Abs. 6 Apothekenbetriebsordnung (ApBetrO) auf Plausibilität geprüft werden. Neben der Dosierung, der Applikationsart, der Trägerlösung nach Art und Menge liegt die Determinierung der Verwendbarkeit (Haltbarkeit des Rezepturarzneimittels) jeder einzelnen Zubereitung in pharmazeutischer Verantwortung. Die Verwendbarkeit einer Zubereitung ist der Zeitraum, indem die physikalisch-chemischen, mikrobiologischen (und biologischen) Eigenschaften eines Arzneimittels innerhalb festgesetzter Grenzen bleiben. Die Angabe der Verwendbarkeit gehört nach §14 Abs. 1 ApBetrO zur ordnungsgemäßen Kennzeichnung eines Rezepturarzneimittels (5).

Basierend auf dem Leitfaden der EMA *Maximum shelf-life for sterile products for human use after first opening or following reconstitution* (6) wird die Verwendbarkeitsfrist in den jeweiligen Fachinformationen meist auf 24 Stunden begrenzt. Die Hersteller geben selten verlängerte physikalisch-chemische Stabilitätsdaten an. Aus mikrobiologischen Gründen sollten hergestellte Zubereitungen meist sofort verwendet werden, vor allem wenn sie nicht unter aseptischen Bedingungen zubereitet werden. Es werden auch keine Angaben zur Anbruchshaltbarkeit (in-use stability) angegeben, da die Fertigarzneimittel als Einzeldosen- und nicht als Mehrdosenbehältnisse zugelassen sind. Für die klinische Apothekenpraxis sind physikalisch-chemische Daten zur Anbruchshaltbarkeit sowie für applikationsfertige Zubereitungen jedoch unabdingbar um in verschiedenen Situationen (Zytostatikaanbrüche, Kühlschranksausfall, Transport über Rohrpost) datenbasiert entscheiden zu können und einen Verwurf an teuren Zytostatikalösungen zu vermeiden.

1.1 Haltbarkeitsdeterminierung von applikationsfertigen parenteralen Zubereitungen

Die *Ph. Eur. Monographie 2619 Pharmazeutische Zubereitungen* bezieht sich auf Arzneimittel, die in der Apotheke für spezifische Bedürfnisse von Patienten und Patientinnen zubereitet werden. Hierzu zählen Rezepturarzneimittel (Magistrale Zubereitungen: individuell zubereitet, Abgabe unmittelbar nach Herstellung) und Defekturarzneimittel (Offizinale Zubereitungen: auf Vorrat zubereitet, Abgabe auf Nachfrage). Die Haltbarkeit für diese Zubereitungen kann abweichend von der Marktzulassung des Arzneimittel durch die verantwortliche Person risikoadaptiert festgelegt werden. Hierbei muss sichergestellt werden, dass die Qualität und der Zweck der Zubereitung während der Haltbarkeitsdauer erhalten bleibt. Dafür muss sowohl die physikalisch-chemische als auch die mikrobiologische Stabilität berücksichtigt werden, die kürzere Stabilität bestimmt die Haltbarkeit der Zubereitung. Im Falle von Defekturarzneimittel müssen Lagerungsbedingungen und Haltbarkeitsdauer, beispielsweise anhand analytischer Daten oder einer professionellen Beurteilung, die durch Literaturnachweise gestützt sein kann, begründet werden (7).

Wenn die Haltbarkeitsdeterminierung auf Basis von veröffentlichter Literatur erfolgt, ist die Qualität der Stabilitätsuntersuchung und die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu prüfen. Zur Evidenzbewertung einer Stabilitätsuntersuchung gehört der Abgleich mit der „Guten Praxis der Stabilitätsuntersuchungen“ wie in mehreren Leitlinien definiert (8-11). Es sollten nur Ergebnisse von Publikationen verwendet werden, die einen peer-review Prozess durchlaufen haben (7, 12). Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen werden in verschiedenen Faktendatenbanken zusammengetragen:

- Die ADKA STABIL-Datenbank stellt publizierte Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität und Kompatibilität von Arzneimitteln zur Tumorthherapie unter Angabe der Literatur zur Verfügung (13).
- Die Stabilis-Datenbank stellt Stabilitäts- und Kompatibilitätsdaten von Arzneimitteln unter Angabe der Literatur sowie einer Einschätzung zum Evidenzgrad zur Verfügung (14).

Publizierte Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität können umso eher übertragen werden, je besser die stabilitätsbestimmenden Faktoren (Art der Trägerlösung, Konzentration, verwendete Packmittel, Temperatur während der Lagerung und Verabreichung, etc.) übereinstimmen. Eine Checkliste für die Bewertung von Stabilitätsdaten wird von den NHS-Guidelines bereitgestellt (10, 11).

Die mikrobiologische Stabilität wird anhand von Sterilitäts- und Integritätstests während der Validierungsphase durch die verantwortlichen Personen individuell festgelegt (9). Lediglich die United States Pharmacopeia (USP) und die niederländische *GMP-Z Richtlinie 2022 Z3 Aseptische Herstellung* machen Angaben zur empirischen Haltbarkeitsdeterminierung, die anhand

Einleitung

des Risikopotentials der Zubereitung festgelegt werden (Tabelle 1). Hierbei wird in Hochrisiko-Zubereitungen (validierte Reinraumumgebung, mehr als drei sterile Ausgangsprodukte, komplexer Zubereitungsprozess, wachstumsfördernde Eigenschaften der Zubereitung z.B. totale parenterale Ernährung), Mittelrisiko-Zubereitungen (validierte Reinraumumgebung, mehr als drei sterile Ausgangsprodukte, langwieriger und komplexer Misch-/Übertragungsprozess) und Niedrigrisiko-Zubereitungen (validierte Reinraumumgebung, drei oder weniger sterile Ausgangsprodukte, simpler Herstellprozess, keine wachstumsfördernden Eigenschaften der Zubereitung) eingeteilt (15-18).

Tabelle 1: Empirische Haltbarkeitsdeterminierung nach Risikopotential der Zubereitung (niedrig, mittel, hoch) und Lagerbedingung (17, 18).

Risikopotential der Zubereitung	Lager- bedingung	USP <797> ⁽¹⁷⁾	Niederländische
		(Older Version Official 1 May 2018 to 30 November 2019)	GMP-Z Richtlinie 2022 Z3 Aseptische Herstel- lung ⁽¹⁸⁾
Niedrig	Raumtemperatur	48 Stunden	1 Monat
	2-8°C	14 Tage	
	-10°C bis -25°C	45 Tage	
Mittel	Raumtemperatur	30 Stunden	
	2-8°C	9 Tage	
	-10°C bis -25°C	45 Tage	
Hoch	Raumtemperatur	24 Stunden	7 Tage
	2-8°C	3 Tage	
	-10°C bis -25°C	45 Tage	

Zubereitungen zur intrathekalen Applikation zählen zu den Hochrisikozubereitungen, weshalb kurze Haltbarkeitszeiträume von maximal 24 Stunden empfohlen sind. Für intravenöse Zubereitungen sind Haltbarkeitsfristen von 7-28 Tagen beschrieben. Für subkutanen Zubereitungen (Niedrigrisikozubereitungen) sind ebenfalls Haltbarkeitsfristen bis zu 28 Tagen beschrieben. Für defekturemäßige, in Chargen zubereitete Arzneimittel können auch längere Stabilitätsdaten über einen Zeitraum von 3, 6 oder 12 Monaten relevant sein.

1.2 Physikalisch-chemische Stabilität Small Molecules

Charakterisierung

Als small molecules (kleine Moleküle) werden chemische Verbindungen mit geringem Molekulargewicht (<2000 Dalton) bezeichnet (10). Sie werden seit vielen Jahrzehnten zur Tumorthherapie eingesetzt. Intravenös zu verabreichende, kleine Moleküle lassen sich basierend auf ihrem Wirkmechanismus in verschiedene Gruppen einteilen. Die ältesten Vertreter stellen die Alkylanzien dar, die mit (Desoxy-)ribonukleinsäure (DNS, RNS) chemisch reagieren können und zu Mutationen, fehlerhaften Replikationen, Zytotoxizität und schließlich zum Zelltod führen. Ein Vertreter ist der Nitrosoharnstoff Carmustin, der bei verschiedenen Hirntumoren, Hirnmetastasen, Multiplem Myelom, malignen Tumoren des Lymphsystems und des Gastrointestinalbereichs und zur Konditionierung vor autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation Einsatz findet (Abbildung 1).

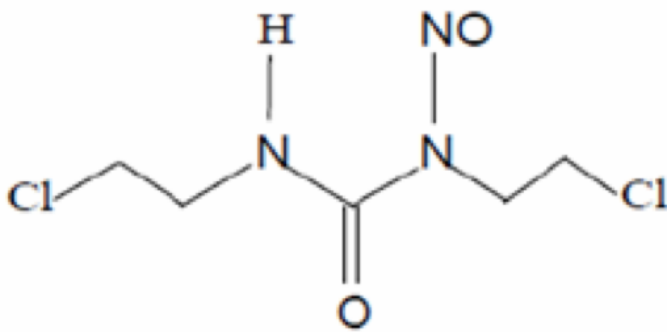


Abbildung 1: Chemische Struktur von Carmustin (1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosourea, BCNU)(19).

Physikalisch-chemische Instabilitätsreaktionen

In Tabelle 2 sind physikalische und chemische Instabilitätsreaktionen für kleine Moleküle aufgeführt.

Tabelle 2: Physikalische und chemische Instabilitätsreaktionen kleiner Moleküle (9).

Physikalische Instabilitätsreaktionen	
Präzipitation	<ul style="list-style-type: none"> • Kann Wirkstoff (WS) und Hilfsstoffe (HS) betreffen • Ausgelöst z.B. durch Überschreiten der Sättigungskonzentration, Verdünnung von stabilisierenden HS (Lösungsvermittler, Solubilisierungsmittel), pH-Wertänderung der Lösung, Verdünnung gepufferter Lösungen, Mischung inkompatibler Komponenten
Sorption (Adsorption, Absorption)	<ul style="list-style-type: none"> • Adsorption (Oberflächenphänomen): <ul style="list-style-type: none"> ○ Anhaftung des Moleküls (HS, WS) an Oberflächen (Spritzen, Spikes, Kanülen, Primärpackmittel, Infusionssysteme, Filter) ○ Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen des WS und des Oberflächenmaterials ○ Typischerweise auf polymeren, zellulosehaltigen Oberflächen oder Kunststoffen, z.T. auch auf Glas

<p>Leaching</p> <p>Farbänderungen</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Konzentrationsabhängig (relativ mehr Sorptionsphänomene bei geringen Ausgangskonzentrationen) • Absorption: <ul style="list-style-type: none"> ○ Eindringung der Moleküle (HS, WS) in Materialien (Spritzen, Spikes, Kanülen, Primärpackmittel, Infusionssysteme, Filter) ○ Entwickelt sich langsamer, ist schwieriger zu kontrollieren ○ Häufig bei lipophilen Molekülen mit amorphen Materialein wie Polyvinylchlorid (PVC) • Migration von Zusatzstoffen (z.B. Weichmacher aus PVC, Stabilisatoren, Silikonöle) aus Primärpackmitteln oder Medizinprodukten in die Zubereitung • Folge: Instabilität der Zubereitung, toxische Wirkung • können durch chemische Reaktionen (Hydrolyse, Oxidation) oder den Abbau eines Inhaltsstoffs (HS, WS) ausgelöst werden
<p>Chemische Instabilitätsreaktionen</p>	
<p>Hydrolyse</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Betrifft hydrolyseempfindliche WS (z.B. mit Ester- oder Amidstrukturen) • Verstärkt bei stark sauren oder stark basischen pH-Werten und hohen Temperaturen
<p>Oxidation</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meist ausgelöst durch Sauerstoff aus der Luft • Verstärkte Oxidationsprozesse bei ungünstigem pH-Wert der Lösung • Vermeidung durch Inertgas bei Arzneimittelabfüllung, pH-Wert-Einstellung oder Verwendung von Chelatbildnern (Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA)
<p>Photolyse</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tageslicht und UV-Strahlung kann als Katalysator für Oxidation und Hydrolyse dienen • Ist direkt proportional zur Intensität und Wellenlänge des applizierten Lichts • Vermeidbar durch lichtundurchlässige Behältermaterialien oder lichtgeschützte Sekundärverpackung
<p>Racemisierung, Epimerisierung</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Racemisierung: <ul style="list-style-type: none"> ○ Umwandlung von chiralen Molekülen in ihre Enantiomere ○ Ein Enantiomer kann eine höhere pharmakologische Aktivität aufweisen als das anderen Enantiomer • Epimerisierung: <ul style="list-style-type: none"> ○ Konfigurationsumkehr an einem chiralen Zentrum <p>→ Racemisierung und Epimerisierung können zu geringerer Aktivität des WS führen, treten jedoch selten auf</p>

Analytische Untersuchungsmethoden

Farbe, Klarheit, Präzipitation

Zur Beurteilung der Farbe sieht das Europäische Arzneibuch einen visuellen Vergleich von Untersuchungslösung und Referenzlösungen mit standardisierten Farbskalen (braun, gelb, rot, grün) (*Ph. Eur. 2.2.2 Färbung von Flüssigkeiten*) vor (20). Es handelt sich hierbei jedoch um eine semiquantitative Methode, die als ungeeignet für Stabilitätsuntersuchungen eingestuft wird. Eine europäische Konsensusgruppe spricht sich für den Einsatz ergänzender, quantitativer Verfahren aus (insbesondere für den Vergleich von Absorptionsspektren während der Studiendauer) um Farbveränderung beurteilen zu können (8). Die Arzneibuchmethoden *Ph. Eur. 2.2.1 Klarheit und Opaleszenz von Flüssigkeiten* (21) und *Ph. Eur. 2.9.20 Partikelkontamination - Sichtbare Partikel* (22) werden zur Untersuchung sichtbarer Partikel herangezogen.

pH-Wert, Osmolalität

Veränderungen im pH-Wert können auf chemische Instabilitätsreaktionen (z.B. Oxidation, Hydrolyse) hinweisen und sollten über die komplette Studiendauer untersucht werden. Fallende pH-Werte am Studienende können auf die Diffusion von CO₂ durch das Behältermaterial und eine dadurch entstehende Acidifizierung erklärt werden. Sie können als unkritisch eingestuft werden, sofern der Wirkstoff nicht säurelabil ist und in der HPLC-Untersuchung keine Zunahme von Abbauprodukten nachgewiesen werden kann (8). Das Europäische Arzneibuch empfiehlt für die pH-Wertuntersuchung die potentiometrische Methode (*Ph. Eur. 2.2.3 pH-Wert – Potentiometrische Methode*) (23).

Die Untersuchung der Osmolalität (*Ph. Eur. 2.2.35 Osmolalität*) (24) wurde lange Zeit als ergänzende Methode für Stabilitätsuntersuchungen befürwortet, da konstante Ergebnisse aus Osmolalitätsuntersuchungen mit ausbleibenden Wirkstoffabbau assoziiert wurden (9). In einer kürzlich veröffentlichten Publikation wird diese Aussage jedoch kritisch hinterfragt, da bei 11 von 13 untersuchten instabilen Arzneimittellösungen die Ergebnisse der Osmolalitätsuntersuchungen nicht mit dem Konzentrationsverlust und dem Auftreten von Abbauprodukten korrelierten (25).

Wirkstoffkonzentration/Konzentration der Abbauprodukte

Kleine chemische Moleküle und deren Abbauprodukte lassen sich aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften chromatografisch untersuchen, da die Retentionszeit mit den hydrophoben Eigenschaften des Moleküls korreliert. Die Reversed-Phase (RP)-HPLC, die meist mit Diodearray- (DAD) oder UV-VIS-Detektoren gekoppelt wird, gilt als Standardmethode für die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration und die Untersuchung von Abbauprodukten (9, 10, 26). Zunehmend wird auch die Ultra-HPLC (UHPLC) verwendet, die im Vergleich zur

Einleitung

herkömmlichen HPLC im Säulenmaterial kleinere Partikelgrößen aufweist. Hierdurch kommt es zu einer Erhöhung des Durchsatzes, der Auflösung, der Sensitivität und der Präzision bei gleichzeitig geringerem Lösungsmittelverbrauch (27). Gekoppelt werden UHPLC-Anlagen zunehmend mit (in Reihe geschalteten) massenspektrometrischen Detektoren (UHPLC-MS-MS), die eine zeitliche und räumliche Trennung der chemischen Verbindung ermöglicht (10).

Nicht sichtbare Partikel

Nicht-sichtbare Partikel können unentdeckt über die Lagerdauer (vor allem bei niedrigen Lagertemperaturen) zu sichtbaren Präzipitationen heranwachsen und später im Administrationsset sichtbar werden (8). Das Europäische Arzneibuch schreibt für Injektions- und Infusionslösungen die Kontrolle von nicht sichtbare Partikeln (z.B. Mikropräzipitationen) (*Ph. Eur. 2.9.19 Partikelkontamination – Nicht sichtbare Partikel*) vor (28). Hierbei finden die Laserlichtblockade (große Probevolumina erforderlich) und die mikroskopische Methode Anwendung. Beide Methoden sind geeignet um die physikalische Stabilität (Entwicklung von Größe, Form und Anzahl der Partikel) zu beurteilen, stehen aber in der Apothekenpraxis nicht immer zur Verfügung (8).

1.3 Physikalisch-chemische Stabilität Monoklonale Antikörper

Charakterisierung

Antikörper zählen zu den biopharmazeutischen Arzneimitteln und sind in ihrem Aufbau und ihrer Funktionsweise mittlerweile gut beschrieben. Sie werden mittels DNS-Technologie und Hybridomatechniken hergestellt und bestehen strukturell aus zwei leichten (light chain, L) und zwei schweren (heavy chain, H) Ketten, die durch kovalente Disulfidbrückenbindungen verbunden werden. Innerhalb der Ketten befinden sich jeweils variable (V_L , V_H) und konstante (C_L , C_H) Regionen (Abbildung 2a).

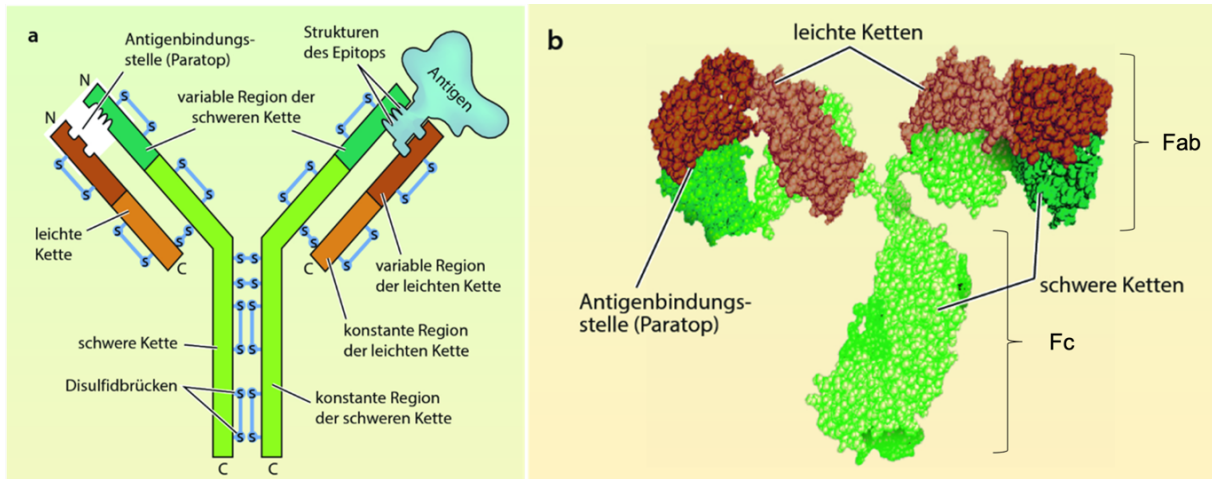


Abbildung 2: Schematische zweidimensionale (a) und dreidimensionale (b) Darstellung eines IgG Antikörpers (29).

Je nach Ausprägung in den schweren Ketten werden Immunoglobuline in fünf verschiedenen Klassen (IgG, IgM, IgA, IgD und IgE) eingeteilt. Die aus einem einzigen Zellklon gewonnenen monoklonalen Antikörper (mAbs) (30) zählen zu den Immunoglobulinen der Klasse G (IgG). IgGs können anhand der Zahl ihrer Disulfidbrücken (31) in vier Subgruppen (IgG₁-IgG₄) unterteilt werden, wobei IgG₁ der häufigste Subtyp in der Arzneimitteltherapie ist (32).

Die mAb-Quartärstruktur kann in drei Teile aufgeteilt werden. Zwei Teile werden als Antigenbindungsstellen (fragment antigen binding, Fab-Fragment) bezeichnet (Abbildung 2b). Sie bestehen aus einer leichten Kette, einer variablen schweren Kette und einer konstanten schweren Kette. Die Spezifität des Antikörpers, ein Antigen zu binden, zeichnet sich durch die drei komplementaritätsbestimmenden Regionen (complementary determining regions, CDRs) aus, die sich jeweils in allen variablen Regionen befinden. Neben den beiden Fab-Fragmenten bildet das kristallisierbare Fragment (fragment crystallizable, Fc-Fragment) den dritten Teil des Antikörpers (Abbildung 2b).

Das Fc-Fragment besteht aus dem restlichen Teil beider schwerer Ketten, ist zur Antigenbindung unfähig und vermittelt je nach Klasse verschiedene Effektorfunktionen (Abbildung 3):

- Die komplementabhängige Zytotoxizität (complement dependent cytotoxicity, CDC) wird durch Fc-FcγR- und Fc-C1q-Interaktionen vermittelt.

Einleitung

- Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) wird über NK-Zellen vermittelt, die durch Wechselwirkung von zellgebundenem FcγRIIIa mit dem Fc-Fragment des mAb aktiviert werden. Dies führt zu zytotoxischen Effektor-Funktionen, die zum Tod der Zielzelle führen.
- Die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADPC) wird durch Interaktion mit FcγRIIa auf Makrophagen vermittelt und steigert die phagozytotische Aktivität.
- Die FcRn (Fc-Receptor neonatal)-Interaktionen (FcRn wird z.B. auf Endothelzellen exprimiert) vermitteln die Übertragung von mütterlichen Antikörpern auf den Fötus über die Plazentaschranke während der Schwangerschaft (33, 34).

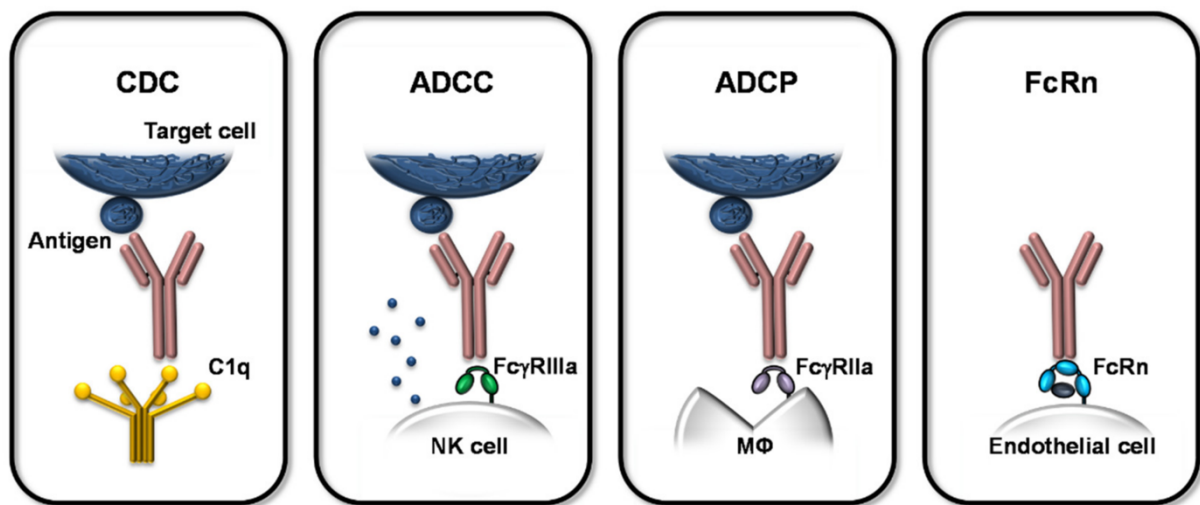


Abbildung 3: Fc-Fragment vermittelte Effektorfunktionen monoklonaler Antikörper (CDC, ADCC, ADPC, Bindung an FcRn) (34).

Referenzarzneimittel (Originator) und Biosimilar

Als zielgerichtete Therapien werden monoklonale Antikörper zur Behandlung von Krebs-, Autoimmun- oder Infektionserkrankungen, sowie zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen von Organtransplantaten oder als Krankheitsmodifikatoren neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt (35). Nach Ablauf des Patentschutzes dürfen biosimilare Arzneimittel (Biosimilar), die eine hohe Ähnlichkeit in der Struktur, biologischen Aktivität, Wirksamkeit, Sicherheit und im Immunogenitätsprofil zum Referenzarzneimittel (Originatorprodukt) vorweisen, vermarktet werden (36). Aufgrund der Variabilität der Ursprungszelllinie und des Herstellungsprozesses sind biologische Produkte nicht identisch. Zwischen Referenz- und Biosimilar-Arzneimittel sowie zwischen verschiedenen Chargen des selben Arzneimittels gibt es geringfügige Unterschiede, die als Mikroheterogenität bezeichnet werden. Die Mikroheterogenität (gelbe Schattierung, Abbildung 4) z.B. in der Glykosylierung (blaue Dreiecke, Abbildung 4) ist akzeptabel, sofern die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) (Kreise, Abbildung 4) die Proteinfaltung (Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur) und die biologische Aktivität gleich ist und sich

Einleitung

nicht auf die Sicherheit und Wirksamkeit des Arzneimittels auswirkt (8, 37). Die Voraussetzung für eine akzeptable Mikroheterogenität ist ein robustes Herstellungsverfahren (36, 38).

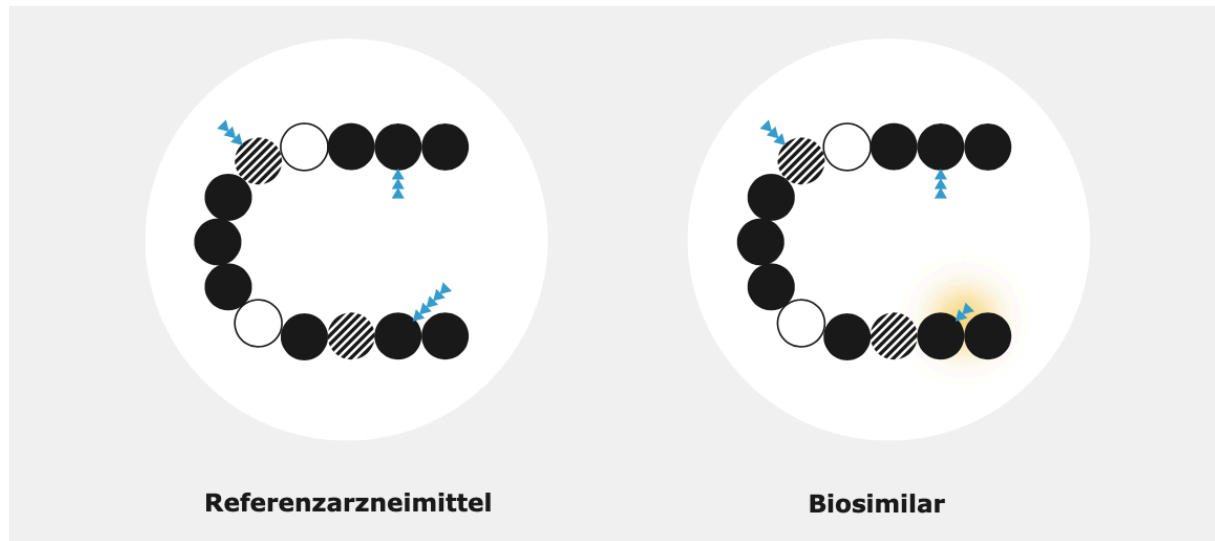


Abbildung 4: Mikroheterogenität zwischen Referenzarzneimittel (Originator) und Biosimilar (36).

Physikalisch-chemische Instabilitätsreaktionen

Durch Einflussfaktoren wie pH-Wert, Temperatur, Sauerstoff, Licht, Behälter-Materialien, Proteinkonzentration, Hilfsstoffe, Tenside oder durch das Assoziationspotential kann es zu physikalischen oder chemischen Instabilitäten monoklonaler Antikörper während der Lagerung kommen, wobei beiden Formen nicht immer streng voneinander abgrenzbar sind.

Die Applikation von instabilen monoklonalen Antikörpern beim Menschen kann den Therapieerfolg beeinträchtigen und gesundheitliche Risiken verursachen. Neben dem Verlust der therapeutischen Wirkung können immunologische Reaktionen (Hypersensitivität, lebensbedrohliche Anaphylaxie) ausgelöst werden. Durch eine veränderte Pharmakokinetik kann es zu unvorhersehbarer Wirkstoffverteilung und Dosierungsproblemen kommen. Um die Wirksamkeit und Sicherheit monoklonaler Antikörper gewährleisten zu können ist es daher wichtig Einflussfaktoren und Abbaureaktionen zu kennen und bewerten zu können. Physikalische und chemische Instabilitätsreaktionen werden in zahlreichen Publikationen detailliert beschrieben (8, 11, 32, 39, 40).

Physikalische Instabilitätsreaktionen

Zu den am häufigsten vorkommenden physikalischen Instabilitätsreaktionen zählen Denaturierung, Aggregation, Präzipitation und Adsorption.

Die Denaturierung von Proteinen kann beispielsweise durch Umwelteinflüsse wie starke Temperaturschwankungen oder pH-Wert-Änderungen ausgelöst werden. Es kommt zu einem Verlust der höheren Ordnungsstruktur (Sekundär- oder Tertiärstruktur) und damit zur Entfaltung des Proteins, wodurch die Wirkung verloren geht und die Anfälligkeit für Folgeprozesse wie die Aggregation steigen kann (32, 39, 40).

Einleitung

Bei der Aggregation handelt es sich um den Umbau nativer, gefalteter Proteine zu Produkten mit höherem Molekulargewicht (Oligomere, Polymere). Sie kann durch mechanischen Stress, Temperaturänderungen, Verdünnung von stabilisierenden Hilfsstoffen, chemischen Instabilitätsreaktionen oder Behältermaterialien (Weichmacher, Silikonöle) ausgelöst werden. Es können lösliche und unlösliche Aggregate entstehen, die sich in der Form ihrer Bindungen unterscheiden (schwache unspezifische Bindungen z.B. Van der Waals Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und elektrostatische Interaktionen sowie kovalente Aggregation z.B. durch kovalente Bindungen oder Disulfidbrücken-Bindungen). Die Aggregation ist in den meisten Fällen irreversibel (8, 9, 11, 32, 39).

Durch die Bildung von Präzipitationen entstehen unlösliche Partikel, die aus dem reinen Antikörper selbst bestehen oder heterogener Natur sein können, indem zusätzlich Hilfsstoffe, aus dem Verpackungsmaterial freigesetzte Stoffe (Leachables) oder Verunreinigungen enthalten sind (32). Im Europäischen Arzneibuch werden Grenzwerte ($\geq 10 \mu\text{m}$ und $\geq 25 \mu\text{m}$) für nicht-sichtbare Partikel in pharmazeutischen Zubereitungen festgelegt (28).

Proteine haben als oberflächenaktive Substanzen die Eigenschaft an hydrophobe und hydrophile Oberflächen zu adsorbieren. Auch proteinstabilisierende Hilfsstoffe, Konservierungsmittel und Tenside können Adsorptionsphänomene aufzeigen und damit die stabilisierenden Eigenschaften für das Protein verringern. Besonders kritisch ist die Adsorption bei stark verdünnten Lösungen oder großflächigem Oberflächenkontakt zu sehen. Durch die Adsorption an Behältermaterialien kann es zu Instabilitäten, Wirkverlust und somit potentiellen Underdosierungen kommen. Die Adsorption ist konzentrationsabhängig und wird u. a. durch pH-Wert, Ionenstärke und Anzahl der Proteinlagen beeinflusst. Eine nachfolgende Desorption kann zu Proteininstabilitätsreaktionen (Denaturierung, Aggregation) führen (11, 32).

Chemische Instabilitätsreaktionen

Zu chemischen Instabilitätsreaktionen monoklonaler Antikörper zählen Oxidation, Disulfidbrückenbildung/-spaltung, Desaminierung, Hydrolyse und Glykierung. Chemische Modifikationen von mAbs können zu einer Ladungsheterogenität führen, indem sie deren isoelektrischen Punkt (pI) verändern (32).

Oxidation (einschließlich Disulfidbrückenbindung) ist eine der häufigsten chemischen Instabilitätsreaktionen. Sie entsteht durch die Anwesenheit von Oxidantien wie Licht, Peroxide (Sauerstoff), Metalle oder in Form einer Autooxidation (32, 40). Besonders anfällig für Oxidation sind Methionin-, Cystein-, Lysin-, Histidin- und Tryptophanreste (39). Durch Oxidation kommt es zu einer Zunahme der positiven Gesamtladungen (steigender pI-Wert) und zur Entstehung von basischen Varianten (32). Die Bildung von Disulfidbrückenbindungen ist eine Folge der Oxidation zwei freier Cysteinreste, wobei eine kovalente Bindung zwischen den Schwefelatomen beider Thiolgruppen gebildet wird (41).

Einleitung

Desaminierung ist eine typische Instabilitätsreaktion für Proteine die stark vom pH-Wert abhängt und vorwiegend Asparagin- und Glutaminreste betrifft. Durch Desaminierung kommt es zu einer Zunahme der negativen Gesamtladungen (abnehmender pI-Wert) und zu sauren Varianten.

Asparagin- und Asparaginsäurereste gelten als hydrolyseanfällig, wobei die Reaktion vermutlich über ein Succinimid-Zwischenprodukt verläuft. Diese Form der chemischen Instabilität tritt primär unter extremen Bedingungen wie stark erhöhter Temperatur oder niedrigem pH-Wert auf und ist unter kontrollierten Lagerbedingungen als unwahrscheinlich einzustufen. Durch eine geeignete Formulierung kann der Hydrolyse effektiv vorgebeugt werden (32, 39, 42).

Zucker werden in mAb-Formulierungen als stabilisierende Hilfsstoffe und in Infusionsbeuteln als Trägerlösung (G5%) eingesetzt. Zwischen reduzierenden Zuckern und Proteinen kann eine Glykierung (Maillard-Reaktion) auftreten, wodurch zunächst eine Schiff-Base entsteht, die sich in ein stabiles Ketoamin umwandeln und die Funktionalität des Proteins beeinträchtigen kann. Obwohl in mAb-Formulierungen meist nicht-reduzierende Zucker eingesetzt werden, können reduzierende Zucker weiterhin als Abbauprodukte auftreten und potenziell instabilitätsrelevant sein (32, 41, 43-45).

Analytische Untersuchungsmethoden

Um die Mikroheterogenität und dreidimensionale Struktur von mAbs analysieren und bewerten zu können (8), werden (im Gegensatz zu kleinen chemischen Molekülen) verschiedene, so genannte orthogonale, stabilitätsanzeigende, analytische Methoden verwendet (11, 37). In Tabelle 3 ist eine Auswahl an analytischen Methoden zusammengefasst, die für die Untersuchung monoklonaler Antikörper angezeigt sind.

Einleitung

Tabelle 3: Ausgewählte analytische Methoden zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität monoklonaler Antikörper basierend auf (8, 11, 32, 46, 47).

Detektierbare Instabilitäten	Analysemethode, Europäische Arzneibuchprüfung	Analyseprinzip	Vorteile (+), Nachteile (-)
Farbe, Klarheit			
Mikroaggregate	Turbidimetrie <i>Ph. Eur. 2.2.1 Klarheit und Opaleszenz von Flüssigkeiten</i>	Untersuchung des transmittierten Lichts durch eine Lösung bei 320 nm - 400 nm.	+ Einfache Implementierung + Besonders zuverlässig bei geringer Trübung - Nicht möglich für stark getrübe Lösungen (z.B. mit hohem Proteinanteil) - Keine direkte Information über Größe und Verteilung der (Protein)aggregate
Sichtbare Partikel			
Partikel $\geq 80 \mu\text{m}$	Sichtprüfung <i>Ph. Eur. 2.9.20 Partikelkontamination - Sichtbare Partikel</i>	Sichtprüfung der zu untersuchenden Lösung vor zwei Tafeln (weiß, schwarz).	+ Einfache Implementierung - Abhängig von den Fähigkeiten/Erfahrungen der durchführenden Person
Nichtsichtbare Partikel			
Partikel 10 - 150 μm	Laserlichtblockade <i>Ph. Eur. 2.9.19 Partikelkontamination – Nicht sichtbare Partikel</i>	Detektion der Lichtintensitätsminderung, die durch einzelne Partikel verursacht wird, wenn diese einen Lichtstrahl (Laser) durchqueren. Die Lichtblockade korreliert mit dem Partikeldurchmesser.	+ Ermöglicht eine quantitative und größenbasierte Analyse in einem weiten Partikelgrößenbereich + Schnelle nicht-invasive Messung - Empfindlich gegenüber Störungen (Luftblasen, Fasern) - Großes Probenvolumen notwendig
Partikel 1 - 150 μm	Lichtmikroskopisches Verfahren	Visuelle Charakterisierung von Aggregaten.	+ Auch geeignet für trübe, gefärbte, hochvisköse Lösungen

Einleitung

	<i>Ph. Eur. 2.9.19 Partikelkontamination – Nicht sichtbare Partikel</i>		<ul style="list-style-type: none"> + Unabhängig von optischen Störungen - Zeitaufwändig, objektiv - Geringere Reproduzierbarkeit - Nur für geringe Volumina
Partikel 0,3 nm - 10 µm	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	Messung des hydrodynamischen Durchmessers von Partikeln in einer Lösung durch die optische Detektion des gestreuten Lichts durch deren Brownsche Molekularbewegung.	<ul style="list-style-type: none"> + Schnelle Durchführung + Großer Partikelgrößen- und Konzentrationsbereich + Kleines Probenvolumen ausreichend + Nicht zerstörend - Ungeeignet für sehr hohe oder sehr niedrige Partikelkonzentrationen
Physikalische Stabilität, Aggregatdetektion			
Aggregate, Fragmente (lösliche Dimere, Oligomere) Ca. 1 - 100 nm	Größenausschlusschromatographie (SEC)	Chromatographische Trennung von Molekülen anhand ihres Molekulargewichts in einer HPLC-Säule, wobei große Moleküle aufgrund der geringeren Diffusion in die Poren der HPLC-Säule früher eluieren.	<ul style="list-style-type: none"> + Goldstandard der Proteinanalytik + Quantifizierung möglich + Mit verschiedenen Detektoren koppelbar + Detektion von Molekülen mit geringem (LMW) und hohem (HMW) Molekulargewicht + Separative Methode + Hohe Reproduzierbarkeit - Nicht geeignet für sehr große Aggregate (Verstopfen die HPLC-Säule)
Detektion von mAb-Abbau	Natriumdodecyl(lauryl)sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	Trennung der Proteine basierend auf Größe und Ladung, Detektion durch Färbung (Coomassie, Silber).	<ul style="list-style-type: none"> + Einfache Durchführung + Präzise Trennung mit guter Auflösung - Zeitaufwändiges Verfahren

Einleitung

			- Keine Information über die native Struktur durch Proteindenaturierung
Detektion von Modifikationen in der Tertiärstruktur	UV-Spektroskopie zweiter Ableitung	UV-Spektroskopie im Bereich 250 - 320 nm.	+ Einfache Implementierung + Nicht zerstörend - Hilfsstoffe aus den Fertigarzneimitteln können die Messung stören
Chemische Stabilität			
mAb-Abbau: Desaminierung in Form von sauren Ladungsvarianten/Peaks, Oxidation in Form von basischen Ladungsvarianten/Peaks	Ionenaustauschchromatographie (IEC), vorwiegend Kationenaustauschchromatographie (CIEC)	Trennung der mAb-Ladungsvarianten durch elektrostatische Wechselwirkung mit der stationären Phase der HPLC-Säule aufgrund des unterschiedlichen pI.	+ Goldstandard der Proteinanalytik + Nichtdenaturierende Analyse - Aufwändig in der Validierung
mAb-Abbau: Veränderungen in der Primärstruktur durch Oxidations- und Desamidierungsprozesse	Peptid-Mapping	Enzymatische Spaltung von mAbs in Peptide mit anschließender Trennung durch HPLC.	+ Separative Methode - Empfindlich gegenüber Umgebungsbedingungen
Weitere Untersuchungsmethoden			
<ul style="list-style-type: none"> • pH-Wert Bestimmung, <i>Ph. Eur. 2.2.3 pH-Wert – Potentiometrische Methode</i> • HS-Konzentration (sofern diese für die Wirkung relevant ist, z.B. Hyaluronidase-Assay zur Untersuchung von Hyaluronidase als Penetrationsvermittler bei s.c. zu applizierenden mAbs) 			

1.4 Gute Praxis der Stabilitätstestung Small Molecules und Monoklonale Antikörper

Validierung analytischer Untersuchungsmethoden

Die *ICH Guideline Q2 (R1)* beschreibt die Anforderungen an die Validierung analytischer Methoden. Sie definiert die aufgeführten Parameter zur Methodenvvalidierung (48):

Spezifität

Die Spezifität einer analytischen Methode kann durch Vortestungen untersucht werden. Hierbei muss der zu untersuchende Wirkstoff neben möglichen Abbauprodukten, Verunreinigungen oder Hilfsstoffen eindeutig identifizierbar sein. Bei HPLC-Analysen muss eine eindeutige Zuordnung des Wirkstoff-Peaks gewährleistet, sowie eine ausreichende Trennung von anderen Peaks gegeben sein. Die praktische Umsetzung kann durch die Zugabe von käuflich erhältlichen Verunreinigungen zum Analyt erfolgen (Spiking). Sind Verunreinigungen nicht erhältlich, können diese durch Stress-Studien (erzwungene Abbaustudien, forcierte Degradation) hervorgebracht werden. Hierbei wird der Analyt extremen pH-, Temperatur-, und Oxidationsbedingungen ausgesetzt und im Anschluss untersucht, um den Abbauweg, der durch erhöhte Temperaturen, Einfrier- oder Auftauprozesse, Oxidation, Licht, pH-Veränderungen oder mechanische Belastung ausgesetzt ist, nachzuahmen (9, 49, 50).

Linearität

Eine lineare Korrelation zwischen Probenkonzentration und analytischem Ergebnis über den Arbeitsbereich ist Voraussetzung für die Bestimmung des Probengehalts. Um die Kalibriergerade zu erstellen werden mindestens fünf verschiedene Konzentrationen einer Referenzsubstanz (CRS-Substanz, alternativ mit dem Fertigarzneimittel) hergestellt und untersucht. Für HPLC-Untersuchungen wird die resultierende Peakfläche gegen die nominale Konzentration aufgetragen und der Korrelationskoeffizient (R^2) bestimmt.

Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich definiert ein Intervall zwischen der oberen und unteren Konzentrationsgrenze eines Analyten, in dem nachgewiesen wurde, dass die Methode zuverlässige Ergebnisse (Präzision, Richtigkeit, Linearität) erzielt und ist abhängig von der vorgesehenen Anwendung. Für eine Gehaltsbestimmung wird ein Arbeitsbereich von 80%-120% der Untersuchungskonzentration empfohlen.

Richtigkeit

Die Richtigkeit eines analytischen Verfahrens beschreibt, wie nahe das Messergebnis am wahren oder anerkannten Referenzwert liegt. Sie wird anhand von 3 verschiedenen

Einleitung

Konzentrationen, die jeweils in dreifacher Wiederholung ($n=9$) untersucht und bewertet werden, bestimmt. Die Ergebnisse sind als Wiederfindungsrate (%) oder als Differenz zum wahren Wert mit Vertrauensintervall anzugeben.

Präzision

Die Präzision eines analytischen Verfahrens beschreibt die Übereinstimmung zwischen wiederholten Messungen derselben homogenen Probe unter festgelegten Bedingungen. Die Wiederholpräzision (Intraday) wird durch mehreren Messungen in einem kurzen Zeitraum (meist an einem Tag) unter gleichen Laborbedingungen bestimmt. Hierbei werden entweder mindestens 9 Bestimmungen, die den für das Verfahren angegebenen Bereich abdecken (z. B. 3 Konzentrationen/jeweils 3 Wiederholungen) oder mindestens 6 Bestimmungen bei 100% der Testkonzentration durchgeführt. Die Präzision über mehrere Tage (Interday) hingegen drückt Schwankungen innerhalb eines Labors bei wiederholten Messungen unter wechselnden Umständen (Mitarbeiter, Gerät, Tag) aus.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) ist die geringste Menge eines Analyten in einer Probe, die nachgewiesen, aber nicht exakt quantifiziert werden kann. Bei Analyseverfahren, die ein Grundlinienrauschen aufweisen (z.B. HPLC), kann hierfür das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt werden (Analyt ist sicher nachweisbar wenn Signal-Rausch-Verhältnis zwischen 3 und 2:1).

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze (LOQ, limit of quantification) ist die geringste Menge eines Analyten in einer Probe, die mit angemessener Präzision und Genauigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Sie wird hauptsächlich für die Bestimmung von Verunreinigungen und/oder Abbauprodukten verwendet und kann für Analyseverfahren die ein Grundlinienrauschen aufweisen (z.B. HPLC) mittels Signal-Rausch-Verhältnis eingeschätzt werden (typisches Signal-Rausch-Verhältnis liegt bei 10:1).

Robustheit

Die Robustheit beschreibt die Zuverlässigkeit bei kleinen, gezielten Änderungen der Methodenparameter in analytischen Methoden. Sofern Messergebnisse empfindlich auf Veränderungen reagieren, müssen die Untersuchungsbedingungen genauestens kontrolliert und entsprechend dokumentiert werden. Typische Variationen für HPLC Untersuchungen sind beispielsweise der pH-Wert und die Zusammensetzung der mobilen Phase, der Säulentyp, die Temperatur oder die Flussrate.

Studiendesign

Das Studiendesign ist für die Aussagekraft einer Stabilitätsstudie entscheidend. Das vom National Health Service (NHS) verfasste *Standard Protocol for Deriving and Assessment of Stability Part 1 - Aseptic Preparations (Small Molecules)* (10), das *Standard Protocol for Deriving and Assessment of Stability Part 2 - Aseptic Preparations (Biopharmaceuticals) Incorporating Addendum on Antibody Drug Conjugates* (11), die von der GERPAC-Gruppe (Evaluation and Research Group on Protection in Controlled Atmospher) verfasste Leitlinie *Methodological guidelines for stability studies of hospital pharmaceutical preparations* (9) sowie verschiedene Publikationen (8, 39) beschreiben die „Gute Praxis von Stabilitätsuntersuchungen“ eingehend. In Tabelle 4 sind zu beachtende Parameter bei der Durchführung einer physikalisch-chemischen Stabilitätsstudie zu kleinen Molekülen und mAbs vergleichend zusammengefasst.

Einleitung

Tabelle 4: Studiendesign physikalisch-chemischer Stabilitätsstudien von Small Molecules und monoklonalen Antikörpern (9-11).

Small Molecules	Monoklonale Antikörper
Wirkstoff	
<ul style="list-style-type: none"> • Wirkstoff aus derselben Charge verwenden • Angabe: Produkt/Wirkstoffbezeichnung, Hersteller, Chargenbezeichnung, (Haltbarkeitsdatum) (9) 	
Rekonstituens/Verdünnungsmittel	
<ul style="list-style-type: none"> • Rekonstitution/Verdünnung analog Fachinformation und klinischer Praxis • Rekonstitutions-/Verdünnungsmittel: Wasser für Injektionszwecke (WFI), 0,9% Natriumchloridlösung, 5% Glukoselösung (11) 	
Behältnisse	
<ul style="list-style-type: none"> • Behälter entsprechend klinischer Praxis (8, 11) • Typische Behältermaterialien: <ul style="list-style-type: none"> ○ Glas (Stammlösungen) ○ Plastikspritzen (z.B. Zweiteilige/dreiteilige Spritzen, Luer-lock/Luer, Füllvolumina 1-50 ml) ○ Infusionsbeutel (Polyolefin (PO), Polyethylen (PE), Polypropylen (PP) z.B. Leerbeutel/vorgefüllte Beutel mit NaCl 0,9%/Glukose 5%) ○ Elastomerpumpen ○ Verschlusssysteme (z.B. Kombistopper, Stopfen aus Butylkautschuk) → vorzugsweise PVC-freie Behältermaterialien (Polyolefin) verwenden • Hilfsmittel zum Überführen des Wirkstoffs aus den Originalbehältern entsprechend klinischer Praxis (Spritzentyp, Spike, Kanüle) (11) • Angabe: Behältermaterial, Chargenbezeichnung, Hersteller 	
<ul style="list-style-type: none"> • Extrapolation von Daten zwischen verschiedenen Behältern und Infusionsgeräten kann zulässig sein, sofern Abbauweg des Arzneimittels und Behältereigenschaften (Sauerstoff-Durchlässigkeit, Wasserverlust, Lichtdurchlässigkeit, Materialzusammensetzung, Extraktions-/Adsorptionspotential) bekannt. 	<ul style="list-style-type: none"> • Interaktion mit dem Behältermaterial möglich (z.B. Adsorption/Absorption) • Extrapolation von Daten zwischen verschiedenen Behältermaterialien nicht zulässig

	<ul style="list-style-type: none"> • Größe des Behälters praxisnah wählen (idealweise in verschiedenen Behältergrößen untersuchen) → Möglicher Nachteil: Hohe Kosten durch Verbrauch großer Antikörpermengen. Es ist daher zulässig den kleinstmöglichen Behälter zu wählen und die Daten auf andere Behältergrößen (desselben Materials) zu extrapolieren. Die Grenzfläche zwischen Lösung und Behälter bzw. Luftraum ist bei kleinen Behältnissen am größten (entspricht worst case Bedingungen für Aggregatbildung) (11).
Lagerbedingungen	
<ul style="list-style-type: none"> • (Lichtgeschützt) bei Kühlschranktemperatur ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), Raumtemperatur ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) • An die Kühlschranklagerung kann eine 24-48 stündige Raumtemperaturlagerung angeschlossen werden, um praxisnahe Bedingungen (Vorbereiten der Applikation und Applikation) zu simulieren 	
<ul style="list-style-type: none"> • Körpertemperatur ($32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, auf der Körperoberfläche getragene Pumpen) bzw. ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, für implantierte Pumpenreservoirs) • Gefroren ($-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) 	
Konzentration	
<ul style="list-style-type: none"> • Dosierungen analog Fachinformation und klinischer Praxis • Sehr niedrige und sehr hohe Konzentration → Stabilitätsdaten können zwischen beiden Konzentrationen interpoliert werden • Interpolationen zu Konzentrationen, die sich außerhalb der untersuchten Konzentrationen befinden sind nicht zulässig 	
Lagerdauer/Studiendauer	
<ul style="list-style-type: none"> • Stabilitätsdaten dürfen über die Studiendauer hinaus nicht extrapoliert werden • Studiendauer länger als geschätzte Haltbarkeit wählen • Studiendauer sollte sich an der Stabilität des untersuchten Arzneimittels orientieren (NHS Empfehlung (11) 48 Stunden bis 35 Tage) • Viele physikalisch-chemische Stabilitätsstudien werden über eine Dauer von 28 Tagen durchgeführt (51, 52) • Studiendauern über drei Monate (11) bzw. ein Jahr (9) werden nicht empfohlen 	

Probenahmeplan	
<ul style="list-style-type: none"> • Unmittelbar nach Zubereitung der Untersuchungslösungen findet die erste Probenziehung statt (T0, Referenz) • Weitere vier (11) bis fünf (9) Probenziehungen finden verteilt über den Untersuchungszeitraum statt • Die GERPAC-Gruppe schlägt vor, Proben nach 1/24, 1/12, 1/4, 1/2, und 3/4 des geplanten Untersuchungszeitraums zu ziehen (9), z.B. T0 plus vier bzw. fünf weitere Untersuchungstage (z.B. (T1), T7, T14, T21, T28). Falls sich die Proben nach kurzer Zeit als instabil erweisen sollte, sollte die Studie wiederholt werden und der Untersuchungszeitraum entsprechend verkürzt werden 	
Probenanzahl	
<ul style="list-style-type: none"> • Es sollten mindestens drei unabhängige Proben zu jedem Zeitpunkt untersucht werden. Die Messungen erfolgen dreifach (n=9) 	
Zubereitung der Untersuchungslösungen	
<ul style="list-style-type: none"> • Die Untersuchungslösungen sollten zum selben Zeitpunkt aufbereitet werden, um Schwankungen zu vermeiden. Der Zubereitungsprozess sollte unter Praxisbedingungen erfolgen 	
Spezifikation/Akzeptanzkriterien	
<ul style="list-style-type: none"> • Als relevanteste Spezifikation gilt der Wirkstoffgehalt, wobei ein Gehalt von 95-105% zum Zeitpunkt der Zubereitung und 90-105% zum Zeitpunkt der angegebenen Verwendbarkeitsfrist akzeptiert wird (53) • Zum Zeitpunkt der angegebenen Verwendbarkeitsfrist ist in Abhängigkeit vom Risikoprofil eine Anpassung an 95% oder 85% als untere Grenze zu prüfen (8) 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Abbauprodukte: Anstieg um <2% relativ zum Hauptpeak • Keine physischen Veränderungen des Aussehens • Keine signifikanten pH-Wert Änderungen (<0,5 pH-Einheiten über den Untersuchungszeitraum) (11)

1.5 Mikrobiologische Stabilität von applikationsfertigen parenteralen Zubereitungen

Mikrobiologische Risikofaktoren bei der aseptischen Herstellung

Die Kontamination parenteraler Zubereitungen durch Endotoxine oder Mikroorganismen (MO) kann insbesondere bei onkologischen, immungeschwächten Patienten zu lebensbedrohlichen Infektionen und SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) führen. Parenterale Zubereitungen müssen daher über den Herstell-, Lager- und Applikationszeitraum Sterilität der Ausgangssubstanzen aufweisen, um für Patienten kein mikrobiologisches Risiko darzustellen. Das Risiko für eine mikrobielle Kontamination steigt, wenn das Produkt mit der Umwelt in direkten Kontakt kommt (extrinsische Risikofaktoren). Durch strenge Einhaltung der „Good Preparation Practice“ (GPP) und der im Qualitätsmanagement der Apotheke definierten Verfahren wird sichergestellt, dass das Kontaminationsrisiko für parenterale Zubereitungen so gering wie möglich gehalten wird. Hierbei muss der Zubereitungsprozess (validierte/aseptische Arbeitsweise, definierte Arbeitsanweisungen), die Qualität der Umgebung (Reinraumumgebung, Material, Reinigungs-/Hygienevorgaben, Monitoring von Partikeln und Keimen) und Personal (geschult, validiert durch Nährmedienabfüllung, entsprechende Kleidung) berücksichtigt werden (16, 39). Detaillierte Empfehlungen sind im *PIC/S PE 010-Leitfaden zur guten Praxis bei der Herstellung von Arzneimitteln in Gesundheitseinrichtungen* enthalten (54). Neben extrinsischen Risikofaktoren gibt es auch intrinsische Risikofaktoren, die Einfluss auf die mikrobiologische Qualität haben können. So besitzt jede Arzneimittelformulierung ein individuelles wachstumsförderndes/-hemmendes Potential für Mikroorganismen (55, 56), das vom Nährstoffgehalt, der Wasseraktivität, dem Redoxpotential und dem pH-Wert der Zubereitung abhängig ist (15). Weitere Risikofaktoren stellen die Komplexität einer Zubereitung (multiple Ausgangsmaterialien, multiple Manipulationen, Mischen großer Volumina) und der zeitliche Abstand zwischen Zubereitung und Applikation dar (57, 58). Anhand der genannten Risikofaktoren können RTA-Zubereitungen in Hochrisiko- oder Niedrigrisiko-Zubereitungen eingeteilt werden. Zum Beispiel stellt eine totale parenterale Ernährungszubereitung, die über einen langen Zeitraum appliziert wird und aus vielen verschiedenen Komponenten zubereitet wird, eine Hochrisiko-Zubereitung dar. Eine antibiotische Therapie, die mit nur einem einfachen Rekonstitutionsschritt zubereitet wird, kann als Niedrigrisiko-Zubereitung eingestuft werden (16, 17).

Methoden zur mikrobiologischen Qualitätsbestimmung

Für die mikrobiologische Qualitätsbestimmung schreibt das Europäische Arzneibuch die Prüfung auf Sterilität (*Ph. Eur. 2.6.1 Prüfung auf Sterilität*) (59) vor, wobei im Anschluss an die Herstellung die An- bzw. Abwesenheit von Mikroorganismen in einem Kulturmedium untersucht werden soll. Aufgrund der 14-tägigen Inkubationszeit liegen die Ergebnisse jedoch erst spät vor. Daher ist diese zerstörende Prüfung im klinischen Alltag für dringliche und

Einleitung

patientenindividuell hergestellte Therapien unpraktikabel und ermöglicht selten korrigierende Maßnahmen zu einem ausreichend frühen Zeitpunkt. Mit den im europäischen Arzneibuch aufgeführten alternativen Methoden zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität (*Ph. Eur. 5.1.6 Alternative Methoden zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität*) (60) können echtzeitnahe Ergebnisse geliefert werden, um im Falle eines mikrobiellen Nachweises Korrekturen frühzeitig vornehmen zu können. Sie werden daher auch als „Rapid Microbiological Methods“ bezeichnet. Eine alternative, vereinfachte Methode für die mikrobielle Untersuchung von Parenteraliazubereitungen, ist die Direktbeschickung von Blutkulturflaschen (z.B. BACTEC, BacT/Alert) zur Testung auf aerobe bzw. anaerobe Keime, die in verschiedenen Publikationen beschrieben wird (61, 62). Die Blutkulturflaschen werden mit Aliquots (1-10 ml) der zu untersuchenden Lösung im Direktbeschickungsverfahren versetzt und im Anschluss in Automaten bebrütet. Im Medium wachsende Mikroorganismen setzen CO₂ frei, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff reagiert und bei Wachstum ein Signal auslöst. Die maximale Bebrütungsdauer beträgt 14 Tage, wobei erste Ergebnisse bereits nach 24-48 Stunden zur Verfügung stehen und als Kriterium für die Freigabe von im Voraus hergestellten, aseptischen Zubereitungen verwendet werden können.

Eine Prüfung auf Bakterien-Endotoxine (*Ph. Eur. 2.6.14 Prüfung auf Bakterien-Endotoxine*) (63) muss nur durchgeführt werden, wenn unsterile Ausgangsmaterialien verwendet werden (15).

Mikrobiologische Prozessvalidierung

Die Dichtigkeit des Primärpackmittels ist Grundvoraussetzung für den Erhalt der Sterilität einer Zubereitung. Durch Dichtigkeitsprüfungen von Behälter- und Verschlussystemen (Behälterintegritätstests) soll nachgewiesen werden, dass das Arzneimittel vor mikrobiellem Eintritt während der Lagerung und des Transports geschützt ist. Es sind mikrobiologische oder physikalische Dichtigkeitstests beschrieben, die zur Bestimmung der Verwendbarkeitsfrist des Behälterverschlussystems verwendet werden können (64).

Bei mikrobiologischen Dichtigkeitsstests werden die zu untersuchenden Behälter-Verschluss-Systeme mit sterilem Nährmedium befüllt. Im Anschluss wird das mit Nährmedium befüllte Primärpackmittel gänzlich oder teilweise in MO-Suspension mit *Brevundimonas diminuta* (kleinster verfügbarer Testkeim) oder *Escherichia Coli* (beweglicher, kleiner Testkeim, dringt gut in Lücken ein) getaucht. Undichtigkeiten werden über eine Trübung der Nährmedienlösung nach Bebrütung angezeigt, die auf mikrobielles Wachstum rückschließen lässt. Als physikalischer Dichtigkeitsstest wird in der klinischen Praxis der Farbstoff-Intrusionstest angewandt. Hierbei werden Primärpackmittel mit Wasser oder Arzneistofflösung gefüllt, verschlossen und im Anschluss unter Anwenden eines Vakuums in eine Farbstofflösung (z.B. Methylenblau) getaucht. Färbt sich das Wasser bzw. die Arzneistofflösung durch Eindringen der

Einleitung

Farbstofflösung blau ein, zeigt dies eine Undichtigkeit im Packmittel auf. Zur Erstvalidierung von neu eingesetzten Behälter-Verschluss-Kombinationen sind sowohl physikalische als auch mikrobiologische Dichtigkeitstests empfohlen (64). Eine weitere Methode, um die Dichtigkeit medizinischer (Plastik)Verpackungen und Beuteln mittels Farbstoffpenetration (Toluidinblau, Triton X-100) zu prüfen ist in *ASTM F19299: standard test method for detecting seal leaks in porous medical packaging by dye penetration* beschrieben.

Mikrobielle Wachstumseigenschaften von Parenteraliazubereitungen

Kenntnisse zur Viabilität (Lebensfähigkeit) von MOs in aseptisch hergestellten Parenteraliazubereitungen helfen im Falle einer unbeabsichtigten Kontamination während des Herstellprozesses das Risiko mikrobiellen Wachstums während Lagerung und Applikation einschätzen zu können. Da jedes Arzneimittel ein individuelles wachstumsförderndes/-hemmendes Potential aufweist und dies nicht von den pharmakologischen Eigenschaften einer Zubereitung abgeleitet werden kann (15), wird empfohlen für jede Zubereitung das Wachstumspotential für fakultativ pathogene Keime zu untersuchen (55, 56). Die Untersuchungen können in Anlehnung an die Europäische Arzneibuch Prüfung für antimikrobielle Wirksamkeitstests (*Ph. Eur. 5.1.3 Prüfung auf ausreichende antimikrobielle Konservierung*) (65) durchgeführt werden. Aseptisch zubereitete, konservierungsmittelfreie Arzneimittellösungen werden mit fakultativ pathogenen Keimen in niedrigen Konzentrationen (10^2 - 10^5 /ml) inokuliert, um eine versehentliche Kontamination zu simulieren. Zu festgelegten Zeitpunkten werden Proben entnommen, auf Agarplatten ausgestrichen, bebrütet und die koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Nach Metcalf soll die Ausgangskonzentration in der zu untersuchenden Testlösung <100 KBE/ml betragen und alle Werte, die mehr als 0,5 log-Einheiten zur letzten Probe abweichen, evaluiert werden (55). Die Viabilität fakultativ pathogener Keime in aseptisch hergestellten Arzneimittelzubereitungen wurde in einigen Studien untersucht (61, 62, 66-81), wachstumshemmende Eigenschaften konnten nur wenigen Zubereitungen zugesprochen werden. Nutritive Eigenschaften konnten vorwiegend in lipidhaltigen Zubereitungen nachgewiesen werden (66, 67). Nichtsdestotrotz können Mikroorganismen auch in wässrigen zytostatischen oder antibiotischen Zubereitungen lebensfähig bleiben (39).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die experimentelle Bestimmung der physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Stabilität ausgewählter Arzneimittel zur parenteralen Tumortherapie. Kenntnisse zur Stabilität der konzentrierten und verdünnten parenteralen (RTA)-Zubereitungen erlauben eine sichere und ökonomische Handhabung der als Ausgangsmaterial eingesetzten Fertigarzneimittel. Darüber hinaus kann die Wartezeit für ambulante Patienten reduziert werden, wenn Zubereitungen für geplante Therapien im Voraus hergestellt und bis zur Applikation ohne Wirkungsverlust und Toxizitätszunahme gelagert werden können. Ziel war insbesondere der Erkenntnisgewinn zu folgenden spezifischen Fragestellungen der Haltbarkeit von applikationsfertigen Zubereitungen für die parenterale Tumortherapie.

Vergleichende Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität carmustinhaltiger Arzneimittel (Carmubris, Carmustin Obvius)

Das Alkylans Carmustin wurde 1980 von der Firma Bristol-Myers Squibb unter dem Namen Carmubris (BCNU) erstmals zugelassen. Firmenunabhängig durchgeführte Untersuchungen der physikalisch-chemischen Stabilität carmustinhaltiger, rekonstituierter Stammlösungen und verdünnter Infusionslösungen ergaben eine rasche, temperaturabhängige Zersetzung des Wirkstoffs. Im Jahr 2018 folgte die Zulassung des Generikums Carmustin Obvius. Die Zulassungsunterlagen der beiden Carmustin-Fertigarzneimittel enthalten unterschiedliche Angaben zur physikalisch-chemischen Stabilität der rekonstituierten Lösungen. Zur physikalisch-chemischen Stabilität verdünnter Carmustin Obvius Infusionslösungen fehlen Angaben in der Fachinformation und aus wissenschaftlichen Publikationen. Ziel dieser Arbeit war daher eine vergleichende Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität von Carmustin Obvius (Medac GmbH) und Carmubris (Tillomed Pharma GmbH) Stammlösungen und Infusionslösungen (0,2 mg/ml, 1,0 mg/ml) in mit 5% Glukose vorgefüllten PE/PP-Beuteln. Zur Untersuchung wurde eine bekannte Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) Methode mit DAD adaptiert, pH-Messungen, Osmolaritäts-Messungen und Prüfungen auf sichtbare Partikel und Farbveränderungen durchgeführt.

Physikalisch-chemische Stabilität von Daratumumab Injektionslösung (DARZALEX® 1800 mg Injektionslösung) in dreiteiligen PP-Einmalspritzen

In den letzten Jahrzehnten wurde eine beträchtliche Anzahl monoklonaler Antikörper für die systemische Tumortherapie zugelassen, viele weitere befinden sich in der Pipeline. Die hochmolekularen Glykoproteine zählen zu den biologischen Arzneimitteln. Der Aufbau der Glykoproteine ist sehr komplex und die Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur empfindlich für unterschiedliche physikalisch-chemische Abbaureaktionen. Zum Nachweis der

Zielsetzung

Intaktheit des Proteins sind verschiedene, sich ergänzende analytische Methoden, sogenannte orthogonale Methoden, erforderlich.

Der monoklonale Antikörper Daratumumab ist zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen. Vier Jahre nach Zulassung der intravenösen (i.v.) Daratumumab Formulierung kam im Jahr 2020 die subkutane (s.c.) Formulierung auf den Markt. Diese wird heute bevorzugt eingesetzt wegen vereinfachter Dosierung (1800 mg fix), kurzer Injektionszeit (3-5 Minuten) und weniger infusionsbedingten Nebenwirkungen (13% s.c. vs. 34% i.v.) bei gleichem Outcome. Die applikationsfertige Injektionslösung wird durch Überführung der konzentrierten Lösung aus dem Glasvial in eine Plastikeinmalspritze zubereitet. Weder in der Fachinformation noch in wissenschaftlichen Publikationen gibt es bisher Angaben zur physikalisch-chemischen Stabilität applikationsfertiger Daratumumab-Injektionslösungen in Plastikeinmalspritzen, die mit Kombistoppfern verschlossen sind. Um applikationsfertige Spritzen einzeln oder in Serie auf Vorrat zubereiten zu können, bedarf es Stabilitätsdaten. Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung der physikalisch-chemischen Stabilität applikationsfertiger Daratumumab-Injektionslösungen, die in verschiedenen dreiteiligen Plastikeinmalspritzen bei 2-8 °C und 22±2 °C über einen Zeitraum von 28 Tagen gelagert wurden. Neben der Etablierung, Validierung und Durchführung einer Größenausschluss- und Ionenaustausch-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (SE-, IE-HPLC) mit DAD wurden pH-Messungen und Prüfungen auf sichtbare Partikel und Farbveränderungen durchgeführt und die Ergebnisse hinsichtlich der festgelegten Spezifikationen für physikalisch-chemische Stabilität bewertet.

Physikalisch-chemische Stabilität von Trastuzumab (Ontruzant®) Infusionslösungskonzentrat

Nach Patentablauf des Trastuzumab-Originalpräparats (Herceptin®) wurden mehrere Biosimilars, darunter das Trastuzumab-Biosimilar SB3 (Ontruzant®), zugelassen. Zwischenzeitlich sind zahlreiche Publikationen zur physikalisch-chemischen Stabilität von konzentrierten und verdünnten Trastuzumab-Zubereitungen erschienen. Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen monoklonaler Antikörper dürfen aufgrund der komplexen Proteinstruktur und der individuellen Herstellprozesse jedoch weder übertragen noch extrapoliert werden. Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität der rekonstituierten Trastuzumab SB3-Stammlösungen über einen längeren Zeitraum fehlen. Die Weiterverwendung von Anbrüchen der SB3-Stammlösung ist nur begrenzt möglich. Ziel dieser Untersuchung war es, die physikalisch-chemische Stabilität rekonstituierter Trastuzumab SB3-Stammlösungen bei Kühlschrank- (2-8 °C) oder Raumtemperlagerung (15-25 °C) über einen verlängerten Zeitraum von 28 Tagen zu bestimmen. Die Untersuchungen erfolgten mittels einer validierten SE-HPLC Methode mit DAD, einer validierten UV-Spektrometrie-Methode, pH-Messungen und Prüfung auf sichtbare Partikel und Farbveränderungen.

Viabilität fakultativ pathogener Mikroorganismen in applikationsfertigen Zubereitungen für die systemische Tumorthherapie

Bei der empirischen Verwendbarkeitsdeterminierung aseptisch hergestellter, applikationsfertiger Zubereitungen muss neben der physikalisch-chemischen auch die mikrobiologische Stabilität berücksichtigt werden. Letztere setzt Sterilität voraus, die durch regelmäßige Sterilitätsprüfungen, Mediafills und Umgebungsmonitoring kontrolliert wird. Kommt es zur unbeabsichtigten Kontamination, bleiben viele MOs in wässrigen Lösungen lebensfähig. Die Viabilität verschiedener MOs in applikationsfertigen Zubereitungen ist abhängig von pH-Wert, Redoxpotential und Wasseraktivität der Zubereitung sowie vom Wirkstoff und dessen Konzentration. Die Zubereitung selbst kann somit wachstumsfördernde oder -hemmende Eigenschaften aufweisen und damit die mikrobiologische Stabilität beeinflussen. Untersuchung der nutritiven Eigenschaften applikationsfertiger Zubereitungen helfen, das arzneimittelindividuelle Risiko mikrobiologischer Instabilität besser einzuschätzen und unterstützen bei der Haltbarkeitsdeterminierung. Anschließend an frühere Untersuchungen wurde die Viabilität fakultativ pathogener Mikroorganismen in 20 neuen Arzneimitteln (Biologika, chemische Moleküle) zur systemischen Tumorthherapie untersucht.

3 Stabilitätsuntersuchungen

3.1 Physikalisch-chemische Stabilität carmustinhaltiger Arzneimittel

Zusammenfassung

Hintergrund: Carmustin Obvius wurde als Generikum 38 Jahre nach Markteinführung des Originatorprodukts Carmubris zugelassen. Die Daten zur Anbruchsstabilität beider Arzneimittel sind in den Zulassungsunterlagen unterschiedlich angegeben. Physikalisch-chemische Stabilitätsdaten zur verdünnten Carmustin Obvius Infusionslösung fehlen.

Zielsetzung: Ziel war die vergleichende Untersuchung der physikalisch-chemischen Stabilität des Referenzproduktes Carmubris (Tillomed Pharma GmbH) und des Generikums Carmustin Obvius (Medac GmbH).

Material und Methoden: Es wurden rekonstituierte Carmustin Stammlösungen der Nennkonzentration 3,3 mg/ml und applikationsfertige Carmustin Infusionslösungen der Nennkonzentration 0,2 mg/ml beider Fertigarzneimittel Carmubris und Carmustin Obvius untersucht. Zusätzlich wurden Carmustin Obvius Infusionslösungen 1,0 mg/ml untersucht. Die Infusionslösungen wurden durch die Zugabe entsprechender Mengen rekonstituierter Stammlösung in mit 5%iger Glukose-Lösung vorgefüllten PP/PE-Beuteln zubereitet. Die Untersuchungsproben wurden unmittelbar nach Rekonstitution oder Verdünnung (Stunde 0) und nach 3,5, 6, 8,5 und 11 Stunden bei Raumtemperaturlagerung (22 °C) oder nach (12), 24, 48 und 60 Stunden bei gekühlter Lagerung (2-8 °C) gezogen. Zur Simulation der Applikation wurden die 60 Stunden gekühlt gelagerten Infusionslösungen anschließend bei 22 °C gelagert und nach weiteren 3 und 6 Stunden auf Stabilität untersucht. Untersuchungsmethoden waren die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD), pH-Wert Messung, Osmolaritätsmessung und Prüfung auf sichtbare Partikel oder Farbveränderungen.

Ergebnisse: Die rekonstituierten Carmustin Obvius und Carmubris Stammlösungen sind bei kühler Lagerung (2-8 °C) mindestens 48 Stunden physikalisch-chemisch stabil. Carmustin Obvius und Carmubris Infusionslösungen (0,2 mg/ml) sind bei 22 °C bzw. 2-8 °C mindestens 8,5 Stunden bzw. 60 Stunden physikalisch-chemisch stabil. Bei nachfolgender Lagerung der Infusionslösungen bei 22 °C lagen die Carmustin-Konzentrationen nach 3 Stunden an der Stabilitätsgrenze (90%-der Ausgangskonzentration) und nach 6 Stunden unterhalb der 90%-Stabilitätsgrenze. Die Carmustin Obvius Infusionslösungen (1,0 mg/ml) sind bei 22 °C mindestens 8,5 Stunden physikalisch-chemisch stabil. Bei gekühlter Lagerung (2-8 °C) wurde physikalisch-chemische Stabilität über 60 Stunden nachgewiesen.

Schlussfolgerung: Die Stabilität carmustinhaltiger Zubereitungen ist stark temperaturabhängig. Die bei 2-8 °C gelagerten Stammlösungen sind bis zu 48 Stunden physikalisch-chemisch stabil. Gebrauchsfertige Infusionslösungen (0,2 mg/ml, 1,0 mg/ml) sind 60 Stunden bei 2-8 °C oder 8,5 Stunden bei 22 °C und lichtgeschützter Lagerung physikalisch-chemisch stabil.

Weiterführende Literatur:

Siehe Anhang

Physicochemical stability of carmustine-containing medicinal products after reconstitution and after dilution to ready-to-administer infusion solutions stored refrigerated or at room temperature

Knoll L, Kraemer I, Thiesen J.

3.2 Physikalisch-chemische Stabilität subkutaner Daratumumab-Injektionslösung

Zusammenfassung

Hintergrund: Zur Therapie des Multiplen Myeloms wird zunehmend die nachträglich zugelassene subkutane anstelle der intravenösen Daratumumab Formulierung verwendet. In der Fachinformation der subkutanen Daratumumab-Injektionslösung (DARZALEX® 1800 mg Injektionslösung) ist als physikalisch-chemische Stabilität für die applikationsfertige Zubereitung 24 Stunden bei 2-8 °C und Lichtschutz, sowie weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur (15-25 °C) und Umgebungslicht angegeben.

Zielsetzung: Ziel dieser Untersuchung war es, die physikalisch-chemische Stabilität der gebrauchsfertigen subkutanen Daratumumab-Injektionslösung in verschiedenen Plastik-Einmalspritzen als Primärbehältnis und unter verschiedenen Lagerbedingungen über einen Zeitraum von 28 Tagen zu bestimmen.

Material und Methoden: DARZALEX 1800 mg subkutane Injektionslösung wurde in dreiteilige Luer-Lock-Einmalspritzen (BD Plastipak Luer-Lock-Spritzen 20 ml, Original-Perfusor®-Spritzen 50 ml B. Braun) aufgezogen, verschlossen und lichtgeschützt bei 2-8 °C oder bei Raumtemperatur (22±2 °C) über einen Zeitraum von maximal 28 Tagen gelagert. Die Proben wurden unmittelbar nach der Zubereitung (Tag 0) sowie nach 2, 7, 14, 21 und 28 Tagen gezogen und analysiert. Die physikalisch-chemische Stabilität der Injektionslösung wurde mittels Ionenaustausch- und Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (IE-, SE-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD), pH-Wert Messung und visueller Kontrolle auf Partikel oder Farbveränderungen bestimmt.

Ergebnisse: Die mittels IE-HPLC ermittelten Peakflächen und die Verhältnisse der Peakflächen untereinander blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert. Es zeigten sich keine zusätzlichen Peaks, die auf Abbauprodukte in Form von Daratumumab-Ladungsvarianten hinweisen. Im SE-HPLC-Assay wurde weder die Bildung von Aggregaten noch von Fragmenten festgestellt. Die Daratumumab-Monomerkonzentrationen lagen während des gesamten Untersuchungszeitraums über 95 % der an Tag 0 gemessenen Ausgangskonzentrationen. Die pH-Werte blieben unverändert. Die Untersuchungslösungen blieben klar und es wurden keine Farbveränderungen oder sichtbare Partikel beobachtet. Alle Ergebnisse waren unabhängig von den Lagerungsbedingungen.

Schlussfolgerung: Unabhängig von der Lagertemperatur erwies sich die subkutane Daratumumab-Injektionslösung in dreiteiligen PP-Einmalspritzen als über 28 Tage physikalisch-chemisch stabil. Zur Gewährleistung der mikrobiologischen Stabilität wird die Lagerung bei 2-8 °C empfohlen.

Weiterführende Literatur:

Siehe Anhang

In-use stability of ready-to-administer daratumumab subcutaneous injection solution in plastic syringes

Knoll L, Thiesen J, Klassen MD, Reinders LMH, Tuerk J, Kraemer I.

3.3 Physikalisch-chemische Stabilität des Trastuzumab Biosimilars SB3 (Ontruzant®) nach Rekonstitution im Originalvial

Zusammenfassung

Hintergrund: Laut Fachinformation des Trastuzumab Biosimilars SB3 (Ontruzant®), ist die rekonstituierte Lösung (21 mg/ml) bei Kühlschranklagerung 7 Tage physikalisch-chemisch stabil. Weitere experimentellen Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität des Trastuzumab (SB3)-Konzentrats über einen verlängerten Zeitraum von 28 Tagen unter verschiedenen Lagerbedingungen wurden bisher nicht publiziert.

Zielsetzung: Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung der physikalisch-chemische Stabilität von rekonstituiertem Trastuzumab SB3 im Originalvial bei Kühlschrank- oder Raumtemperatur-Lagerung über 28 Tage.

Material und Methoden: Trastuzumab SB3 (Ontruzant®) wurde entsprechend der Fachinformation mit Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert. Die konzentrierten Lösungen wurden in den Originalvials bei 2-8 °C oder bei Raumtemperatur (15-25 °C, Ph. Eur.) über 28 Tage gelagert. Die Proben wurden unmittelbar nach Rekonstitution (Tag 0) und nach 7, 14, (21) und 28 Tagen gezogen und mittels Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (SE-HPLC) mit Diodenarray-Detektion (DAD), Ultraviolett (UV)-Spektrometrie, pH-Messung und Prüfung auf sichtbare Partikel, Klarheit und Farbveränderungen untersucht.

Ergebnisse: Die durch SE-HPLC bestimmten Trastuzumab-Konzentrationen betragen über den kompletten Untersuchungszeitraum >95% der Ausgangskonzentration. Die pH-Werte und die mittels UV-Spektrometrie ermittelten Proteinkonzentrationen blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert. Unabhängig von der Lagertemperatur konnten zu keinem Zeitpunkt sichtbare Partikel, Trübungen oder Farbveränderungen festgestellt werden.

Schlussfolgerung: Die physikalisch-chemische Stabilität der rekonstituierten Trastuzumab SB3 Ontruzant®-Lösung in den Originalvials ist, gemäß den verwendeten analytischen Methoden, bei Raumtemperatur- oder Kühlschranklagerung über einen Zeitraum von 28 Tagen gegeben. Die Ergebnisse sollten durch Untersuchung der Trastuzumab SB3 Ladungsvarianten mittels IE-HPLC oder icIEF untermauert werden. Um mikrobiologische Instabilität zu vermeiden, wird die Lagerung im Kühlschrank empfohlen.

Weiterführende Literatur:

Siehe Anhang

**Focused physicochemical stability study of
reconstituted Trastuzumab biosimilar SB3 (Ontruzant®)
stored in the original vials over 28 days**

Knoll L, Thiesen J, Kraemer I.

3.4 Viabilität fakultativ pathogener Mikroorganismen in parenteralen Zubereitungen zur Tumortherapie

Zusammenfassung

Hintergrund: Ein Risikofaktor bei der aseptischen Zubereitung parenteraler Arzneimittel ist die Kontamination mit Mikroorganismen (MOs). MOs können in wässrigen, parenteralen Zubereitungen viabel (lebensfähig) bleiben, auch wenn keine wachstumsfördernde Bedingungen vorliegen. Informationen über die Viabilität von MOs in aseptisch hergestellten parenteralen Zubereitungen helfen das mikrobiologische Risiko besser beurteilen zu können und sollten bei der Determinierung der Haltbarkeit einer Zubereitung berücksichtigt werden.

Zielsetzung: Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung der Viabilität vier verschiedener, fakultativ pathogener MOs in 20 neuen Arzneimitteln zur parenteralen Tumortherapie.

Material und Methoden: Es wurden 20 Biologika- und Small Molecule-Testlösungen entsprechend der klinischen Praxis in der niedrigsten üblichen Konzentration unter aseptischen Bedingungen zubereitet. Testlösungen und reine Trägerlösungen (0,9% NaCl, G5) wurden jeweils mit einer Suspension von *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* inokuliert, sodass Konzentrationen von 10^4 - 10^5 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml Testlösung resultierten. Die Lagerung der inokulierten Testlösungen erfolgte lichtgeschützt bei 22 °C. Nach 4, 24, 48 und 144 Stunden wurden Aliquots entnommen, jeweils dreifach verdünnt, pro Verdünnung zweifach auf Agarplatten (tryptic soy agar) ausgestrichen und die Agarplatten bei 37 °C bebrütet. Nach 24 bzw. 72 Stunden wurden die KBE der Bakterien bzw. von *C. albicans* gezählt.

Ergebnisse: In den meisten Testlösungen (vorwiegend in Lösungen mit monoklonalen Antikörpern) nahmen die KBE-Zahlen von *P. aeruginosa* zu und die KBE-Zahlen von *E. faecium* und *S. aureus* blieben gleich oder nahmen zu. Die monoklonalen Antikörper und Filgrastim (Biologika) zeigten keine ausgeprägten nutritiven Eigenschaften. Testlösungen mit Azacitidin, Pixantron und Vinflunin (Small Molecules) zeigten eine speziesspezifische bakteriostatische und bakterizide Wirkung. In allen Testlösungen (außer Testlösungen mit Nivolumab und Pixantron) blieben KBE-Zahlen von *C. albicans* unverändert oder nahmen zu.

Schlussfolgerung: Die vier ausgewählten fakultativ pathogenen MOs blieben in den meisten verdünnten Biologika- und Small Molecule-Testlösungen überlebensfähig oder vermehrten sich. Bei der Herstellung und Applikation parenteraler Zubereitungen müssen daher strenge aseptische Bedingungen eingehalten werden, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Fehlende antimikrobielle Eigenschaften von parenteralen Zubereitungen zur Tumortherapie müssen bei der Verwendbarkeitsdeterminierung 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, Kraemer I.

4 Schlussfolgerung

Gegenstand dieser Arbeit war die Gewinnung neuer Erkenntnisse zur physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Stabilität ausgewählter Arzneimittel zur parenteralen Tumorthherapie. Auf Basis der experimentellen Befunde kann die Haltbarkeit der rekonstituierten Lösungen und applikationsfertigen Zubereitungen valide determiniert werden. Der Prozess der aseptischen Zubereitung in der Apotheke gewinnt an Sicherheit, Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit. Bei längerer Haltbarkeit der applikationsfertigen Zubereitungen können Stationen im Voraus beliefert und die Applikation sicherer, effektiver und wirtschaftlicher (z.B. durch verkürzte Wartezeiten) gestaltet werden.

Die experimentellen Untersuchungen zeigen, dass die physikalisch-chemische Stabilität von Carmustin stark temperaturabhängig und kaum konzentrationsabhängig ist. Rekonstituierte Carmustin Obvius (Medac GmbH) und Carmubris (Tillomed Pharma GmbH) Stammlösungen sind bei Kühlschranklagerung (2-8 °C) für 48 Stunden physikalisch-chemisch stabil. Die gebrauchsfertigen Infusionslösungen beider Produkte sind bei Kühlschranklagerung (2-8 °C) 60 Stunden physikalisch-chemisch stabil. Falls sie (versehentlich) bei Raumtemperatur (22 °C) gelagert werden, können sie bis 8,5 Stunden nach Zubereitung verwendet werden. Die vergleichende Untersuchung zeigt keinen signifikanten Unterschied der physikalisch-chemischen Stabilität zwischen beiden Carmustin-Fertigarzneimitteln.

Applikationsfertige Daratumumab-Injektionslösungen (DARZALEX® 1800 mg Injektionslösung) können in dreiteiligen PP-Einmalspritzen (BD Plastipak Luer-Lock-Spritzen 20 ml, Original-Perfusor®-Spritzen 50 ml B. Braun) bei 2-8 °C oder Raumtemperatur (22±2 °C) über einen Zeitraum von 28 Tagen gelagert werden. Die Untersuchungsergebnisse führen zu effektiven und effizienten Abläufen in der zentralen Zytostatikazubereitung der Apotheke, da Daratumumab-Zubereitungen außerhalb der Spitzenzeiten einzeln oder in Serie auf Vorrat zubereitet werden können. Ambulante Patienten und Patientinnen profitieren von verkürzten Wartezeiten.

Die physikalisch-chemische Stabilität von Trastuzumab SB3 (Ontruzant®) Infusionskonzentrat wurde über 28 Tage bei 2-8 °C und Raumtemperatur (15-25 °C) nach Punktieren der Original Glasvials nachgewiesen. In der Zytostatikaabteilung können Anbrüche somit über 28 Tage verwendet werden. Bei unbeabsichtigten Temperaturabweichungen (z.B. Kühlschrankausfall) können die teuren Antikörperlösungen weiterverwendet und müssen nicht entsorgt werden. Die Viabilität der ausgewählten fakultativ pathogenen MOs blieb in den meisten der getesteten applikationsfertigen Zubereitungen (Biologika- und Small Molecule-Testlösungen) zur systemischen Tumorthherapie erhalten. Ausgeprägte nutritive Eigenschaften konnten nicht nachgewiesen werden. In mAb-Zubereitungen kam es jedoch spezies-spezifisch auch zum Anstieg der KBE-Zahlen während des Untersuchungszeitraums von 144 Stunden. Das Fehlen der antimikrobiellen Aktivität muss bei der Haltbarkeitsdeterminierung einer applikationsfertigen

Schlussfolgerung

Zubereitung berücksichtigt werden. Um vulnerable, onkologischen Patienten und Patientinnen vor mikrobiologischen Kontaminationen zu schützen, müssen alle parenteralen Zubereitungen unter streng aseptischen, kontrollierten Umgebungsbedingungen zubereitet und möglichst gekühlt gelagert werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS). Technische Regeln für Gefahrstoffe – Verzeichnis krebserzeugender, keimzellmutagener oder reproduktionstoxischer Stoffe (TRGS 905). Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) [Internet]. 2021 [zitiert am 30.07.2025], URL: <https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRGS/pdf/TRGS-905.pdf>.
2. European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics (SmPC) DARZALEX 1800 mg solution for injection [Internet]. 2025 [zitiert am 30.07.2025], URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/darzalex-epar-product-information_en.pdf.
3. European Medicines Agency. Summary of Product Characteristic (SmPC) Ontruzant 150 mg and 420 mg powder for concentrate for solution for infusion [Internet]. 2022 [zitiert am 30.07.2025], URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ontruzant-epar-product-information_en.pdf.
4. European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics (SmPC) Carmustine medac 100 mg powder and solvent for concentrate for solution for infusion [Internet]. 2023 [zitiert am 30.07.2025], URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/carmustine-medac-epar-product-information_en.pdf.
5. Bundesministerium für Gesundheit. Verordnung über den Betrieb von Apotheken (Apothekenbetriebsordnung – ApBetrO) [Internet]. 26. September 1995 (BGBl. I S. 1195), zuletzt geändert durch Art. 8z4 des Gesetzes vom 12. Dezember 2023 (BGBl. 2023 I Nr. 359). [zitiert am 30.07.2025], URL: https://www.gesetze-im-internet.de/apobetro_1987/BJNR005470987.html.
6. European Medicines Agency. Maximum shelf-life for sterile products for human use after first opening or following reconstitution - Scientific guideline [Internet]. Januar 1998 [zitiert am 25.02.2024], URL: <https://www.ema.europa.eu/en/maximum-shelf-life-sterile-products-human-use-after-first-opening-or-following-reconstitution-scientific-guideline>.
7. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.3, 2023: Monographie Pharmazeutische Zubereitungen. 11.3/2619.
8. 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(4):221-31.
9. Sautou V, Bossard D, Chedru-Legros V, Crauste-Manciet S, Fleury-Souverain S, Lagarce F, et al. GERPAC (European Society of Hospital Pharmaceutical Technologies): Methodological guidelines for stability studies of hospital pharmaceutical preparations. 1st ed. [Internet]. 2013 [zitiert am 29.07.2025], URL: https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide_stabilite_anglais.pdf.

10. NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. A Standard Protocol for Deriving and Assessment of Stability Part 1-Aseptic Preparations (Small Molecules) [Internet]. 5th ed., 2019 [zitiert am 07.04.2025], URL: <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2013/12/Stability-part-1-small-molecules-5th-Ed-Sept-19.pdf>.
11. NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. A Standard Protocol for Deriving and Assessment of Stability Part 2-Aseptic Preparations (Biopharmaceuticals) Incorporating Addendum on Antibody Drug Conjugates [Internet]. 5th ed., 2021 [zitiert am 07.04.2025], URL: <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2017/03/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v5.pdf>.
12. Kraemer I, Thiesen J. Extended stability data on small molecule anticancer medicinal products - anything new? any additional information necessary? GaBI Journal. 2024;13(2):61,70.
13. Krämer I, Thiesen J. ADKA STABIL-Datenbank [Internet]. [zitiert am 25.07.2025], URL: <https://aminfo.adka.de/adka-datenbanken/adka-stabil-datenbank>.
14. Vigneron J, Rota JB, et al. Stabilis. [Internet]. [zitiert am 13.04.2025], URL: <https://www.stabilis.org>.
15. Crauste-Manciet S, Krämer I, Lagarce F, Sautou V, Beaney A, Smith J, 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.
16. Ricci MS, Frazier M, Moore J, Cromwell M, Galush WJ, Patel AR, et al. In-use physicochemical and microbiological stability of biological parenteral products. Am J Health Syst Pharm. 2015;72(5):396-407.
17. Pharmaceutical Compounding - Sterile Preparations (General Chapter <797>). In: The United States Pharmacopoeia, 41th rev., and The national formulary, 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2018.
18. Niederländischer Verband der Krankenhausapotheker (NZVA). Niederländische GMP-Z Richtlinie Z3 Aseptische Arbeitsweise [Internet]. 2022 [zitiert am 18.08.2025], URL: https://nvza.nl/wp-content/uploads/Z3-GMPZ_Herziening-feb-2022-definitief.pdf.
19. European Medicines Agency. Assessment Report Carmustin Obvius [Internet]. 2018 [zitiert am 21.07.2025], URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/carmustine-obvius-epar-public-assessment-report_en.pdf.
20. Council of Europe. European pharmacopoeia. 11th ed. 11.0, 2023: Färbung von Flüssigkeiten. 11.0/2.2.2.
21. Council of Europe. European pharmacopoeia. 11th ed. 11.0, 2023: Klarheit und Opaleszenz von Flüssigkeiten. 11.0/2.2.1.
22. Council of Europe. European pharmacopoeia. 11th ed. 11.0, 2023: Partikelkontamination - Sichtbare Partikel. 11.0/2.9.20.

Literaturverzeichnis

23. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: pH-Wert – Potentiometrische Methode. 11.0/2.2.3.
24. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.3, 2023: Osmolalität 11.3/2.2.35.
25. Vigneron J, Sacrez M, D'Huart E, Demoré B. Assessment of the relevance of osmolality measurement as a criterion for the stability of solutions. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2023;8:20220008.
26. Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods--critical review. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;28(6):1011-40.
27. Dong MW, Guillarme D. Newer Developments in HPLC Impacting Pharmaceutical Analysis: A Brief Review. *Am Pharm Rev.* 2013;16(4):36-43.
28. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Partikelkontamination – Nicht sichtbare Partikel. 11.0/2.9.19.
29. Groffik C. *Impfen. Eine Entscheidungshilfe für Eltern.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2020.
30. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.2, 2023: Monographie Monoklonale Antikörper für Menschen. 11.2/2031.
31. Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF. *Antikörper und ihre Antigene. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2020.
32. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):169-90.
33. Bournazos S, Wang TT, Dahan R, Maamary J, Ravetch JV. Signaling by Antibodies: Recent Progress. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:285-311.
34. Gogesch P, Dudek S, van Zandbergen G, Waibler Z, Anzaghe M. The Role of Fc Receptors on the Effectiveness of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16).
35. Liu JK. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond).* 2014;3(4):113-6.
36. European Medicines Agency. *Biosimilars in der EU Leitfaden für Medizinische Fachkräfte* [Internet]. 2019 [zitiert am 05.02.2025], URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals_en.pdf?bcgovtm=stua2019.
37. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. *Biosimilars* [Internet]. 2021 [zitiert am 05.02.2025], URL: https://www.akdae.de/fileadmin/user_upload/akdae/Arzneimitteltherapie/LF/PDF/Biosimilars.pdf.

38. Weise M, Bielsky MC, De Smet K, Ehmann F, Ekman N, Giezen TJ, et al. Biosimilars: what clinicians should know. *Blood*. 2012;120(26):5111-7.
39. Kraemer I, Thiesen J, Astier A. Formulation and Administration of Biological Medicinal Products. *Pharm Res*. 2020;37(8):159.
40. Shire SJ. Stability of monoclonal antibodies (mAbs). *Monoclonal Antibodies*. 2015:45-92.
41. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm*. 2005;289(1-2):1-30.
42. Berrill A, Biddlecombe J, Bracewell D. Product quality during manufacture and supply. *Peptide and Protein Delivery*. 2011:313-339.
43. Leblanc Y, Bihoreau N, Jube M, Andre MH, Tellier Z, Chevreux G. Glycation of polyclonal IgGs: Effect of sugar excipients during stability studies. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;102:185-90.
44. Quan C, Alcalá E, Petkovska I, Matthews D, Canova-Davis E, Taticek R, et al. A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. *Anal Biochem*. 2008;373(2):179-91.
45. Fischer S, Hoernschemeyer J, Mahler HC. Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;70(1):42-50.
46. Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci*. 2009;98(9):2909-34.
47. Chaudhuri R, Cheng Y, Middaugh CR, Volkin DB. High-throughput biophysical analysis of protein therapeutics to examine interrelationships between aggregate formation and conformational stability. *AAPS J*. 2014;16(1):48-64.
48. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ICH Q2(R1) [Internet]. 1995 [zitiert am 05.02.2025], URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5-first-version_en.pdf.
49. International Conference on Harmonization. Stability testing of biotechnological/biological products Q5C [Internet]. 1995 [zitiert am 05.02.2025], URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q5C%20Guideline.pdf>.
50. Hawe A, Wiggernhorn M, van de Weert M, Garbe JH, Mahler HC, Jiskoot W. Forced degradation of therapeutic proteins. *J Pharm Sci*. 2012;101(3):895-913.
51. Kirsch L, Linxweiler H, Thiesen J, Kraemer I. Physicochemical stability of bevacizumab biosimilar CT-P16 (Vegzelma) concentrate for solution stored in original vials after first opening. *Eur J Hosp Pharm*. 2025.

52. Almasi J, Thiesen J, Kraemer I. Physicochemical stability of durvalumab (Imfinzi®) concentrate for solution in original vials after first opening. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2023;8(1);20230008.
53. Kraemer I, Hilgarth H. ADKA-Leitlinie für die Aseptische Zubereitung und Prüfung applikationsfertiger Parenteralia in der Krankenhausapotheke [Internet]. 2025 [zitiert am 08.06.2025], URL: <https://www.adka.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=5475&token=71ecec33f3dcf5c905e8a45dcd7e8fe343880b27>.
54. Pharmaceutical inspection convention. PIC/S PE 010-4 Guide to good practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments [Internet]. März 2014, [zitiert am 08.06.2025], URL: <https://picscheme.org/docview/3443>.
55. Metcalfe JW. Microbiological Quality of Drug Products after Penetration of the Container System for Dose Preparation Prior to Patient Administration. *Am Pharm Rev.* 2009.
56. Lolas AG, Metcalfe JW. Evaluation of the microbial growth potential of pharmaceutical drug products and quality by design. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2011;65(1):63-70.
57. Trissel LA, Gentempo JA, Anderson RW, Lajeunesse JD. Using a medium-fill simulation to evaluate the microbial contamination rate for USP medium-risk-level compounding. *Am J Health Syst Pharm.* 2005;62(3):285-8.
58. Trissel LA, Gentempo JA, Saenz LM, Woodard MY, Angeles CH. Effect of two work practice changes on the microbial contamination rates of pharmacy-compounded sterile preparations. *Am J Health Syst Pharm.* 2007;64(8):837-41.
59. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Prüfung auf Sterilität. 11.0/2.6.1.
60. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Alternative Methoden zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität. 11.0/5.1.6.
61. Matheron A, Guerault MN, Vazquez R, Cheron M, Brossard D, Crauste-Manciet S. Microbiological stability tests with simulated broth preparations and integrity testing for sterile standard cytotoxic preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2020;5(1):20200002.
62. Sangnier M, Bouguéon G, Berroneau A, Dubois V, Crauste-Manciet S. Removal of bacterial growth inhibition of anticancer drugs by using complexation materials. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2020;5(1):20190018.
63. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Prüfung auf Bakterien-Endotoxine. 11.0/2.6.14.
64. NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. Protocols for the integrity testing of syringes [Internet]. 2nd ed., 2013 [zitiert am 06.04.2025], URL: <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2013/07/NHS-PQAC-YCD-Integrity-Testing-of-Syringes-2013-2nd-Edn1.pdf>.

65. Council of Europe. European pharmacopeia. 11th ed. 11.0, 2023: Prüfung auf ausreichende antimikrobielle Konservierung. 11.0/5.1.3.
66. 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.
67. Sarakbi I, Heeb R, Thiesen J, Kraemer I. Viability of Selected Microorganisms in Non-Cytotoxic Aseptic Preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2016;1(1):9-20.
68. Almasi J, Knoll L, Thiesen J, Kramer I. Viability of selected microorganisms in parenteral preparations for novel systemic anti-cancer therapy. *J Oncol Pharm Pract*. 2024;30(4):614-21.
69. Karstens A, Krämer I. Viability of microorganisms in novel chemical and biopharmaceutical drug solutions for cancer treatment. *Eur J Hosp Pharm*. 2007;13(2):27-32.
70. Bruenke J, Riemann T, Kessler P, Kachel N. Epidural infections, bacteriostatic drug effects and technical strategies for prevention. *Reg Anesth Pain Med*. 2022;47(2):128-30.
71. Cancanelli L, Selmin F, Camuffo L, Mangoni G, Piccoli M, Rivano M, 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*. 2020.
72. Kraemer I, Wenchel HM. Viability of microorganisms in antineoplastic drug solutions. *Eur J Hosp Pharm*. 1991;1(1):14-9.
73. Kraemer I, Wenchel HM. Wachstumsverhalten ausgewählter Mikroorganismen in Zytostatika-Zubereitungen. *Krankenhauspharmazie*. 1988;11:439-42.
74. Krämer I. Viability of microorganisms in novel antineoplastic and antiviral drug solutions. *J Oncol Pharm Practice*. 1998;4(1):32-7.
75. Favier B, Latour JF, Fuhrmann C. Viability of microorganisms in bags of cytotoxic drugs. *J Oncol Pharm Practice*. 2001;6:167-71.
76. Patel K, Craig SB, McBride MG, Palepu NR. Microbial inhibitory properties and stability of topotecan hydrochloride injection. *Am J Health Syst Pharm*. 1998;55(15):1584-7.
77. Holmes CJ, Kubey WY, Love DI. Viability of microorganisms in fluorouracil and cisplatin small-volume injections. *Am J Hosp Pharm*. 1988;45(5):1089-91.
78. Jacobson PA, West NJ, Spadoni V, Maksym CJ, Pierson C. Sterility of filgrastim (G-CSF) in syringes. *Ann Pharmacother*. 1996;30(11):1238-42.
79. Calame W, van der Waals R, Douwes-Idema N, Mattie H, van Furth R. Antibacterial effect of etoposide in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(9):1456-7.
80. Bodet CA, Jorgensen JH, Drutz DJ. Antibacterial activities of antineoplastic agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28(3):437-9.
81. Hamilton-Miller JMT. Antimicrobiological activity of 21 antineoplastic agents. *Br J Canc*. 1984;48:367-9.

6 Anhang

**Physicochemical stability of carmustine-containing medicinal products
after reconstitution and after dilution to ready-to-administer infusion solutions
stored refrigerated or at room temperature**

Knoll L, Kraemer I, Thiesen J.
Eur J Hosp Pharm. 2021 February 15.
<https://ejhp.bmj.com/content/30/1/11>

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

Physicochemical stability of carmustine-containing medicinal products after reconstitution and after dilution to ready-to-administer infusion solutions stored refrigerated or at room temperature

Laura Knoll, Irene Kraemer, Judith Thiesen

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/ejpharm-2020-002597>).

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

Correspondence to Laura Knoll, Department of Pharmacy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz 55131, Rheinland-Pfalz, Germany; Laura.knoll@unimedizin-mainz.de

Received 9 November 2020
Revised 30 December 2020
Accepted 15 February 2021

EAHP Statement S: Patient Safety and Quality Assurance.



© European Association of Hospital Pharmacists 2021. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Knoll L, Kraemer I, Thiesen J. *Eur J Hosp Pharm* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/ejpharm-2020-002597

ABSTRACT

Introduction The aim of this study was to determine and compare the physicochemical stability of two carmustine-containing medicinal products licensed and marketed in Europe as Carmustin Obvius (Medac GmbH) and Carmubris (Tillomed Pharma GmbH). Reconstituted stock solutions and diluted ready-to-administer infusion solutions of the two products were investigated.

Methods Reconstituted carmustine stock solutions (3.3 mg/mL) and ready-to-administer infusion solutions (0.2 mg/mL, 1.0 mg/mL) prepared in prefilled 5% glucose injection solution PP/PE bags were stored at 22°C or 2–8°C over a maximum period of 66 hours protected from light. Samples were taken immediately after reconstitution or dilution and after 3.5, 6, 8.5 and 11 hours when stored at 22°C or after (12), 24, 48 and 60 hours when stored at 2–8°C, followed by 3- and 6-hour storage at 22°C (60+3 hours, 60+6 hours). Physicochemical stability was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection, measurement of pH, osmolality and inspection for visible particles or colour changes.

Results Carmustin Obvius and Carmubris reconstituted stock solutions were physicochemically stable for at least 48 hours when stored at 2–8°C. Carmustin Obvius and Carmubris infusion solutions 0.2 mg/mL were physicochemically stable for at least 8.5 hours and 60 hours when stored at 22°C and 2–8°C, respectively. After subsequent storage of the 60-hour refrigerated test solutions for 3 hours at 22°C, the carmustine concentrations averaged the 90% limit and fell below the 90% limit after 6 hours. Carmustin Obvius infusion solutions 1.0 mg/mL were physicochemically stable for at least 8.5 hours when stored at 22°C and for 60 hours when stored at 2–8°C.

Conclusion According to the physicochemical stability data, the shelf life (95% limit) of the refrigerated stock solutions is 48 hours and the shelf life (90% limit) of ready-to-administer infusion solutions (0.2 mg/mL, 1.0 mg/mL) is 60 hours at 2–8°C or 8.5 hours at 22°C under light protection. These results facilitate the use of both medicinal products in a pharmacy-based centralised cytotoxic preparation unit.

INTRODUCTION

The antineoplastic activity of carmustine (N,N' -bis(2-chlorethyl)-1-nitrosourea, abbreviated BCNU, MW 214.05 g/mol) is based on the alkylation of the DNA/RNA nucleoproteins and less significantly on the carbamylation of lysine residues in enzymes

causing irreversible inactivation. Recently, the indication for carmustine was extended to conditioning chemotherapy prior to autologous or allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in haematological diseases. The recommended carmustine doses for adults are 150–200 mg/m² or 300–600 mg/m² in conditioning treatment protocols.¹

Carmustine was developed as a medicinal product by Bristol-Myers Squibb and was licensed internationally 40 years ago (trademarks: Carmubris, BCNU). Since 2013 the licences have been held by Emcure Pharmaceuticals, India. The European Medicines Agency authorised Carmustine Obvius as a generic medicine in 2018. Currently, in Germany, the generic and the reference medicines are marketed by Medac GmbH, Wedel, Germany and Tillomed Pharma GmbH, Schönefeld, Germany, respectively. The products are available as powder (100 mg) and solvent (3 mL ethanol) for concentrate for solution for infusion. The pharmaceutical details of the two products are shown in table 1.

Prior to infusion, the stock solutions are to be diluted with 5% glucose or 0.9% sodium chloride injection solution.^{1,2} Carmustin Obvius infusion solutions should be administered immediately after reconstitution by intravenous drip under light protection via a polyvinylchloride-free polyethylene (PE) infusion set over a 1–2 hour period.

Carmustine is unstable in aqueous solutions and degrades spontaneously to reactive intermediates that are also capable of alkylation and carbamylation. It is known from the literature that the degradation of reconstituted and diluted infusion solutions depends mainly on pH, but also on temperature and light.^{3–5} Of the known high-performance liquid chromatography (HPLC) methods used for the analysis of carmustine,^{4–7} the current method specifically developed for the medicinal product has been adopted and modified.⁸

In the official documents of the licensed products, different information is given about the in-use shelf life at room temperature of the reference (8 hours) and the generic product (3 hours; see table 1). However, the assessment report of Carmustin Obvius states that the reconstituted/diluted generic and reference product Carmubris shows similar degradation tendencies⁹ at room temperature with a decrease of approximately 4–5% and 6–7% in content after

Original research

Table 1 Pharmaceutical details of Carmustin Obvius (Medac GmbH) and Carmubris (Tillomed Pharma GmbH) according to the Summary of Product Characteristics^{1,2}

Product	Carmustin Obvius (Medac GmbH, Wedel, Germany)	Carmubris (Tillomed Pharma GmbH, Ahrensberg, Germany)
Active substance	Carmustine	Carmustine
Medicinal product	Carmustin 100 mg powder and solvent for concentrate for solution for infusion	Carmubris powder and solvent for preparing an infusion solution
Excipients	No	No
Powder	White to almost white powder or lyophilisate Refrigerated storage and transport Maximum temperature 30°C	Powder, lyophilisate Refrigerated storage Maximum temperature 27°C
Solvents	3.0 mL ethanol anhydrous 27.0 mL water for injection	3.0 mL ethanol absolute 27.0 mL water for injection
Stock solution	3.3 mg/mL carmustine Clear, colourless to light yellow pH 4.0–5.0 (EPAR) ³	3.3 mg/mL carmustine Clear, colourless to light yellow pH 5.6–6.0
Diluent in glass containers	500 mL 5% glucose solution for injection 500 mL 0.9% sodium chloride solution for injection	500 mL 5% glucose solution for injection 500 mL 0.9% sodium chloride solution for injection
Concentration in diluted infusion solutions	0.2 mg/mL carmustine (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL in conditioning treatment)	0.2 mg/mL carmustine
pH and osmolarity of diluted (ready-to-administer) infusion solutions	pH 4.0–5.0 and 385–397 mOsm/L if stock solution is diluted in 5% glucose solution for injection; pH 4.0–6.8 and 370–378 mOsm/L if stock solution is diluted in 0.9% sodium chloride solution for injection	NA
Shelf life after reconstitution	Not declared	24 hours at 2–8°C
Shelf life of the ready-to-administer infusion solution	3 hours	8 hours at room temperature protected from light 24 hours at 2–8°C and further 6 hours at room temperature protected from light

EPAR, European Public Assessment Report; NA, not available.

3 hours and 4 hours, respectively.³ Data regarding the physicochemical stability of reconstituted and diluted Carmustin Obvius stored under refrigeration are not available, but these are crucial for shelf life determination in pharmacy-based centralised cytotoxic preparation units.

The aim of this study was to determine and compare the physicochemical stability of Carmustin Obvius and Carmubris reconstituted stock solutions and diluted infusion solutions, concentration 0.2 mg/mL and 1.0 mg/mL, in polypropylene/polyethylene (PP/PE) bags prefilled with 5% glucose (G5) vehicle solution. Physicochemical stability of the test solutions was analysed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection, measurement of pH and osmolarity, and by observation of visible particles and colour changes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of test solutions

The stability tests were performed with the authorised and marketed medicinal products. Test solutions were stored protected from light, either refrigerated at 2–8°C or in a climatic chamber (ICH260L, Memmert) at 22°C. For each medicinal product, storage condition and concentration, three test solutions were prepared.

Stock solutions

Carmustin Obvius (Medac GmbH; Carmustin: batch 1805502, expiry date August 2020, ethanol: batch 80528A, expiry date May 2020) and Carmubris (Tillomed Pharma GmbH; Carmustin: batch CDAA919, expiry date June 2021, ethanol: batch DHAA8008, expiry date June 2021) were dissolved with 3 mL of the ethanol attached and further diluted with 27 mL of water for injection (B Braun,

Melsungen, Germany; batch 184228091, 194438091). Stock solutions of the nominal concentration 3.3 mg/mL carmustine were stored at 2–8°C.

Infusion solutions

Carmustine infusion solutions (0.2 mg/mL, 1.0 mg/mL) were prepared by injecting 6 mL or 30 mL (20 mg or 100 mg) of freshly reconstituted stock solutions into prefilled G5 freeflex infusion bags of the nominal volume 100 mL (freeflex, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany; batch 13NGS133, 13MFS302). Due to the 6.0 mL average overfilling of the freeflex bags and the added volume (6 mL, 30 mL) of carmustine stock solution, 12 mL or 36 mL of G5 solution were withdrawn to obtain a final volume of 100 mL in the test infusion bags. Three infusion solutions each were stored at 2–8°C or 22°C.

Preparation of samples

Stock solutions

Immediately after reconstitution and after 12, 24 and 48 hours storage at 2–8°C, 1.0 mL samples were withdrawn from each stock solution and further diluted in HPLC vials to fit the calibration curve by mixing 60 µL aliquots with 940 µL G5 (B Braun, Melsungen, Germany; batch 19351015, 19222010) to a final concentration of 0.2 mg/mL in triplicate.

Infusion solutions 0.2 mg/mL

Immediately after dilution and after 12, 24, 48 and 60 hours storage at 2–8°C, and after an additional 3 and 6 hours storage at 22°C or after 3.5, 6, 8.5 and 11 hours storage at 22°C, 1.0 mL samples were withdrawn in triplicate and assayed without further dilution.

Table 2 Characteristics of the RP-HPLC assay based on the method of Allamneni et al.⁶

Parameter	Condition/set value
Column	C18 ODS Hypersil™, 5 µm, 150 mm x 4.6 mm, Thermoscientific
Column temperature	25°C
Sample temperature	2–8°C
Flow rate	1.5 mL/min
Injection volume	10 µL
Run time	15 min
Detection wavelength	230 nm
Mobile phase	70% water HPLC grade and 30% acetonitrile HPLC grade
Flush solution	95% water HPLC grade and 5% acetonitrile HPLC grade
Pump mode	Isocratic

RP-HPLC, reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Infusion solutions 1.0 mg/mL

Immediately after dilution and after 24, 48 and 60 hours storage at 2–8°C, or after 3.5, 6, 8.5 and 11 hours storage at 22°C, 0.2 mL samples were withdrawn and diluted in HPLC vials with 0.8 mL G5 (batch 19351015, 19222010) to a final concentration of 0.2 mg/mL in triplicate.

pH and osmolality

Undiluted samples were used for measurement of pH and osmolality at each sampling time point.

HPLC assay

Carmustine concentrations were determined by a stability-indicating RP-HPLC method (see table 2), adopted from a known RP-HPLC assay and slightly modified.⁶

The HPLC equipment consisted of a Waters Alliance 2695 pump connected to a Waters photodiode array detector 2990 (Waters, Eschborn, Germany). Waters Empower Pro, Empower 2 Software, Version 6.10.01.00 was used for instrument operation, data collection and processing. Samples were injected in triplicate by an autosampler. The retention time of carmustine was about 7–8 min. Test solutions were considered to be stable when the measured carmustine concentration was ≥90% of the concentration measured initially (100%).

Validation of the RP-HPLC assay

The validation was carried out in accordance with the ICH Harmonised Tripartite Guidelines for Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).¹⁰ Linearity testing was performed with a stock solution of 10.0 mg carmustine CRS

substance (EDQM Code: Y0002128, Id: 00FvGj, batch 1.0) dissolved in 0.3 mL ethanol 96% (VWR International GmbH, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, batch 19D234008) and further diluted with 2.7 mL water for injection (B Braun, batch 19041012). By further dilution with G5 (batch 19351015, 19222010) solutions of the concentration 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 were achieved. Aliquots of the calibration standards were injected in triplicate. The calibration curve was constructed by plotting the peak area versus the nominal concentration of carmustine.

Intra- and inter-day accuracy and precision were validated by analysing carmustine solutions on five consecutive days. Stock solutions were freshly prepared as described above. Ten test solutions of the nominal concentration 0.2 mg/mL were obtained by mixing 60 µL stock solution and 940 µL G5 in HPLC vials. From test vials 1 and 10, samples were injected 10-fold on five consecutive days. From test vials 2–9, a single injection was performed on the same days.

pH measurement

The pH values were measured using a pH 210 Microprocessor pH meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany) equipped with an InLab Micro pH glass electrode (Mettler Toledo, Greifensee, Germany). The pH meter was calibrated with standard buffer solutions pH 4.01 (DuraCal buffer, Hamilton Bonaduz AG; batch 1720122, expiry date 14 September 2021) and pH 7.00 (DuraCal buffer, Hamilton Bonaduz AG; batch 111005562, expiry date 22 April 2023) directly before each measurement time point. Each sample was measured once.

Osmolality

Osmolality of each sample was measured once by using an Osmomat 3000 D (serial number 300160266; Gonotec GmbH, Berlin, Germany).

Visual inspection

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

RESULTS

Validation of the RP-HPLC assay

The HPLC method was adopted from the stability-indicating method originally developed to analyse the bulk product and lyophilised powder of the licensed medicinal product.⁶ The

Table 3 Stability of carmustine (Carmustin Obvius, Carmubris) stock solution stored for 48 hours at 2–8°C in the punctured vial and carmustine infusion solutions (0.2 mg/mL, 1.0 mg/mL) diluted in 5% glucose injection solution (freeflex PP/PE bags) stored at 2–8°C for 60 hours; further 6 hours stored at 22°C under light protection

Carmustine-containing medicinal product	Initial carmustine concentration (mg/mL) ± RSD (%)		% Initial carmustine concentration remaining ± RSD (%) (n=9) Measured concentration 0 hour = 100%					
	Nominal	Measured	12 hours	24 hours	48 hours	60 hours	60+3 hours	60+6 hours
Carmustin Obvius	3.33	3.3707 (±0.57)	98.46 (±1.52)	96.87 (±1.11)	94.02 (±2.31)	NA		
Carmubris		3.3481 (±0.93)	99.61 (±0.68)	97.89 (±0.47)	95.45 (±0.76)			
Carmustin Obvius	0.2	0.2011 (±1.39)	96.84 (±0.60)	95.42 (±0.39)	93.03 (±0.22)	91.95 (±0.40)	89.82 (±0.49)	86.80 (±0.29)
Carmubris		0.1994 (±0.77)	97.79 (±0.28)	96.04 (±0.29)	93.81 (±0.25)	92.57 (±0.42)	91.76 (±1.78)	88.70 (±0.35)
Carmustin Obvius	1.0	0.9649 (±1.00)	NA	96.39 (±0.83)	95.47 (±0.56)	93.07 (±0.67)	NA	

The remaining carmustine concentration is expressed as mean ± RSD percentage rate (%) of nine measurements per time point (n=9). NA, not applicable; RSD, relative standard deviation.

Original research

Table 4 Stability of carmustine (Carmustin Obvius, Carmubris) infusion solutions (0.20 mg/mL, 1.00 mg/mL) diluted in 5% glucose injection solution (freeflex PP/PE bags), stored at 22°C for 11 hours under light protection

Carmustine-containing medicinal product	Initial carmustine concentration (mg/mL)±RSD (%)		% Initial carmustine concentration remaining±RSD (%) (n=9) Measured concentration 0 hour=100%			
	Nominal	Measured	3.5 hours	6 hours	8.5 hours	11 hours
Carmustin Obvius	0.2	0.2038 (±1.36)	96.47 (±0.51)	93.39 (±0.52)	91.07 (±0.39)	88.68 (±0.38)
Carmubris		0.2045 (±1.16)	96.08 (±0.31)	93.57 (±0.49)	91.36 (±0.30)	88.88 (±0.32)
Carmustin Obvius	1.0	0.9855 (±1.28)	96.41 (±0.86)	94.59 (±0.64)	92.14 (±0.76)	89.99 (±0.69)

The remaining carmustine concentration is expressed as mean±RSD percentage rate (%) of nine measurements per time point (n=9). RSD, relative standard deviation.

correlation coefficient of the modified assay attained by plotting the peak areas against the corresponding concentrations amounted to $R^2=0.999$ and proved linearity over the defined concentration range. The intra-day precision tests showed a mean carmustine concentration of 0.1965 mg/mL (98.25%)±0.66% relative standard deviation (RSD). The inter-day precision tests revealed a mean carmustine concentration of 0.1943 mg/mL (97.15%)±1.58% RSD. The results met the acceptance criteria based on ICH Q2 (R1)¹⁰ and proved reproducibility.

Stability of carmustine stock solutions and diluted infusion solutions

The HPLC chromatograms of the test solutions were consistently characterised by sharp peaks and retention times of about 7–8 min for the carmustine peak (see online supplemental figures 1 and 2). Peaks of related impurities and degradation products were not detected in the chromatograms during the stability tests. However, the peak area of the carmustine peak decreased rapidly in all test solutions prepared from the generic and the reference products. Detailed results regarding the loss of carmustine in the stock solutions and diluted infusion solutions during storage at 2–8°C and 22°C are shown in tables 3 and 4, respectively.

Immediately after reconstitution, the stock solutions of both products amounted to nearly 100% of the nominal carmustine content (specification 95–105%).⁷ The carmustine concentrations decreased to 94.02±2.31% (Carmustin Obvius) and 95.45±0.76% (Carmubris) after 48 hours storage under refrigeration. The in-use shelf life of the stock solutions of both products is therefore proven to be at least 48 hours when stored under refrigeration.

Carmustin Obvius 0.2 mg/mL and 1.0 mg/mL and Carmubris 0.2 mg/mL infusion solutions were found to be physicochemically stable for at least 60 hours when stored at 2–8°C, taking 90% of the initial concentration as acceptance criteria. Concerning the loss of carmustine, there was very little difference between

the low and high concentration test solutions and also the undiluted stock solutions (see tables 3 and 4). After subsequent storage of the test solutions at 22°C for 3 hours, the carmustine concentrations averaged the 90% limit set and fell below the 90% limit after 6 hours (Carmustin Obvius 86.8%, Carmubris 88.7%). When the infusion solutions were stored at 22°C from the beginning, the carmustine concentrations were about 91% after 8.5 hours and fell below the 90% limit after 11 hours.

pH, osmolarity and visual inspection

The results of the pH measurements for test solutions stored at 2–8°C and 22°C are shown in tables 5 and 6, respectively.

The initial pH values of the stock solutions were 5.9 for Carmustin Obvius and 6.5 for Carmubris. For both products, the measured pH values are higher than the indicated ones (Carmustin Obvius 4.0–5.0,¹ Carmubris 5.6–6.0²). The pH values of the stock solutions of both brand products fell continuously over a period of 48 hours (Carmustin Obvius pH 4.6, Carmubris pH 5.2). In addition, the initial pH values of the diluted infusion solutions surpassed pH 6, and also decreased over the observation period in test solutions of both medicinal products.

Measurement of the osmolarity showed that both products fulfilled the acceptance criteria of the official documents. No changes in osmolarity were registered during the observation period for stock solutions (~1900 mOsm/L) or for infusion solutions (~380 mOsm/L) of both manufacturers and for all storage temperatures. No visible particles or colour changes were found at any time.

DISCUSSION

Experimental conditions

The storage conditions were chosen according to the in-use shelf life given in the Summary of Product Characteristics (SmPC) and practicality issues in a pharmacy-based cytotoxic reconstitution

Table 5 pH of carmustine (Carmustin Obvius, Carmubris) stock solution stored for 48 hours at 2–8°C in the punctured vial and carmustine infusion solutions (0.20 mg/mL, 1.00 mg/mL) diluted in 5% glucose injection solution (freeflex PP/PE bags) stored at 2–8°C for 60 hours±further 6 hours stored at 22°C under light protection

Carmustine-containing medicinal product	Concentration (mg/mL)	Mean±SD pH (n=3)						
		Initial	12 hours	24 hours	48 hours	60 hours	60+3 hours	60+6 hours
Carmustin Obvius	3.33	5.91 (±0.41)	5.76 (±0.28)	4.84 (±0.08)	4.62 (±0.07)	NA		
Carmubris		6.53 (±0.06)	5.41 (±0.08)	5.42 (±0.10)	5.24 (±0.02)			
Carmustin Obvius	0.2	6.77 (±0.13)	6.51 (±0.05)	6.41 (±0.06)	6.39 (±0.08)	6.28 (±0.02)	6.08 (±0.07)	6.21 (±0.19)
Carmubris		6.79 (±0.10)	6.57 (±0.10)	6.17 (±0.22)	6.37 (±0.12)	5.42 (±0.15)	5.62 (±0.09)	4.98 (±0.15)
Carmustin Obvius	1.0	6.67 (±0.17)	NA	6.08 (±0.07)	5.57 (±0.14)	5.55 (±0.20)	NA	

Mean±SD pH of three measurements per sample per time point (n=3). NA, not applicable.

Table 6 pH of carmustine (Carmustin Obvius, Carmubris) infusion solutions (0.20 mg/mL, 1.00 mg/mL) diluted in 5% glucose injection solution (freeflex PP/PE bags), stored at 22°C for 11 hours under light protection

Carmustine-containing medicinal product	Concentration (mg/mL)	Mean±SD pH (n=3)				
		Initial	3.5 hours	6 hours	8.5 hours	11 hours
Carmustin Obvius	0.2	6.59 (±1.31)	5.32 (±6.51)	6.23 (±1.54)	5.36 (±5.10)	6.11 (±5.50)
Carmubris		4.90 (±6.98)	4.91 (±6.21)	5.25 (±2.38)	4.92 (±4.22)	4.82 (±4.63)
Carmustin Obvius	1.0	6.18 (±1.18)	5.77 (±2.23)	5.75 (±1.25)	5.57 (±1.67)	5.36 (±3.82)

Mean±RSD pH of three measurements per sample per time point (n=3).
RSD, relative standard deviation.

area. Therefore, stock solutions and diluted ready-to-administer infusion solutions were stored refrigerated, in accordance with common pharmacy practice. In order to simulate the administration procedure at room temperature, stability of the light-protected infusion solutions was studied at 22°C in a climatic chamber.

Acidic and especially base-induced decomposition of carmustine in aqueous media is described.^{14,15} Carmustine is most stable in aqueous buffered solutions in pH ranges from minimum 3.5 to maximum 5.0.^{3,4} Above pH 7, carmustine undergoes more rapid decomposition.¹¹ The pH of marketed G5 infusion solutions is usually lower than the pH of 0.9% NaCl solutions, thus favouring the stability of carmustine.⁵ Therefore, diluted infusion solutions were prepared by using prefilled G5 infusion bags (pH 4.3) as diluent solutions. Instead of glass containers, inert polyolefin bags (PP/PE) were used. Because of occupational safety, plastic containers are to be preferred and the suitability of PE containers is indicated for the generic product.^{1,5,6} Laskar and Ayres³ reported sorption of carmustine to polyvinylchloride, ethylene-vinyl acetate and polyurethane administration sets, but not to PE or glass surfaces. Significant sorption and incompatibility with the primary container were not expected. An administration set was not connected, and samples were directly withdrawn from the container.

Carmustine is relatively light-sensitive.⁴ Therefore, the test solutions were stored in an opaque plastic box and only exposed to fluorescent light during sampling. In clinical practice, light protection is ensured by covering the containers with lightproof bags and using opaque administration sets to avoid light-induced degradation.

Physicochemical stability

Carmustine decomposes in aqueous solution to form 2-chloroethylamine hydrochloride, acetaldehyde, nitrogen and carbon dioxide.¹² Because these degradation products are not absorbing UV light, degradation peaks were not traceable in the HPLC spectra. Further, the originator indicates that the reconstituted injection decomposes by zero order kinetics.¹³ At ambient and refrigerated temperatures, the anticipated loss is 6% in 3 hours and 4% in 24 hours, respectively. In our studies the loss of carmustine amounted to about 3% in 3 hours at 22°C and about 3% in 24 hours at refrigerated temperatures. The observed degradation rates at ambient temperature and the recommended infusion period of 1–2 hours limit the storage period of the infusion solutions at temperatures above 20°C and may result in carmustine concentrations lower than 90% when the infusion is completed. Of note, the remaining carmustine content of the generic product was equivalent to that reported by other investigators for the reference product.^{5,6}

The rate of degradation is considered to be independent of the carmustine concentration. Loss of carmustine was slightly higher in the more diluted infusion solutions (0.2 mg/mL) in

both temperature conditions. Eventually, sorption of lipophilic carmustine to the surface of the infusion bag becomes obvious when the concentration is lower and results in a higher sorption percentage rate. However, the effect seems to be minimal in PE bags and is likely to be irrelevant in clinical practice.⁷

It is noteworthy that the indicated pH values of the reconstituted generic and reference products differ by one pH unit although the solvents and excipients are identical (see table 1). Measured pH values of the reconstituted stock solutions and of the diluted carmustine infusion solutions were higher than indicated in the official documents. As the pharmaceutical form is a powder or a lyophilisate, this might be the reason why different pH values were measured after dissolution. Like Ostermann-Kraljevic *et al.*,⁷ we found that the decrease in pH is more intensive when the carmustine concentration is higher. This can be explained by the increased formation of acidic degradation products (eg, acetaldehyde).

Although the measured pH values were higher than those favouring stability,^{3,4} physicochemical stability was not reduced in our experiments. A limitation of our study is that we did not test 0.9% NaCl infusion solutions as a vehicle solution. However, we assume that the differing pH values of pure G5 (pH 4.3) and 0.9% NaCl infusion solutions (pH 5.98 declared pH 5.0–7.0) do not affect the pH of the admixtures and the physicochemical stability of carmustine infusion solutions to a relevant extent.

By using the same solvents, diluents and primary containers, equivalent degradation kinetics for the reference and generic medicine were found. Although PP/PE bags were used instead of glass containers, in our experiments the stability time of the

What this paper adds

What is already known on this subject

- ▶ The degradation of reconstituted and diluted carmustine-containing infusion solutions depends on pH, temperature and light.
- ▶ The physicochemical stability of the reconstituted and diluted carmustine originator product (Carmubris) was determined by HPLC assays and pH measurement.

What this study adds

- ▶ Physicochemical stability data of the reconstituted and diluted carmustine generic product (Carmustin Obvius) stored in a refrigerator or at room temperature.
- ▶ Carmustin Obvius and Carmubris reconstituted stock solutions are physicochemically stable for at least 48 hours when stored at 2–8°C.
- ▶ Carmustin Obvius and Carmubris infusion solutions 0.2 mg/mL or 1 mg/mL are physicochemically stable for at least 8.5 hours and 60 hours when stored at 22°C and 2–8°C, respectively.

Original research

diluted infusion solutions was longer than the in-use stability time given in the SmPCs of both medicinal products.

CONCLUSION

Identical carmustine losses were found in stock solutions and infusion solutions prepared in G5 polyolefin bags of the generic product (Carmustin Obvius) and the reference product (Carmubris). Degradation kinetics were shown to be independent of the initial concentration of carmustine. According to the physicochemical stability data, the shelf life (95% limit) of the refrigerated stock solution was 48 hours and the shelf life (90% limit) of the ready-to-administer infusion solution was 60 hours at 2–8°C or 8.5 hours at 22°C under light protection. These results facilitate the use of both medicinal products in a pharmacy-based centralised cytotoxic preparation unit.

Contributors LK carried out the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. IK supervised the project and checked the manuscript together with JL.

Funding The laboratory tests were funded by a specific grant of 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 required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, LK, upon reasonable request.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability

of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

REFERENCES

- 1 European Medicines Agency. Carmustine Obvius: summary of product characteristics, 2018. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/carmustine-obvius-epar-product-information_de.pdf [Accessed 20 Sep 2020].
- 2 Tillomed Pharma GmbH. Carmubris® Pulver und Lösungsmittel Zur Herstellung einer Infusionslösung, 2018. Available: http://www.tillomed-pharma.de/fachinformationen/fachinfo_Carmubris.pdf [Accessed 20 Sep 2020].
- 3 Laskar PA, Ayres JW. Degradation of carmustine in aqueous media. *J Pharm Sci* 1977;66:1073–6.
- 4 Fredriksson K, Lundgren P, Landersjö L. Stability of carmustine—kinetics and compatibility during administration. *Acta Pharm Suec* 1986;23:115–24.
- 5 Hadji-Miraglou-Gonzalez MF, Gayte-Sorbier A, Airaudo CB, et al. Effects of temperature, solution composition, and type of container on the stability and absorption of carmustine. *Clin Ther* 1992;14:821–4.
- 6 Favier M, De Cazanove E, Coste A, et al. Stability of carmustine in polyvinyl chloride bags and polyethylene-lined trilayer plastic containers. *Am J Health Syst Pharm* 2001;58:238–41.
- 7 Ostermann-Kraljevic S, Berger M, Voeltray M, et al. Stability and compatibility studies of antineoplastic agents in glass and polyethylene containers. *EHP Science* 1999;5:167.
- 8 Allamneni Y, Murthy T, Venkata M, et al. Validation of RP-HPLC analytical method for estimation of carmustine in bulk and lyophilized vials. *Indo Am J Pharm* 2017;7:416–23.
- 9 European Medicines Agency. Assessment report Carmustine Obvius, 2018. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/carmustine-obvius-epar-public-assessment-report_en.pdf [Accessed 20 Sep 2020].
- 10 International Conference on Harmonisation. Harmonized tripartite guidelines for validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 1994.
- 11 Loo TL, Dixon RL, Dixon RL, et al. The antitumor agent, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *J Pharm Sci* 1966;55:492–7.
- 12 Montgomery JA, James R, McCaleb GS, et al. The modes of decomposition of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and related compounds. *J Med Chem* 1967;10:668–74.
- 13 Association of British Pharmaceutical Industry. *ABPI compendium of datasheets and product characteristics 1999–2000: with the code of practice for the pharmaceutical industry*. London: Datapharm Publications, 1998: 238.

**In-use stability of ready-to-administer daratumumab subcutaneous
injection solution in plastic syringes**

Knoll L, Thiesen J, Klassen MD, Reinders LMH, Tuerk J, Kraemer I.

Eur J Hosp Pharm. 2023 October 3.

<https://ejhp.bmj.com/content/early/2023/10/25/ejhpharm-2023-003928>

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

In-use stability of ready-to-administer daratumumab subcutaneous injection solution in plastic syringes

Laura Knoll ¹, Judith Thiesen,¹ Martin D Klassen,² Lars M H Reinders,² Jochen Tuerk,² Irene Kraemer¹

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/ejpharm-2023-003928>).

¹Pharmacy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

²Institut für Umwelt & Energie Technik & Analytik e V (IUTA), Duisburg, Germany

Correspondence to Laura Knoll, Pharmacy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Rheinland-Pfalz, Germany; Laura.knoll@unimedizin-mainz.de

Received 21 July 2023
Accepted 3 October 2023

EAHP Statement 3: Production and Compounding. EAHP Statement 5: Patient Safety and Quality Assurance.

 Check for updates

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

To cite: Knoll L, Thiesen J, Klassen MD, et al. *Eur J Hosp Pharm* Epub ahead of print: [please include Day/Month/Year]. doi:10.1136/ejpharm-2023-003928

ABSTRACT

Objective In multiple myeloma patients, daratumumab is preferably injected subcutaneously. The summary of product characteristics of daratumumab subcutaneous injection solution specifies physicochemical stability for the prepared syringe for 24 hours at 2–8°C protected from light, and another 12 hours at room temperature (15–25°C) in ambient light conditions. The aim of this study was to determine the in-use stability of ready-to-administer daratumumab subcutaneous injection solution in different types of syringe and different conditions over a 28-day period.

Methods Daratumumab subcutaneous (DARZALEX 1800 mg) injection solution was withdrawn into disposable three-piece Luer-Lock syringes (20 mL, 50 mL), capped, and stored light protected at 2–8°C or at room temperature (22±2°C) over a maximum period of 28 days. Samples were taken immediately after preparation (day 0) and after 2, 7, 14, 21, and 28 days. Physicochemical stability was determined by ion-exchange high-performance liquid chromatography (IE-HPLC) and size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) with ultraviolet detection, pH measurement and visual inspection for particles or colour changes.

Results In the IE-HPLC assay, peak areas and peak-to-peak area ratios remained unchanged over the whole study period, and showed no additional peaks of degraded daratumumab charge variants. In the SE-HPLC assay, neither a formation of aggregates nor of fragments was detected. Daratumumab monomer concentrations exceeded 95% of the initially measured concentrations over the entire test period. pH values remained constant. Test solutions remained clear, and no colour changes or visible particles were detected. All results were independent of storage conditions.

Conclusion Daratumumab subcutaneous injection solution proved to be physicochemically stable in capped three-piece plastic syringes for at least 28 days when stored light protected at 2–8°C or at room temperature (22±2°C). For microbiological reasons aseptic preparation and refrigerated storage are recommended. In-use stability of ready-to-administer daratumumab subcutaneous syringes prepared under appropriate aseptic conditions is given for 28 days.

INTRODUCTION

Daratumumab, a monoclonal human antibody (type IgG1κ), binds to CD38 antigen, which is overexpressed in multiple myeloma cells. Binding of daratumumab induces tumour cell lysis by complement-dependent cytotoxicity, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and

WHAT IS ALREADY KNOWN ON THIS TOPIC

⇒ Daratumumab subcutaneous injection solution is physicochemically stable in plastic syringes stored refrigerated for 24 hours and an additional 12 hours at room temperature (15–25°C) in ambient light conditions.

WHAT THIS STUDY ADDS

⇒ This study found prolonged physicochemical stability data of daratumumab subcutaneous injection solutions. Qualitative and quantitative prolonged stability data were based on validated orthogonal analytical methods. Daratumumab subcutaneous injection solution is physicochemically stable in three-piece plastic syringes for 28 days stored refrigerated (2–8°C) or at room temperature (22±2°C) while light protected.

HOW THIS STUDY MIGHT AFFECT RESEARCH, PRACTICE OR POLICY

⇒ The findings allow for the preparation of ready-to-administer daratumumab subcutaneous injection solution in advance under aseptic conditions. They also allow for efficient preparation in pharmacy-based centralised cytotoxic preparation units.

antibody-dependent cellular phagocytosis. Furthermore, tumour cells are driven into apoptosis after Fc (fragment crystallisable) mediated cross-linking, and CD38 enzymatic activity is modified by inhibiting cyclase activity and stimulating hydrolase activity.¹

Daratumumab is indicated as combination therapy in adult patients with newly diagnosed multiple myeloma who are ineligible (in combination with lenalidomide and dexamethasone or with bortezomib, melphalan and prednisone) or eligible (in combination with bortezomib, thalidomide and dexamethasone) for autologous stem cell transplantation. Furthermore, daratumumab is licensed to treat adult patients with relapsed and refractory multiple myeloma.²

Intravenous daratumumab (DARZALEX 20 mg/mL) concentrate for solution for infusion was introduced in the European market as first-in-class CD38 monoclonal antibody in 2016. In addition, the subcutaneous daratumumab formulation (DARZALEX 1800 mg) entered the market in 2020. Whereas the intravenous formulation is dosed patient-individually with 16 mg/kg and infused over a period of about 3–7 hours, the subcutaneous

Original research

formulation is injected as fixed dose (1800 mg, 15 mL) over 3–5 min into the abdominal wall. The objective response rates of both formulations showed comparable results (37% vs 41%), while more infusion-related reactions were observed during intravenous administration.³ Thus, the subcutaneous formulation promotes efficacy and safety of drug administration.

In general, daratumumab infusion/injection solutions are prepared in pharmacy-based centralised cytotoxic preparation units. Thus, pharmacists are responsible for assessing the shelf-life of these preparations by considering the physicochemical and microbiological stability. The manufacturer specified the shelf-life of unopened daratumumab subcutaneous to be 2 years stored at 2–8°C and 24 hours at 2–8°C protected from light, and another 12 hours stored at room temperature (15–25°C) in ambient light in plastic syringes.² Since the solution with its stabilising excipients is not further diluted, impairment of stability during storage in syringes seems unlikely, and prolonged physicochemical stability is worth investigating. Of note, preliminary investigations of daratumumab intravenous infusion solutions stored refrigerated over 14 days in infusion bags did not show physicochemical instability.⁴ Further stability data, especially for the subcutaneous formulation, are necessary to improve efficient preparation of daratumumab subcutaneous syringes.

Therefore, the objective of our study was to determine in-use stability of ready-to-administer daratumumab subcutaneous injection solution in three-piece plastic syringes as primary containers over a period of 28 days. Physicochemical stability was analysed by ion-exchange high-performance liquid chromatography (IE-HPLC) and size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC), with ultraviolet detection, measurement of pH and observation for visible particles and colour changes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of test solutions

Stability tests of daratumumab were performed with 12 vials of the marketed medicinal product DARZALEX 1800 mg injection solution (Janssen-Cilag International NV, batch LJS3V00, expiry October 2022; and batch LIS4Z01, expiry September 2022). Each vial contained 1800 mg daratumumab together with the excipients; that is, recombinant human hyaluronidase (rHuPH20), L-histidine, L-histidine hydrochloride monohydrate, methionine, polysorbate 20, sorbitol (E420) and water for injection ad 15 mL.⁵ The content of each vial was either transferred into six syringes, type BD Plastipak Luer-Lock-Spritzen 20 mL (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany, batch 2112042, expiry 30 November 2026) or into six syringes, type Original-Perfusor-Spritzen 50 mL (B. Braun SE, Melsungen, Germany, batch 22A14D8007, expiry 1 January 2027). The syringes were capped with combi-stoppers (Combi-Stopper, B. Braun SE, Melsungen, Germany, batch 22A27A8151, expiry 3 January 2027). Three 20 mL syringes and three 50 mL syringes were stored either refrigerated (Kühlzelle Viessmann, type TE1200*20230*60) at 2–8°C or in a climatic chamber (Klimaschrank Memmert IPP55 Plus, V214.0024) at 22±2°C for 28 days protected from light.

Preparation of samples

1.0 mL samples were withdrawn from each test solution immediately after filling (day 0) and after 2, 7, 14, 21 and 28 days of storage.

Samples for HPLC (IE-HPLC, SE-HPLC)

For the HPLC assays, samples of daratumumab 120 mg/mL test solutions were diluted. In dilution step 1, 100 µL daratumumab test solution was mixed with 900 µL water (Elga Veolia, PURELAB Chorus 1). In dilution step 2, 200 µL of the 12 mg/mL daratumumab solution was mixed with 1000 µL water, resulting in 2.0 mg/mL daratumumab samples.

Samples for pH measurement and visual inspection

Undiluted samples were used for measurement of pH, and inspected for visible particles and colour changes at each sampling time point.

HPLC ASSAYS

IE-HPLC

Daratumumab charge variants were determined by using a gradient IE-HPLC assay. Propac WCX-10 precolumn (BioLC Analytical 4 mm x 50 mm, 10 µm Thermo Fisher Scientific, Reinach, Switzerland) and analytical column (BioLC Analytical 4 mm x 250 mm, 10 µm Thermo Fisher Scientific, Reinach, Switzerland) were used. Sample temperature was set to 2–8°C, and column temperature was set to 35°C. Run time was 51 min, starting with 99% buffer A (20 mM MES+60 mM NaCl pH 6.0) to 60% buffer B (20 mM MES+180 mM NaCl pH 6.0) in 31 min, then 99% buffer B for 10 min and re-equilibration with 99% buffer A for 10 min. 25 µL samples were injected in triplicate using a G1367E autosampler (Agilent, Waldbronn, Germany), and analysed using an Agilent 1200 LC system with a G1312B binary pump (flow rate 0.8 mL/min) connected to an Agilent G1315C DAD SL Diodearray Detector (detection wavelength 280 nm). Data were collected and processed using OpenLab CDS ChemStation Edition (revision C.01.09 [144]). The individual peak areas of the peak spectrum were recorded by manual integration from minimum to minimum.

SE-HPLC

The molecular size distribution of daratumumab was determined by an isocratic SE-HPLC assay. The assay comprised a TSKgel column (G3000SWXL 7.8 x 300 mm, 5 µm, Tosoh Bioscience) and phosphate-buffered saline (150 mM) as mobile phase. Sample temperature was set to 2–8°C, and column temperature was set to 40°C. Run time was 20 min. 1 µL samples were injected in triplicate by a Shimadzu SIL20AC autosampler, and analysed using a Shimadzu LC-20-AD Prominence pump (flow rate 1.0 mL/min) connected to a Shimadzu SPD10AV UV detector (detection wavelength 280 nm). Data were collected and processed using Analyst software (version 1.7.2.).

Validation of the HPLC assays

To demonstrate the robustness of the analyses, the HPLC methods used were validated according to the ICH Guideline Q2 (R1) validation of analytical procedures.⁵ Validation procedures were performed with a licensed medicinal product (DARZALEX 1800 mg injection solution, batch LGS4D06, expiry July 2022, batch LLS0J01, expiry November 2022), because chemical reference substance was not available.

For validation of the IE-HPLC assay, three freshly prepared standards of daratumumab were measured in triplicate. For linearity testing of the SE-HPLC assay, daratumumab was diluted with water in two dilution steps, resulting in calibration standards of 1.0, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4 and 3.0 mg/mL. Aliquots of each calibration standard were injected in triplicate. The

calibration curve was obtained by plotting the peak area against the nominal concentration.

Intraday and interday accuracy and precision of both HPLC assay methods were validated by analysing 10 daratumumab 2.0 mg/mL solutions on five consecutive days. Test solutions were freshly prepared every day. Test solution numbers 1 and 10 were injected in triplicate, and test solution numbers 2–9 were injected single fold on days 1–5.

Suitability of the methods was proven by forced degradation experiments. Stress conditions used were similar to those previously published,⁶ adjusted when required and set to test concentrations of 2.0 mg/mL by dilution with the respective mobile phase. For oxidation, samples were incubated with 1% hydrogen peroxide solution (H₂O₂ 1%) and/or 0.1% hydrogen peroxide solution (H₂O₂ 0.1%), and stored for 3 hours at 30°C. Acidic (pH 2, 60°C for 2 hours) and alkaline (IE-HPLC pH 12, 30°C for 24 hours; SE-HPLC pH 11, 60°C for 3 hours) stressed test solutions were neutralised before analysis. Protein aggregation was induced by thermal stress (60°C for 3 hours).

pH measurement

The pH values were measured using a Seven Compact S210 pH metre equipped with an InLab Micro Pro-ISM electrode (Mettler Toledo, Greifensee, Germany). The pH metre was calibrated with standard buffer solutions pH 2.00 (batch 1F317E, Mettler Toledo), pH 4.01 (batch 1G207E, Mettler Toledo), pH 7.00 (batch P05202M, Carl Roth), pH 9.21 (batch 1G083C, Mettler Toledo) and pH 11.00 (batch 1F325F, Mettler Toledo). Functional testing was carried out with a pH 7.00 standard buffer solution (batch P05202M, Carl Roth, accepted deviation ±0.05) directly before each measurement. Each sample was measured once.

Visual inspection

According to the summary of product characteristics, daratumumab concentrate is supposed to be clear to opalescent, and colourless to yellow.² All test solutions were visually examined for visible particles and colour changes whenever samples were withdrawn.

Acceptance criteria

Acceptance criteria for both HPLC methods were set to a maximum of 5% loss of the initial concentrations, and no more than 2% increase of the degradation peaks relative to the main peak. Acceptance criteria for pH measurement were set to pH change <0.5.⁷ Test solutions with no visual particles or no colour changes were defined as physicochemically stable.

RESULTS

Validation of the IE-HPLC assay

Figure 1B shows a representative chromatogram of daratumumab subcutaneous injection solution immediately after puncturing the vial. Four daratumumab peaks were identified, with peak 1 and 2 corresponding to the acidic charge variants, and peak 4 corresponding to the basic charge variant of the main peak (peak 3). In figure 2A–D, the resulting chromatograms of forced degradation tests are given. Acidic, alkaline and oxidative degradation lead to significant decreases of the main peak (figure 2A,B,D) and formation of degradation peaks (figure 2A,D). Degradation peaks were clearly separated from the daratumumab parent peaks.

Intraday and interday precision of the IE-HPLC assay are summarised in the online supplemental table. Subsequent injections resulted in incremental overlapping of peak 2 and the main peak. As a consequence, the ratio of the peak area of peak 2 to the total peak area is lower for the intraday precision than for the interday precision (see online supplemental table 1). The

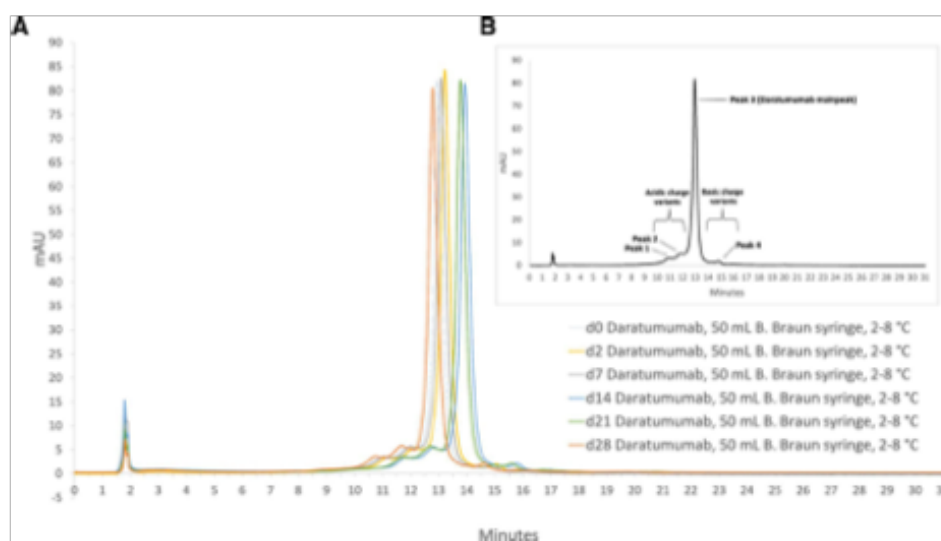


Figure 1 (A) Overlay of IE-HPLC chromatogram profiles for daratumumab stored in 50 mL three-piece syringes at 2–8°C for 28 days. (B) Representative IE-HPLC chromatogram of freshly prepared 2.0 mg/mL daratumumab solution (DARZALEX 1800 mg injection solution). IE-HPLC, ion-exchange high-performance liquid chromatography.

Original research

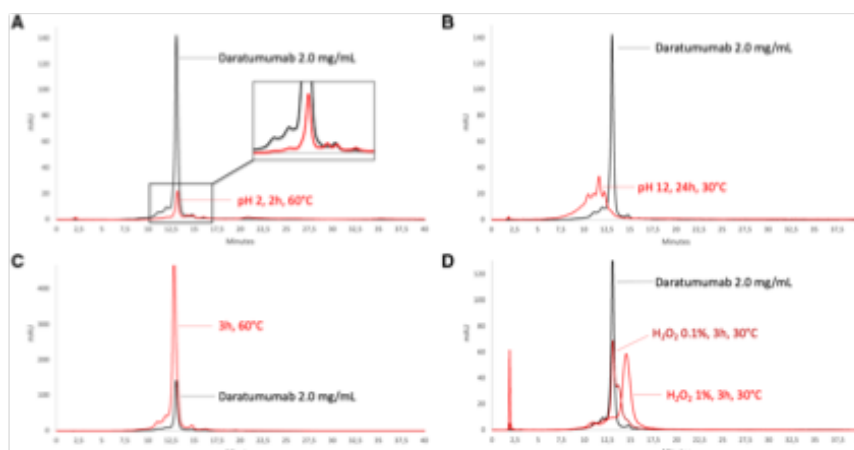


Figure 2 (A–D) Overlay of IE-HPLC chromatograms of freshly prepared 2.0 mg/mL daratumumab subcutaneous injection solution (black line) and degraded daratumumab subcutaneous injection solution (red line). Degradation conditions: (A) pH 2, 2 hours, 60°C; (B) pH 12, 24 hours, 30°C; (C) 3 hours, 60°C; (D) H₂O₂ 0.1% and H₂O₂ 1%, 3 hours, 30°C. IE-HPLC, ion-exchange high-performance liquid chromatography.

decrease of the ratio of the main peak (peak 3) corresponds to the increased area of peak 2.

Validation of the SE-HPLC assay

SE-HPLC chromatograms of daratumumab solutions were consistently characterised by the monomer peak at retention time (t_R) around 8.3 min. In figure 3A–D the resulting chromatograms of forced degraded daratumumab are given. All types of stress conditions led to changes in the main peak height, either

decrease (acid, thermal stress figure 3A,C) or increase (alkaline, oxidative stress figure 3B,D). Moreover, acidic and oxidative stress conditions caused the appearance of secondary peaks (soluble high molecular weight products (HMWP), low molecular weight products (LMWP)) not interfering with the daratumumab main peak, thereby demonstrating the suitability of the assay (figure 3A,D).

The correlation coefficients of the assay amounted to $R^2=0.999$ and proved linearity over the defined concentration

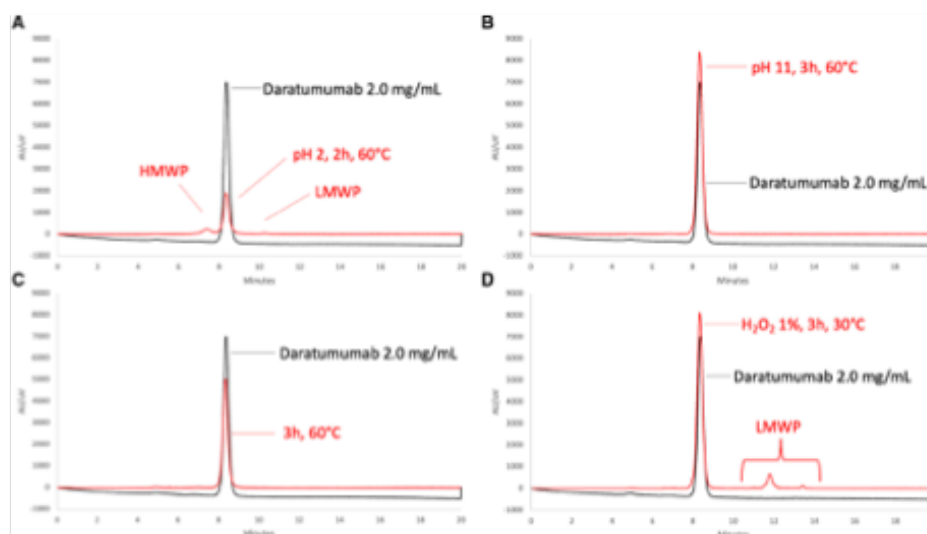


Figure 3 (A–D) Overlay of SE-HPLC chromatograms of freshly prepared 2.0 mg/mL daratumumab subcutaneous injection solution (black line) and degraded daratumumab subcutaneous injection solution (red line). Degradation conditions: (A) pH 2, 2 hours, 60°C; (B) pH 11, 3 hours, 60°C; (C) 3 hours, 60°C; (D) H₂O₂ 1%, 3 hours, 30°C. HMWP, high molecular weight products; LMWP, low molecular weight products; SE-HPLC, size-exclusion high-performance liquid chromatography.

Table 1 Stability of daratumumab subcutaneous injection solution in B. Braun 50 mL and BD 20 mL syringes stored at 2–8°C or 22±2°C for 28 days determined via IE-HPLC. Results expressed as % peak area of the total peak area (100%) ±SD (n=9)

Time point (day)	IE-HPLC assay							
	2–8°C Peak area (%)±SD (n=9)				22±2°C Peak area (%)±SD (n=9)			
	Peak 1	Peak 2	Peak 3 (Main peak)	Peak 4	Peak 1	Peak 2	Peak 3 (Main peak)	Peak 4
	B. Braun 50 mL				B. Braun 50 mL			
0	0.9±0.06	1.0±0.07	97.0±0.15	1.1±0.04	0.9±0.06	1.1±0.07	96.8±0.13	1.1±0.03
2	0.9±0.06	1.1±0.04	96.9±0.15	1.1±0.09	0.9±0.07	1.2±0.08	96.7±0.11	1.2±0.09
7	0.9±0.04	1.0±0.06	97.0±0.10	1.1±0.07	0.9±0.05	1.0±0.03	96.9±0.10	1.1±0.07
14	1.0±0.03	1.2±0.06	96.7±0.10	1.1±0.08	1.1±0.05	1.1±0.04	96.6±0.11	1.2±0.07
21	1.0±0.07	1.2±0.06	96.7±0.08	1.1±0.03	1.1±0.05	1.0±0.05	96.7±0.07	1.2±0.06
28	0.9±0.06	1.0±0.07	96.9±0.12	1.1±0.05	1.3±0.03	0.9±0.05	96.6±0.07	1.2±0.06
	BD 20 mL				BD 20 mL			
0	0.9±0.06	1.1±0.06	96.9±0.12	1.1±0.08	0.9±0.08	1.2±0.05	96.7±0.15	1.2±0.08
2	0.9±0.07	1.2±0.05	96.8±0.13	1.1±0.06	1.0±0.08	1.2±0.08	96.8±0.17	1.1±0.09
7	0.9±0.07	1.1±0.06	97.0±0.11	1.0±0.09	1.0±0.08	1.0±0.04	96.9±0.11	1.1±0.07
14	0.9±0.04	1.3±0.06	96.7±0.12	1.1±0.08	1.1±0.06	1.1±0.08	96.6±0.15	1.2±0.08
21	0.9±0.03	1.2±0.07	96.8±0.12	1.1±0.08	1.1±0.05	1.0±0.07	96.7±0.08	1.2±0.04
28	0.9±0.08	1.0±0.03	96.9±0.08	1.1±0.05	1.3±0.06	0.9±0.06	96.6±0.05	1.3±0.05

IE-HPLC, ion-exchange high-performance liquid chromatography; SD, standard deviation.

range. The intraday precision test showed a mean daratumumab concentration of 120.58 mg/mL (100.5%) ±0.40% relative standard deviation (RSD). The interday precision tests revealed a mean daratumumab concentration of 120.28 mg/mL (100.23%) ±1.13% RSD.

Daratumumab subcutaneous injection solution analysed by IE-HPLC

Peak areas of the main peak and charge variants are given in table 1 as percentage rates of the total peak area. Peak area ratios met the acceptance criteria (main peak deviation ≤5%) regardless of the type of primary container or storage condition. In addition, the height of the main peak remained unchanged over the entire study period, and no significant changes of the charge variant profile were found (figure 1A).

Daratumumab subcutaneous injection solution analysed by SE-HPLC

All monomer peaks were checked for changes in peak area and peak height, and the chromatograms were inspected for the formation of secondary peaks such as HMWP and LMWP. No systematic or substantial changes were observed in any of the solutions tested regardless of storage temperature. Neither

storage in siliconised B. Braun 50 mL three-piece syringes nor in BD 20 mL three-piece syringes caused aggregation characterised by HMWP. Detailed results are shown in table 2. All main peaks met the acceptance criteria (main peak deviation ≤5%).

Visual inspection and pH

Results of the pH measurements are given in table 3. pH values remained constant between pH 5.64 and 5.72 over the entire test period, independent of the syringe type and storage temperature. No visible particles or colour changes were observed at any time.

DISCUSSION

Physicochemical stability of daratumumab subcutaneous injection solution was analysed by orthogonal analytical methods, to facilitate allocation of extended in-use stability and efficient pharmacy-based aseptic preparation. As the injection concentrate is just transferred into plastic syringes, stability could only be affected by storage temperature or by contact with airborne oxygen and the siliconised inner surfaces of the syringes. This was not the case over the 28-day observation period. Qualitative and quantitative changes of daratumumab variants were minimal. The injection solution proved to be physicochemically stable in both types of syringes and under both storage temperatures over

Table 2 Stability of daratumumab subcutaneous injection solution in B. Braun 50 mL and BD 20 mL syringes stored at 2–8°C or 22±2°C for 28 days determined via SE-HPLC. Results expressed as % remaining daratumumab concentration ±SD (n=9), initial concentration day 0 set as 100%

Syringe type, storage temperature	SE-HPLC assay							
	Initial daratumumab monomer concentration (mg/mL)±SD (n=9)		Daratumumab concentration remaining ±SD (n=9) measured concentration day 0=100%					
	Nominal	Measured (day 0)	d2	d7	d7*	d14*	d21*	d28*
B. Braun 50 mL, 2–8°C	120	119.05±1.6	100.6±1.0	97.7±0.8	98.2±0.8	98.1±0.6	99.1±1.0	99.7±0.7
BD 20 mL, 2–8°C	120	118.88±1.0	99.9±0.5	97.9±0.5	98.4±0.5	98.2±0.4	99.0±0.5	100.2±0.7
B. Braun 50 mL, 22±2°C	120	119.48±1.1	99.5±0.7	97.2±0.4	98.1±0.6	97.9±0.4	98.2±0.6	99.6±0.3
BD 20 mL, 22±2°C	120	119.05±1.0	99.2±0.8	96.9±0.5	97.9±0.6	97.9±1.8	98.1±0.8	99.6±0.7

*Results obtained with new column (R²=1.000).

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

Original research

Table 3 pH of daratumumab subcutaneous injection solution in B. Braun 50 mL and BD 20 mL syringes stored at 2–8°C or 22±2°C for 28 days. Results expressed as mean pH±SD (n=3)

Syringe type, storage temperature	pH±SD (n=3)					
	d0	d2	d7	d14	d21	d28
B. Braun 50 mL, 2–8°C	5.67±0.02	5.68±0.03	5.68±0.04	5.72±0.04	5.68±0.06	5.71±0.03
BD 20 mL, 2–8°C	5.69±0.01	5.66±0.01	5.65±0.02	5.68±0.02	5.68±0.01	5.69±0.01
B. Braun 50 mL, 22±2°C	5.71±0.02	5.64±0.01	5.67±0.01	5.70±0.01	5.65±0.01	5.70±0.02
BD 20 mL, 22±2°C	5.70±0.01	5.64±0.02	5.69±0.02	5.69±0.01	5.68±0.01	5.70±0.03

SD, standard deviation.

the entire study period. Impurities and daratumumab degradation products were not detected.

Full characterisation of monoclonal antibodies requires various analytical methods to determine the primary and higher order structures, and the heterogeneity of the charge, size and glycan variants. A limited number of analytical methods are used for stability testing. In this study, test methods were chosen in accordance with the recommendations of a European consensus group.⁸ IE-HPLC and SE-HPLC are considered to be the most appropriate stability-indicating assays.^{9,10} IE-HPLC is used to determine acidic and basic charge variants resulting from post-translational modification (eg, C-terminal lysine truncation, glycation) or degradation (eg, deamidation).¹¹ SE-HPLC is used to detect aggregates and fragments. In accordance with the recommendations of the NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee,⁷ the unmanipulated or freshly manipulated licensed medicine was used as a reference standard. Sample numbers, measuring time points and temperature conditions were chosen according to the specifications of the NHS committee,⁷ while the sampling technique and primary packaging were chosen according to clinical practice.

In IE-HPLC chromatograms, four peaks of daratumumab variants (two acidic, one main and one basic variant) were detected. Similar results were reported for daratumumab by Duivelshof *et al*¹¹ and for other monoclonal antibodies,^{12–17} reflecting the microheterogeneity of biotechnologically produced products. During our forced degradation studies, thermal and alkaline stress caused daratumumab degradation and increased the rates of acidic variants. Small drifts of the t_R are only related to small variations of the method; for example, varying batches of the mobile phases (figure 1A). Storage of daratumumab subcutaneous injection solution at room temperature over a period of 28 days did not cause any degradation. This finding is in accordance with the results of Duivelshof *et al*, reporting that elevated temperature stresses daratumumab samples less than thermal stress combined with pH changes.¹¹

No secondary peaks were detected in SE-HPLC chromatograms, indicating the absence of fragmentation or aggregation after contact with siliconised inner surfaces of the syringes under both storage conditions. Fragmentation and aggregation were also not found when Mangoni *et al* studied the stability of diluted daratumumab infusion solutions in low-density polyethylene infusion bags stored refrigerated over a period of 14 days.⁴ Results of IE-HPLC and SE-HPLC revealed that no adsorption occurred by contact with various inner surfaces of the syringes.

Physicochemical stability of daratumumab subcutaneous test solutions was also proven by unchanged pH values and the absence of visible particles. Subvisible particles were not measured, which might be taken as a limitation. However, formation of subvisible particles is unlikely, because the injection solution formulated with its stabilising excipients was withdrawn into syringes without any further dilution. Moreover, the

limited volume of the test solutions did not allow measurement of subvisible particles according to the pharmacopoeia. Similar investigations of rituximab and trastuzumab subcutaneous formulations did not show major differences in the number of subvisible particles over time.^{15,16} When Mangoni *et al* measured subvisible particle formation by dynamic light scattering in diluted daratumumab infusion solutions, no significant increase in particle count was detected, even after 14 days of refrigerated storage.⁴

Another limitation of our study is that we did not investigate the stability of the excipients, especially the activity of hyaluronidase. Hyaluronidase is present in most subcutaneous formulations, and accelerates the resorption of the active ingredient after subcutaneous injection.¹⁸ Stability of hyaluronidase in the daratumumab subcutaneous formulation is proven by the license procedure. Transfer of rituximab¹⁵ and trastuzumab¹⁶ subcutaneous formulations into three-piece syringes did not alter the hyaluronidase activity. To the best of our knowledge, there are no available data in literature restricting the stability of the medicinal product based on a decrease of hyaluronidase activity. Nevertheless, investigations regarding the activity of hyaluronidase (eg, in the form of an activity-based (enzymatic) assay) would allow additional statements regarding the stability and efficacy of the medicinal product.

A recently published study investigated the viability of different facultative pathogenic microorganisms in diluted daratumumab infusion solutions.¹⁹ Microorganisms remained viable in diluted daratumumab solutions, but pronounced growth supporting activity was not reported. Nevertheless, refrigerated storage of ready-to-use daratumumab syringes is recommended from a microbiological perspective. Moreover, controlled and validated aseptic conditions are required for the preparation of ready-to-use preparations. In case of given microbiological stability allocation of in-use stability according to the proven 28-day physicochemical stability is accepted.²⁰

CONCLUSION

Physicochemical stability of daratumumab ready-to-administer subcutaneous injection solution in three-piece Luer-Lock syringes was demonstrated by orthogonal methods over a period of 28 days. No substantial changes were observed by any of the analytical methods used, regardless of storage temperature and type of primary container. Therefore, daratumumab subcutaneous injection solution withdrawn into BD or B. Braun syringes can be prepared in advance and stored for up to 28 days. From a microbiological point of view, refrigerated storage is recommended.

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

Contributors UK: investigation, validation, data curation, writing original draft preparation, guarantor. JT and IK: resources, conceptualisation, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition, guarantors. LR and

MK: support in method establishment, proof reading. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not applicable.

Ethics approval Not applicable.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available upon reasonable request.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

ORCID ID

Laura Knoll <http://orcid.org/0009-0000-5717-4560>

REFERENCES

- European Medicines Agency. Assessment report darzalex. 2021. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/darzalex-h-c-4077-i-0044-epar-assessment-report-variation_en.pdf [Accessed 23 Feb 2023].
- European Medicines Agency. Summary of product characteristics darzalex 1800 mg injection solution. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/darzalex-epar-product-information_en.pdf [Accessed 23 Feb 2023].
- European Medicines Agency. Assessment report darzalex. 2020. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/darzalex-h-c-4077-a-0032-epar-assessment-report-extension_en.pdf [Accessed 15 Jun 2023].
- Mangoni G, Selmin E, Camuffo L, et al. 3PC-015 short term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody daratumumab. 25th EAHP Congress, 25th–27th March 2020, Gothenburg, Sweden; March 2020.
- International Conference on Harmonization. Harmonized tripartite guidelines for validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 1995. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf [Accessed 6 Mar 2023].
- Nowak C, K Cheung J, M Dellatore S, et al. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: a practical guide. *MAbs* 2017;9:1217–30.
- NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. A standard protocol for deriving and assessment of stability, part 2 aseptic preparations (Biopharmaceuticals). 2021. Available: <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2017/03/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v5.pdf> [Accessed 16 Jun 2023].
- Bardin C, Astier A, Vubo A, 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, et al. An industry perspective on forced degradation studies of biopharmaceuticals: survey outcome and recommendations. *J Pharm Sci* 2020;109:6–21.
- Goyon A, D'Atri V, Bobaly B, et al. Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. 1 – non-denaturing chromatographic techniques. *Journal of Chromatography B* 2017;1058:73–84.
- Duiwelshof BL, Fekete S, Guillaume D, et al. A generic workflow for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies-application to daratumumab. *Anal Bioanal Chem* 2019;411:4615–27.
- Hui A, Yin J, Liu W, et al. Prolonged in-use stability of diluted atezolizumab in commercial intravenous bags. *Int J Pharm Compd* 2021;25:246–57.
- Bardo-Brouard P, Vieillard V, Shekarian T, et al. Stability of ipilimumab in its original vial after opening allows its use for at least 4 weeks and facilitates pooling of residues. *Eur J Cancer* 2016;58:8–16.
- Vieillard V, Paul M, Ibrahim T, et al. Extended stability of the rituximab biosimilar CT-P10 in its opened vials and after dilution and storage in polyolefin bags. *Ann Pharm Fr* 2017;75:420–35.
- Mueller C, Dietel E, Heynen SR, et al. Physico-chemical stability of mabthera drug-product solution for subcutaneous injection under in-use conditions with different administration materials. *Int J Pharm Compd* 2015;19:261–7.
- Nalenz H, Schönhammer K, Dietel E, et al. Compatibility of herceptin SC with SC administration materials. ESCP Symposium Abstract book; 2014.
- Almasi J, Thiesen J, Krämer I. Physicochemical stability of durvalumab (Imfinzi®) concentrate for solution in original vials after first opening. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2023;8.
- Usage information: HYLASE® Dessau 1500 IU, powder for solution for injection. 2012. Available: https://www.medikamente-par-klick.de/images/e-commerce/06/78/06785611_2012-06_de_o.pdf [Accessed 30 Jun 2023].
- 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;10781552231179185:10781552231179185.
- Crauste-Manciet S, Krämer I, Lagarde E, et al. GERPAC consensus conference – guidance on the assignment of microbiological shelf-life for hospital pharmacy aseptic preparations. *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy* 2020;5.

**Focused physicochemical stability study of reconstituted
Trastuzumab biosimilar SB3 (Ontruzant[®]) stored in the original vials over 28 days**

Knoll L, Thiesen J, Kraemer I.
Pharm Technol Hosp Pharm. 2024 May 10.
<https://doi.org/10.1515/pthp-2024-0001>

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



Laura Knoll*, Judith Thiesen and Irene Krämer

Focused physicochemical stability study of reconstituted trastuzumab biosimilar SB3 (Ontruzant®) stored in the original vials over 28 days

<https://doi.org/10.1515/ptph-2024-0001>

Received January 19, 2024; accepted May 10, 2024;

published online May 22, 2024

Abstract

Objective: Trastuzumab biosimilar SB3 (Ontruzant®), a HER2 binding monoclonal antibody, is available as powder for concentrate for solution for infusion. According to the summary of product characteristics, the reconstituted solution (21 mg/mL) is physicochemically stable for 7 days when stored refrigerated at 2–8 °C. The objective of this focused study was to determine the extended physicochemical stability of trastuzumab SB3 reconstituted with water for injection and stored in the original glass vials under refrigeration or at room temperature over a period of 28 days.

Methods: Ontruzant® vials were reconstituted with sterile water for injection and stored light protected at 2–8 °C in the refrigerator or at room temperature (15–25 °C, Ph. Eur.) over a maximum period of 28 days. At predefined time points (day 0, 7, 14, (21), 28) samples were withdrawn and analyzed by size-exclusion high-performance liquid chromatography with photodiode array detection, ultraviolet spectroscopy, and pH measurement. Test solutions were inspected for colour changes, clarity, and visible particles at each sampling time point.

Results: According to the size-exclusion chromatography assay, trastuzumab SB3 monomer concentrations exceeded 95 % of the initially measured concentrations over the entire study period. pH values and trastuzumab concentrations measured by UV remained unchanged. No colour changes or visible particles were detected. Results were independent from storage temperature.

*Corresponding author: Laura Knoll, Department of Pharmacy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Germany.
E-mail: Laura.Knoll@unimedizin-mainz.de. <https://orcid.org/0009-0000-5717-4560>

Judith Thiesen and Irene Krämer, Department of Pharmacy, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany.
<https://orcid.org/0000-0002-7576-3665> (I. Krämer)

Conclusions: According to the stability indicating methods used, physicochemical stability of reconstituted trastuzumab SB3 Ontruzant® solution in original glass vials is given over a period of 28 days either stored refrigerated or at room temperature. Results have to be substantiated by IE-HPLC or icIEF. To avoid microbiological instability storage under refrigeration is recommended.

Keywords: trastuzumab SB3; biosimilar; reconstituted solution; physicochemical stability; SE-HPLC

Introduction

Trastuzumab, a humanized immunoglobulin G1 monoclonal antibody (mAb), binds to human epidermal growth factor receptor's (HER2's) extracellular domain thereby inhibiting growth of HER2 overexpressing tumour cells. In 2000, trastuzumab originator product Herceptin® (Roche Registration GmbH) was approved. Since 2017, several trastuzumab biosimilars were authorized by EMA. Trastuzumab reference and biosimilar products are approved for the treatment of adult patients with metastatic or early breast cancer or metastatic gastric cancer when tumours have HER2 overexpression or HER2 gene amplification [1].

In Europe, biosimilar medicinal products are licensed according to the EMA-Guidelines which are based on comparative quality, non-clinical, and clinical studies [2]. Due to the natural variability of the biological source and to the unique manufacturing process of each manufacturer, minor differences can occur between the biosimilar and its reference product. Minor variabilities, differences in the formulation and administration devices are allowed when scientific evidence shows that it does not affect safety, efficacy, and immunogenicity of the product [3]. Because of these variabilities, physicochemical in-use stability data cannot be extrapolated and must be experimentally tested for each finished reference and biosimilar brand product [4, 5]. In-use physicochemical stability data submitted by the manufacturer are assessed during the licensing process and published in the product-specific summaries of product

Open Access. © 2024 the author(s), published by De Gruyter. This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

characteristics (SmPCs). In addition, stability studies are published in scientific journals, e.g. for the trastuzumab reference product Herceptin® [6–11] and the different trastuzumab biosimilar products [12–18]. In the SmPC of the trastuzumab biosimilar SB3 (Ontruzant®) is given that the reconstituted stock solution is physicochemically stable for 7 days when stored at 2–8 °C [1]. Yun et al. reported that the reconstituted SB3 solution is physicochemically stable for 3 days when stored at 25 ± 2 °C [12]. Data on extended physicochemical stability of reconstituted Ontruzant® solution are lacking and would facilitate efficient handling in pharmacy practice. Therefore, we designed a focused study on extended physicochemical stability of reconstituted SB3 solutions in the original vials over a period of 28 days either stored under light protection at 2–8 °C or at room temperature. For the focused study, size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC), ultraviolet (UV) spectroscopy, measurement of pH, and observation for visible particles and colour changes were chosen as analytical methods.

Materials and methods

Test solutions

Stability tests were performed with the authorized and marketed medicinal product Ontruzant® 150 and 420 mg powder for concentrate for solution for infusion. With six vials of Ontruzant® 420 mg (batch F1903258) SE-HPLC assay, pH measurement, visual inspection (series 1) and with six vials of Ontruzant® 150 mg (batch F2003096) UV spectroscopy (series 2) were performed. Each vial was reconstituted with 7.2 mL (for 150 mg) or with 20 mL (for 420 mg) water for injection (Aqua ad injectabilia, B Braun Melsungen AG, Germany, batch 184,238,091 and 2,24,518,091), resulting in concentrations of 21 mg/mL trastuzumab. Three vials of each series were either stored in the refrigerator (2–8 °C) or at room temperature (15–25 °C, Ph. Eur.) packed in lightproof plastic boxes.

Sampling time points

Samples for SE-HPLC and UV spectroscopy were withdrawn directly after reconstitution (d0) and at day 7, 14, 21, and 28 of storage. Measurement of pH was performed at the same time points except for day 21.

Sample preparation

For SE-HPLC 47.6 µL of trastuzumab test solution (21 mg/mL) was mixed with 952.4 µL of water for injection, resulting in samples of the nominal concentration 1.0 mg/mL. For UV spectroscopy 100 µL of trastuzumab test solution (21 mg/mL) was twice diluted 1:10 with 900 µL water for injection, resulting in samples of the nominal concentration 0.21 mg/mL.

SE-HPLC assay

Intact trastuzumab monomer soluble aggregates and fragments were determined by a stability indicating SE-HPLC assay with photodiode array detection, which was previously established by Kaiser et al. [6]. Acceptance criteria were set to a 5% maximum loss of the monomer concentration and a 2% maximum increase of secondary peak areas related to the main peak area [4]. Detailed characteristics of the SE-HPLC assay are given in Table 1. The SE-HPLC method used was validated according to the ICH Guideline Q2 (R1) [19]. Because a chemical reference standard was not available, validation was performed with Ontruzant® final medicinal product. Ontruzant® was reconstituted with water for injection and further diluted with water HPLC grade. Linearity of the method was evaluated with seven trastuzumab standard concentrations (0.5, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.5 mg/mL). Aliquots of each calibration standard were injected three times. The calibration curve was obtained by plotting the peak area against the nominal trastuzumab concentration. Intraday and interday accuracy and precision of the SE-HPLC assay were validated by analysing 10 trastuzumab solutions (1.0 mg/mL) on five consecutive days. Test solutions were freshly prepared every day. Test solution numbers 1 and 10 were injected tenfold, and test solution numbers 2–9 were injected single fold on days 1–5.

UV spectroscopy

Trastuzumab concentrations were measured by an Evolution 201 UV-vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, serial number 5A3P172004, Schwerte, Germany). Prepared samples were transferred to a High Precision Cell made of Quartz SUPRASIL® (Light Path, 10 mm, Hellma Analytics, article no. 104-10-40) and absorption was determined at 280 nm wavelength. Water for injection (Aqua ad injectabilia, B Braun Melsungen AG, batch 2,24,518,091) was used as blank reference. The UV method used was validated according to the ICH Guideline Q2 (R1) [19]. For linearity testing, trastuzumab concentrated solution was diluted with water HPLC grade, resulting in seven calibration standards (0.105, 0.168, 0.189, 0.210, 0.231, 0.252, 0.315 mg/mL). Each standard solution was measured three times. The calibration curve was obtained by plotting extinction against the nominal concentration. Accuracy and interday precision were analyzed in parallel. Therefore, three standard solutions

Table 1: Characteristics of the SE-HPLC assay.

	SE-HPLC (based on Kaiser et al. [6])
Column	TSKgel G3000SWXL 7.8 × 300 mm, 5 µm, Tosoh bioscience
Column temperature	25 °C
Sample temperature	5 ± 2 °C
Mobile phase	0.2 M KH ₂ PO ₄ solution + 0.2 M NaOH solution (pH 7.2)
Gradient profile	Isocratic
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 µL
Injections per vial	3
Run time	20 min
Retention time	About 8.5 min
Detection wavelength	214 nm

SE-HPLC, size-exclusion high-performance liquid chromatography.

(0.168, 0.210, 0.252 mg/mL) were freshly prepared in triplicate. Each standard solution was measured three times, resulting in nine measurements per concentration. For interday precision three samples with the concentration of 0.210 mg/mL were freshly prepared and measured in triplicate on each of five consecutive days. Acceptance criteria was defined as less than 10 % loss of trastuzumab concentrations.

pH measurement

pH measurements were performed with the 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 standard buffer solutions pH 4.01 (DuraCal buffer, Hamilton Bonaduz AG; batch 1,720,122) and pH 7.00 (DuraCal buffer, Hamilton Bonaduz AG; batch 111,005,562) whenever test solutions were measured. Each sample of undiluted test solutions was measured three times. Acceptance criteria for stability was defined as not more than 0.5 pH unit change over the 28 day study period [4].

Appearance

According to the SmPC, trastuzumab lyophilized powder is supposed to be white to pale yellow. After reconstitution, it results in a colourless to pale yellow transparent solution [1]. Whenever samples from test

solutions were withdrawn, test solutions were visually examined with the unaided eye for visible particles and colour changes. Test solutions without any changes were defined as physicochemical stable.

Results

SE-HPLC

In the SE-HPLC chromatograms of trastuzumab Ontruzant[®] test solutions a sharp main peak related to the trastuzumab monomer was detected at the retention time (R_t) of approximately 8.5 min, a small peak with R_t of about 12 min related to the excipient histidine, and a very small peak at the R_t of about 5 min, most likely related to a higher molecular weight product (HMWP) (see Figure 1). The correlation coefficient of the trastuzumab assay amounted to $R^2=0.9874$ and proved linearity over the tested concentration range. The mean trastuzumab concentration of the intraday precision test was 1.014 mg/mL (101.4 %) \pm 0.57 % relative standard deviation (RSD). The interday precision tests revealed a mean trastuzumab concentration of 1.002 mg/mL (100.2 %) \pm 1.46 % RSD. Results deviated less than 2 % and proved reproducibility.

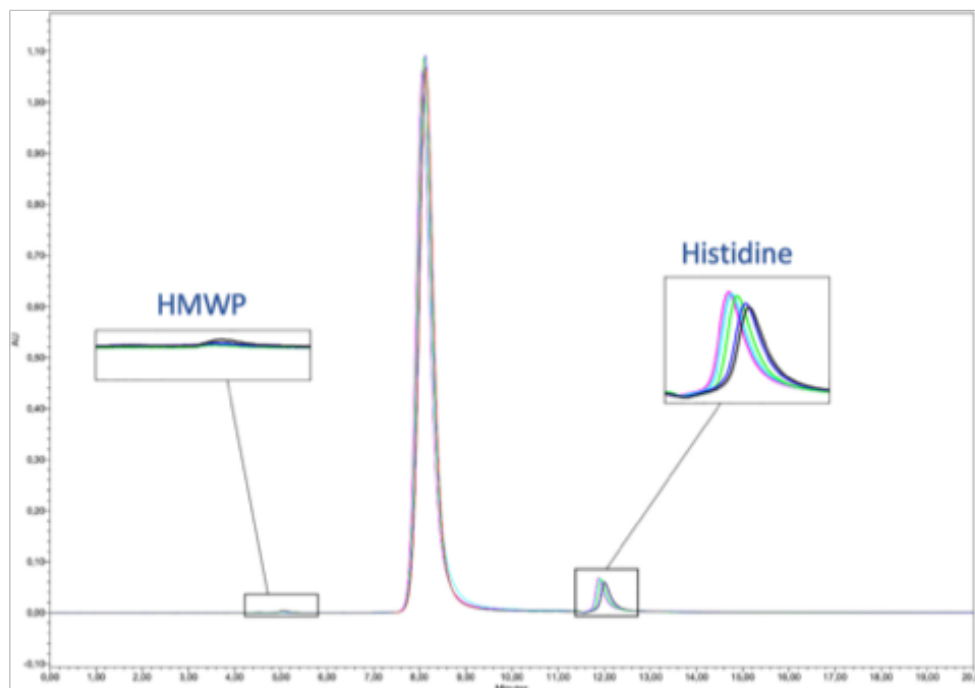


Figure 1: Overlay of SE-HPLC chromatograms of trastuzumab SB3 solution (1.0 mg/mL) d0, d1, d7, d14, d21, d28. Main peak with high molecular weight product (HMWP) and histidine at detection wavelength 214 nm.

All monomer peaks of the test solutions stored at 2–8 °C or at 15–25 °C were inspected for changes in peak area, peak height and for the formation of additional secondary peaks in form of HMWPs and low molecular weight products (LMWPs). No substantial or systematic changes could be detected in the test solutions over the entire 28-day storage period. All main peaks and secondary peaks met the acceptance criteria (main peak deviation $\leq 5\%$, secondary peaks maximum of 2% in relation to the main peak). Detailed results are shown in Table 2.

UV spectroscopy

The correlation coefficient of the assay amounted to $R^2=0.9998$ and proved linearity over the tested concentration range. Accuracy of the assay was determined by the calculation of the percentage rate of recovery for each concentration tested and amounted to $99.7 \pm 0.3\%$ resulting from nine measurements per concentration. Intraday reproducibility showed relative standard deviations of 0.4% for 0.168 mg/mL, 0.2% for 0.210 mg/mL, and 0.3% for 0.252 mg/mL test solutions. Interday precision, expressed as relative standard deviation of the mean values of five consecutive days, was 1.1% and therefore proved reproducibility.

Detailed results of the UV assay are given as percentage rate of the initial trastuzumab concentration (Table 3).

Trastuzumab concentrations remained unchanged (99.68–101.80%) and within the specification ($\geq 90\%$ of the initial concentration) at both storage conditions over the 28 day study period.

pH measurement and appearance

Results of the pH measurements are shown in Table 4. Trastuzumab pH values remained stable (6.22–6.27) and remained within the specification (<0.5 pH unit changes) during the study period of 28 days. Because inter-individual deviations of the measurements were low ($SD \leq 0.02$), standard deviations were not listed in Table 4. The appearance of trastuzumab test solutions remained unchanged and revealed no visible particles or colour changes within the observation period.

Discussion

In-use stability data of mAb containing reference or bio-similar medicinal products need individual testing because of their complexity and heterogeneity [4, 20]. For the same reasons, physicochemical stability of (glyco)proteins such as mAbs is determined by orthogonal analytical methods.

Table 2: Stability of trastuzumab SB3 reconstituted in the original vial stored at 2–8 °C and 15–25 °C over 28 days determined via SE-HPLC. Results expressed as % remaining trastuzumab concentration \pm SD (n=9), initial concentration day 0 set as 100%.

Storage temperature	SE-HPLC assay						
	Initial trastuzumab monomer concentration, mg/mL \pm SD (n=9)		Trastuzumab concentration remaining \pm SD (n=9); measured concentration day 0=100%				
	Nominal	Measured (day 0)	d1	d7	d14	d21	d28
2–8 °C	21	20.66 (± 0.29)	98.87 (± 1.88)	99.22 ^a (± 1.84)	101.77 (± 2.17)	102.24 (± 0.99)	100.83 (± 1.78)
15–25 °C	21	20.59 (± 0.11)	100.29 (± 0.73)	100.84 (± 1.38)	101.47 (± 0.70)	101.76 (± 0.69)	102.22 (± 0.58)

^an=8. SE-HPLC, size-exclusion high-performance liquid chromatography; SD, standard deviation.

Table 3: Stability of trastuzumab SB3 reconstituted in the original vial stored at 2–8 °C and 15–25 °C over 28 days. UV spectroscopy results expressed as % remaining trastuzumab concentration \pm SD (n=9), initial concentration day 0 set as 100%.

Storage temperature	UV spectroscopy						
	Initial trastuzumab concentration, mg/mL \pm SD (n=9)		Trastuzumab concentration remaining \pm SD (n=9); measured concentration day 0=100%				
	Nominal	Measured (day 0)	d1	d7	d14	d21	d28
2–8 °C	21	20.94 (± 0.05)	100.58 (± 0.67)	101.54 (± 0.47)	100.27 (± 0.25)	99.68 (± 0.55)	99.95 (± 0.42)
15–25 °C	21	21.08 (± 0.10)	101.80 (± 0.86)	100.37 (± 1.21)	100.37 (± 0.32)	100.42 (± 0.35)	99.95 (± 0.35)

SD, standard deviation.

Table 4: pH of trastuzumab SB3 stock solution reconstituted in the original vial stored at 2–8 °C and 15–25 °C over 28 days. Results expressed as mean pH.

Storage temperature	pH				
	d0	d1	d7	d14	d28
2–8 °C	6.27	6.22	6.24	6.27	6.24
15–25 °C	6.27	6.25	6.25	6.26	6.25

Out of the recommended orthogonal analytical methods we focused on SE-HPLC, UV-spectroscopy, and pH measurement to determine the integrity of trastuzumab SB3. These stability-indicating methods were chosen for the extended in-use stability study as physicochemical stability of reconstituted and diluted trastuzumab SB3 was already comprehensively investigated using these methods among others [12]. SE-HPLC is well accepted to investigate the intact tertiary structure of mAbs and the absence of oligomers and soluble aggregates. We used previously the same SE-HPLC method for the stability testing of trastuzumab reference product and proved the stability indicating nature by forced degradation studies [6]. Concurrent validation of the SE-HPLC and UV assay were based on the ICH Q2 (R1) guideline [19]. Acceptance criteria for the assessment of stability, sample numbers, sampling time points and storage conditions were chosen based on the specifications of the NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee [4].

Many studies showed physicochemical stability of trastuzumab reference product and various biosimilars. According to the methods used in our study, reconstituted trastuzumab SB3 (Ontruzant®) solution stored in the original glass vials revealed to be physicochemically stable over a period of 28 days regardless of the storage temperature. Impurities and degradation products were not detected. Yun et al. reported physicochemical stability data of reconstituted trastuzumab SB3 solution (3 days at 25 °C) and diluted trastuzumab SB3 infusion solution (28 days at 5 °C and 25 °C) [12]. The SE-HPLC assays of reconstituted SB3 solutions were identical in both studies during the first 3 days and did not change in our study over the extended test period of 28 days. No significant changes of the trastuzumab peak and no additional secondary peaks got obvious indicating the absence of fragmentation or aggregation. The LMWP peak at R_t 12 min was assigned to histidine which is used as a common excipient in the formulation of final medicinal mAb products [21]. pH values (6.22–6.27) remained unchanged over the extended test period and corresponded to those measured by Yun et al. in the reconstituted trastuzumab SB3 solution (pH 6.1–6.2) [12]. In addition, no change

in colour, clarity, or particulate matter could be observed in both studies. Furthermore, there is evidence that higher concentrations of mAb solutions show less degradation tendencies than lower concentrations, which could be related by container absorption or the dilution of stabilising excipients [4]. The extended physicochemical stability of reconstituted, concentrated trastuzumab SB3 solution is in agreement with the previously proven stability of diluted trastuzumab SB3 infusion solution [12]. Results were independent from the chosen storage temperature (2–8 °C, room temperature) in both studies.

Limitations

Physicochemical stability of proteinaceous medicinal products should be studied by orthogonal methods. Out of the highly recommended and utilized methods [4, 7, 8, 12, 14–18, 20, 22] ion-exchange high-performance liquid chromatography (IE-HPLC) or imaged capillary isoelectric focusing (icIEF) were not used in this study to investigate possible changes in charge variants (acidic, main, and basic variants). Although, Yun et al. showed by icIEF that the initial isoform pattern did not change in diluted trastuzumab SB3 solutions for 28 days [12] and because the utilized UV spectroscopy method only indicates the protein content, additional IE-HPLC or icIEF are necessary to substantiate stability of reconstituted trastuzumab SB3 over 28 days. Subvisible particle measurement and submicronic aggregation were not tested in our study due to the limited available volume of trastuzumab SB3 reconstituted solution.

Finally, microbiological and physicochemical stability are to be considered concurrently when determining the stability of an individual mAb preparation. Microbiological stability of trastuzumab was tested by Karstens et al. by intended inoculation of trastuzumab diluted solution with various facultative pathogenic microorganisms [23]. Tested strains remained viable but did not show any pronounced growth supporting activity in trastuzumab solutions over the observation period. Therefore, refrigerated storage is recommended inhibiting growth of contaminating mesophilic microbes. Nevertheless, the reconstituted trastuzumab solution can still be used after a temporary interruption of refrigerated storage thus preventing waste and promoting efficiency.

Conclusions

According to the stability indicating methods used, physicochemical stability of reconstituted trastuzumab SB3

Ontruzant[®] solution in original glass vials is given over a period of 28 days either stored refrigerated or at room temperature. No significant changes could be observed by the analytical methods used. However, additional experimental testing of changes in charge variants over the 28 day period should be added to substantiate the findings. From a microbiological point of view, refrigerated storage is recommended. Results promote a more efficient handling in terms of costs, environment, and practicability in everyday pharmacy practice without compromising safety and efficacy of trastuzumab SB3 preparation.

Research ethics: Not applicable.

Informed consent: Not applicable.

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

Competing interests: The authors state no conflict of interest.

Research funding: None declared.

Data availability: The raw data can be obtained on request from the corresponding author.

References

- Summary of product characteristics, Ontruzant 150 mg and 420 mg powder for concentrate for solution for infusion. 2017. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ontruzant-epar-product-information_en.pdf [Accessed 30 Jun 2023].
- <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/biosimilar-medicines-overview#ema-inpage-item-10278> [Accessed 13 Jan 2024].
- Biosimilars in the EU. Information guide for healthcare professionals; 2019. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals_de.pdf [Accessed 01 Jul 2023].
- NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. A standard protocol for deriving and assessment of stability, part 2 aseptic preparations (biopharmaceuticals); 2021. Available: <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2017/03/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v5.pdf> [Accessed 29 Oct 2023].
- Krämer I, Thiesen J, Astier A. Formulation and administration of biological medicinal products. *Pharm Res* 2020;37:159.
- Kaiser J, Krämer I. Physicochemical stability of diluted Trastuzumab infusion solutions in polypropylene infusion bags. *Int J Pharm Compd* 2011;15:515–20.
- Paul M, Vieillard V, Da Silva Lemos R, Escalup L, Astier A. Long-term physicochemical stability of diluted trastuzumab. *Int J Pharm* 2013;448:101–4.
- Glover ZW, Gennaro L, Yadav S, Demeule B, Wong PY, Sreedhara A. Compatibility and stability of pertuzumab and trastuzumab admixtures in i.v. infusion bags for coadministration. *J Pharmaceut Sci* 2013;102:794–812.
- Nalenz H, Köpf E, Dietel E. Prolonged in-use stability of reconstituted herceptin in commercial intravenous bags. *Int J Pharm Compd* 2018;22: 417–23.
- Pabari RM, Ryan B, Ahmad W, Ramtoola Z. Physical and structural stability of the monoclonal antibody, trastuzumab (Herceptin[®]), intravenous solutions. *Curr Pharmaceut Biotechnol* 2013;14:220–5.
- Gao Y, Shelling AN, Porter D, Leung E, Wu Z. Stability of trastuzumab during nanomedicine formulation using SEC-HPLC coupled with polyacrylamide gel electrophoresis. *Pharmaceut Dev Technol* 2023;28: 288–98.
- Yun J, Kim J, Chung J, Hwang SJ, Park SJ. Extended stability of reconstituted and diluted SB3 (trastuzumab biosimilar) assessed by physicochemical and biological properties. *Adv Ther* 2019;36:1700–14.
- Kim SJ, Lee JW, Kang HY, Kim SY, Shin YK, Kim KW, et al. In-use physicochemical and biological stability of the trastuzumab biosimilar CT-P6 upon preparation for intravenous infusion. *BioDrugs* 2018;32: 619–25.
- 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.
- Crampton S, Polozova A, Asbury D, Lueras A, Breslin P, Hippenmeyer J, et al. Stability of the trastuzumab biosimilar ABP 980 compared to reference product after intravenous bag preparation, transport and storage at various temperatures, concentrations and stress conditions. *GaBI J* 2020;9:5–13.
- Davies L, Milligan K, Corris M, Clarke I, Dwyer P, Lee SE, et al. Extended stability of the trastuzumab biosimilar ABP 980 (KANJINTI[™]) in polyolefin bags and elastomeric devices. *GaBI J* 2021;10:153–71.
- 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. *Expet Opin Biol Ther* 2022;22: 299–311.
- Guyader GL, Vieillard V, Paul M. Physicochemical stability study of MYL-14010, a biosimilar of trastuzumab, following a transient temperature excursion. *J Oncol Pharm Pract* 2021;27:847–56.
- International Conference on Harmonization. Harmonized tripartite guidelines for validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1); 1995. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf [Accessed 16 Nov 2023].
- Basle YL, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review. *J Pharmaceut Sci* 2020;109: 169–90.
- Almasi J, Thiesen J, Krämer I. Physicochemical stability of durvalumab (Imfinzi[®]) concentrate for solution in original vials after first opening. *Pharm Technol Hosp Pharm* 2023;8:20230008.
- 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.
- Karstens A, Krämer I. Viability of micro-organisms in novel chemical and biopharmaceutical drug solutions for cancer treatment. *Eur J Hosp Pharm Sci Pract* 2007;13:27–32.

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

Almasi J, Knoll L, Thiesen J, Krämer I.
J Oncol Pharm Practice. 2023 June 4.
<https://doi.org/10.1177/10781552231179185>

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



Original Article

JOURNAL OF
ONCOLOGY
PHARMACY
PRACTICE*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

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

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.^{1–3} 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.¹ 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.¹ 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.⁴ Based on the pharmacopoeia monographs of antimicrobial efficacy tests (USP <51>, Ph. Eur. 5.1.3)^{5,6} 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.^{4,7–22} 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 10⁸ 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 10⁷/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® 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®, Glucosteril® 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™ 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 ^a (25 ± 2 °C)	
Series 1	Atezolizumab	Tecentriq [®]	Roche	B0020H03	–	0.9% NaCl	3.36	24 h	
	Avelumab	Bavencio [®]	Merck Serono	ALJ29765	–	0.9% NaCl	3.2	24 h	
	Bevacizumab	Avastin [®]	Roche	N7427H18	–	0.9% NaCl	2.5	28 d	
	Blinatumomab	Blinxto [®]	Amgen	1119706	Water for injection	0.9% NaCl	0.032 µg/mL	96 h	
	Cemiplimab	Libtayo [®]	Sanofi	9F001F	–	0.9% NaCl	3.5	8 h	
	Daratumumab	Darzalex [®]	Janssen-Cilag	KG54203	–	0.9% NaCl	0.4	15 h	
	Durvalumab	Imfinzi [®]	AstraZeneca	BAEF	–	0.9% NaCl	2.0	8 h	
	Eliuzumab	Empliciti [®]	Celgene	ABQ7329	–	0.9% NaCl	2.0	8 h	
	Nivolumab	Opdivo [®]	BMS	ABQ5596	–	0.9% NaCl	1.0	7 d	
	Pembrolizumab	Keytruda [®]	MSD	T024402	–	0.9% NaCl	2.0	7 d	
	Obinutuzumab	Gazyvaro [®]	Roche	H0136	–	0.9% NaCl	1.0	48 h	
	Series 2	Azacitidine	Azacitidin Hexal [®]	Hexal	CSA00005B	Water for injection	–	25	4 h ^b
		Carfilzomib	Kyprolis [®]	Amgen	1117814A	Water for injection	5% Glucose	0.3	10 d
Filgrastim		Filgrastim Hexal [®]	Hexal	K52299	–	–	600 µg/mL	72 h	
Mogamulizumab		Poteligeo [®]	Kyowa Kirin	B24051	–	0.9% NaCl	0.5	24 h	
Ocrelizumab		Ocrevus [®]	Roche	H0043	–	0.9% NaCl	1.2	8 h	
Pertuzumab		Perjeta [®]	Roche	H0409H12	–	0.9% NaCl	1.68	24 h	
Pixantrone		Pacuvri [®]	CTI	6017728	0.9% NaCl	0.9% NaCl	0.3	24 h	
Ramucirumab		Cyramza [®]	Lilly	D069147G	–	0.9% NaCl	1.6	4 h	
Vinflunine		Javlor [®]	Pierre Fabre Pharma	10P023_A	–	0.9% NaCl	4.8	24 h ^c	

^aaccording to the current summaries of product characteristics (SmPCs).

^bwhen reconstituted with cold (2–8 °C) water for injection.

^cwhen stored light protected.

the suspension was added to the previously prepared 9 mL test samples to achieve concentrations of approximately 10⁴ 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, osmolarity, 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).²³ 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
Series 2	Pembrolizumab	5.21	5.21	4.96	4.95	>8.5
	Obinutuzumab	5.29	5.42	5.49	5.83	>8.5
	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
Series 2	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.

		<i>P. aeruginosa</i> (CFU log/mL)					
Test/control solution		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*
Azacitidine		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.^{4,11–15} In a recently published study the level of intended microbial contamination was also 10^5 CFU/mL.⁷ Less detrimental experimental conditions are achieved, when the inoculum level is adjusted to 10^3 CFU/mL to simulate inadvertent touch contamination (i.e., low-level contamination).^{24,25} 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 <S1>, "No increase in counts is defined as not more than 0.5 log₁₀ 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.²⁴ 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".²⁵ Ricci et al. also mention that "protein drug product solutions have been shown to promote microbiological growth following contamination".² In line with our previous results,^{12,13} 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.¹⁰ 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.^{11,26}

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.¹⁸ 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.¹⁴ Further vinca alkaloids proved species-specific antibacterial but not antifungal activity.^{4,14}

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
	Obinutuzumab	5.29	5.65	5.78	5.35	4.46
	Series 2	0.9% NaCl	5.13	5.17	5.99	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).

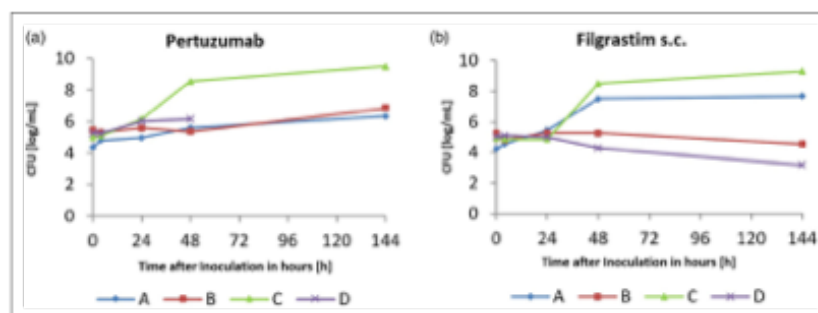


Figure 1. (a,b) viability of the four selected test organisms (A: *C. albicans*, B: *S. aureus*, C: *P. aeruginosa*, D: *E. faecium*) in diluted Pertuzumab (1a) or undiluted Filgrastim s.c. (1b) test solutions. CFU=colony forming units.

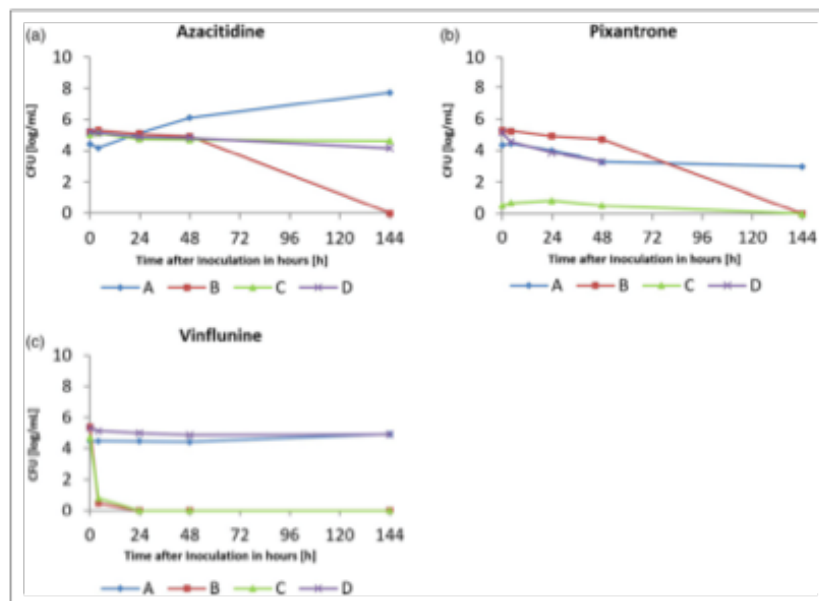


Figure 2. (a–c) viability of the four selected test organisms (A: *C. albicans*, B: *S. aureus*, C: *P. aeruginosa*, D: *E. faecium*) in undiluted Azacitidine (2a) or diluted Pixantrone (2b), Vinflunine (2c) test solutions. CFU = colony forming units.

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.⁴

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.

Author 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, Lagarde 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, Guernault 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, Bougaëon 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, Carnuffo 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.
- Hamilton-Miller JMT. Antimicrobial 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.

