Studien zur Kompatibilität von Parenteralia auf einer pädiatrisch-kardiologischen Intensivstation und zur Stabilität eines monoklonalen Antikörpers

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sven Jirschitzka

Kiel, 2023

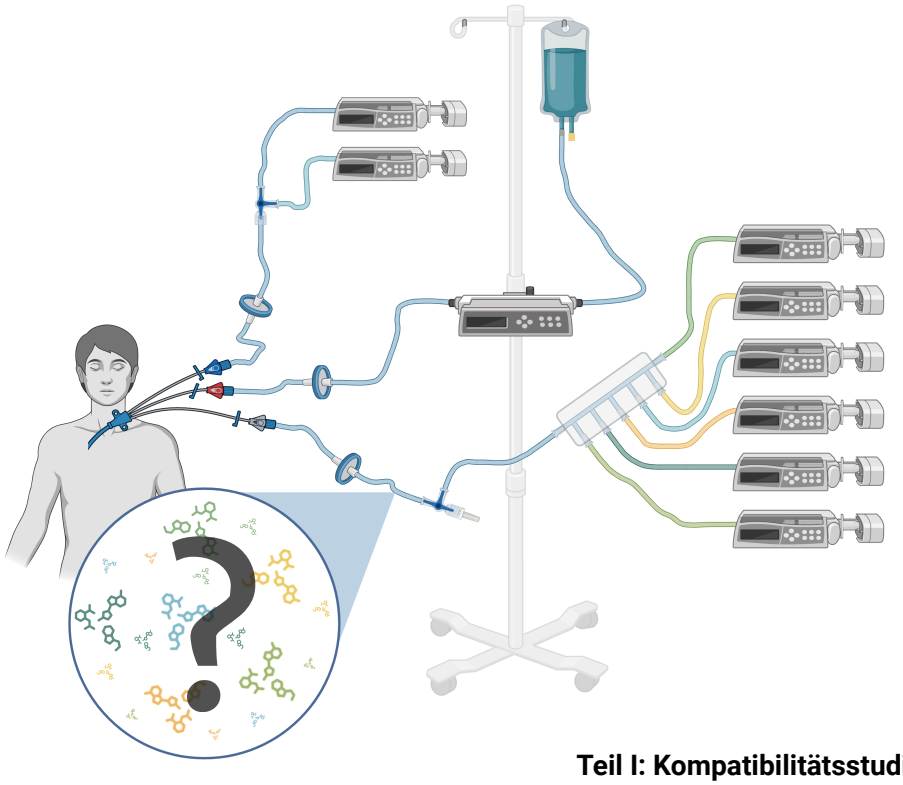
Dekan:	Prof. Dr. Frank Kempken
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Kunze
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Dennis Schade
Tag der Verteidigung:	20.07.2023

»Whose job is to protect patients from harm from drug instabilities and incompatibilities and other aspects of clinical pharmaceutics?
Nurses and physicians? Not likely.
Drug companies or the US Food and Drug Administration? Even less likely.
If not pharmacists, the self-declared drug experts, then who?«

Lawrence A. Trissel [1]

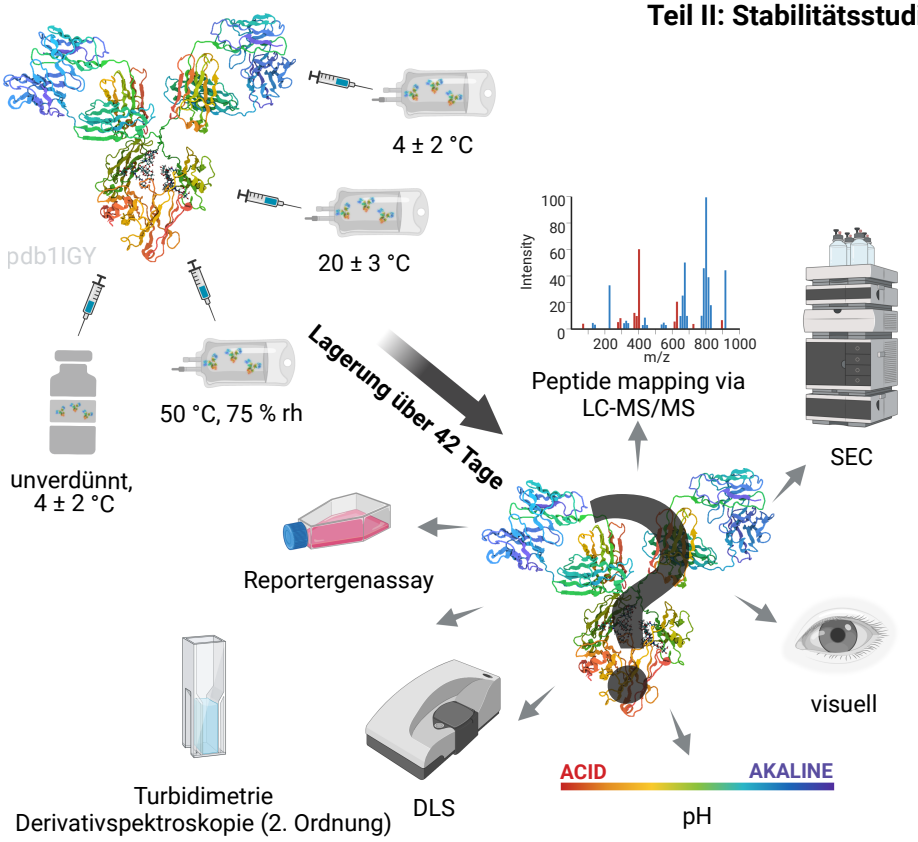
Titelbild: Kreuzknoten
Modifiziert nach einer Vorlage (CC BY-SA 3.0) von Lucasbosch
(https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Lucasbosch)

Graphische Zusammenfassung



Teil I: Kompatibilitätsstudie

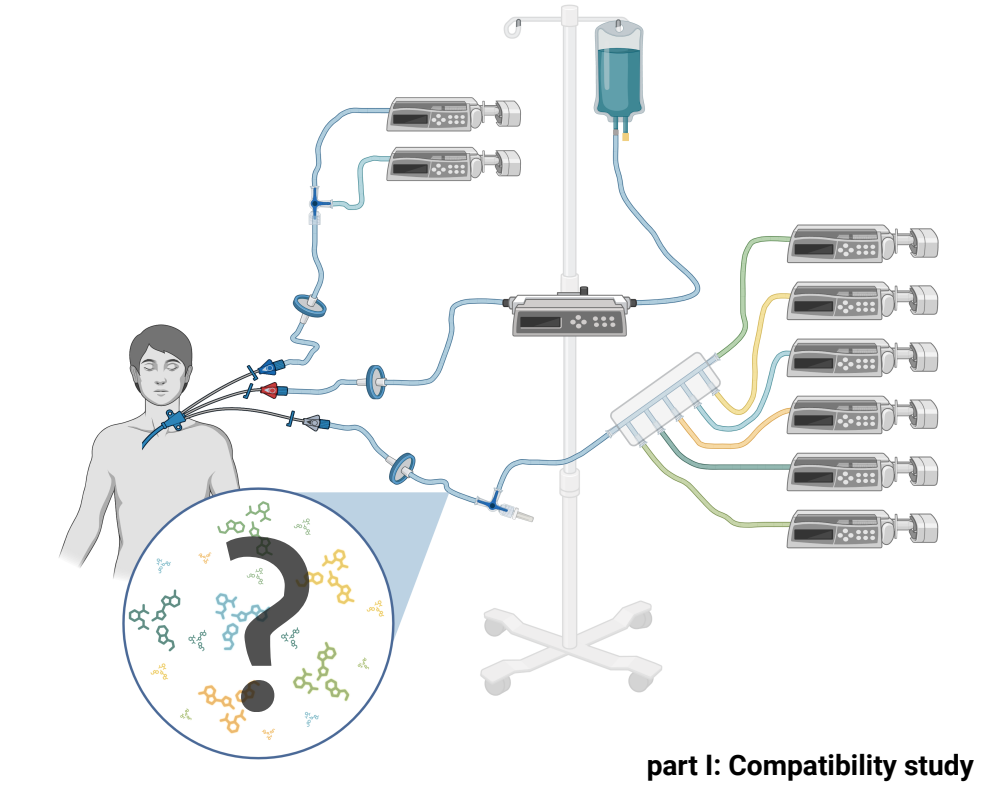
Teil II: Stabilitätsstudie



Zusammenfassung

In den Fachinformationen der pharmazeutischen Hersteller werden umfassende Informationen über Arzneimittel zur Verfügung gestellt. Die Angaben zur Kompatibilität des Arzneimittels mit anderen Arzneistoffen und zur Stabilität eines geöffneten oder zur Applikation vorbereiteten Arzneimittels sind jedoch sehr begrenzt. In der Praxis wären diese Informationen allerdings von hohem Interesse. Dies gilt insbesondere für Parenteralia. Im ersten Teil dieser Arbeit, wurden daher Kompatibilitätsstudien zu den parenteral angewendeten Arzneistoffen Etacrynsäure, Theophyllin und Furosemid in Kombination mit anderen Arzneimitteln, durchgeführt. Diese Arzneistoffe werden häufig bei Patient*innen mit angeborenen Herzfehlern im Rahmen einer intensivmedizinischen Betreuung angewendet. Es sollte untersucht werden, ob die gleichzeitige Applikation dieser Arzneistoffe über ein gemeinsames Infusionslumen mit Qualitätseinschränkungen verbunden ist, diese also miteinander inkompatibel sind. Insgesamt wurden 60 verschiedene Arzneistoffkombinationen getestet, davon 50 mit HPLC-Messungen, von denen 19 als inkompatibel bewertet wurden. Indem diese inkompatiblen Arzneistoffkombinationen den Patient*innen stets separat appliziert werden, kann die Arzneimitteltherapiesicherheit erhöht werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Stabilität von Pertuzumab unter verschiedenen Lagerungsbedingungen untersucht. Pertuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher unter dem Handelsnamen Perjeta bei HER2-positivem Brustkrebs angewendet wird. Perjeta stellt dabei ein Infusionskonzentrat dar, welches vor der Anwendung mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt werden muss, um eine applikationsfertige Zubereitung zu erhalten. Die applikationsfertigen Zubereitungen werden in der Regel in spezialisierten Apotheken hergestellt. In der Fachinformation von Perjeta ist aktuell eine Stabilität der applikationsfertigen Zubereitungen von 24 h bei 30 °C oder 30 Tage bei 2 - 8 °C, geschützt vor Licht, angegeben. Ziel der Stabilitätsstudie war es zu untersuchen, ob die applikationsfertigen Zubereitungen auch bei Raumtemperatur und ohne Lichtschutz über einen längeren Zeitraum gelagert werden können. Darüber hinaus sollten auch die im Kühlschrank gelagerten, einmal geöffneten Infusionsfläschchen, in denen nach der Herstellung der applikationsfertigen Zubereitungen routinemäßig restliches Infusionskonzentrat enthalten ist, untersucht werden. Mit einer umfangreichen Auswahl an analytischen Methoden (visuelle Begutachtung, pH-Messung, Turbidimetrie, Derivativspektroskopie, Dynamische Lichtstreuung, Größenausschlusschromatographie, LC-MS/MS basiertes Peptide mapping und ein Reportergenassay) wurde die physikochemische Stabilität und biologische Aktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die applikationsfertigen Zubereitungen bei Raumtemperatur und ohne Lichtschutz, sowie die einmal geöffneten Perjeta-Fläschchen, welche im Kühlschrank gelagert wurden über 28 Tage stabil sind. Mit Hilfe dieser Daten können die herstellenden Apotheken ihre Arbeitsabläufe vereinfachen und durch Lagerung und Nutzung der unverbrauchten Perjeta-Lösung deutliche Kosten und Ressourcen einsparen.

Graphical abstract



Abstract

Comprehensive information about drugs are provided in the manufacturers' summary of product characteristics. However, the information on the compatibility of the drug with other drugs and on the stability of an opened drug or after preparation is commonly limited. Availability of these information would be of great interest for healthcare professionals. This applies in particular to parenteral drugs.

The first part of this thesis thus focussed on compatibility studies of the parenterally administered drugs etacrynic acid, theophylline and furosemide in combination with other drugs. These drugs are commonly used in intensive care for patients with congenital heart defects. The aim was to investigate whether the simultaneous administration of these drugs impairs their quality, which indicates incompatibility of the respective combination. A total of 60 different drug combinations were tested, 50 of them with HPLC measurements, of which 19 were assessed as incompatible. In order to increase the safety of drug therapy these drugs should always be administered to patients separately.

In the second part of the thesis the stability of pertuzumab under different storage conditions was investigated. Pertuzumab is a monoclonal antibody which is used under its trade name Perjeta for treatment of HER2-positive breast cancer. Perjeta is an infusion concentrate that has to be diluted with isotonic saline solution to obtain a ready-to-use preparation. This process is usually handled by specialised pharmacies. The summary of product characteristics for Perjeta currently states a stability of the ready-to-use preparations of 24 h at 30 °C or 30 days at 2 - 8 °C, protected from light. The aim of the stability study was to investigate whether the ready-to-use preparations can also be stored at room temperature and without light protection for a prolonged period of time. After preparation residual solution is left over in the Perjeta vials. Thus in addition to the ready-to-use preparations the once opened vials stored in the refrigerator were assessed. A comprehensive array of analytical methods (visual assessment, pH measurement, turbidimetry, derivative spectroscopy, dynamic light scattering, size exclusion chromatography, LC-MS/MS based peptide mapping and a reporter gene assay) was applied to investigate physicochemical stability and biological activity. Results indicated that the ready-to-use preparations stored at room temperature and without light protection, as well as the perjeta vials once opened and stored in the refrigerator, are stable for 28 days. This data enables manufacturing pharmacies to simplify their workflow and save significant costs and resources by storing and using the remaining unused Perjeta solution.

Veröffentlichungen

Bestätigung des Eigenanteils, bereits veröffentlichter oder zur Veröffentlichung eingereichter Publikationen der Dissertation mit dem Titel: „Studien zur Kompatibilität von Parenteralia auf einer pädiatrisch-kardiologischen Intensivstation und zur Stabilität eines monoklonalen Antikörpers“.

Combined physicochemical and functional assessment of pertuzumab integrity supports extended in-use stability
Sven Jirschitzka, Daniel Längle, Hendrik Lück, Dennis Schade, Thomas Kunze
in: Archiv der Pharmazie, 2023 (https://doi.org/10.1002/ardp.202300072)

	Konzeptionierung	Planung	Durchführung	Manuskripterstellung
Eigenanteil	90 %	70 %	80 %	80 %

An aza-Michael addition product causes incompatibility between etacrynic acid and theophylline in a paediatric cardiological ICU
Sven Jirschitzka, Ulrich Girreser, Thomas Kunze
in: Pharmazie, 2023 (https://doi.org/10.1691/ph.2023.2564)

	Konzeptionierung	Planung	Durchführung	Manuskripterstellung
Eigenanteil	50 %	50 %	50 %	60 %

Manuskript zur Publikation eingereicht:
Compatibility study of etacrynic acid and theophylline with other commonly used drugs in a paediatric cardiological intensive care unit
Sven Jirschitzka, Kirstin Reinecke, Swantje Eisend, Thomas Kunze
in: Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy, *eingereicht am 25.05.2023*

	Konzeptionierung	Planung	Durchführung	Manuskripterstellung
Eigenanteil	70 %	80 %	90 %	80 %

Kiel, 12.06.2023	Professor Dr. Thomas Kunze (Betreuer)	Sven Jirschitzka (Doktorand)

Kongressbeiträge

Kurzvortrag

„Compatibility study of ethacrynic acid with common drugs in paediatric-cardiological intensive care“ - DPhG Annual meeting 28. Sep. – 01. Oct. 2021, Leipzig

Poster

„Compatibility study of ethacrynic acid with common drugs in paediatric-cardiological intensive care“ - DPhG Annual meeting 28. Sep. – 01. Oct. 2021, Leipzig

Inhaltsverzeichnis

I. Studien zur Kompatibilität von Parenteralia auf einer pädiatrisch-kardiologischen Intensivstation 25

1. Einleitung 27
1.1. Kompatibilität von Arzneistoffen 27
1.2. Parenterale Therapie auf Intensivstationen 28
1.3. Therapie pädiatrisch-kardiologischer Patient*innen auf einer Intensivstation 32
1.3.1. Angeborene Herzfehler 32
1.3.2. Pharmakotherapie 36

2. Zielsetzung 39

3. Ergebnisse und Diskussion 41
3.1. Erstellung einer Kompatibilitätstabelle 41
3.2. Physikochemische Kompatibilität von Etacrynsäure und Theophyllin mit anderen Arzneimitteln 44
3.3. Identifikation eines Additionsprodukts zwischen Etacrynsäure und Theophyllin 87
3.4. Identifikation eines Degradationsprodukts in der Mischung von Etacrynsäure und Natriumhydrogencarbonat 93
3.5. Physikalische Kompatibilität von Furosemid mit anderen Arzneimitteln . . . 94
3.6. Weitere relevante Arzneistoffkombinationen 99

4. Zusammenfassung 101

II. Studien zur Stabilität eines monoklonalen Antikörpers 103

5. Einleitung 105
5.1. Monoklonale Antikörper als Arzneimittel 105
5.2. Aufbau von monoklonalen Antikörpern 110
5.3. Stabilität von monoklonalen Antikörpern 112
5.4. Arzneimittelformulierung für monoklonale Antikörper 114
5.5. Pertuzumab (Perjeta) 115
5.6. Ambulante Chemotherapie 117

6. Zielsetzung 119

7. Ergebnisse und Diskussion **121**
7.1. Methodenentwicklung . . . 121
7.1.1. Derivativspektroskopie . . . 121
7.1.2. Größenausschlusschromatographie (SEC) . . . 123
7.1.3. Peptide mapping . . . 124
7.1.4. Entwicklung eines Reportergenassays . . . 127
7.2. Stabilitätsstudie . . . 138

8. Zusammenfassung **169**

III. Experimentalteil **171**

9. Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Laborgeräte **173**

10. Methoden der Kompatibilitätsstudie **179**
10.1. Literaturrecherche der Kompatibilitätsdaten . . . 179
10.2. Probenvorbereitung . . . 179
10.3. Visuelle Begutachtung . . . 179
10.4. pH Messung . . . 180
10.5. Turbidimetrie . . . 180
10.6. HPLC . . . 180
10.7. LC-MS und LC-MS/MS . . . 181
10.8. Probenvorbereitung für NMR-Messungen . . . 182
10.9. NMR Spektroskopie . . . 182
10.10. HPLC für Metamizol . . . 182

11. Methoden der Stabilitätsstudie **183**
11.1. Herstellung und Vorbereitung der Proben . . . 183
11.2. Visuelle Begutachtung . . . 183
11.3. pH Messung . . . 184
11.4. Turbidimetrie . . . 184
11.5. Derivativspektroskopie . . . 184
11.6. Dynamische Licht Streuung (DLS) . . . 184
11.7. Größenausschlusschromatographie (SEC) . . . 184
11.8. Peptide mapping . . . 185
11.8.1. Probenaufarbeitung, Verdau, Festphasenextraktion . . . 185
11.8.2. HPLC-UV (Peptide fingerprint) . . . 186
11.8.3. LC-MS/MS (Peptide mass fingerprint) . . . 186
11.9. Stresstest von Pertuzumab . . . 187

11.10. Zellkultur 187
11.10.1. Routinemethoden der Zellkultur 187
11.10.2. Übersicht der verwendeten Vektoren 188
11.10.3. Transfektionsstudien 191
11.10.4. Methoden zur Entwicklung des Reportergenassays (Md.RGA.) . . . 192

12. Software und Statistik **195**

Literaturverzeichnis **197**

Abbildungsverzeichnis

1.1. Darstellung eines dreilumigen Katheters. 30

1.2. Beispielhafte Darstellung eines Infusionsregimes über einen dreilumigen Katheter. 31

1.3. Schematische Darstellung der Anatomie des Hypoplastischen Linksherzsyndroms und dessen operativer Korrektur. 35

3.1. Poster der für die Kinderintensivstation erstellten Kompatibilitätstabelle. 43

3.2. Kompatibilitätstabelle der Arzneistoffe Etacrynsäure, Theophyllin und Furosemid mit anderen Arzneistoffen vor Beginn der Kompatibilitätsstudien. 44

3.3. Identifiziertes Aza-Michael-Addukt aus Mischungen von Etacrynsäure und Theophyllin ([2-(2,3-dichloro-4-2-[(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-purin-7(6*H*)-yl)methyl]butanoylphenoxy)essigsäure]). 87

3.4. Identifiziertes Degradationsprodukt aus Mischungen von Etacrynsäure und Natriumhydrogencarbonat (2-(2,3-dichloro-4-(2-(hydroxymethyl)butanoyl)phenoxy)essigsäure). 93

3.5. Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Unacid (Ampicillin und Sulbactam). 95

3.6. Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Cefazolin-saar (Cefazolin). 96

3.7. Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Glucosteril 50 % (Glucoselösung 50 %). 97

3.8. Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Paracetamol B. Braun (Paracetamol). 98

3.9. HPLC-Messungen von Metamizol. 100

4.1. Kompatibilitätstabelle nach Abschluss aller Kompatibilitätsuntersuchungen. . 101

5.1. FDA-Zulassungen monoklonaler Antikörper. 109

5.2. Aufbau eines monoklonalen Antikörpers. 111

5.3. Beispielhafter Ablauf der ambulanten Chemotherapiebelieferung bei zentralisierter Herstellung. 117

7.1. UV-Spektren einer Lösung von Perjeta in unterschiedlichen Konzentrationen. 122

7.2. Repräsentative SEC-Chromatogramme einer Lösung von Perjeta, Histidin und Polysorbat 20. 124

7.3. Ergebnisse der ersten HPLC-UV-basierten Peptide mapping Experimente. . . 125

7.4. Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten SKBR-3 Zellen und MCF-7 Zellen.129

7.5. Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten SKBR-3 Zellen und MCF-7 Zellen nach Transfektion mit Polyethylenimin (PEI), Hoechst-Färbung und Fixierung. 131
7.6. Mikroskopische Aufnahmen von SKBR-3 Zellen nach Transfektion mit Lipofectamin 2000 (ohne Hoechst-Färbung und Fixierung). 131
7.7. Ergebnisse des Reportergenassays nach der Stimulation von MCF-7 Zellen mit 100 ng/ml EGF in unterschiedlichen Inkubationszeiten. 133
7.8. Ergebnisse des Reportergenassays nach Stimulation von SKBR-3 Zellen und MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von EGF (Inkubationszeit: 4 h). 134
7.9. Ergebnisse des Reportergenassays nach der simultanen Transfektion von MCF-7 Zellen mit dem experimentellen Luciferase-Vektor und einem HER2-Rezeptor codierenden Vektor mit anschließender Stimulation mit EGF (100 ng/ml, 4 h). 135
7.10. Ergebnisse des Reportergenassays nach der simultanen Transfektion von MCF-7 Zellen mit dem experimentellen Luciferase-Vektor und einem HER2-Rezeptor codierenden Vektor mit Inkubation von Pertuzumab (30 min) und anschließender Stimulation mit EGF (100 ng/ml, 4 h). 136
7.11. Ergebnisse des Reportergenassays nach der Stimulation von MCF-7 Zellen mit Heregulin-α. 136
7.12. Ergebnisse des Reportergenassays nach der Inkubation von MCF-7 Zellen mit verschiedenen Pertuzumab Konzentrationen. 137

10.1. Apparatur modifiziert nach Ph.Eur. 10 2.9.20 zur Prüfung auf sichtbare Partikel. 180

11.1. Vektorkarte von pEGFP2. 189
11.2. Vektorkarte von pRL-TK (Promega, #E2241), GeneBank: AF025846.2. 189
11.3. Vektorkarte von pFos WT-GL3 (Addgene #11983). 190
11.4. Vektorkarte von HER2 WT (Addgene #16257). 190

Tabellenverzeichnis

1.1. Anzahl der gleichzeitig zu applizierenden Infusionslösungen auf Intensivstationen . . . 29
1.2. Einteilung und Häufigkeiten angeborener Herzfehler . . . 33
1.3. Herz- und Gefäßsystem beeinflussende Wirkstoffe . . . 36
1.4. Schmerzmittel und Sedativa . . . 37
1.5. Antiinfektiva . . . 37
1.6. Diuretika . . . 38
1.7. Andere Wirkstoffe . . . 38

3.1. Anfangs-pH-Werte der Mischungen mit Etacrynsäure . . . 93

7.1. Optimierte Bedingungen der transienten Transfektion mit Polyethylenimin . . . 129

9.1. Chemikalien und Reagenzien . . . 173
9.2. Arzneimittel modifiziert nach Jirschitzka et al. . . . 174
9.3. Verbrauchsmaterialien . . . 176
9.4. Laborgeräte . . . 176

10.1. Verwendetes HPLC-System . . . 181

11.1. Pipettierschema der Festphasenextraktion mit ZipTip Pipettenspitzen . . . 186

Abkürzungsverzeichnis

4-MAA	4-Methylaminoantipyrin
ABC	Ammoniumhydrogencarbonat
ACN	Acetonitril
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität
CDR	hochvariable Bereiche (Complementarity-determining regions)
D_2O	deuteriertes Wasser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM-HG	Dulbecco's modified eagle's medium mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat, 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}
DTT	Dithiotreitol
EGF	epidermal growth factor
FA	Ameisensäure
FBS	fetales Kälberserum
FDA	U.S. Food & Drug Administration
FRET	Förster resonance energy transfer
HPLC	high-performance-liquid-chromatography
HRG	Heregulin-α
KCl	Kaliumchlorid-Lösung
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
NaCl	isotonische Kochsalzlösung
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat-Lösung
OH-Eca	2-(2,3-dichloro-4-(2-(hydroxymethyl)butanoyl)phenoxy)essigsäure
Opti-MEM	Opti-minimum essential media
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
Ph. Eur.	Europäsisches Arzneibuch
PICC	peripherally inserted central catheter
rL	relative Luftfeuchtigkeit
scFv	single chain fragment variable
SEC	Größenausschlusschromatographie
TFA	Trifluoressigsäure
T:P	Trypsin-zu-Protein-Verhältnis
TPN	Totale-Parenterale-Ernährungslösung

UKSH Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

ZVK zentraler Venenkatheter

Teil I.

Studien zur Kompatibilität von Parenteralia auf einer pädiatrisch-kardiologischen Intensivstation

1. Einleitung

1.1. Kompatibilität von Arzneistoffen

Zwei oder mehr Arzneistoffe sind miteinander kompatibel, wenn sie gemeinsam in einer Mischung oder Lösung ohne relevante Veränderungen der Qualität bestehen bleiben können. Entsprechend sind Inkompatibilitäten definiert als Reaktionen zwischen zwei oder mehr Arzneistoffen oder zwischen einem Arzneistoff und dem Primärpackmittel, welche zu einem nicht mehr optimalen Produkt führt und Patient*innen dadurch nicht optimal therapiert werden können.[2] Per Definition finden diese Reaktionen außerhalb des menschlichen Körpers (in vitro) statt und sind dadurch von Arzneimittelinteraktionen abgegrenzt.[3] Obwohl Inkompatibilitäten auch zwischen Feststoffen auftreten können, liegt der Fokus bei der Untersuchung von Kompatibilitäten meist auf Mischungen gelöster Arzneistoffe und dabei insbesondere auf Lösungen, welche zur parenteralen Anwendung vorgesehen sind.

Inkompatibilitäten können in physikalische Inkompatibilitäten (z.B. Fällung, Trübung, Änderung der Viskosität oder des pH-Werts, Farbänderung oder Gasentstehung) und chemische Inkompatibilitäten (z.B. Oxidation, Hydrolyse, Komplexierung oder andere komplexere chemische Reaktionen) unterschieden werden.[4] Dabei wird ein Gehaltsverlust von mehr als 10 % eines Arzneistoffs nach dem Mischen als chemisch inkompatibel bewertet.[5] Darüber hinaus können Inkompatibilitäten in manifeste und larvierte Inkompatibilitäten eingeteilt werden. Manifeste Inkompatibilitäten sind sensorisch wahrnehmbare Reaktionen, also z.B. eine Trübung oder Farbänderung einer Lösung. Larvierte („versteckte“) Inkompatibilitäten sind sensorisch nicht wahrnehmbar und können nur mit analytischen Methoden detektiert werden. Larvierte Inkompatibilitäten stellen in der Praxis eine erhöhte Gefahr dar, da sie nicht bemerkt werden und somit die Wahrscheinlichkeit hoch ist, die Patient*innen zu erreichen.

Inkompatibilitäten von parenteralen Arzneimitteln sind mit einer Inzidenz zwischen 2 % und 68 % beschrieben.[2],[3],[6],[7] Diese große Spanne an Inzidenzen liegt an der Heterogenität der Studien. So wurde in Machotka et al. die Verabreichung von Infusionen durch Pharmazeut*innen über ein Jahr beobachtet, dokumentiert und schließlich retrospektiv die Kompatibilität der verabreichten Arzneistoffe bewertet.[2] Eingeschlossen wurden Patient*innen, welche mindestens zwei Infusionen erhielten. Marsilio et al. dokumentierte Inkompatibilitäten hingegen anhand der Daten der Medikationssoftware des Krankenhauses und schloss nur Patien*innnen in die Studie ein, welche mindestens vier Infusionen erhielten.[3] Dabei wurde jedoch nur eine einzige Verordnung pro Patient*in in die Analyse einbezogen.

Werden inkompatible Arzneistoffmischungen nicht bemerkt und den Patient*innen verabreicht, kann dies zu schwerwiegenden Konsequenzen führen. Zum einen kann die Wirksamkeit der Therapie verringert werden oder vollständig ausbleiben. Zum anderen erhöht sich das Risiko für Thrombosen und Embolien, mit den damit verbundenen Organschädi-

gungen vor allem der Lunge, Niere oder des Herzens.[8],[9] Müssen an Kathetern aufgrund von Inkompatibilitäten häufiger Manipulationen (z.B. Wechsel einer Leitung) durchgeführt werden, erhöht sich das Infektionsrisiko.[9] Schließlich können Inkompatibilitäten, vor allem verursacht durch kleinste unlösliche Partikel oder Kristalle, auch zu einem schwerwiegenden systemischen inflammatorischen Response Syndrom (SIRS) und damit im schlechtesten Fall zum Multiorganversagen führen.[9]

Die Vermeidung von Inkompatibilitäten ist daher von hoher Bedeutung, insbesondere vor dem Hintergrund, dass eine parenterale Therapie in der Regel intensivmedizinisch behandelte und damit schwer erkrankte Patient*innen erhalten. Dazu sind jedoch qualitativ hochwertige Kompatibilitätsdaten notwendig, sodass Pflegekräfte, pharmazeutisches oder ärztliches Personal entscheiden können, ob ein bestimmter Arzneistoff mit einem anderen in Kontakt kommen darf bzw. ob bestimmte Arzneistoffe separat appliziert werden sollten. Obwohl immer mehr Kompatibilitätsstudien durchgeführt werden, welche über eine rein visuelle Prüfung hinaus gehen, gibt es noch immer große Informationslücken. D'Huart et al. konnte beispielsweise nur zu jeder dritten beobachteten Arzneimittelkombination Kompatibilitätsdaten finden.[10] Neininger et al. verglich zwei verschiedene Kompatibilitätsdatenbanken (Kompatibilität im Katheter - KiK und King Guide to parenteral admixtures) und kam zu einem ähnlichen Ergebnis.[11] Lediglich zu 23 % bzw. 31,1 % der auf einer pädiatrischen Intensivstation identifizierten Arzneistoffkombinationen konnten Kompatibilitätsdaten gefunden werden.

1.2. Parenterale Therapie auf Intensivstationen

Auf Intensivstationen werden schwerkranke Patient*innen behandelt. Aufgrund der Dringlichkeit der Therapie ist es daher meist notwendig, Arzneimittel parenteral, vor allem als Infusion zu applizieren. Infusionen haben den Vorteil, dass die Wirkstoffe vollständig bioverfügbar sind und die Wirkung beinahe sofort (z.B. bei Katecholaminen oder Propofol) oder zumindest deutlich schneller einsetzt, als bei anderen Applikationsarten (z.B. oral, subkutan). Generell können Infusionen, bedingt durch die Applikationsdauer als Bolusgaben oder Kurzinfusionen (wenige Minuten bis etwa eine Stunde), prolongierte Infusionen (mehrere Stunden) oder Dauerinfusionen (über 24 Stunden oder länger) verabreicht werden. Auf Intensivstationen sind prolongierte Infusionen (z.B. Antibiotika) und Dauerinfusionen von besonderer Bedeutung. Im Mittel müssen den Patient*innen dabei sechs bis sieben Infusionslösungen gleichzeitig verabreicht werden, vereinzelt sogar deutlich mehr (siehe Tabelle 1.1).

Dieser Menge an zu verabreichenden Infusionen steht jedoch nur eine begrenzte Anzahl an venösen Zugängen zur Verfügung. Venöse Zugänge lassen sich in periphere und zentrale Zugänge einteilen. Peripher venöse Zugänge bzw. peripher venöse Katheter (PVK) werden typischerweise auf dem Handrücken oder am Unterarm mit einer Venenverweilkanüle (Synonym: Venenverweilkatheter) gelegt. Sie sind schnell und einfach zu legen und sowohl für

Tabelle 1.1.: Anzahl der gleichzeitig zu applizierenden Infusionslösungen auf Intensivstationen

Studie	Anzahl gleichzeitig verabreichter Infusionslösungen (Mittelwert ± Standardabweichung)
Machotka et al.[2]	6,3 ± 3
Marsilio et al.[3]	6,5 ± 2,4 (min. 4 - max. 15)
Gikic et al.[7]	6,5 ± 2,8
Hani et al.[12]	6,9 ± 3,6 (min. 2 - max. 17)

eine Medikamentenapplikation als auch zur Volumentherapie (z.B. bei Schockzuständen) geeignet.[13, S. 398] Insbesondere für Notfallsituationen sind peripher venöse Zugänge unverzichtbar und daher Standard bei intensivmedizinisch behandelten Patient*innen. Müssen jedoch venenreizende (z.B. Chemotherapeutika, Kaliumchlorid-Lösung (KCl) und generell Lösungen mit einem pH kleiner 5 bzw. größer 9 oder mit einer Osmolarität > 500 mOsmol/l), vasoaktive (z.B. Katecholamine, Phosphodiesterasehemmer) oder sehr viele Medikamente appliziert werden, so ist die Anlage eines zentralen Venenzugangs (zentraler Venenkatheter (ZVK)) erforderlich.[13, S. 400] Darüber hinaus, ist bei einer länger andauernden parenteralen Therapie die Anlage eines ZVK zu empfehlen. Ein ZVK wird in der Regel über ein venöses Gefäß (meist im Halsbereich) insertiert und bis in eine der großen Hohlvenen vorgeschoben. Lösungen, welche über einen ZVK appliziert werden, werden somit direkt verdünnt und weiterverteilt, sodass eine Reizung und Entzündung der Venen nahezu ausgeschlossen ist.[13, S. 400]

Im Gegensatz zu peripher venösen Kathetern besteht die Möglichkeit zentral venöse Katheter in mehrlumigen-Ausfertigungen zu verwenden. Dies bedeutet, dass das Innere des Katheters in getrennte Bereiche (Lumen, häufig auch als „Schenkel“ bezeichnet) aufgeteilt ist (siehe Abbildung 1.1). Müssen nun mehrere Arzneimittel gleichzeitig infundiert werden, können die Arzneimittel auf die verschiedenen Lumen des Katheters aufgeteilt werden und kommen somit nicht in Kontakt miteinander. Die Verwendung von mehrlumigen Kathetern ist neben der Schulung des Personals und dem zur Verfügung stellen von Kompatibilitätsdaten eine der wichtigsten Möglichkeiten, um Inkompatibilitäten zu vermeiden.[14]

Von einigen Sonderformen abgesehen, kommen in der klinischen Praxis bei Kindern ab einem Jahr meist drei-, bei Erwachsenen drei- oder fünflumige ZVK zum Einsatz. Bei Kindern unter einem Jahr können aufgrund des geringeren Venendurchmessers meist nur zweilumige oder auch nur einlumige ZVK verwendet werden. Gleichzeitig kann aber auch die Anzahl an ZVK nicht beliebig erhöht werden.

Jeder ZVK stellt ein Risiko für lokale, aber vor allem auch systemische Infektionen (engl.: catheter associated bloodstream infection, CABSI oder bei gesichertem Nachweis: catheter related bloodstream infection, CRBSI) dar. Im Rahmen des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems wurden für das Jahr 2014 Daten zur Häufigkeit der katheterassozierten

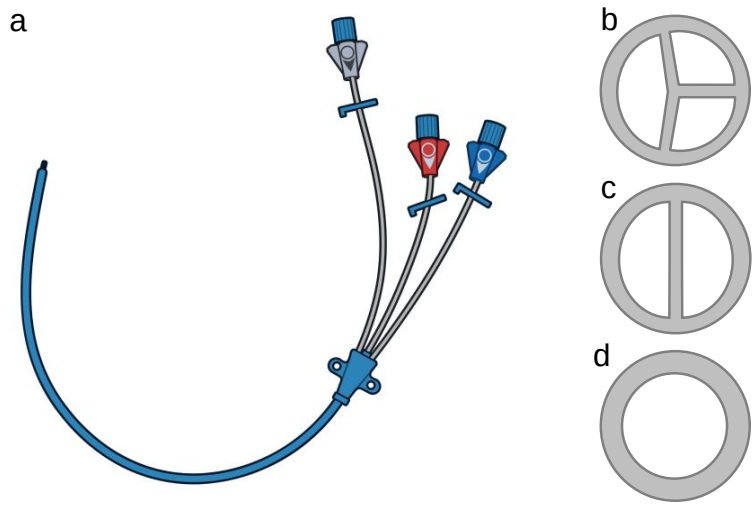


Abbildung 1.1.: Darstellung eines dreilumigen Katheters (a). Jedes Lumen ist farblich codiert (hier grau, rot und blau) und je nach Infusionsstandard der jeweiligen Station für bestimmte Medikamente vorgesehen. Die weiteren Abbildungen stellen Querschnitte eines dreilumigen (b), zweilumigen (c) und einlumigen (d) Katheters schematisch dar.

Sepsis erhoben. So wurden im Mittel 1,1 Sepsisfälle pro 1000 ZVK-Tage berichtet.[15] Werden nur Intensivstationen in Deutschland betrachtet, so wird von jährlich mindestens 8400 katheterassozierten Sepsen ausgegangen.[15] Die Häufigkeit von Infektionen, welche von Gefäßkathetern ausgehen, ist unter anderem auch von der Art des Katheters abhängig. Für getunnelte zentralvenöse Katheter (Hickman oder Broviac Katheter) und peripher insertierte zentral venöse Katheter (engl.: peripherally inserted central catheter (PICC)) wurden niedrigere Infektionsraten berichtet (periphere Venenverweilkatheter haben generell ein deutlich niedrigeres Infektionsrisiko im Vergleich zu ZVK).[15] Pädiatrisch kardiochirurgische Patient*innen scheinen dabei im Vergleich zu anderen Populationen ein deutlich erhöhtes Risiko für katheterassoziierte Infektionen zu haben.[15] Da bei diesen Kindern postoperativ entstehende katheterassozierte Infektionen eine akut lebensbedrohliche Situation darstellen, gilt es, diese unbedingt zu vermeiden.[15]

Zentral venöse Katheter erhöhen nicht nur das Risiko für Infektionen sondern auch für Thrombosen. Für katheterassoziierte Thrombosen sind Inzidenzen zwischen 1,1 % und 39 % beschrieben.[16]–[18] Obwohl die Studienlage sehr heterogen ist, scheinen PICCs ein deutlich höheres Risiko für Thrombosen zu haben.[16],[19] Damit unbenutzte Katheterlumen nicht durch einen Thrombus verschlossen werden, müssen diese mit einer niedrigen Infusionsrate kontinuierlich mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) oder Heparinlösung gespült werden.[8],[20]–[22] Das dadurch bedingte zusätzliche Flüssigkeitsvolumen kann jedoch insbesondere bei kardiologisch behandelten Neugeborenen und kleinen Kindern einer gewünschten Volumenkonstriktion entgegenstehen.[23]

Die Anlage eines ZVK ist technisch anspruchsvoll und insbesondere bei Kindern mit Risiken verbunden.[24] Die schwerwiegendsten Risiken sind Gefäßverletzungen und damit

verbundene starke Blutungen, Pneumothorax, Herzrhythmusstörungen, Luftembolien und Nervenschädigungen.[13, S. 408] Aus diesen genannten Gründen ist die Anzahl an zentral venösen Kathetern auf das absolut notwendige Maß beschränkt. In der Praxis wird der Nutzen eines zusätzlichen ZVK zur Applikation von Arzneistoffen, welche möglicherweise - jedoch aufgrund fehlender Daten, nicht bewiesenermaßen - inkompatibel sind, meist als nicht ausreichend empfunden. Dies führt dazu, dass mehrere Arzneistoffe zusammen über ein gemeinsames Infusionslumen appliziert werden müssen.

Abbildung 1.2 zeigt schematisch ein Infusionsregime, bei dem mehrere Parenteralia über ein gemeinsames Katheterlumen verabreicht werden.

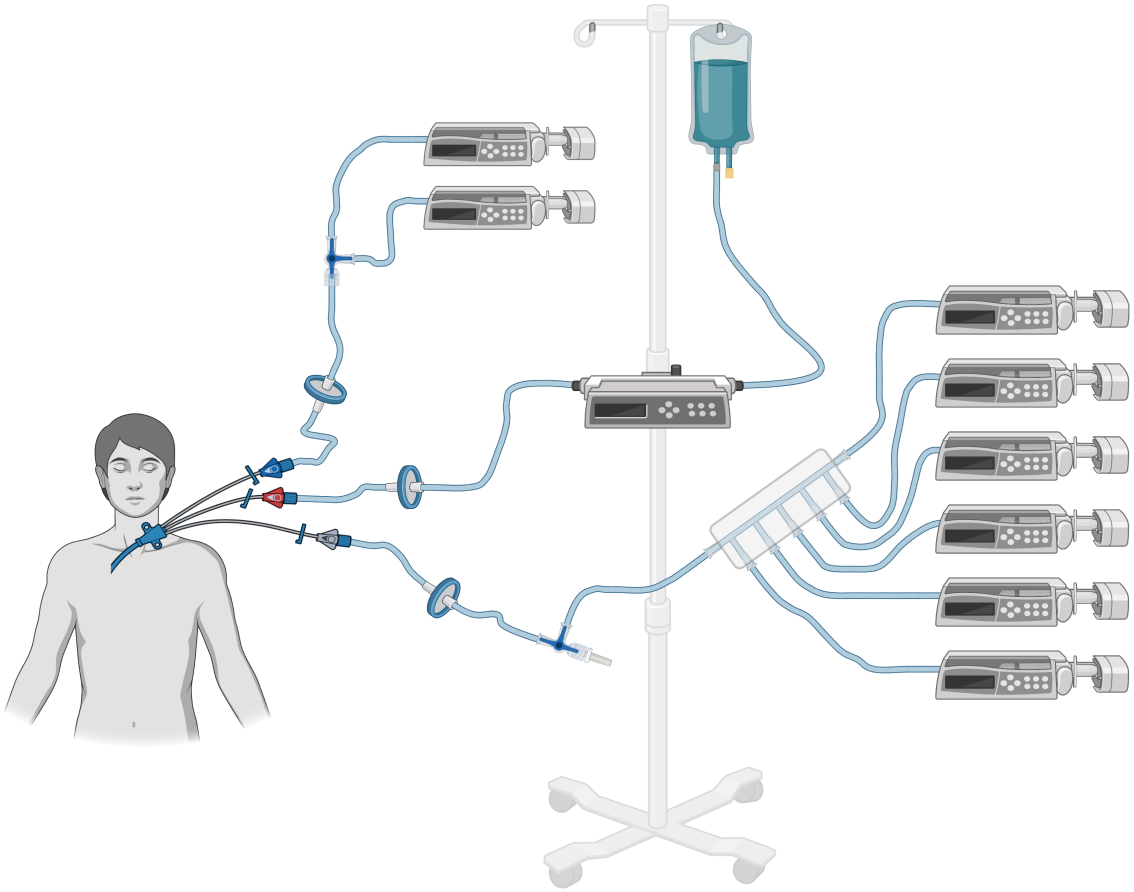


Abbildung 1.2.: Beispielhafte Darstellung eines Infusionsregimes über einen dreilumigen Katheter. Die gemeinsame Applikation der Arzneistoffe erfolgt über einen Drei-Wege-Hahn (blaues Infusionslumen) oder über eine Fünffach-Hahnbank (graues Infusionslumen). Die parenterale Ernährungslösung wird separat über das rote Infusionslumen appliziert.

Bei diesem Infusionsregime wird ein dreilumiger zentral venöser Katheter verwendet und es werden insgesamt neun verschiedene Arzneistoffe als kontinuierliche Infusion mit Hilfe von Infusionspumpen (Spritzenpumpen) appliziert. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, werden die zu applizierenden Arzneistoffe oft in mindestens zwei Gruppen bzw. auf verschiedene Infusionslumen aufgeteilt. Dabei ist ein Infusionslumen allein den als „kritisch“ bezeichneten

Arzneistoffen vorbehalten. Veränderungen in der Dosierung haben hier unmittelbare Auswirkungen für die Patient*innen. Zu diesen „kritischen“ Arzneimitteln gehören Schmerzmittel wie Fentanyl und Morphin, Sedativa wie Midazolam oder Sympathomimetika wie Epinephrin oder Norepinephrin. Alle anderen, „nicht-kritischen“ Arzneimittel (sowohl Dauer- als auch Kurzinfusionen) werden über andere Infusionslumen infundiert. Zur gemeinsamen Applikation von Arzneimitteln über ein gemeinsames Infusionslumen stehen Drei-Wege-Hähne oder Hahnbänke zur Verfügung. Über Drei-Wege-Hähne werden typischerweise auch Kurzinfusionen appliziert. Parenterale Ernährungslösungen werden meist mit einer höheren Laufrate infundiert. Außerdem bestehen sie aus einer komplexen Mischung von Elektrolyten, Aminosäuren, Vitaminen und Kohlenhydraten, was das Potential für Inkompatibilitäten erhöht. Daher werden Totale-Parenterale-Ernährungslösungen (TPN) wenn möglich über ein eigenes Infusionslumen appliziert (siehe Abbildung 1.2).

Bevor die Infusionslösungen schließlich über den Katheter in den Blutkreislauf der Patient*innen gelangen, können Filter in die Infusionsleitungen zwischengeschaltet werden. Diese Infusionsfilter sollen verhindern, das partikuläre Verunreinigungen (z.B. Glassplitter von Brechampullen oder Stopfenmaterial) aber auch durch Inkompatibilitäten hervorgerufene Kristalle oder größere Aggregate in die Patient*innen infundiert werden. Typischerweise werden 0,2 µm Filter und 1,2 µm Filter (speziell für fetthaltige Lösungen) verwendet.[13, S. 410]

1.3. Therapie pädiatrisch-kardiologischer Patient*innen auf einer Intensivstation

Die Idee zu dieser Arbeit ist in Kooperation mit der Intensivstation der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel entstanden. Die Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des UKSH, Campus Kiel ist unter anderem auf die Behandlung von Patient*innen mit Hypoplastischem Linksherzsyndrom und Erwachsene mit angeborenen Herzfehlern spezialisiert. Dies führt dazu, dass auf der Intensivstation im Notfall oder nach schweren operativen Eingriffen alle Altersstufen, vom Neugeborenen bis zum (jungen) Erwachsenen behandelt werden.

1.3.1. Angeborene Herzfehler

Bezogen auf Lebendgeburten in Deutschland kommen Herzvitien mit einer Inzidenz von 1 % vor.[25] Davon können 60,6 % als leicht, 27,4 % als moderat und 12 % als schwerwiegend klassifiziert werden.[25] Blum et al. teilt Herzvitien in die in Tabelle 1.2 dargestellten Gruppen ein.[26, S. 20]

Um einen Eindruck für die Komplexizität der Therapie angeborener Herzfehler zu bekommen und die medikamentöse Therapie (Abschnitt 1.3.2) nachvollziehen zu können, soll im folgenden Absatz auf das Hypoplastische Linksherzsyndroms genauer eingegangen werden. Für die anderen Herzvitien, welche auch in der Klinik für angeborene Herzfehler und

Tabelle 1.2.: Einteilung und Häufigkeiten angeborener Herzfehler. [26, S. 20]

Einteilung	Herzfehler	Häufigkeit
Septumdefekte mit vermehrter Lungendurchblutung ohne Zyanose	Ventrikelseptumdefekt, Atriumseptumdefekt, persistierender Ductus arteriosus Botalli	45 - 65 %
Zyanotische Herzfehler, verminderte bzw. vermehrte Lungendurchblutung	Fallot'sche-Tetralogie, Transposition der großen Arterien	5 - 10 %
Klappenfehler	Pulmonalstenose, -insuffizienz, Aortenstenose, -insuffizienz, Mitralstenose, -insuffizienz	15 %
Aortenfehler	Aortenisthmusstenose	5 - 8 %
Komplexe Herzfehler, vermehrte bzw. verminderte Lungendurchblutung	Hypoplastisches Linksherzsyndrom, Trikuspidalatresie, Truncus arteriosus communis	10 %

Kinderkardiologie in Kiel behandelt werden können, sei auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

Das Hypoplastische Linksherzsyndrom ist ein schwerwiegender angeborener Herzfehler, welche ohne sofortige Therapie innerhalb der ersten Wochen nach Geburt zum Tod des Neugeborenen führt. In Deutschland kommen 0,015 % der lebenden Neugeborenen mit einem Hypoplastischem Linksherzsyndrom auf die Welt.[25]

Beim Hypoplastischen Linksherzsyndrom ist der linke Ventrikel nicht funktionsfähig, entweder aufgrund einer Hypoplasie oder aufgrund einer Stenose der Mitral- oder Aortenklappe. Meist ist auch der aufsteigende Teil der Aorta (Aorta ascendens) hypoplastisch verändert (siehe Abbildung 1.3 b). Dadurch kann der Körper nicht ausreichend mit sauerstoffreichem Blut versorgt werden. Damit diese Kinder überhaupt lebensfähig sind, muss ein Septaldefekt, welcher es erlaubt, dass das Blut aus der Lungenvene über den linken Vorhof wieder in den rechten Vorhof fließen kann, vorliegen und der Ductus arteriosus Botalli (physiologische Verbindung zwischen Pulmonalarterie und Aorta beim Ungeborenen) darf nicht verschlossen sein. Dies vorausgesetzt, kann die rechte Herzkammer den Körper zumindest mit Mischblut (Mischung aus venösem und arteriellem Blut) versorgen. Der Ductus arteriosus Botalli verschließt sich normalerweise in den ersten Stunden nach der Geburt, daher muss als erste Therapiemaßnahme möglichst sofort Prostaglandin E (Alprostadil) zum offenhalten des Durchgangs infundiert werden.[26, S. 324] Da der rechte Ventrikel in diesem Zustand sowohl den Lungenkreislauf als auch den Systemkreislauf mit Blut versorgen muss, wird der rechte Ventrikel extrem belastet. Außerdem fließt das gesamte Blut aus dem Lungen- und Systemkreislauf (entsprechend 200 % des physiologischen Volumens) in den rechten Ventrikel, was

eine Dehnung und Hypertrophie des Muskels mit Beeinträchtigung der Pumpkraft zur Folge hat. Um den geringeren Sauerstoffgehalt des Blutes im Systemkreislauf auszugleichen muss der rechte Ventrikel diesem durch Mehrarbeit entgegenwirken. Dabei wird er jedoch selbst auch nur mit Mischblut und damit sauerstoffärmeren Blut versorgt. Durch die unphysiologische Druckbelastung der Lunge und den damit verbundenen erhöhten Blutfluss kommt es zu vermehrter Schleimproduktion und Schädigung der Pulmonalarterien.[26, S. 322] Dies führt wiederum zu rezidivierenden Infekten und pulmonalvaskulären Erkrankungen. Schließlich wirkt sich die Minderversorgung mit Sauerstoff auch auf Gehirn, Leber, Niere und Darm aus, was entsprechende Funktionsstörungen bis hin zum Organversagen nach sich zieht.[26, S. 322]

Neben der Möglichkeit der Herztransplantation wird in operativen Korrekturmaßnahmen versucht, den rechten Ventrikel zu entlasteten und das Überleben des Kindes mit akzeptabler Lebensqualität sicherzustellen. Die dabei durchgeführten Operationen sind nach ihrem Erfinder William Imon Norwood benannt und gliedern sich in drei Stufen. Bei der Norwood I Operation wird der Stamm der Pulmonalarterie getrennt und mit der Aorta ascendens vertikal verbunden (anastomisiert). Dadurch wird die Aorta ascendens erweitert und ist direkt mit dem rechten Ventrikel verknüpft. Der Ductus arteriosus Botalli wird verschlossen und eine Gefäßprothese (sogenannter Shunt) zwischen der rechten Pulmonalarterie und dem ersten Ast des Aortenbogens (Truncus brachiocephalicus) (Abbildung 1.3 c) oder dem rechten Ventrikel eingeführt (Sano-Technik, Abbildung 1.3 d).[26, S. 325] Dieser erste Schritt der Operation findet innerhalb der ersten Lebenswoche statt und stellt eine der komplexesten und schwierigsten Eingriffe der Kinderkardiochirurgie dar.[27] In weniger spezialisierten Zentren beträgt die postoperative Mortalität 75 %, in großen spezialisierten Zentren 22 %.[27] In Kiel konnte die Mortalität nach Norwood I von anfänglich 21 % sogar auf 2,5 % gesenkt werden.[28]

Nach sechs Monaten findet der zweite Operationsschritt (Norwood II) statt. Ziel ist es, den rechten Ventrikel von dem venösen Blutvolumen der oberen Körperhälfte zu befreien und somit zu entlasten. Dabei wird der Shunt entfernt und die obere Hohlvene mit der rechten Pulmonalarterie verbunden (Abbildung 1.3 e).[26, S. 326] Die Lunge wird nun nur passiv durchblutet, was aber in diesem Alter der Säuglinge toleriert wird. Dieser Kreislauf, bei dem das venöse Blut aus der oberen Körperhälfte direkt in die Lunge fließt wird als Hemifontan bezeichnet.

Zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr findet schließlich, in einem dritten Operationsschritt die vollständige Trennung des Lungen- und Systemkreislauf statt.[29] Dieser Zustand wird als Fontan-Kreislauf bezeichnet. Dazu wird auch die untere Hohlvene vom rechten Vorhof abgekoppelt und mit einer Gefäßprothese mit der rechten Pulmonalarterie verbunden (Abbildung 1.3 f). Eine kleine Verbindung zwischen Hohlvene und rechtem Vorhof bleibt jedoch als Ablaufmöglichkeit bei erhöhtem Druck bestehen.[26, S. 327] In diesem Zustand fließt das gesamte venöse Blut passiv in die Lungen und wird dort mit Sauerstoff angereichert. Das sauerstoffreiche Blut gelangt über den linken und rechten Vorhof in den rechten Ventrikel. Der rechte Ventrikel pumpt das sauerstoffreiche Blut schließlich in den

Systemkreislauf.

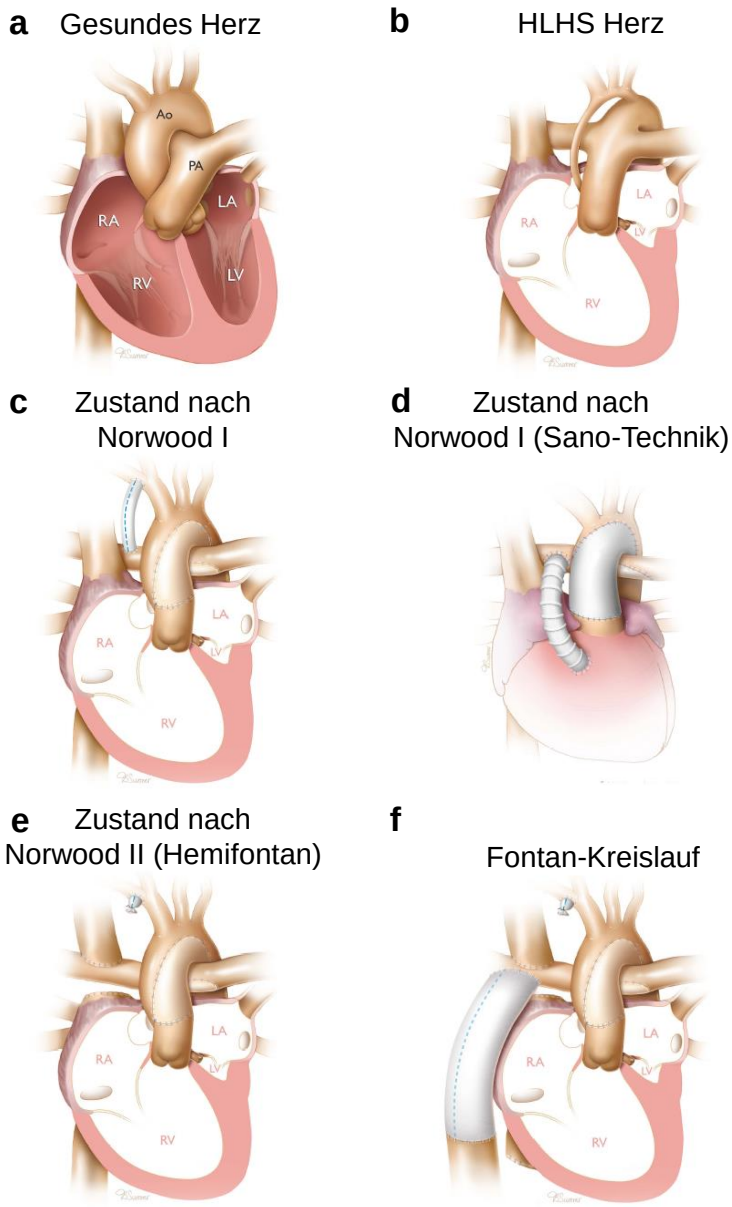


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung der Anatomie des Hypoplastischen Linksherzsyndroms und dessen operativer Korrektur. a: gesundes Herz, b: Hypoplastisches Linksherz syndromatisches Herz, c-f: dreischrittige operative Korrekturmaßnahmen beim hypoplastischen Linksherzsyndrom. Ao: Aorta, LA: linkes Atrium, LV: linker Ventrikel, PA: Pulmonalarterie, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel. Die Abbildung ist modifiziert nach Birla et al.[30]

Die Langzeitprognose von Patient*innen mit Hypoplastischem Linksherzsyndrom und Fontankreislauf kann noch nicht abschließend ermittelt werden. Die 10-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit wird mit 50 - 70 % angegeben. Aufgrund besserer Operationstechniken und Nachsorgeprogramme dürfte diese aber weiter steigen.[29]

1.3.2. Pharmakotherapie

Ziel der Pharmakotherapie ist es, den Kreislauf der Kinder stabil zu halten, das Herz zu entlasten und in seiner Pumpfunktion zu unterstützen. Darüber hinaus ist häufig eine Schmerz- und antibiotische Therapie notwendig.

Die folgenden Tabellen zeigen einen Überblick über häufige auf der Station verwendete Wirkstoffe (Tabelle 1.3 -1.7).

Tabelle 1.3.: Herz- und Gefäßsystem beeinflussende Wirkstoffe

Wirkstoff	Wirkstoffgruppe	Effekt/Anwendung
Alprostadil	Prostaglandin E	Offenhalten des Ductus arteriosus Botalli
Amiodaron	Klasse III-Antiarrhythmikum	Normalisierung des Herzrhythmus (Herzchirurgische Eingriffe erhöhen das Risiko für Herzrhythmusstörungen) [26, S. 52]
Epinephrin	Sympathomimetikum, Katecholamin	niedrige Dosis: v.a. β_1-Stimulation mit stark positiv inotroper und chronotroper Wirkung
Epoprostenol	Prostacylcin (Prostaglandin I_2)	Senkung des pulmonalen Gefäßwiederstands und Senkung des systemischen arteriellen Blutdrucks, Thrombozytenaggregationshemmer
Heparin	Antikoagulanz	Thromboseprophylaxe
Levosimedan	Calciumsensitizer	positiv inotrop durch Sensibilisierung von Troponin C für Calcium, vasodilativ [31, S. 11-12]
Milrinon	Phosphodiesterase-Hemmer	positiv inotrop, vasodilativ, Senkung des systemischen Widerstands
Nitroprussid	NO-Donator	Senkung des systemischen Widerstands, verbesserte Bilanzierung des systemischen und pulmonalen Blutfluss [29]
Norepinephrin	Sympathomimetikum, Katecholamin	ähnliche Wirkung wie Epinephrin, jedoch stärkere periphere Wirkung und dadurch Anstieg des arteriellen Gefäßwiederstands
Phentolamin	α-Rezeptor-Antagonist	positiv inotrop, vasodilativ, Nachlastsenkung [32, S. 525]
Urapidil	α-Rezeptor-Antagonist	vasodilativ, sympatholytisch, jedoch keine Beeinflussung der Herzfrequenz

Tabelle 1.4.: Schmerzmittel und Sedativa

Wirkstoff	Wirkstoffgruppe	Effekt/Anwendung
Clonidin	α_2-Agonist	analgosedierend, Senkung peripherer Gefäßwiederstand und Nachlast, verbesserte diastolische Ventrikelfüllung, Ökonomisierung der Kreislauffunktion [29]
Dexmedetomidin	α_2-Agonist	identisch zu Clonidin
Esketamin	Anästhetikum	starke analgetische und sedative Wirkung, Steigerung von Blutdruck und Herzfrequenz
Fentanyl	Opioid	starke Analgesie, sedativ
Metamizol	Nichtopioid-Analgetikum	Analgesie ggf. im Wechsel mit Paracetamol oder zusätzlich zur Opioidtherapie
Midazolam	Benzodiazepin	sedativ, schlaffördernd, anxiolytisch, muskelrelaxierend
Morphin	Opioid	starke Analgesie, sedativ
Paracetamol	Nichtopioid-Analgetikum	Analgesie ggf. im Wechsel mit Metamizol oder zusätzlich zur Opioidtherapie

Eine Sedierung verursacht immer auch eine Vasodilatation und Verringerung des Sauerstoffverbrauchs.

Tabelle 1.5.: Antiinfektiva

Wirkstoff	Wirkstoffgruppe	Effekt/Anwendung
Amphotericin B, liposomal	Antimykotikum	systemische Pilzinfektionen, Infektionsprophylaxe
Ampicillin + Sulbactam	Aminopenicillin + Betalactamase-Inhibitor	wirksam gegen verschiedene Erreger, perioperative Prophylaxe
Caspofungin	Antimykotikum	systemische Pilzinfektionen
Cefazolin	Cephalosporin 1. Generation	wirksam gegen verschiedene Erreger, perioperative Prophylaxe, Infektionsprophylaxe ZVK
Teicoplanin	Glycopeptid-Antibiotikum	wirksam gegen verschiedene Erreger, Infektionsprophylaxe

Die Wahl der Art und Notwendigkeit einer Infektionsprophylaxe muss individuell gegen das Risiko der Resistenzentwicklung abgewägt werden.

Tabelle 1.6.: Diuretika

Wirkstoff	Wirkstoffgruppe	Effekt/Anwendung
Etacrynsäure	Schleifendiuretikum	starke Diurese, Vor- und Nachlastsenkung
Furosemid	Schleifendiuretikum	starke Diurese, Vor- und Nachlastsenkung
Theophyllin	Phosphodiesterase -Hemmer	verbesserte Diurese in Kombination mit einem Schleifendiuretikum

Kombinationen der genannten Wirkstoffe sind häufig notwendig.

Tabelle 1.7.: Andere Wirkstoffe

Wirkstoff	Wirkstoffgruppe	Effekt/Anwendung
Natriumhydrogen-carbonat	Puffersystem	Azidosetherapie (respiratorische und metabolische Azidosen sind bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern häufig) [31, S. 264]
Natriumthiosulfat	Antidot	gleichzeitige Infusion mit Nitroprussid zur Prophylaxe einer Cyanid-Intoxikation
Normalinsulin	Insulin	Regulation des Blutzuckerspiegels
Pantoprazol	Protonenpumpen-inhibitor	Stressulkusprophylaxe

2. Zielsetzung

Patient*innen mit angeborenen Herzfehlern können mittlerweile dank des medizinischen Fortschritts oftmals mit guter Prognose behandelt werden. Dazu sind jedoch häufig chirurgische Interventionen und eine intensivmedizinische Versorgung notwendig. Als Teil der intensivmedizinischen Versorgung müssen den Patient*innen eine Vielzahl an Arzneimitteln parenteral verabreicht werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Kompatibilität von ausgewählten Parenteralia, welche auf der Intensivstation der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des UKSH, Campus Kiel angewendet werden, zu untersuchen.

Zunächst sollte eine Übersicht der verwendeten Arzneimittel und deren Kompatibilität zueinander erstellt werden. Aufbauend auf dieser ersten Übersicht sollten häufig angewendete Arzneimittel identifiziert werden, zu denen keine Kompatibilitätsdaten zur Verfügung standen. Diese sollten durch eigene Studien ergänzt werden. Hierbei sollte nicht nur die physikalische, sondern auch die chemische Kompatibilität der Arzneistoffe untersucht werden. Dies sollte durch die Etablierung einer HPLC-Methode, die es ermöglicht, alle ausgewählten Arzneistoffe parallel zu quantifizieren und eventuell auftretende Abbauprodukte zu detektieren, umgesetzt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten schließlich der Intensivstation zur Verfügung gestellt werden, um so einen Beitrag zur Erhöhung der Arzneimitteltherapiesicherheit zu leisten.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Erstellung einer Kompatibilitätstabelle

In der Krankenhausapotheke des UKSH, Campus Kiel werden insbesondere Dauerinfusionen aber auch einige Kurzinfusionen zentral für die Intensivstation der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie hergestellt. Anhand dieser Herstelldaten wurden zunächst die häufigsten auf der Intensivstation angewandten Arzneimittel identifiziert. In mehreren Hospitationen und Gesprächen mit den Ärzt*innen und Pflegekräften wurde diese Liste um weitere häufige Arzneimittel ergänzt. Bezüglich vorhandener Kompatibilitätsdaten zu diesen Arzneimitteln wurde eine Literatur- und Datenbankrecherche durchgeführt. Die Ergebnisse wurden schließlich in einer Kompatibilitätstabelle in Form einer Kreuztabelle dargestellt und diese als Poster der Intensivstation zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 3.1). Dabei wurden die vorhandenen Kompatibilitätsdaten der Arzneistoffkombinationen neben der Kategorie „inkompatibel“ und „keine Kompatibilitätsdaten vorhanden“, in vier weitere qualitative Kategorien eingeteilt. Diese sind „widersprüchlich“, „visuell kompatibel bzw. keine Angabe der Methodik“, „physikalisch kompatibel“ und „chemisch kompatibel“. Außerdem wurden die pH-Werte der Arzneistoffe nach den Empfehlungen von Höpner et al. in der Kreuztabelle vereinfacht dargestellt (farbliche Markierung von sauren, neutralen und basischen Arzneistofflösungen).[33] Da die Wahrscheinlichkeit für Inkompatibilitäten zwischen basischen und sauren Arzneimitteln sehr hoch ist,[34] ist die Darstellung der pH-Werte für das Stationspersonal nützlich, um potenzielle Inkompatibilitäten von nicht aufgeführten Arzneistoffkombinationen zumindest abschätzen zu können. Um die Übersichtlichkeit der Kompatibilitätstabelle zu gewährleisten, wurde auf eine Angabe der in den Studien untersuchten Konzentrationen verzichtet, obwohl wie in dieser Arbeit an späterer Stelle gezeigt wird, Inkompatibilitäten konzentrationsabhängig auftreten können.

In der Kompatibilitätstabelle (Abbildung 3.1) fällt zunächst auf, dass zu einem Großteil der aufgeführten Arzneistoffkombinationen keine oder nur unzureichende Kompatibilitätsdaten („widersprüchlich“ oder „visuell kompatibel bzw. keine Angabe der Methodik“) vorhanden waren. Dies zeigt die Menge an fehlenden Daten von qualitativ hochwertigen (über die rein visuelle Bewertung hinausgehenden) Kompatibilitätsstudien. Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, werden die Arzneistoffe standardmäßig auf verschiedene Lumen eines Katheters aufgeteilt. Es ist daher anzumerken, dass manche Arzneistoffkombinationen, welche in der Kompatibilitätstabelle dargestellt sind, in der Praxis nicht vorkommen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Fokus auf die „nicht-kritischen“ Arzneistoffe Etacrynsäure, Theophyllin und Furosemid in Kombination mit weiteren, vor allem von der Kinderintensivstation selbst aufgezogenen Infusionslösungen gelegt. Zu diesen Arzneistoffkombinationen wurde eine umfangreichere Literaturrecherche unter Verwendung weiterer Datenbanken (stabilis und ASHP Injectable drug information) durchgeführt. Ausgangspunkt

für alle weiteren Untersuchungen stellt daher die in Abbildung 3.2 gezeigte Kompatibilitätstabelle dar.

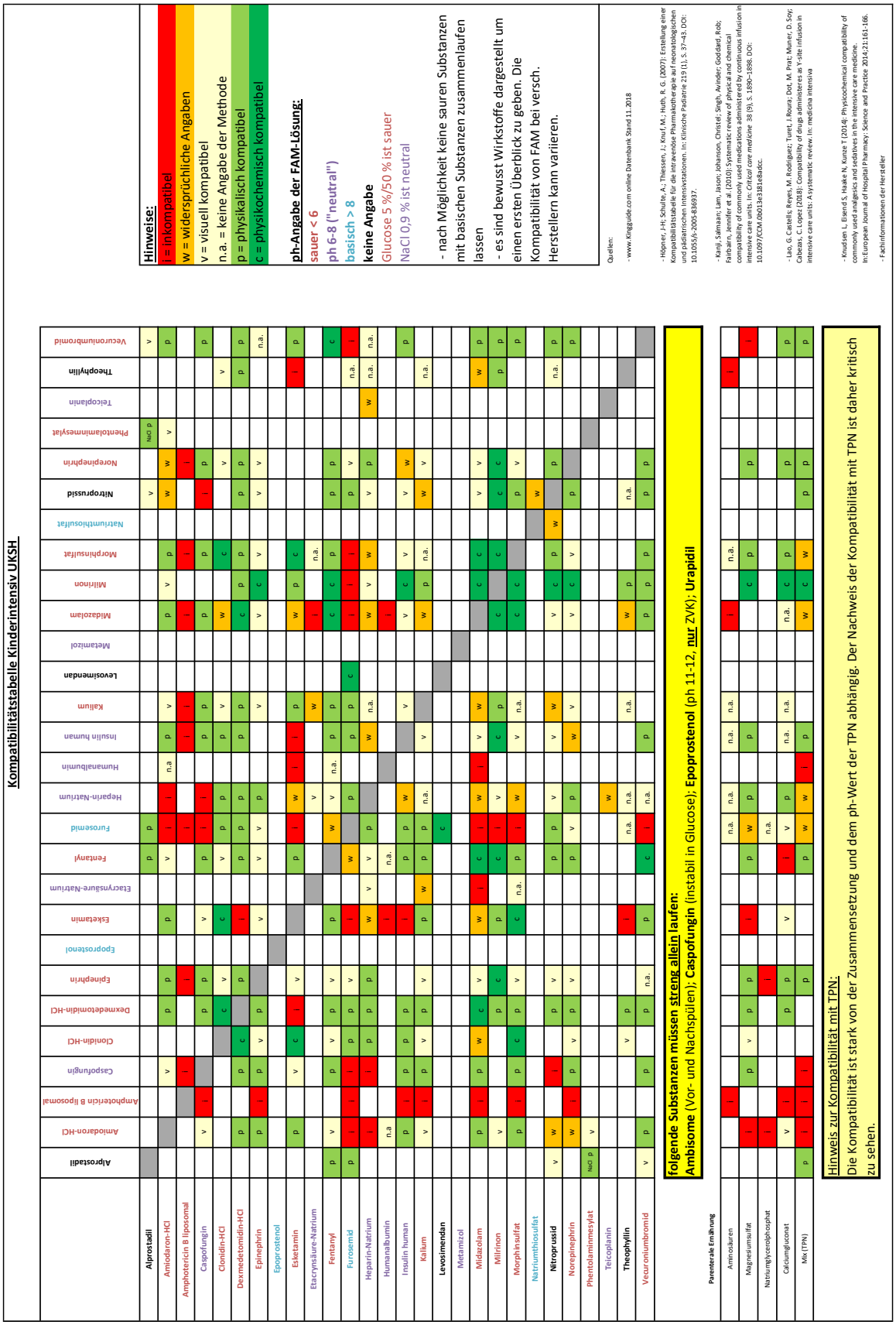


Abbildung 3.1.: Poster der für die Kinderintensivstation erstellten Kompatibilitätstabelle.[33],[35]–[37]

	Theophyllin	Furosemid	Ampicillin + Sulbactam	Cefazolin	Glucose 50 %	Meropenem	Pantoprazol	Paracetamol	Kaliumchlorid 7,46 %	Natriumhydrogen-carbonat 8,4 %
Etacrynsäure										
Theophyllin										
Furosemid										

Abbildung 3.2.: Kompatibilitätstabelle der Arzneistoffe Etacrynsäure, Theophyllin und Furosemid mit anderen Arzneistoffen vor Beginn der Kompatibilitätsstudien. Die Abbildung ist modifiziert nach Jirschitzka et al.[38] und stellt den Ausgangspunkt für die durchgeführten Kompatibilitätsstudien dar. rot: inkompatibel, orange: widersprüchliche Angaben, beige: visuell kompatibel, grün: physikalisch kompatibel.

3.2. Physikochemische Kompatibilität von Etacrynsäure und Theophyllin mit anderen Arzneimitteln

Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, konnten für die beiden Arzneimittel Etacrynsäure und Theophyllin nur wenige Kompatibilitätsdaten gefunden werden.[39],[40] In der von Kershaw et al.[39] durchgeführten Studie wurde die Kompatibilität von Theophyllin nur visuell untersucht. Die Aussagekraft dieser Studie ist daher als gering zu bewerten. Deshalb wurde eine eigene Kompatibilitätsstudie von Etacrynsäure und Theophyllin mit den anderen in Abbildung 3.2 gezeigten Arzneistoffen durchgeführt. Zusätzlich zur visuellen und physikalischen Untersuchung durch pH-Messung und Turbidimetrie, wurde eine high-performance-liquid-chromatography (HPLC)-Methode entwickelt und validiert. Damit war es möglich, eventuelle Degradationsprodukte zu detektieren, den Gehalt der Arzneistoffe (außer Glucose, KCl und Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)) zu bestimmen und Aussagen zur chemischen Kompatibilität zu treffen. Da auf der Intensivstation der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des UKSH, Campus Kiel sowohl Neugeborene als auch junge Erwachsene behandelt werden, wurden die unterschiedlichen Dosierungen bzw. die daraus resultierenden Arzneimittelkonzentrationen in der Kompatibilitätsstudie berücksichtigt.

Die Durchführung, Ergebnisse und Diskussion dieser Kompatibilitätsstudie können in dem zur Publikation eingereichten Manuskript mit dem Titel **„Compatibility study of etacrynic acid and theophylline with other commonly used drugs in a paediatric cardiological intensive care unit“** -Sven Jirschitzka, Kirstin Reinecke, Swantje Eisend, Thomas Kunze (eingereicht in PTHP am 25.05.2023) gefunden werden.[38]

1

Title: Compatibility study of etacrynic acid and theophylline with other commonly used drugs in a paediatric cardiological intensive care unit

Short title: Compatibility study of etacrynic acid and theophylline

Sven Jirschitzka[1], Kirstin Reinecke[2], Swantje Eisend[2], Thomas Kunze[1]

[1] Department of Clinical Pharmacy, Pharmaceutical Institute, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Germany, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany

[2] Hospital Pharmacy, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel, Germany

Corresponding author: Thomas Kunze, Department of Clinical Pharmacy, Pharmaceutical Institute, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany. Phone: 00494318801331, Email: tkunze@pharmazie.uni-kiel.de

Abstract

Objectives: Critically ill paediatric patients often receive a large number of parenteral drugs via only a few available intravenous accesses. This poses the risk of incompatibilities. The aim of our study was to investigate the compatibility of etacrynic acid and theophylline with other parenteral drugs used in a paediatric cardiological intensive care unit. These include ampicillin and sulbactam, cefazolin, furosemide, glucose 50 % solution, meropenem, pantoprazole, paracetamol, potassium chloride 7.46 % solution and sodium bicarbonate 8.4 % solution.

Methods: Drugs were mixed in various concentrations representing infant and adult dosage. The physicochemical compatibility was investigated over a period of up to 96 h using several methods. This was done by visual inspection, pH determination, turbidimetric measurements at 350 nm, 410 nm and 530 nm and content determination via high performance liquid chromatography.

Results: 50 drug combinations were tested. Of these, 37 drug combinations were assessed as physicochemically compatible. Depending on the concentration, 13 drug combinations namely etacrynic acid + theophylline, etacrynic acid + ampicillin + sulbactam, etacrynic acid + cefazolin, theophylline + cefazolin and theophylline + meropenem were evaluated as incompatible.

Conclusion: These results will enable healthcare professionals and pharmacists to optimise infusion therapy for paediatric patients and substantially reduce the risk of incompatibilities regarding etacrynic acid and theophylline.

Keywords: physicochemical compatibility; incompatibility; paediatric intensive care; parenteral drugs

3

Abbreviations

Amp:	ampicillin
Cef:	cefazolin
Eca:	etacrynic acid
Fur:	furosemide
G50:	50 % glucose solution
HPLC:	high performance liquid chromatography
ICU:	intensive care unit
KCl:	potassium chloride solution
Mero:	meropenem
Panto:	pantoprazole
pcICU:	paediatric cardiological intensive care unit
PCM:	paracetamol (acetaminophen)
Sul:	sulbactam
SBC:	sodium bicarbonate solution
Tph:	theophylline

Introduction

Infusion management of critically ill patients is a challenge for healthcare professionals. Several drugs and, if necessary, parenteral nutrition have to be administered to patients via only a few available central or peripheral venous accesses. Due to this fact, incompatibilities between the drugs can occur with serious consequences. Incompatibilities of intravenous drugs are defined as the reaction of two or more drugs or a drug and the container material resulting in solutions that are no longer optimal for the patient [1]. The frequency of incompatibilities in ICUs depends on many factors. These include for example the number of administered drugs, the number of venous accesses, the type of ICU, the patients or the experience of the nurses. Furthermore, the design of studies which investigate the incidence of incompatibilities is very heterogeneous, so that the incidence is reported between 2.16 % and 68 % [1–5]. Incompatibilities can result in an ineffective therapy for the patient and increase the risk of thrombosis, embolisms, infection due to the more frequent manipulation of the infusion line or a dangerous systematic inflammatory syndrome [6]. In general, two types of intravenous applications can be distinguished in intensive care units: intermittent and continuous infusions. Intermittent infusions are administered for only a few minutes up to 1 hour, whereas continuous infusions are administered for several hours and often over a period of 24 hours. In contrast to intermittent infusions, it is not possible to rinse the catheter with a neutral solution, for example 0.9 % saline, after administration of a drug to avoid incompatibilities [7–9]. In addition, continuous infusions often have a lower flow rate and thus longer contact time between the individual drugs, especially in paediatric patients. Therefore, continuous infusions have an increased risk for the occurrence of incompatibilities [3]. One strategy to avoid incompatibilities is the use of multilumen catheters [1]. In adults, 5-lumen catheters are often used. As the venous diameter is smaller, 3-lumen catheters can be used in children, and single- or sometimes 2-lumen catheters can be used in children under 2 years of age. At the same time, venous catheter placement is particularly difficult in infants [10], and each catheter must be kept open by flushing with heparin or normal saline [7, 8, 11, 12], which may be counterproductive to the intended volume constriction in infants following surgery for

congenital heart disease [13]. In addition, each extra venous access increases the risk of infections [14]. It is therefore often unavoidable in paediatric intensive care to infuse multiple drugs through the same lumen of a catheter. Unfortunately, data on drug compatibility is limited for the lower doses used in paediatric units [15, 16]. In this study, we aimed to investigate the physicochemical compatibility of intravenous drugs used in the paediatric cardiological intensive care unit of the Clinic for Congenital Heart Defects and Paediatric Cardiology of the UKSH Campus Kiel in order to increase the safety management of drug therapy. Thereby, we focused on the investigation of the compatibility of etacrynic acid (Eca) and theophylline (Tph) in combination with ampicillin (Amp) + sulbactam (Sul), cefazolin (Cef), furosemide (Fur), 50 % glucose solution (G50), meropenem (Mero), pantoprazole (Panto), paracetamol (acetaminophen, PCM), potassium chloride solution (KCl) or sodium bicarbonate solution (SBC).

Materials and methods

Chemicals and reagents

The drugs as well as 50 ml polypropylene syringes (Original Perfusor® B. Braun Melsungen AG or BD™ Medical™ Plastipak™) and sterile 0.9 % saline solution (B. Braun Melsungen AG or Fresenius Kabi) were kindly provided by the hospital pharmacy of the UKSH Campus Kiel. Table 1 gives the drug formulations, batches and concentrations used. At the time of testing all solutions were within the stated expiry time. LC-MS grade water was obtained from VWR (83645.320), acetonitrile gradient grade 99.9 % from honeywell (34851), acetic acid from Sigma-Aldrich (1.00066) and sodium dihydrogen phosphate from Carl Roth (K300.2).

Study design

In cooperation with the paediatric cardiological intensive care unit (pcICU) of the Clinic for Congenital Heart Defects and Paediatric Cardiology and the hospital pharmacy of the UKSH Campus Kiel, frequently used drugs were identified. Since both newborns and young adults are treated in the pcICU, the drugs are used in a wide range of doses or concentrations. It is

quite possible that concentrations vary by a factor of ten depending on the age of the patient. In addition, it is conceivable that the infusion rates of two drugs are different. When two or more drugs are infused through the same lumen of an infusion catheter, a different infusion rate will result in different concentrations of the drugs. To simulate different infusion rates in compatibility studies, 10:1 and 1:10 mixtures are often investigated in addition to the 1:1 mixture [17, 18]. However, this was not considered appropriate for our study due to the wide range of drug concentrations on the pcICU. Instead, we decided to use a mixing scheme as shown in Figure 1. For each drug, a maximum and a minimum concentration was defined. To represent a worst-case scenario, the drugs were then mixed together in different concentrations as follows: maximum concentration drug A - maximum concentration drug B (a); maximum concentration drug A - minimum concentration drug B (b); minimum concentration drug A - maximum concentration drug B (c); minimum concentration drug A - minimum concentration drug B (d). Drugs, which are used in the pcICU only in one concentration (so-called fix concentration), were mixed only with the maximum (e) or minimum (f) concentration of the other drug.

Each combination was prepared in duplicates. A contact time between the two drugs of 4 h was defined as the clinically relevant time period. If no relevant changes occurred within these 4 h, the combination was considered to be compatible. However, the samples were measured over a total period of 96 h in order to provide more evidence for the data obtained.

Literature and databank research

Firstly, published compatibility data were searched. Therefore, the online databases King® Guide (last updated 03/2020), ASHP® Injectable drug information™ (last updated 06/2020) and stabilis (last updated 02/2023) as well as the prescribing information were used. In addition, the literature database PubMed® was searched for compatibility data using the keywords *compatibility* or *incompatibility* or *Y-site* or *stability* or *coinfusion* and *name of the drug*.

7

Sample Preparation

The drugs were reconstituted, if necessary, with 0.9 % saline (Reomax with 5 % glucose solution provided) according to the manufacturer's instructions and then further diluted with 0.9 % saline. These drug solutions were mixed in a 1:1 ratio in 50 ml syringes as described in the mixing scheme (Figure 1). The filled syringes were sealed with a combi-stopper (B. Braun Melsungen) and stored at room temperature and under laboratory light. Immediately after mixing, as well as after 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h and 96 h, 2 ml of solution were taken for pH determination and turbidimetric measurement. At each measurement point, the samples were also checked for visual conspicuities (e.g. particles, discolouration, production of gas and turbidity) in front of a white and black background using an adapted pharmacopoeia method (Ph. Eur. 10.0: 2.9.20 Particulate Contamination: Visible Particles) [19]. In addition, 0.8 ml of sample solution was taken directly after mixing and after 2 h, 4 h, 24 h and 96 h, aliquoted to 0.2 ml and frozen in liquid nitrogen. The 0.2 ml aliquots were stored at -80 °C until high performance liquid chromatography (HPLC) measurements.

pH measurement

1 ml sample solution was placed in a test tube and the pH was measured after a latency time of 10 minutes with a Hanna pH meter (HI 2211 + HI 1053), which was calibrated daily with ready-to-use buffer solutions (Carl Roth, A517.1, P713.1, 8086.4).

Turbidimetry

To examine the sample solutions for non-visible changes 0.8 ml of the sample solution was placed in a semi-micro cuvette (Brand®, 759115) and measured in triplicates at 350 nm, 410 nm and 530 nm in a photometer (Varian Cary® 50 UV-Vis Spectrophotometer) [20].

HPLC and validation

For the combinations evaluated as physically compatible, the drug content was determined, with the exception of potassium chloride, glucose and sodium bicarbonate. For this purpose,

an HPLC method was developed that allowed the quantification of all selected drugs. A detailed description of the HPLC system, the chromatographic conditions and the validation procedure were described elsewhere [21].

Limit values in compatibility studies

In the literature, different limit values for the methods usually used in compatibility studies are discussed to decide whether a combination can be considered compatible or incompatible. In particular, there are different views on the maximum acceptable deviation of the pH value. For example, in some compatibility studies, a pH deviation of more than 0.2 compared to the beginning is already considered as a sign of incompatibility [22, 23]. In other studies, however, deviations of the pH value of maximum 2 are also accepted [24]. As a limit value for turbidimetric measurements, absorbance changes of 0.01 at 530 nm or 0.04 at lower wavelengths are often defined [18, 25]. One study even accepted changes in absorbance of 0.1 [26]. However, since a visually perceptible discolouration is already observable from an absorbance change at 410 nm of approximately 0.015, a maximum absorbance change of 0.04 as a limit value for 410 nm seemed unsuitable to us. Therefore, we have decided to use a lower limit value for the absorbance at 410 nm. To describe the chemical compatibility of intravenous drugs, a residual content of at least 90 % is generally considered acceptable [20]. In summary, in this study, drug combinations were considered as physicochemical compatible if no changes occurred seen with the unaided eye within 4 h, the pH did not change by more than 1, the absorbance did not change by more than 0.04 at 350 nm and 0.01 at 410 nm and 530 nm, and drug content did not decrease by more than 10 %.

LC-MS

To identify the degradation products, LC-MS and LC-MS/MS experiments were carried out for conspicuous combinations according to a method described elsewhere [21].

Results

Literature research

Only two compatibility studies were found in PubMed® for the drug combinations selected here. Firstly, Allen et al. 1977, who confirmed the physical compatibility between Eca and KCl [27], and secondly, Kershaw et al. 1993, who investigated the compatibility between Tph, Amp, Cef, KCl and Sul and rated them as visually compatible [28]. The three databases (King® guide, ASHP® Injectable drug information™ and stabilis) refer to these two studies when searching for compatibility data for Eca and Tph in combination with the other drugs. Compatibility data beyond this were not given in the databases. Unfortunately, precise information on compatibility with other drugs is also missing in the prescribing information. In the prescribing information for Reomax, at least, it is stated that Eca is incompatible with solutions with a pH below 5. By contrast, the prescribing information of afpred® forte-THEO only states that no substances other than the diluting solution should be added in order to avoid incompatibilities. The prescribing information of the other drugs either mentions an acidic pH, which should be avoided (Lasix®), gives no further information except that the respective drugs should be administered separately (Meropenem Hikma, Pantoprazol EVER Pharma, Paracetamol B. Braun) or states specific incompatibilities, but not for the drugs used in this study (Unacid®, Cefazolin-saar®). As a result of the literature research, the cross-table shown in Figure 2 became the basis for our compatibility study.

Validation HPLC

A HPLC method was developed for the identification and quantification of the drugs. Figure 3 shows an overlayed representative chromatogram of all drugs. With the exception of Amp and Mero, all peaks are baseline separated. However, since Amp and Mero did not need to be identified at the same time, this was not problematic. Table 2 shows the results of the validation and the retention times. All drugs showed a linear relation between peak area and concentration over the whole concentration range. The coefficient of variation was always less than 2 %. The maximum and minimum recoveries for both direct measurement and frozen and

thawed samples were between 97.86 % and 101.99 %. This was considered acceptable for the quantification of the drugs. Therefore, the developed HPLC method was found to be appropriate.

Physicochemical compatibility

When examining the drug mixtures with the unaided eye in front of a black and white background according to Ph. Eur. 10.0: 2.9.20, no changes were noticed in the clinically relevant time period of 4 h. In Figure 4, the results of the compatibility study are presented in form of a cross-table. A total of 50 combinations of drugs were investigated, each in duplicates. Of these, 37 combinations were assessed as physicochemically compatible and 13 combinations were assessed as incompatible. Drug combinations assessed as incompatible include etacrynic acid + theophylline, etacrynic acid + ampicillin + sulbactam, etacrynic acid + cefazolin 100 mg/ml, theophylline + cefazolin and theophylline 4 mg/ml + meropenem 2 mg/ml.

When determining the contents of the combinations of etacrynic acid with sodium bicarbonate, an additional increasing peak was observed in the chromatograms (see Figure 5). LC-MS and LC-MS/MS experiments were carried out to identify the unknown substance. A molecular ion ($M+H^+$) with *m/z* 321 was found and allocated to the unknown substance. Together with the fragmentation pattern obtained from the LC-MS/MS experiment of *m/z* 321 ± 2 (see Figure 6), the substance was identified as 2-(2,3-dichloro-4-(2-(hydroxymethyl)butanoyl)phenoxy)acetic acid (OH-Eca).

A graphical representation of the results of the individual drug combinations over 96 hours can be found in the supplementary materials.

Discussion

The loop diuretic etacrynic acid is currently not a first-choice diuretic. The other loop diuretics torasemide and furosemide have much better side effect profiles [29], so that etacrynic acid is used at most as a reserve diuretic. However, in paediatric cardiological

patients, studies have found a benefit in the use of etacrynic acid alone or in combination with furosemide [30, 31]. A similar situation applies for theophylline. Formerly used for the treatment of asthma or COPD, it is hardly used any more for these indications [32, 33]. In addition to the bronchodilating and anti-inflammatory effects, a diuretic effect of theophylline has been described. Especially in paediatric cardiological patients after surgery, urine output was increased and fluid overload was reduced with theophylline [34, 35].

In addition to Eca and Tph, patients of the pcICU of the Clinic for Congenital Heart Defects and Paediatric Cardiology of UKSH Kiel often receive many other drugs, including Amp + Sul, Cef, Fur, G50, Mero, Panto, PCM, KCl or SBC either as continuous infusion or short infusion. Concerning the possible resulting drug combinations, only two studies were found in the literature which investigated their compatibility [27, 28]. In the study from Kershaw et al. 1993, only a visual assessment of Tph in combination Amp, Cef, KCl and Sul was carried out, so the evidence regarding the compatibility of these drugs is limited. To fill this gap, we performed a compatibility study of our own and investigated the physicochemical compatibility between etacrynic acid and theophylline with other drugs commonly used in the pcICU.

Out of 50 combinations tested, 13 incompatible combinations were identified (see Figure 4). Interestingly, some of these incompatible combinations initially showed no relevant changes visually, turbidimetrically or in terms of their pH, and thus these combinations could be assessed as physically compatible. However, when the content of these combinations was determined by HPLC, it was found that the concentration of one or more drugs decreased by more than 10 % within 4 h and therefore these drug combinations had to be assessed as incompatible. These *physically-not-detectable-incompatible* combinations include etacrynic acid 0.8 mg/ml + theophylline 0.8 mg/ml, etacrynic acid 0.1 mg/ml + theophylline 4 mg/ml or 0.8 mg/ml and etacrynic acid 0.8 mg/ml or 0.1 mg/ml + ampicillin 20 mg/ml + sulbactam 10 mg/ml. In the case of etacrynic acid in combination with theophylline, an addition product of the two drugs is formed, which is described elsewhere in detail [21]. In view of the fact that the contact time of the drug solutions is shorter with Y-site administration compared to a mixture of drugs in the same container and that chemical reactions usually take longer to occur,

physical tests are already considered sufficient in the literature for assessing the compatibility of drugs administered via Y-site infusion [3, 17]. The occurrence of the *physically-not-detectable-incompatible* drugs shows that even with physically inconspicuous drug combinations, the content can drop drastically within a few hours. Therefore, whenever possible, a determination of the drug content should be part of compatibility studies and the evaluation of a drug combination as physically compatible should be carefully interpreted.

Additionally, we found some combinations that were conspicuous because the relative concentration of the drugs dropped by more than 3 % in 4 hours (see supplementary materials). These drug combinations include meropenem and pantoprazole together with etacrynic acid or theophylline. With prolonged storage, these combinations would then also be assessed as incompatible. In other studies, meropenem and pantoprazole were frequently part of drug combinations that were assessed as incompatible [7, 17, 26, 36]. However, since the content of these drugs is in our study within the defined limit and the other methods did not show any further conspicuous features, these drug combinations were nevertheless assessed as compatible over a period of 4 h, despite the fact that it is evident that chemical changes have already been started. Thus, if possible, meropenem and pantoprazole should be infused separately or at least with special caution.

Another interesting drug combination is etacrynic acid with sodium bicarbonate. When combining etacrynic acid with sodium bicarbonate, an additional peak that increases over time was observed in the chromatograms (Figure 5). LC-MS experiments were performed to identify this unknown substance. The molecule ion with *m/z* 321 found via LC-MS strongly suggests that the unknown substance is the vinyl-C hydroxylated product of etacrynic acid (OH-Eca). OH-Eca is a known degradation product of etacrynic acid [37]. ESI-MS/MS experiments of *m/z* 321 ± 2 allowed us to generate further evidence for the identification of the unknown substance as OH-Eca. In particular, the fragment with *m/z* 101 confirms this assumption (see Figure 6). Since the concentration of etacrynic acid in combination with sodium bicarbonate does not decrease by more than 10 % even with prolonged storage, these combinations were also

assessed as compatible. However, caution should be exercised in this case and, if possible, sodium bicarbonate should be administered alone.

A detailed presentation of the experimental results of the drug combinations can be found in the supplementary materials. With this, an individual assessment of the compatibility of the investigated drug combinations is possible, that may go beyond 4 hours. It should be noted that the results of this study are not necessarily transferable to drugs of other manufacturers than those used here due to the possibly different formulation, with regards to the salts, buffers or excipients used. In addition, only 2-drug combinations were investigated in this study. Therefore, the results can be applied to mixtures of 3 or more drugs only to a limited extent.

Conclusion

In this study, we investigated the compatibility of etacrynic acid and theophylline with other drugs commonly used in a paediatric cardiological intensive care unit. 50 drug combinations have been tested in concentrations that reflect the wide dosing differences between infants and young adults. Finally, 37 drug combinations were rated as physicochemically compatible. 13 drug combinations were found to be incompatible and should not be administered through the same lumen of a catheter. It has been shown that the concentration of the individual drugs plays a decisive role in the occurrence of incompatibilities. Therefore, we recommend that compatibility studies always examine several concentrations of a drug. Our findings help healthcare professionals and pharmacists to optimise the infusion regime and thus contribute to improving the safety management of drug therapy in paediatrics.

References

1. Machotka O, Manak J, Kubena A, Vlcek J. Incidence of intravenous drug incompatibilities in intensive care units. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2015; 159(4):652–6.

2. Taxis K, Barber N. Incidence and severity of intravenous drug errors in a German hospital. Eur J Clin Pharmacol 2004; 59(11):815–7.

3. Marsilio NR, Da Silva D, Bueno D. Incompatibilidades medicamentosas em centro de tratamento intensivo adulto de um hospital universitário. Rev Bras Ter Intensiva 2016; 28(2):147–53.

4. Gikic M, Di Paolo ER, Pannatier A. Evaluation of physicochemical incompatibilities during parenteral drug administration in a paediatric intensive care unit. Pharm World Sci 2000; 22(3):88–91.

5. Tissot E, Cornette C, Demoly P, Jacquet M, Barale F, Capellier G. Medication errors at the administration stage in an intensive care unit. Intensive Care Med 1999; 25 (1999):353–9.

6. Flamein F, Storme L, Maiguy-Foinard A, Perez M, Décaudin B, Masse M et al. Avoid Drug Incompatibilities: Clinical Context in Neonatal Intensive Care Unit (NICU). Pharm Technol Hosp Pharm 2017; 2(2).

7. Sriram S, Aishwarya S, Moithu A, Sebastian A, Kumar A. Intravenous Drug Incompatibilities in the Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital in India: Are they Preventable? J Res Pharm Pract 2020; 9(2):106–11.

8. Benlabed M, Martin Mena A, Gaudy R, Perez M, Genay S, Hecq J-D et al. Analysis of particulate exposure during continuous drug infusion in critically ill adult patients: a preliminary proof-of-concept in vitro study. Intensive Care Med Exp 2018; 6(1):38.

9. Oduyale MS, Patel N, Borthwick M, Claus S. Co-administration of multiple intravenous medicines: Intensive care nurses' views and perspectives. Nurs Crit Care 2020; 25(3):156–64.

10. Schindler E, Schears GJ, Hall SR, Yamamoto T. Ultrasound for vascular access in pediatric patients. Paediatr Anaesth 2012; 22(10):1002–7.

11. Bradford NK, Edwards RM, Chan RJ. Normal saline (0.9% sodium chloride) versus heparin intermittent flushing for the prevention of occlusion in long-term central venous catheters in infants and children. Cochrane Database Syst Rev 2020; 4:CD010996.

12. Goossens GA. Flushing and Locking of Venous Catheters: Available Evidence and Evidence Deficit. Nurs Res Pract 2015; 2015:985686.

13. Hanot J, Dingankar AR, Sivarajan VB, Sheppard C, Cave D, Garcia Guerra G. Fluid Management Practices After Surgery for Congenital Heart Disease: A Worldwide Survey. Pediatr Crit Care Med 2019; 20(4):357–64.

14. Lorente L, Henry C, Martín MM, Jiménez A, Mora ML. Central venous catheter-related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters. Crit Care 2005; 9(6):R631-5.

15. Hanifah S, Ball P, Kennedy R. Medication incompatibility in intravenous lines in Paediatric Intensive Care Units PICUs of Indonesian hospital. Crit Care Shock 2018; 21(3):118–27.

16. Neininger MP, Buchholz P, Kiess W, Siekmeyer M, Bertsche A, Bertsche T. Incompatibilities in paediatric intensive care - pitfalls in drug information. Pharmazie 2018; 73(10):605–8.

17. D'Huart E, Vigneron J, Demoré B. Physical Compatibility of Intravenous Drugs Commonly Used in Intensive Care Units: An Observational Study and Physical Compatibility Laboratory Tests on Anti-Infective Drugs. Pharm Technol Hosp Pharm 2019; 4(1):29–40.

18. Gersonde F, Eisend S, Haake N, Kunze T. Physicochemical compatibility and emulsion stability of propofol with commonly used analgesics and sedatives in an intensive care unit. Eur J Hosp Pharm 2017; 24(5):293–303.

19. European Pharmacopoeia, 10th edition 2019, English: Subscription to Main volume + Supplement 1 + Supplement 2. 1. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2019.

20. 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: Table 1. Eur J Hosp Pharm 2012; 19(3):278–85.

21. Jirschitzka S, Girreser U, Kunze T. An aza-Michael addition product causes incompatibility between etacrynic acid and theophylline in a paediatric cardiological ICU. Pharmazie in press; 78(5):27–30.

22. Hines S, Pleasance S. Compatibility of an injectable high strenght oxycodone formulation with typical diluents, syringes, tubings, infusion bags and drugs for potential co-administration. Eur J Hosp Pharm Pract 2009; 15(5):32–8.

23. Tomczak S, Gostyńska A, Nadolna M, Reisner K, Orlando M, Jelińska A et al. Stability and Compatibility Aspects of Drugs: The Case of Selected Cephalosporins. Antibiotics (Basel) 2021; 10(5).

24. Kanji S, Lam J, Johanson C, Singh A, Goddard R, Fairbairn J et al. Systematic review of physical and chemical compatibility of commonly used medications administered by continuous infusion in intensive care units. Crit Care Med 2010; 38(9):1890–8.

25. Knudsen L, Eisend S, Haake N, Kunze T. Physicochemical compatibility of commonly used analgesics and sedatives in the intensive care medicine. Eur J Hosp Pharm 2014; 21(3):161–6.

26. Ayari G, D'Huart E, Vigneron J, Demoré B. Y-site compatibility of intravenous medications commonly used in intensive care units: laboratory tests on 75 mixtures involving nine main drugs. Pharm Technol Hosp Pharm 2022; 7(1).

27. Allen LV, Levinson RS, Phisutsinthop D. Compatibility of various admixtures with secondary additives at Y-injection sites of intravenous administration sets. Am J Hosp Pharm 1977; 34(9):939–43.

28. Kershaw BP, Monnier HL, Mason JH. Visual compatibility of premixed theophylline or heparin with selected drugs for i.v. administration. Am J Hosp Pharm 1993; 50(7):1360, 1362-3.

29. Alisky JM, Tuttle TF. Ethacrynic acid can be effective for refractory congestive heart failure and ascites. South Med J 2003; 96(11):1148–50.

30. Kim KE, Onesti G, Moyer JH, Swartz C. Ethacrynic acid and furosemide. Am J Cardiol 1971; 27(4):407–15.

31. Ricci Z, Haiberger R, Pezzella C, Garisto C, Favia I, Cogo P. Furosemide versus ethacrynic acid in pediatric patients undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial. Crit Care 2015; 19:2.

32. Akademie für Ethik in der Medizin e. V., Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker, Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Bundesarbeitsgemeinschaft SELBSTHILFE e. V., Deutsche Atemwegsliga e. V., Deutsche Forschungsgruppe Pneumologie in der Primärversorgung e. V. et al. NVL COPD – Teilpublikation der Langfassung, 2. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2021.

33. Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker, Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Bundesarbeitsgemeinschaft SELBSTHILFE, Deutsche Atemwegsliga, Deutsche Forschungsgruppe Pneumologie in der Primärversorgung, Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie et al. NVL Asthma – Langfassung, 4. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2018.

34. Yavuz Y, Isildak FU. Effect of intraoperative theophylline use on acute kidney injury in paediatric cardiac surgery. Cardiol Young 2022:1–9.

35. Bell M, Jackson E, Mi Z, McCombs J, Carcillo J. Low-dose theophylline increases urine output in diuretic-dependent critically ill children. Intensive Care Med 1998; 24(10):1099–105.

36. Lessard J-J, Caron E, Schérer H, Forest J-M, Leclair G. Compatibility of Y-Site Injection of Meropenem Trihydrate With 101 Other Injectable Drugs. Hosp Pharm 2020; 55(5):332–7.

37. Yarwood RJ, Moore WD, Collett JH. The influence of the ammonium ion on the stability of ethacrynic acid in aqueous solution. J Pharm Biomed Anal 1987; 5(4):369–78.

Table 1. Drugs tested in this compatibility study

Drug	Salt	Corporate name (company)	Batch	min. – max. or fix conc. (mg/ml)
Ampicillin + Sulbactam	Ampicillin sodium + Sulbactam sodium	Unacid® 1.5 g (Pfizer)	DA787402; DL253401	20 + 10
Cefazolin	Cefazolin sodium	Cefazolin-saar® 2000 mg i.v. (Chephasaar)	3075900; 3076000; 3117100	10 – 100
Etacrynic acid	Etacrynate sodium	Reomax 50 mg/20ml (Bioindustria L.I.M.)	063162; 079178	0.1 – 0.8
Furosemide	Furosemide sodium	Lasix® 20 mg/2 ml (Sanofi-Aventis)	G0767; J0712; J0273; J1033; K0933	0.2 – 2
50 % Glucose	n/a	Glucosteril® 50 % (Fresenius Kabi)	14NE48	undiluted
Meropenem	Meropenem trihydrate	Meropenem Hikma 1 g (Hikma Pharma)	MDEA1230; MDEA1091	2 – 20
Pantoprazole	Pantoprazole sodium sesquihydrate	Pantoprazol EVER Pharma 40 mg (EVER Pharma)	R6681; R7FE1; R75V1	1
Paracetamol (Acetaminophen)	n/a	Paracetamol B. Braun 10 mg/ml (B. Braun)	20185406; 20183403; 21187413	10
7.46 % Potassium chloride	n/a	Kaliumchlorid-Lösung 7.46 % (SERAG-WIESSNER)	2000317	undiluted
8.4% Sodium bicarbonate	n/a	Natrium-hydrogencarbonat 1 molar 8.4 % (SERAG-WIESSNER)	227182	undiluted
Theophylline	n/a	afpred® forte-THEO 200 mg (Leyh-Pharma)	70601; 80641; 90371	0.8 – 4

Table 2. Results of the validation of the HPLC method.

Drug	λ (nm)	Linearity (mg/ml)	t_R (min)	R^2	equation regression line	max. CV (%)	Recovery† min. - max. (%)
Amp	220	0.02 – 0.6	7.2	1.000	y = 6937085x + 19697	0.9 Ø 0.5 ± 0.3	98.1 – 101.9 Ø 100.5 ± 1.1
Cef	254 270	0.02 – 0.6	8.5	1.000 1.000	y = 7231211x + 2461 y = 8925616x + 4391	1.9 Ø 0.8 ± 0.5	98.7 – 101.2 Ø 99.8 ± 0.8
Eca [21]	254 270	0.01 – 0.6	18.8	1.000 1.000	y = 3851626x + 649 y = 4136890x + 448	1.9 Ø 0.9 ± 0.6	97.9 – 101.3 Ø 99.1 ± 0.8
Fur	333	0.02 – 0.6	14.6	1.000	y = 4709531x + 71	1.2 Ø 0.5 ± 0.5	98.8 – 101.9 Ø 99.8 ± 1.3
Mero	254 270	0.2 – 1.2	6.8	1.000 1.000	y = 2421753x – 2164 y = 3686763x + 4119	0.9 Ø 0.4 ± 0.3	98 – 101.51 Ø 99.6 ± 1.2
Panto	254 270	0.02 – 0.6	13.9	1.000 1.000	y = 6641497x – 4860 y = 913636x – 1845	1.9 Ø 1.1 ± 0.8	98.6 – 102 Ø 100.5 ± 1
PCM	254 270	0.04 – 0.12	2.5	0.999 0.999	y = 17521965x – 14972 y = 5917913x – 5008	2.0 Ø 1 ± 0.7	98.4 – 101.9 Ø 100.7 ± 0.7
Sul	220	0.01 – 0.3	1.6	1.000	y = 1997774x – 2446	1.3 Ø 0.6 ± 0.5	98.2 – 100.9 Ø 99.7 ± 1.1
Tph [21]	254 270	0.01 – 0.6	4.6	1.000 1.000	y = 8614303x + 281 y = 18121856x + 303	1.6 Ø 0.7 ± 0.4	98.6 – 100.9 Ø 99.5 ± 0.5

λ: wavelength, t_R: mean retention time, R^2 correlation coefficient, CV: coefficient of variation, Amp: ampicillin, Cef: cefazolin, Eca: etacrynic acid, Fur: furosemide, Mero: meropenem, Panto: pantoprazole, PCM: paracetamol, Sul: sulbactam, Tph: theophylline; Ø: mean ± sd; †includes both the intraday and interday recovery after freezing and thawing

Figure Legend

Figure 1 Mixing scheme. Resulting combinations are a, b, c, d, e, f.

Figure 2 Compatibility chart displayed as a cross-table. Colour indicates the type of compatibility. beige: visually compatible, green: physically compatible, white: no information available

Figure 3 Overlayed HPLC-UV Chromatogram of tested drugs.

Figure 2 Compatibility table displayed as a cross-table. a,b,c,d,e,f represents the drug combinations according to Figure 1. The respective concentrations in mg/ml, unless otherwise stated, are entered in the columns or rows. Colour indicates the type of compatibility. light green: physically compatible, dark green: physicochemically compatible, red: incompatible, †relative concentration decreases by more than 3 % within 4 hours, ††appearance of an increasing degradation product, †††published data, concentration not included

Figure 3 Overlayed chromatogram of etacrynic acid 0.8 mg/ml + sodium hydrogencarbonate 8.4 %. **?**: unknown substance

Figure 4 MS/MS experiment of *m/z* 321 ± 2 and presumed Fragmentation of 2-(2,3-dichloro-4-(2-(hydroxymethyl)butanoyl)phenoxy)acetic acid.

Figure 1

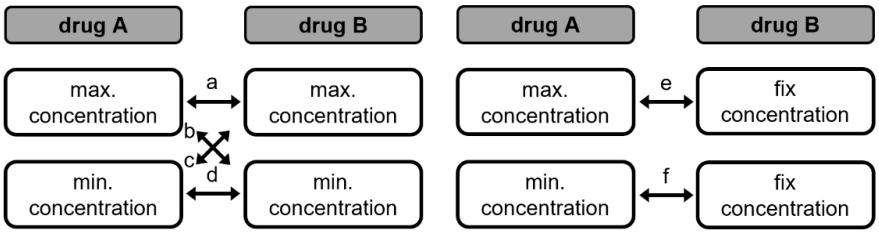


Figure 2

	Theophylline	Ampicillin + Sulbactam	Cefazolin	Furosemide	Glucose 50 %	Meropenem	Pantoprazole	Paracetamol	Potassium chloride 7.46 %	Sodium bicarbonate 8.4
Etacrynic acid										
Theophylline										

21

Figure 3

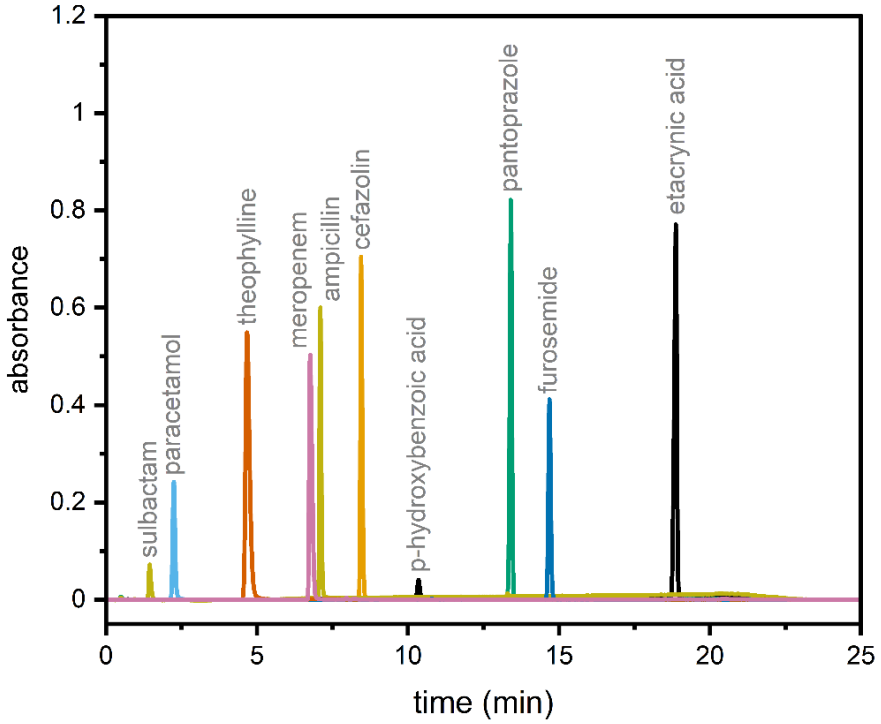


Figure 4

		Theophylline		Ampicillin + Sulbactam	Cefazolin		Furosemide		Glucose	Meropenem		Pantoprazole	Paracetamol	Potassium chloride	Sodium bicarbonate
		4	0.8	20+10	100	10	2	0.2	50 %	20	2	1	10	7.46 %	8.4 %
Etacrynic acid	0.8	a	b	e	a	b	a	b	e	a†	b	e	e	†††	e††
	0.1	c	d	f	c	d	c	d	f	c†	d	f†	f		f††
Theophylline	4			e	a	b	a	b	e	a†	b	e	e	e	e
	0.8			f	c	d	c	d	f	c	d†	f	f	f	f

Figure 5

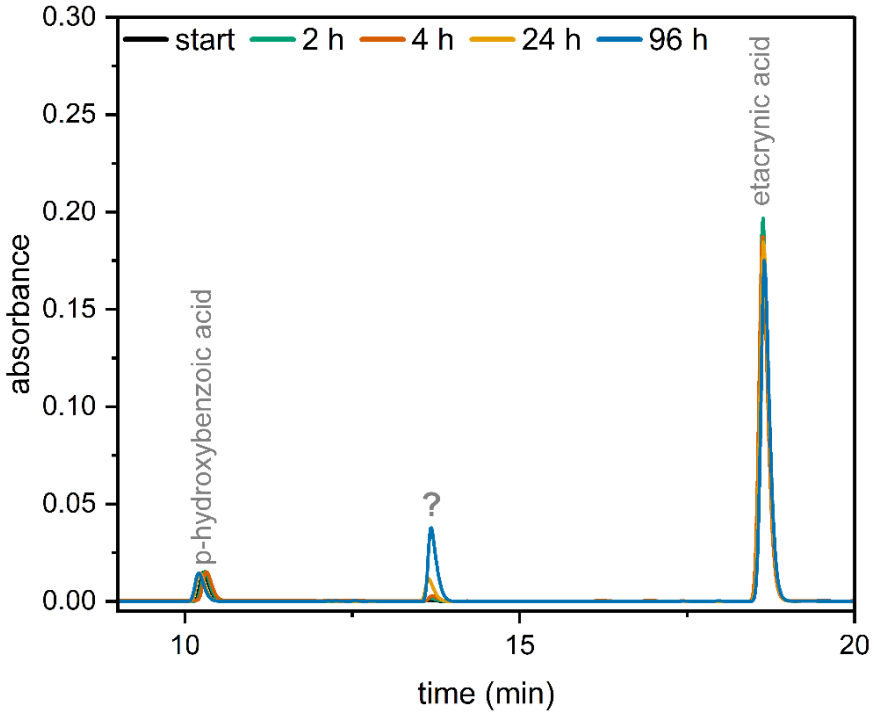
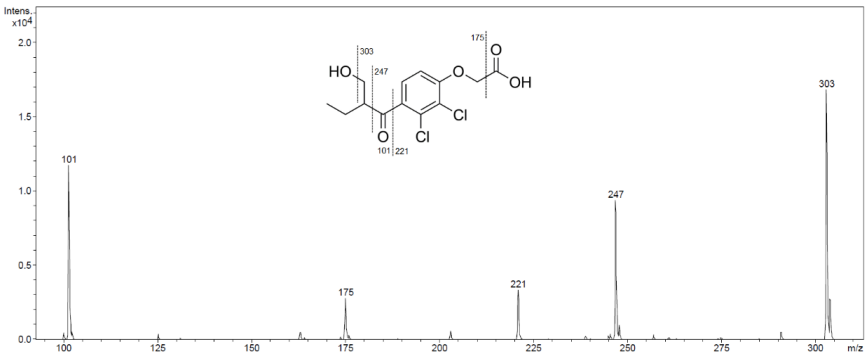


Figure 6



S1

Compatibility study of etacrynic acid and theophylline with other commonly used drugs in a paediatric cardiological intensive care unit

Sven Jirschitzka[1], Kirstin Reinecke[2], Swantje Eisend[2], Thomas Kunze[1]

[1] Department of Clinical Pharmacy, Pharmaceutical Institute, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Germany, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany

[2] Hospital Pharmacy, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel, Germany

Corresponding author: Thomas Kunze, Department of Clinical Pharmacy, Pharmaceutical Institute, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany. Email: tkunze@pharmazie.uni-kiel.de

Supplementary Material

For a larger view, the digital version of the supplementary material is recommended.

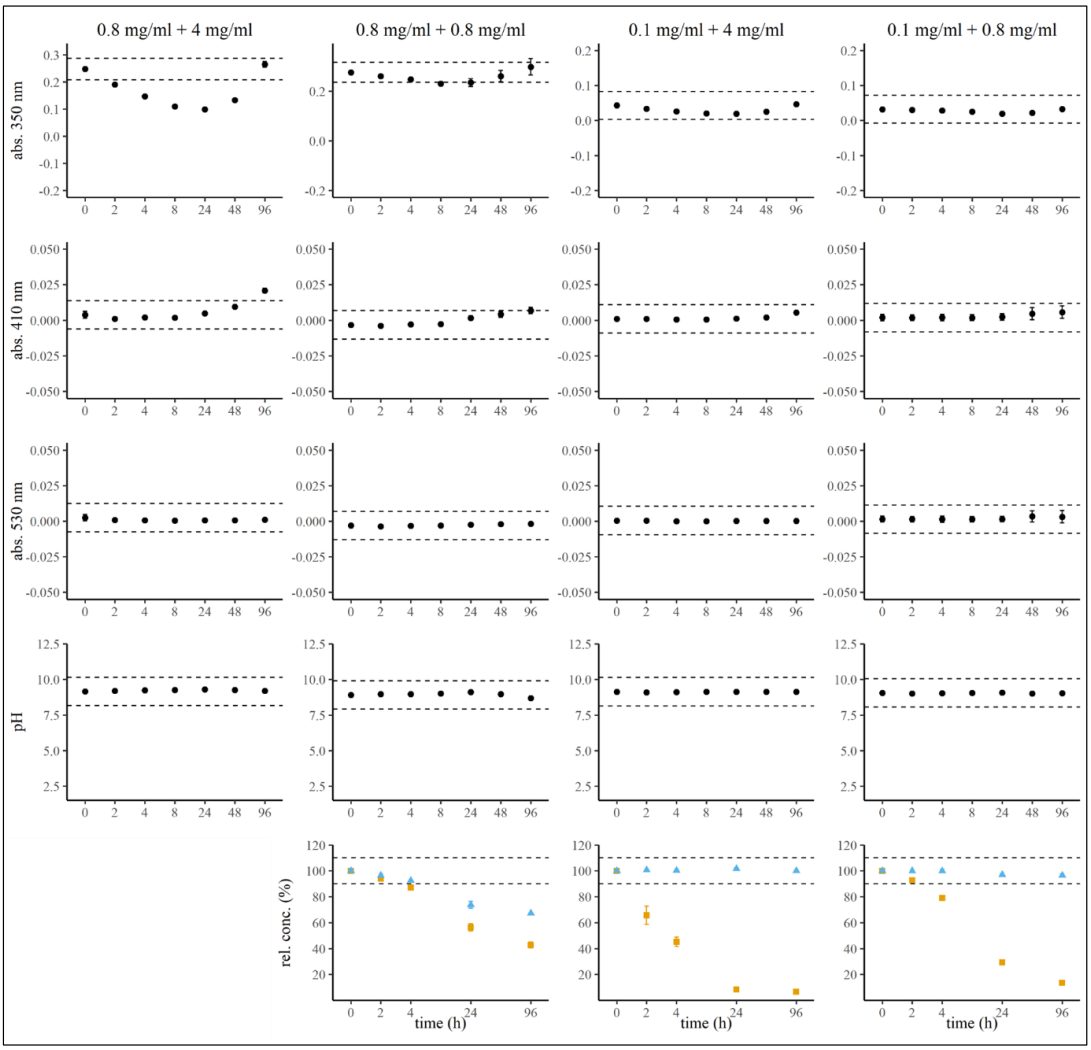
Table of content

page	detailed results of the combination
S2	etacrynic acid + theophylline
S3	etacrynic acid + ampicillin + sulbactam
S4	etacrynic acid + cefazolin
S5	etacrynic acid + furosemide
S6	etacrynic acid + glucose
S7	etacrynic acid + meropenem
S8	etacrynic acid + pantoprazole
S9	etacrynic acid + paracetamol
S10	etacrynic acid + sodium bicarbonate
S11	theophylline + ampicillin + sulbactam
S12	theophylline + cefazolin
S13	theophylline + furosemide
S14	theophylline + glucose
S15	theophylline + meropenem
S16	theophylline + pantoprazole
S17	theophylline + paracetamol
S18	theophylline + potassium chloride
S19	theophylline + sodium bicarbonate

S2

Etacrynic acid + theophylline

(Reomax + afpred® forte-THEO)

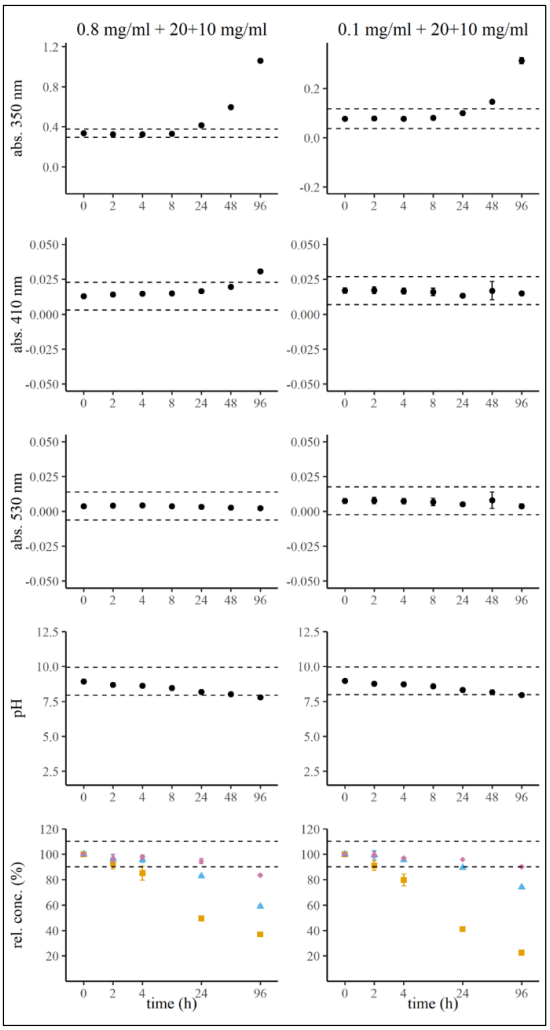


■ etacrynic acid ▲ theophylline
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S3

Etacrynic acid + ampicillin + sulbactam

(Reomax + Unacid®)

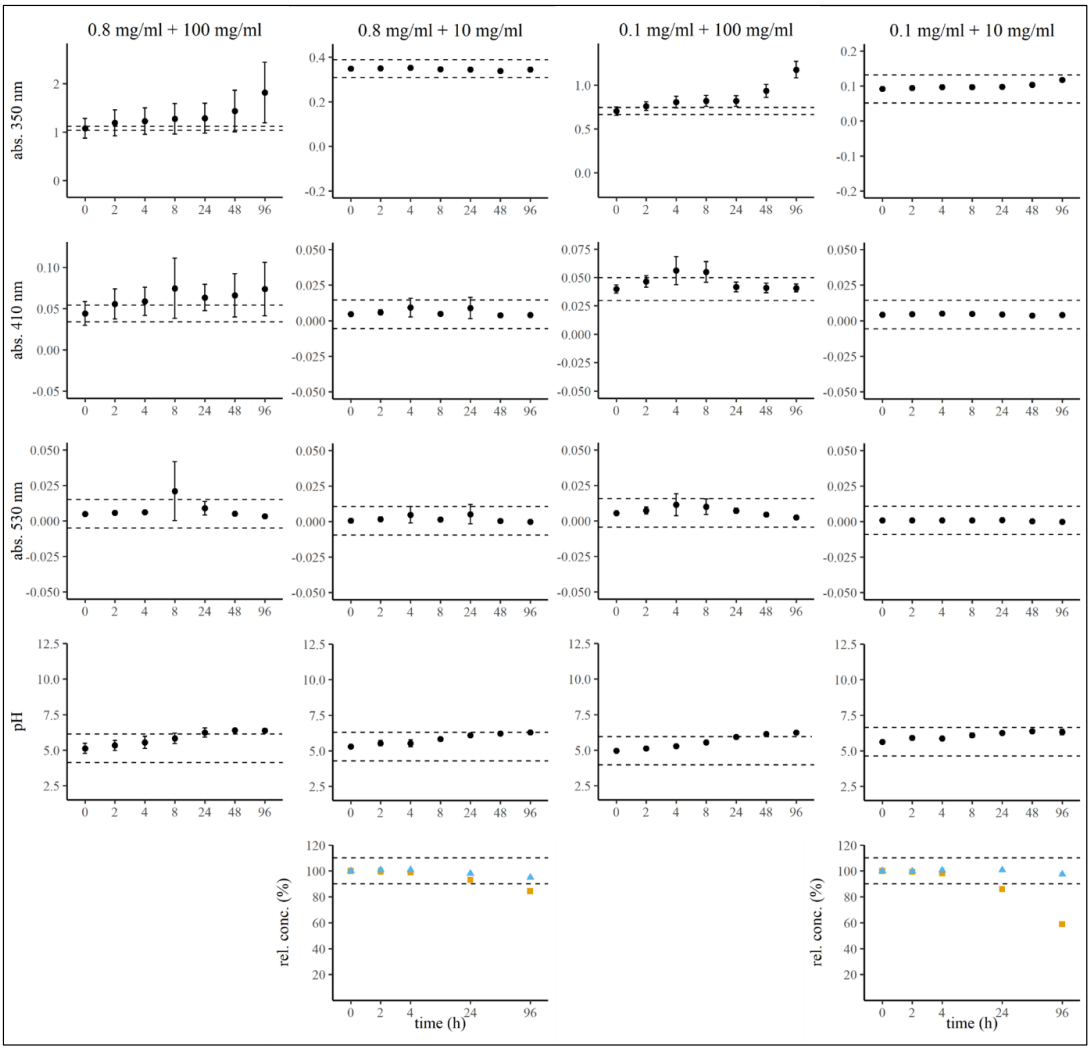


■ etacrynic acid ▲ ampicillin ♦ sulbactam
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S4

Etacrynic acid + cefazolin

(Reomax + Cefazolin-saar®)

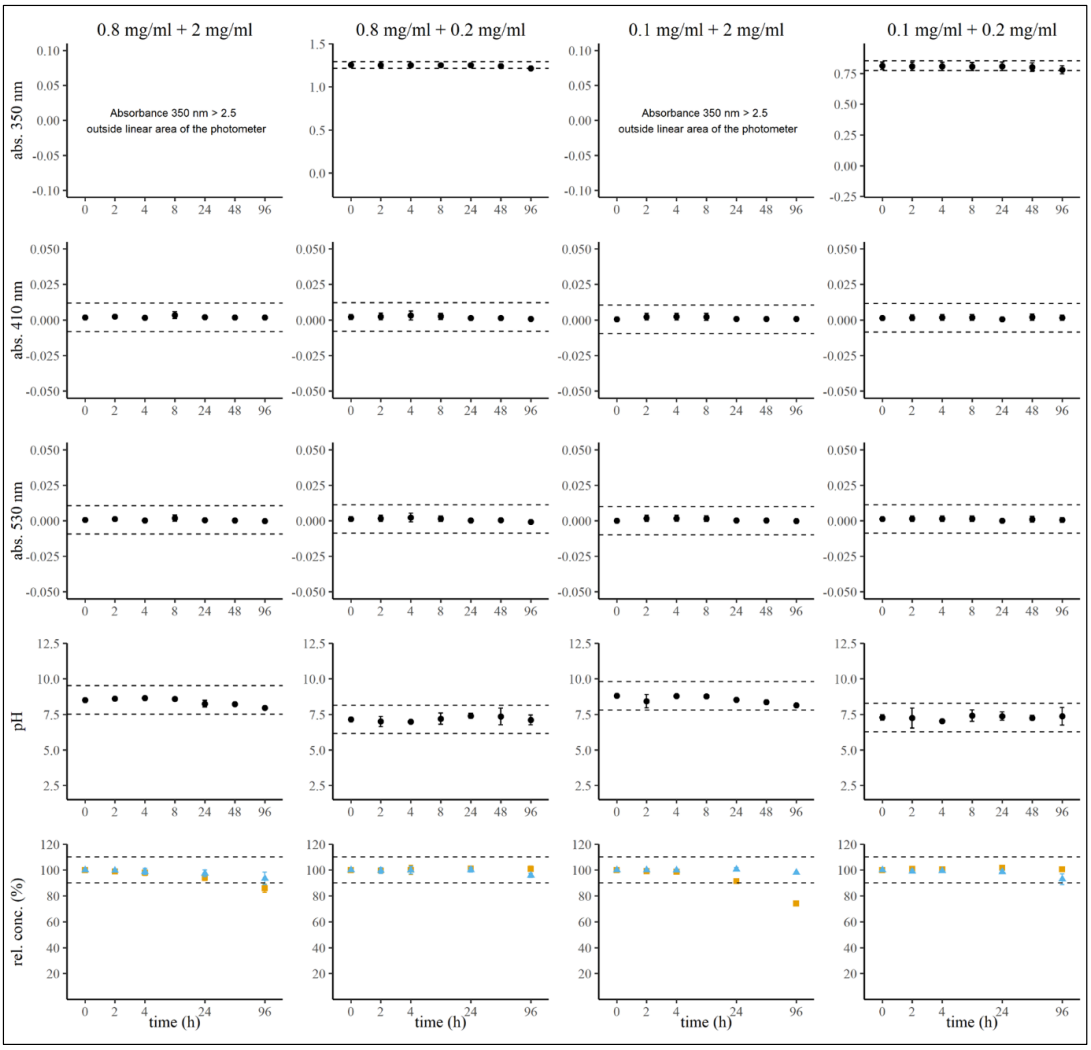


■ etacrynic acid ▲ cefazolin
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S5

Etacrynic acid + furosemide

(Reomax + Lasix®)

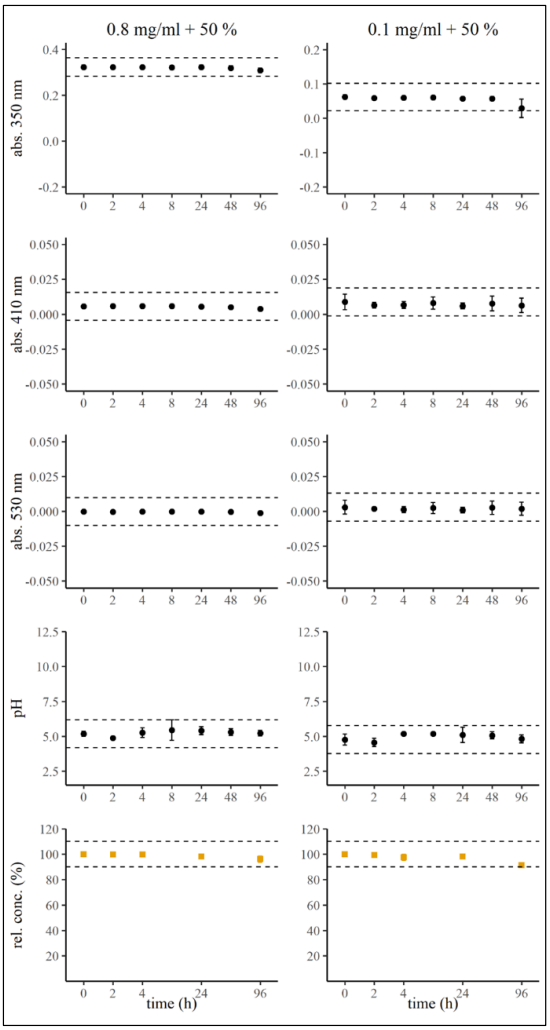


■ etacrynic acid ▲ furosemide
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S6

Etacrynic acid + glucose

(Reomax + Glucosteril®)

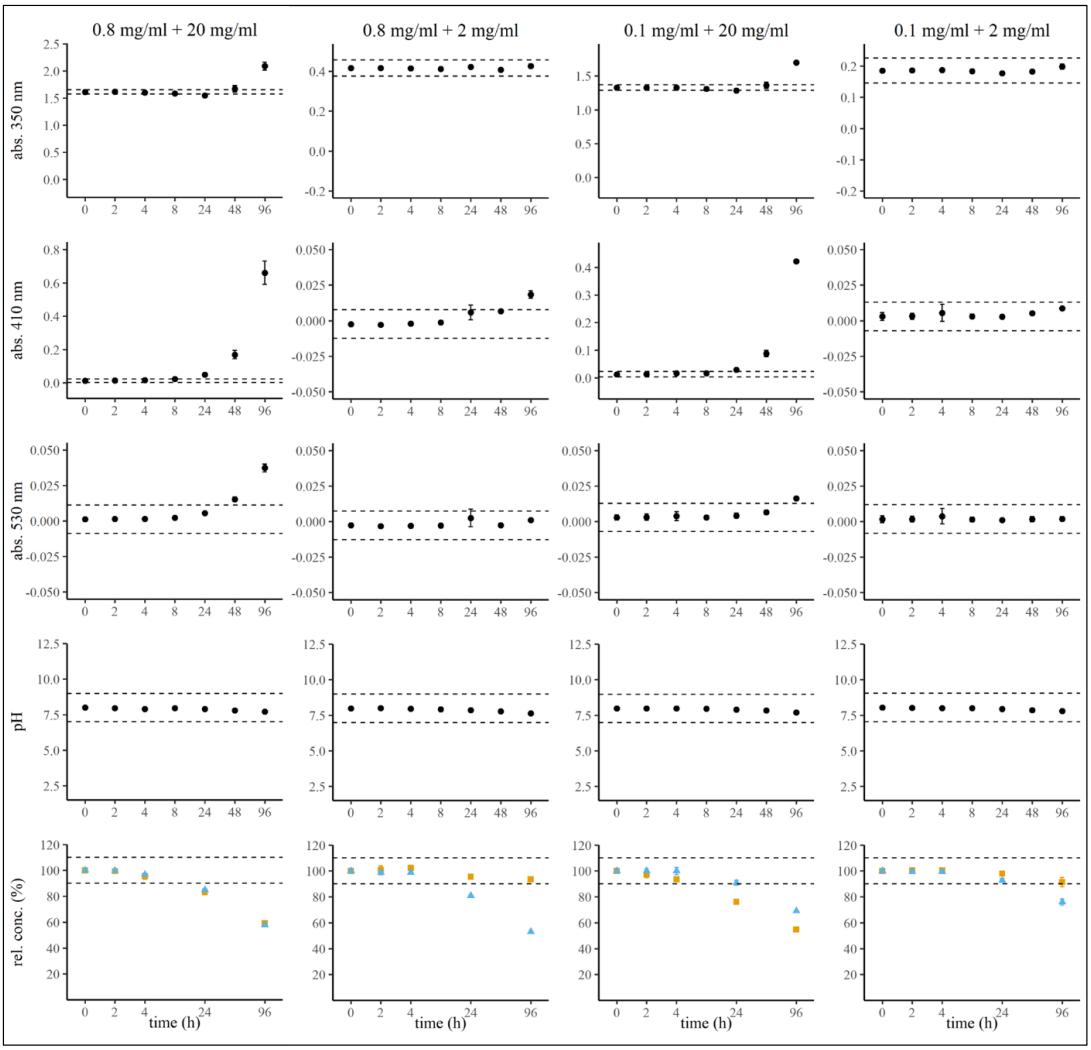


■ etacrynic acid
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S7

Etacrynic acid + meropenem

(Reomax + Meropenem Hikma)

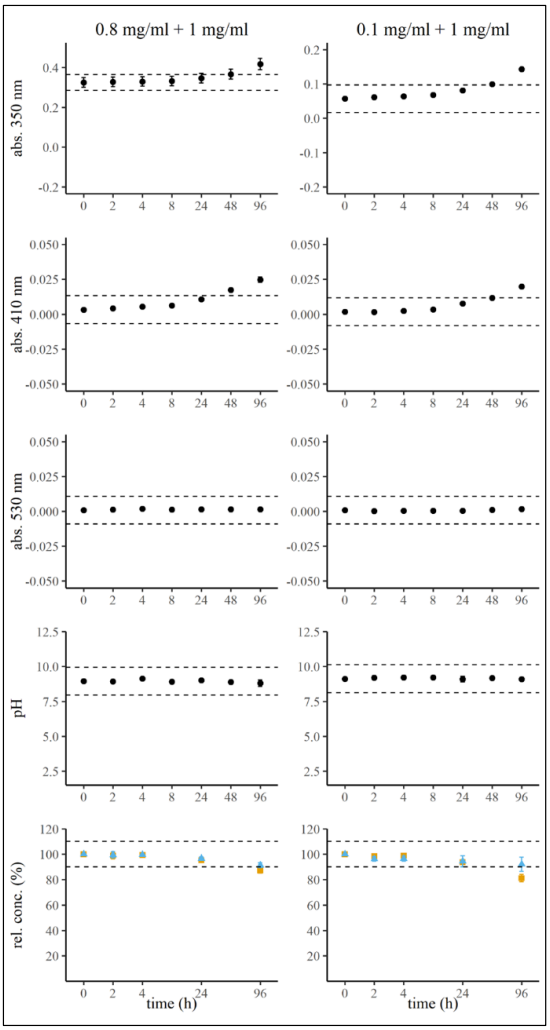


■ etacrynic acid ▲ meropenem
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S8

Etacrynic acid + pantoprazole

(Reomax + Pantoprazol EVER)

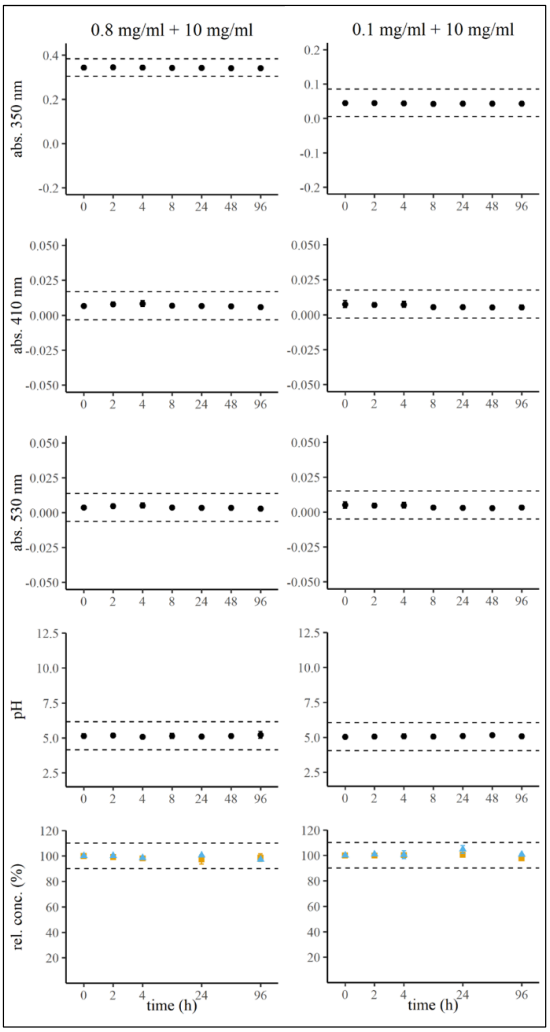


■ etacrynic acid ▲ pantoprazole
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S9

Etacrynic acid + paracetamol

(Reomax + Paracetamol B. Braun)

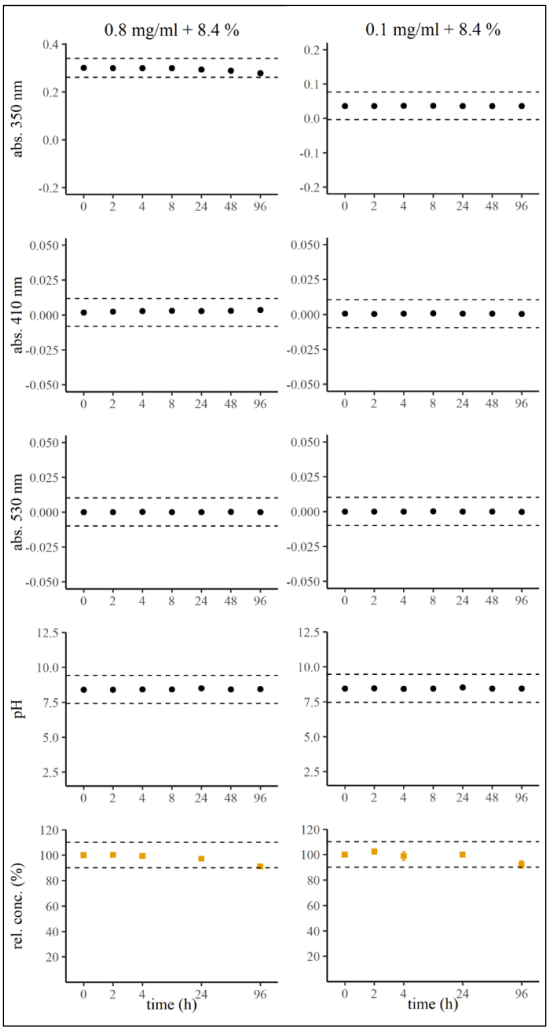


■ etacrynic acid ▲ paracetamol
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S10

Etacrynic acid + sodium bicarbonate

(Reomax + Natriumhydrogencarbonat SERAG-WIESSNER)

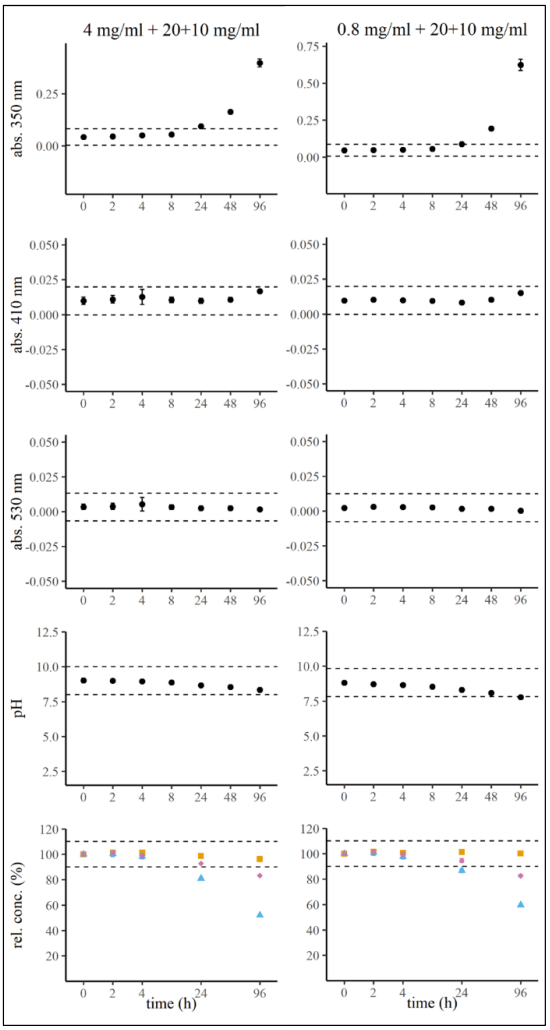


■ etacrynic acid
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S11

Theophylline + ampicillin + sulbactam

(afpred® forte-THEO + Unacid®)

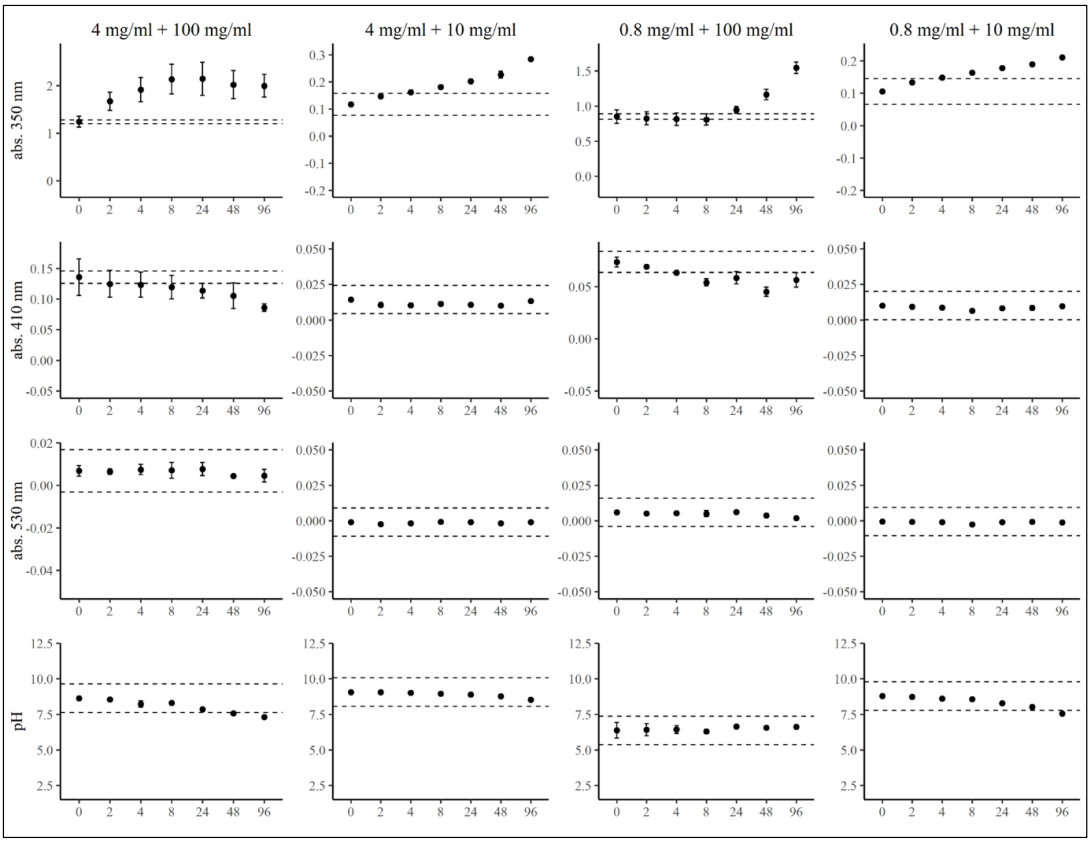


■ theophylline ▲ ampicillin ♦ sulbactam
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S12

Theophylline + cefazolin

(afpred® forte-THEO + Cefazolin-saar®)



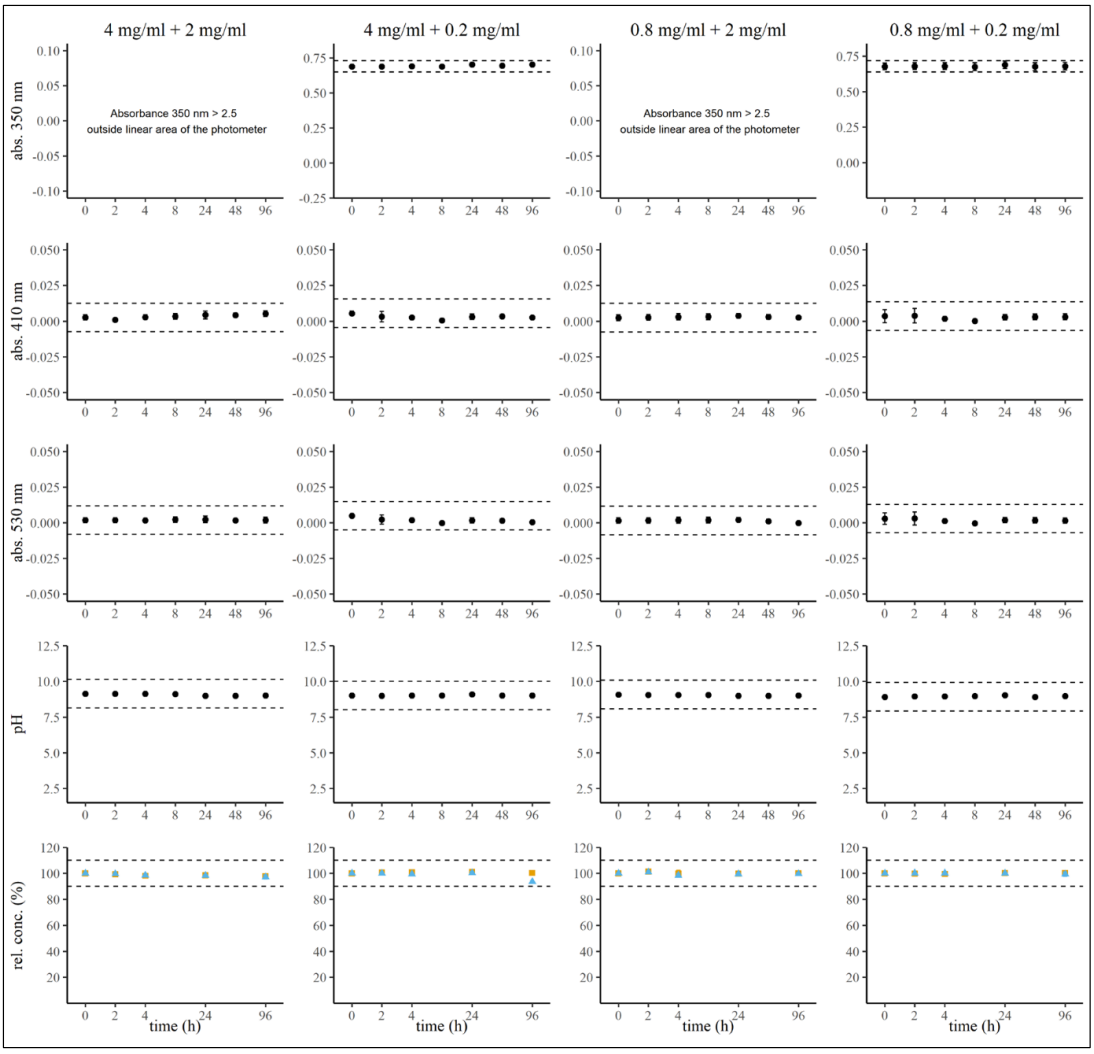
No content determination as the combination is already physically incompatible.

Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S13

Theophylline + furosemide

(afpred® forte-THEO + Lasix®)

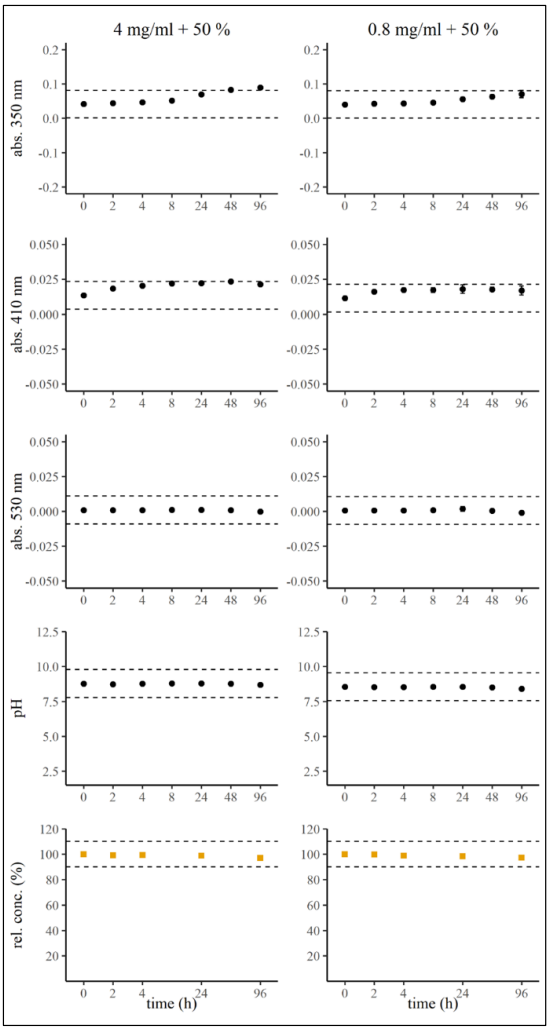


■ theophylline ▲ furosemide
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (*n* = 2).

S14

Theophylline + glucose

(afpred® forte-THEO + Glucosteril®)

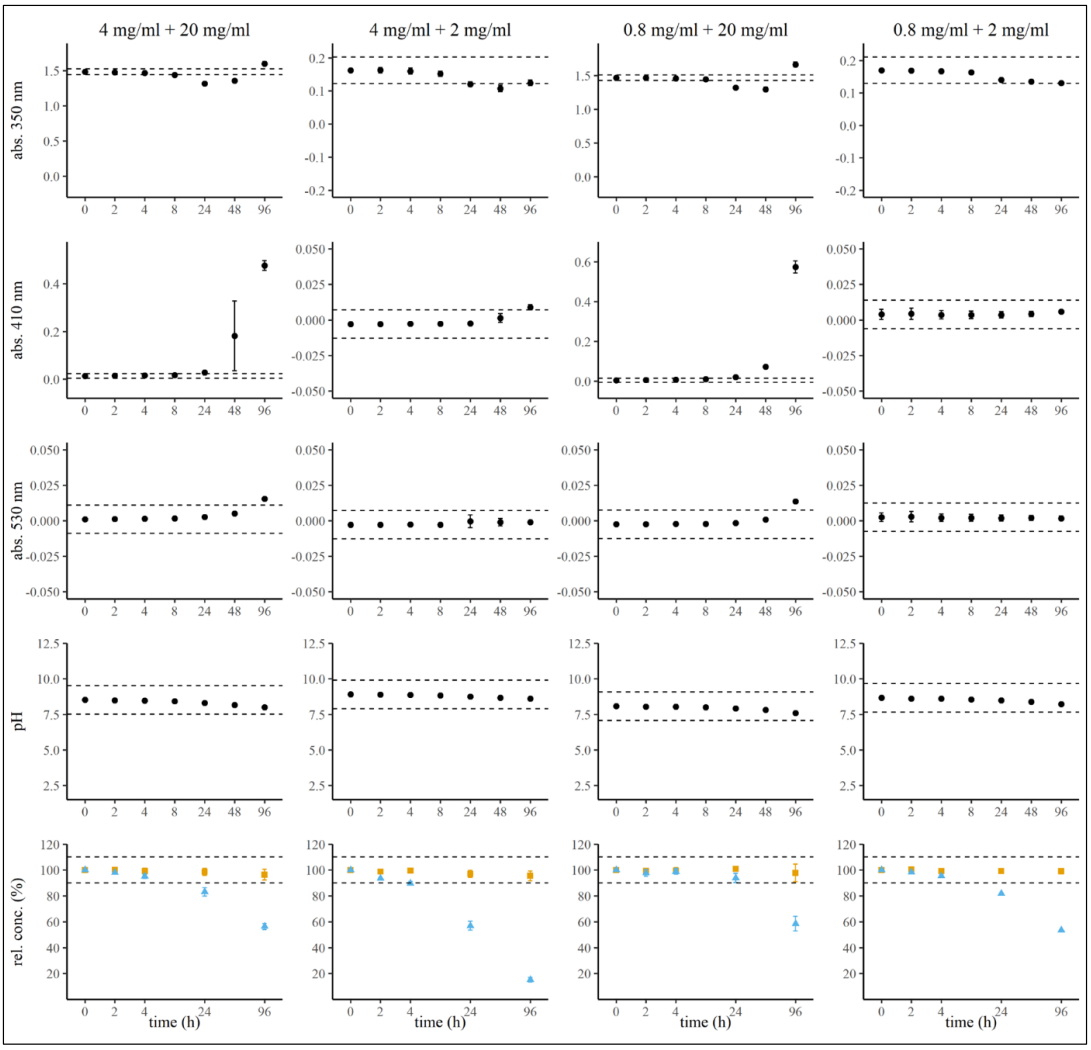


■ theophylline
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S15

Theophylline + meropenem

(afpred® forte-THEO + Meropenem Hikma)

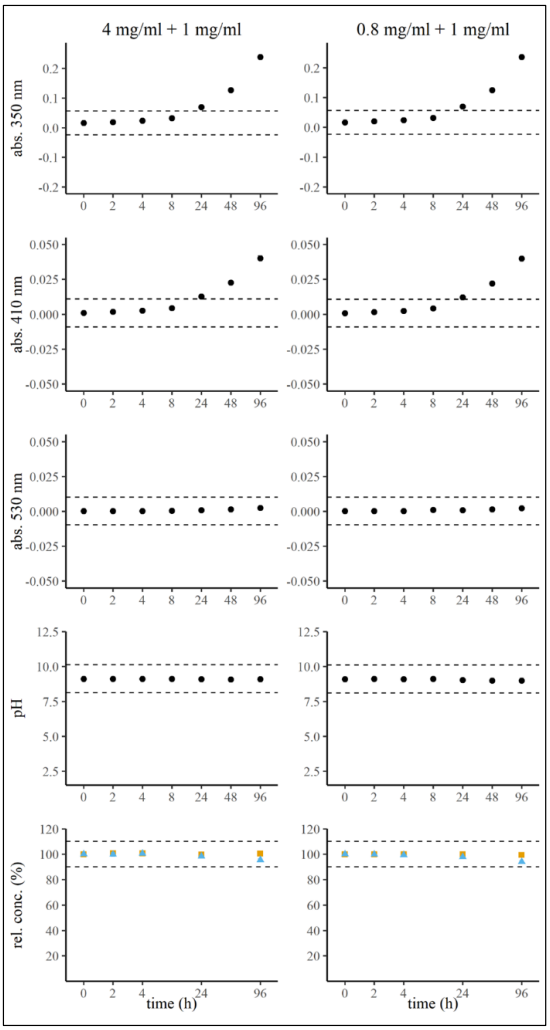


■ theophylline ▲ meropenem
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S16

Theophylline + pantoprazole

(afpred® forte-THEO + Pantoprazol EVER)

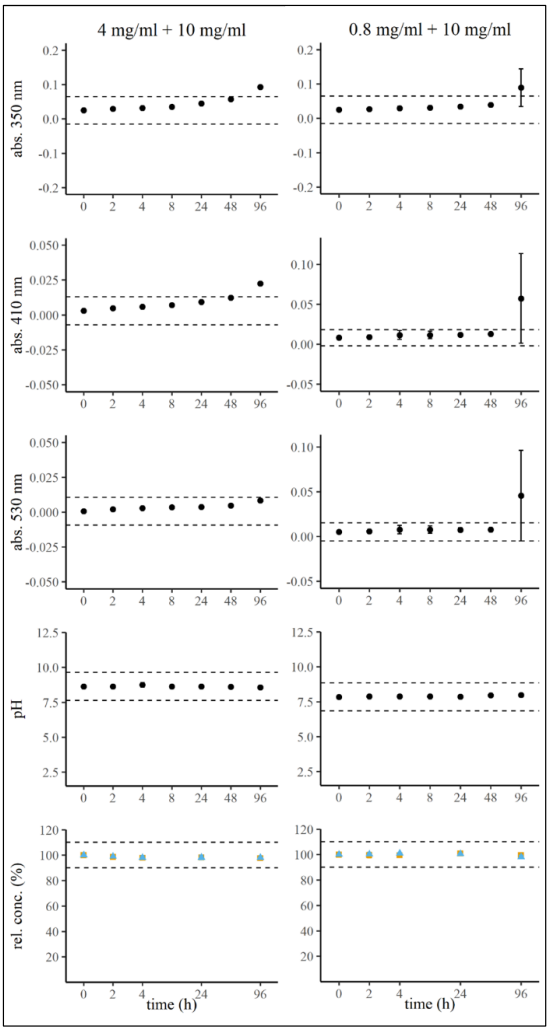


■ theophylline ▲ pantoprazole
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S17

Theophylline + paracetamol

(afpred® forte-THEO + Paracetamol B. Braun)

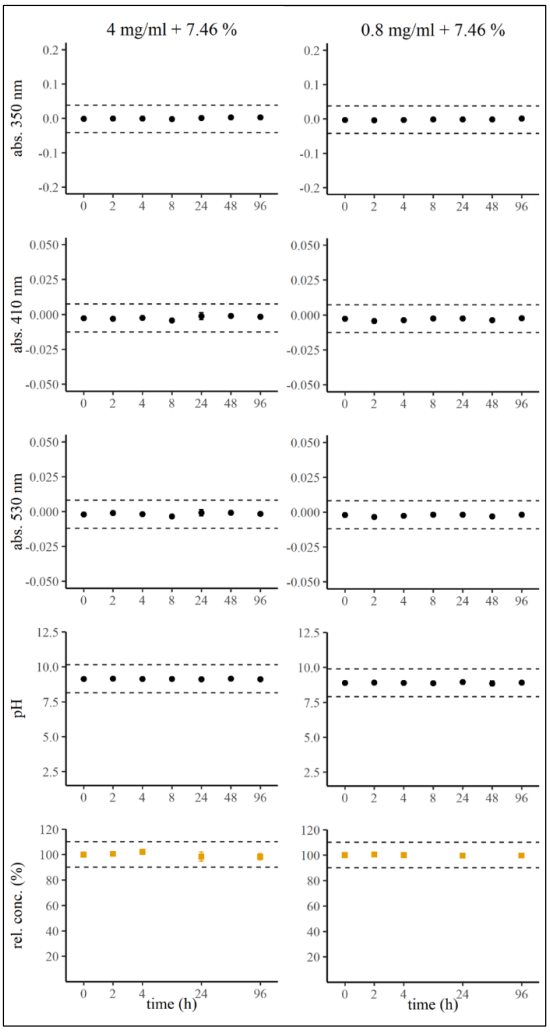


■ theophylline ▲ paracetamol
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S18

Theophylline + potassium chloride

(afpred® forte-THEO + Kaliumchlorid-Lösung SERAG-WIESSNER)

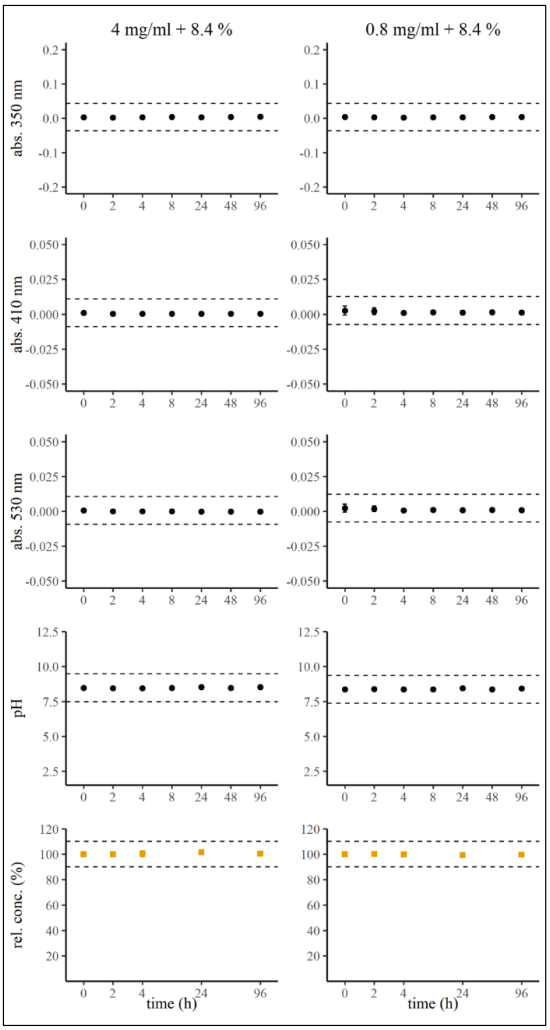


■ theophylline
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

S19

Theophylline + sodium bicarbonate

(afpred® forte-THEO + Natriumhydrogencarbonat SERAG-WIESSNER)



■ theophylline
Dashed lines indicate limits for accepting as compatible.
Data is shown as mean ± sd (n = 2).

3.3. Identifikation eines Additionsprodukts zwischen Etacrynsäure und Theophyllin

In der Kompatibilitätsstudie stellten die Arzneimittelkombinationen aus Etacrynsäure und Theophyllin eine Besonderheit dar. Nach visueller und physikalischer Testung zeigten sich in drei der vier getesteten Kombinationen keine Anzeichen von Inkompatibilitäten. Konzentrationsabhängig hätten also drei Mischungen aus Etacrynsäure und Theophyllin als physikalisch kompatibel bewertet werden können. Bei der Vermessung an der HPLC sank jedoch der Gehalt der Arzneistoffe innerhalb von 4 h deutlich ab, sodass Etacrynsäure mit Theophyllin als inkompatibel bewertet werden musste. Interessanterweise zeigte sich in den Chromatogrammen, ein über die Lagerungszeit größer werdender, zusätzlicher Peak. Da dieser Peak nicht bei anderen Arzneimittelkombinationen im Chromatogramm sichtbar war, lag die Vermutung nahe, dass es sich dabei um ein Reaktionsprodukt aus Etacrynsäure und Theophyllin handeln muss. Zur Identifikation dieser Substanz wurden Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie- (LC-MS), Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie- (LC-MS/MS) und in Kooperation mit Dr. Ulrich Girreser mehrere NMR-Experimente (Cosy, HSQC und HMBC) durchgeführt. Schließlich konnte die Substanz als ein Aza-Michael-Addukt zwischen Etacrynsäure und Theophyllin identifiziert und die exakte chemische Struktur aufgeklärt werden (siehe Abbildung 3.3).

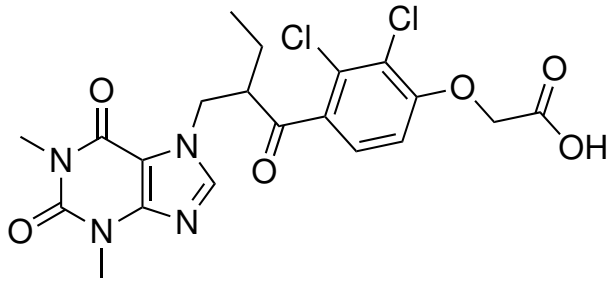


Abbildung 3.3.: Identifiziertes Aza-Michael-Addukt aus Mischungen von Etacrynsäure und Theophyllin ([2-(2,3-dichloro-4-2-[(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-purin-7(6*H*)-yl)methyl]butanoylphenoxy)essigsäure]).

Die Identifikation des Aza-Michael-Addukts ist im Detail in der Publikation: **„An aza-Michael addition product causes incompatibility between etacrynic acid and theophylline in a paediatric cardiological ICU“** -Sven Jirschitzka, Ulrich Girreser, Thomas Kunze, (https//10.1691/ph.2023.2564), 2023 beschrieben.[41]

ORIGINAL ARTICLES

Department of Clinical Pharmacy[1]; Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry[2], Pharmaceutical Institute, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany

An aza-Michael addition product causes incompatibility between etacrynic acid and theophylline in a paediatric cardiological ICU

S. Jirschitzka,[1] U. Girreser,[2] T. Kunze[1,*]

Received November 25, 2022, accepted February 6, 2023

**Corresponding Author: Thomas Kunze, Department of Clinical Pharmacy, Pharmaceutical Institute, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany*
tkunze@pharmazie.uni-kiel.de

Pharmazie 78: 27-30 (2023) *doi: 10.1691/ph.2023.2564*

In a compatibility study of parenteral drugs commonly used in paediatric cardiological intensive care units, an unknown reaction product was found in a mixture of etacrynic acid and theophylline. The conditions in terms of the concentration of etacrynic acid and theophylline as well as the materials used corresponded to the conditions in the intensive care unit. Initially, the reaction product appeared as a significant and increasing peak in the chromatograms when determining the content of etacrynic acid and theophylline via HPLC. At the same time, the concentrations of both drugs decreased. A literature search in the chemical databases Reaxys® and Scifinder® revealed a patent from 1967 describing an aza-Michael addition between etacrynic acid and theophylline to either N-7 or N-9. Using LC-MS/MS experiments, we were able to confirm that Michael-like reaction between etacrynic acid and theophylline occurs. To elucidate the exact structure of the reaction product we performed NMR experiments (COSY, HSQC and HMBC). With the acquired data we were finally able to identify the unknown compound as the N-7 substituted adduct [2-(2,3-dichloro-4-{2-[(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-purin-7(6*H*)-yl)methyl]butanoyl}phenoxy)acetic acid]. Our findings show that etacrynic acid and theophylline should not be mixed and should be administered through separate venous lines when infused.

1. Introduction

Patients in intensive care units (ICU) often receive a variety of different parenteral drugs. However, the number of central or peripheral venous accesses is limited, especially in critically ill children. Ideally, compatibility studies are available to help healthcare professionals decide which drugs can be administered together and which are better administered alone. But this is not always the case, as the drugs and concentrations can vary greatly from ward to ward and patient to patient. For example, the loop diuretic etacrynic acid (Eca; Fig. 1a), first described by Schultz et al. (1962), is rarely used today due to potential side effects (Alisky and Tuttle 2003). Nevertheless, in paediatric cardiological intensive care units, etacrynic acid is still used in addition to or as an alternative to other diuretics, e.g. furosemide, when these alone are not sufficiently effective (Kim et al. 1971; Ricci et al. 2015). Etacrynic acid can react as a Michael acceptor due to the a,ß-unsaturated carbonyl group with nucleophilic compounds (Michael donor). Another drug used in paediatric cardiological intensive care is theophylline (Tph; Fig. 1b), which is a bronchodilator and is usually used to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Additionally, a significant diuretic effect has also been observed, especially in critically ill children (Da Silva et al. 2012; Bell et al. 1998). Reactions of theophylline as a nucleophile are mainly observed at N-7 of the purine skeleton, very seldom reactions at positions N-9 or C-8 have been reported (Lister 1979). This correlates well with the predominance of the 7-H tautomer versus the 9-H tautomer and the higher basicity of N-7 compared with N-9 (Gulevskaya and Pozharskii 1991; Reisch et al. 1994). The aza-Michael type addition of theophylline to electron deficient alkenes is also a known reaction with synthetic potential (Rybár and Štibrányi 1973; Horváth 1995). Recently, the addition of aromatic amines, which have similar basicity compared with theophylline to enones in aqueos solutions have been reported (Dutt et al. 2020).

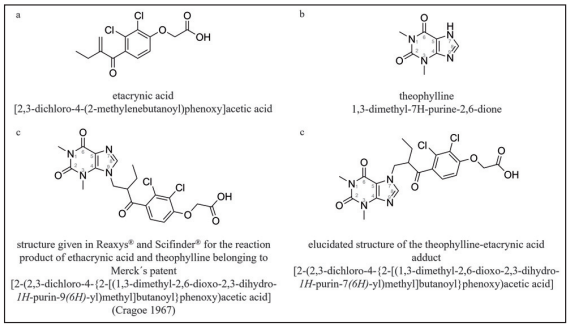


Fig. 1: Formulas of etacrynic acid and theophylline and the two adducts

As part of a compatibility study of parenteral drugs used in a paediatric cardiological intensive care unit, an unknown reaction product between etacrynic acid contained in the drug Reomax® and theophylline contained in the drug afpred® forte-THEO was identified and finally, the structure was completely elucidated using LC-MS/MS and NMR experiments.

2. Investigations and results

2.1. Method validation for quantification

For quantification of the drugs, an HPLC method was developed. The results of the validation of the HPLC method are presented in Table 1. Tph and Eca were quantified in the range of 0.01 – 0.6 mg/ml with sufficient reproducibility and recovery, therefore the HPLC method was considered appropriate.

Table 1: Results of the validation of the HPLC method

Drug	λ (nm)	Linearity (mg/ml)	t_R (min)	R^2	Equation regression line	max. CV (%)	Recovery* min. – max. (%)
Tph	254	0.01 – 0.6	4.6	1.0000	y = 8614302.6x + 281.4	1.6	98.6 – 100.9
	270			0.9999	y = 18121856.4x + 303	Ø 0.7 ± 0.4	Ø 99.5 ± 0.5
Eca	254	0.01 – 0.6	18.8	1.0000	y = 3851626.1x + 649.4	1.9	97.9 – 101.3
	270			1.0000	y = 4136889.8x + 447.8	Ø 0.9 ± 0.6	Ø 99.1 ± 0.8

λ: wavelength; t_R: mean retention time; R^2 correlation coefficient; CV: coefficient of variation; Eca: ethacrynic acid; Tph: theophylline; Ø: mean ± sd; *includes both the intraday and interday recovery after freezing and thawing

Table 2: pH Values of the different drug combinations measured directly after mixing (start) and after 2 h, 4 h, 24 h, 96 h; Eca: etacrynic acid; Tph: theophylline

combination Eca + Tph (mg/ml)		Start	after 2 h	after 4 h	after 24 h	after 96 h
0.4 + 2	duplicate 1/2	9.17	9.20	9.24	9.28	9.21
	duplicate 2/2	9.15	9.18	9.22	9.30	9.17
0.4 + 0.4	duplicate 1/2	8.86	8.98	8.97	9.13	8.67
	duplicate 2/2	8.97	8.97	8.99	9.11	8.70
0.05 + 2	duplicate 1/2	9.13	9.05	9.09	9.12	9.10
	duplicate 2/2	9.15	9.15	9.16	9.16	9.16
0.05 + 0.4	duplicate 1/2	9.09	9.06	9.04	9.11	9.04
	duplicate 2/2	9.02	8.98	9.03	9.04	9.04

Table 3: Drug concentrations for etacrynic acid (Eca) and theophylline (Tph) relative to the initial content of the different drug combinations measured immediately after mixing and after 2 h, 4 h, 24 h, 96 h

Combination (mg/ml)		Start (%)	After 2 h (%)	After 4 h (%)	After 24 h (%)	After 96 h (%)
0.4	**Eca**	100	77.4 ± 4.6	49.2 ± 2.6	14.1 ± 0.1 *	13.2 ± 0.3 *
2	**Tph**	100	97.1 ± 0.9	95.8 ± 0.9	92.2 ± 0.4	91.0 ± 0.3
0.4	**Eca**	100	94.0 ± 1.4	87.0 ± 0.3	56.3 ± 2.7	42.8 ± 2.3
0.4	**Tph**	100	96.4 ± 1.5	92.5 ± 0.1	73.8 ± 2.7	67.3 ± 0.1
0.05	**Eca**	100	65.6 ± 7.1	45.2 ± 3.6	8.4 ± 1.5 *	6.6 ± 0.1 *
2	**Tph**	100	100.7 ± 0.6	100.2 ± 0.6	101.6 ± 0.7	100.1 ± 0.3
0.05	**Eca**	100	92.7 ± 1.3	79.1 ± 0.0	29.4 ± 0.3 *	13.5 ± 0.1 *
0.4	**Tph**	100	100.0 ± 0.9	99.8 ± 1.4	97.0 ± 0.8	96.5 ± 1.2

*values are extrapolated, since the concentration is outside the calibration (mean ± sd, n = 2^3)

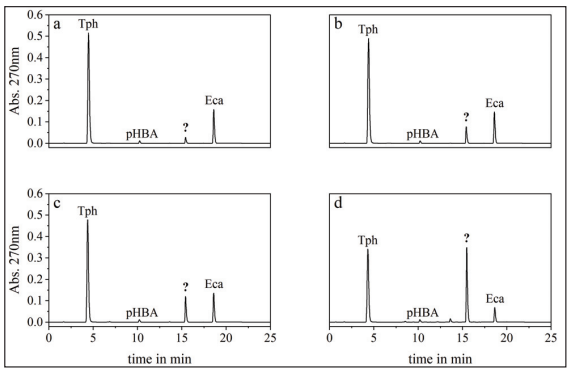


Fig. 2: Chromatogram of the combination of 0.8 mg/ml etacrynic acid (Eca) and 0.8 mg/ml theophylline (Tph); a: immediately after mixing; b: after 2 h; c: after 4 h; d: after 96 h; pHBA: p-hydroxybenzoic acid (an excipient in Remoax); ?: unknown substance

2.2. pH Values

As part of the compatibility study, the pH value of the individual drug solutions as well as the mixtures was routinely measured. The pH of the diluted Reomax® solution was 7.55 for 0.1 mg/ml and 7.58 for 0.8 mg/ml. A pH of 9.04 was measured for the 0.8 mg/ml concentrated afpred® forte-THEO solution and a pH of 9.18 for 4 mg/ml. Table 2 shows the measured pH values of the drug combinations. The pH value is around 9 for all combinations and over the entire storage time.

2.3. High performance liquid chromatography

Figure 2 shows representative chromatograms for the measurement of a mixture of etacrynic acid and theophylline. Immediately after mixing a prominent, additional peak with a retention time of 15.4 minutes is visible, which becomes larger upon prolonged storage. Table 3 shows the concentrations of Eca and Tph in different combinations. The initial concentration directly after mixing was defined as 100 %. The subsequent measurements after a certain time of storage (2 h, 4 h, 24 h, or 96 h) are shown in relation to the initial content in percent. It can be seen that the concentrations, especially of Eca, which is less concentrated than Thp, decrease continuously. Especially with large excess of Thp, the content of Eca decreases very quickly. For example, the concentration of Eca in combination with the concentrations 0.05 mg/ml Eca and 2 mg/ml Tph drops to 65.6 % after only two hours.

2.4. LC-MS

In a first LC-MS run, besides the molecular ions belonging to etacrynic acid (*m/z* 303) and theophylline (*m/z* 181), another $[M+H]^+$ molecular ion (*m/z* 483) with a typical isotope pattern for two chloro substituents were found. Only one isomer with *m/z* 483 was detected in all LC-MS runs, even with extensive overload, which is shown in the total ion chromatogram in Fig. 3. The

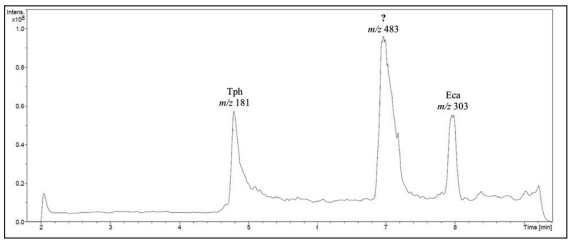


Fig. 3: Representative total ion chromatogram of a mixture of theophylline (Tph) and etacrynic acid (Eca); ?: unknown substance

unknown substance with *m/z* 483 elutes after 7.0 min. This peak was further investigated by MS/MS experiments.

Figure 4 represents the spectrum and the presumed fragments of an ESI MS/MS experiment for the selected ion with *m/z* 483 ± 2. In total, seven fragments were detected. Again, four ions with *m/z* 303, *m/z* 247, *m/z* 227 and *m/z* 189 show the partial isotopic signal for two chloro substituents.

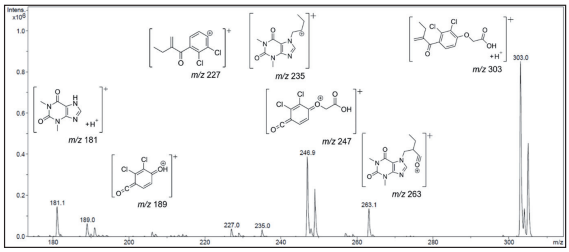


Fig. 4: MS/MS spectrum and presumed ions of the unknown substance with *m/z* 483 ± 2

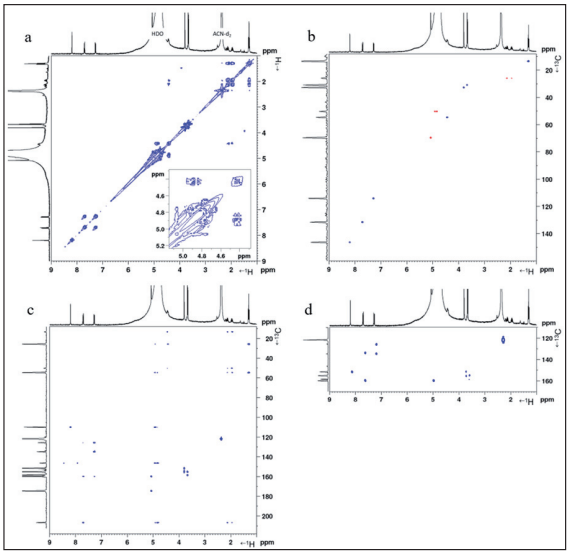


Fig. 5: NMR correlation spectra of the isolated substance a: COSY (HDO: water signal, ACN-d_3: acetonitrile signal); b: HSQC; c: HMBC optimized for 6.2 Hz couplings; d: HMBC optimized for 12.8 Hz couplings; enlarged

2.5. Literature research

Chemical structure search with Reaxys® (Beilstein Registry Number 1195790) and Scifinder® (Chemical Abstracts Number 32893-79-1) revealed a Merck patent from 1967 (Cragoe 1967) showing that a reaction product of Tph and Eca is formed via an aza-Michael addition. The proposed structure was either the N-7- or N-9-substituted isomer. However, only the results of an elemental analysis and no exact structural analysis were published. In Reaxys® (Beilstein registration number 1195790) and Scifinder® (Chemical Abstracts number 32893-79-1) only the N-9 substituted derivative is reported (Cragoe 1967). See Fig. 1c.

2.6. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The unknown substance was isolated and measured with NMR. The sample amount after isolation determined with ERETIC was 0.3 mg in 0.45 ml of a mixture of D_2O and deuterated acetonitrile (1:1). Figure 5 shows the NMR correlation spectra. All ^1H and ^{13}C signals were determined: ^1H NMR (400 MHz, *d*/ppm, D_2O/CD_3CN): 1.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 3 H, CH_2-$C\underline{H}_3$), 1.94 (m, 1 H, $C\underline{H}_2$-CH_3), 2.14 (m, 1 H, $C\underline{H}_2$-CH_3), 3.67 (s, 3 H, N1-CH_3), 3.80 (s, 3 H, N3-CH_3), 4.44 (m, 1 H, CH), 4.84 (m, 1 H, N7-CH_2), 4.92 (m, 1 H, N7-CH_2), 5.07 (s, 2 H, OCH_2), 7.28 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, aryl H-5), 7.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, aryl-H6), 8.16 (s, 1 H, hetaryl-CH), CO_2H not observed due to exchange. ^{13}C NMR (100 MHz, *d*/ppm, D_2O/CD_3CN): 13.4 ($CH_2\underline{C}H_3$), 25.9 ($\underline{C}H_2CH_3$), 30.9 (N1-CH_3), 32.7 (N3-CH_3), 50.3 (N7-CH_2), 54.7 (CH), 69.7 (OCH_2), 110.0 (hetaryl-C5), 114.0 (aryl-C6), 125.7 (aryl-C2), 131.7 (aryl-C5), 133.9 (aryl-C3), 134.9 (aryl-C4), 146.4 (hetaryl-C8), 151.7 (hetaryl-C4), 155.2 (hetaryl-C2), 158.5 (hetaryl-C6), 159.9 (aryl-C1), 174.6 (CO_2H), 206.7 (C=O).

3. Discussion

3.1. Identification of the reaction product

In this study, we identified a reaction product between etacrynic acid and theophylline that has not previously been described under conditions that may occur in an intensive care unit. Fig. 1d represents the identified molecule.

Various degradation products are described for Eca in aqueous solutions. These include a dimer formed after a Diels-Alder-like condensation, a hydrate and another dimer after formaldehyde elimination of the hydrate (Cohen 1971; Görlitzer and Höbbel 1979; Yarwood et al. 1987). However, the expected molecular ions of these degradation products (*m/z* 483 are *m/z* 605, *m/z* 335 and *m/z* 593, respectively) were not observed. In Merck's patent (Cragoe 1967), an aza-Michael addition between Eca and Tph was described. This reaction takes place in water at a pH of 7.1, 25 °C and over a period of 16 h (Cragoe 1967). At this point, it was already very likely that the compound we found was one of the products described in the patent, especially considering that the mixtures of the two drugs Reomax® and afpred® forte-THEO have a pH value of about 9. An alkaline pH favours deprotonation at N-7 of Tph, so that the aza-Michael addition can proceed more easily. A MS/MS experiment then provided further evidence for a Michael-like addition. In particular, the fragment *m/z* 263 confirms this. To elucidate the exact chemical structure, NMR experiments were carried out. Using a HH-COSY, with water suppression technique, all proton signals were evaluated and identified (Fig. 5a) (Berger and Braun 2011). In addition, all ^{13}C carbon signals were determined with two-dimensional heteronuclear correlations, namely a standard HSQC (Fig. 5b) (Berger and Braun 2011) and two HMBC (Fig. 5c–d) experiments (one optimized for 6.2 Hz, and another for 12.8 Hz couplings) (Berger and Braun 2011). The proton spectrum confirmed the formation of the adduct by a Michael-type addition to etacrynic acid. The olefinic protons of the etacrynic acid disappeared, instead a complex multiplet pattern was observed for the diastereotopic protons of the two methylene groups as a chiral centre is generated by the addition reaction. The chemical shifts of the newly formed methylene group (^1H: *d* 4.84 ppm and 4.92 ppm, ^{13}C: *d* 50.3 ppm) and long range correlations of this methylene group with two carbon atoms of the fused imidazole ring of theophylline, one being C-8, the other C-5, only allow the conclusion that it must be the N-7 adduct.

3.2. Conclusion

We were able to clearly identify the reaction product found in a compatibility study of etacrynic acid and theophylline as [2-(2,3-dichloro-4-{2-[(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-purin-7(6*H*)-yl)methyl]butanoyl}phenoxy)acetic acid]. The reaction conditions, such as the selection of drug concentrations and

the materials and solutions used, were fully adapted to the conditions in a paediatric cardiological ICU. Therefore, etacrynic acid and theophylline should not be infused simultaneously through the same lumen of a venous access.

4. Experimental

4.1. Chemicals and reagents

The drugs Reomax® 50 mg/20 ml vials iv (batch: 079178) and afpred® forte-THEO 200 mg (batch: 90371; 80641) as well as 50 ml polypropylene syringes (Original Perfusor® B. Braun Melsungen AG or BD™ Medical™ Plastipak™) and sterile 0.9 % saline solution (B. Braun Melsungen AG or Fresenius Kabi) were kindly provided by the hospital pharmacy of the UKSH Campus Kiel. All solutions were within the stated expiry time at the time of testing. LC-MS grade water was obtained from VWR (83645.320); acetonitrile gradient grade 99.9 % from honeywell (34851) and sodium dihydrogen phosphate as well as the ready-to-use buffer solutions ROTI®Calipure from Carl Roth (K300.2, A517.1, P713.1, 8086.4). Acetic acid Suprapur® and sodium 3-trimethylsilyl propane sulfonate were obtained from Sigma-Aldrich (1.00066, 178837). The deuterated water 99.9 % (00506) and acetonitrile 99.8 % (00205) were purchased from DEUTERO GmbH.

4.2. Sample preparation

For all test solutions, the drugs Reomax®, which contains etacrynic acid, and afpred® forte-THEO, which contains theophylline, were used. Reomax® was reconstituted with 20 ml of 5 % glucose solution according to the manufacturer's instructions and then diluted with 0.9 % saline to a final concentration of 0.1 mg/ml or 0.8 mg/ml. The drug afpred® forte-THEO was diluted with 0.9 % sodium chloride solution to a concentration of 0.8 mg/ml and 4 mg/ml, respectively. These concentrations correspond to the procedure in paediatric cardiological intensive care. To simulate the concurrent flow through one catheter lumen, the solutions were mixed in 50 ml syringes at a ratio of 1:1. The resulting mixtures have the concentrations 0.4 mg/ml Eca + 2 mg/ml Tph; 0.4 mg/ml Eca + 0.4 mg/ml Tph; 0.05 mg/ml Eca + 2 mg/ml Tph; 0.05 mg/ml Eca + 0.4 mg/ml. The syringes were sealed with a combi-stopper (B. Braun) and stored at room temperature and under laboratory light. Each mixture was prepared in duplicate. Samples were taken immediately after mixing, as well as after 2 h, 4 h, 24 h and 96 h. The pH values of the solutions were determined. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. The samples were freshly thawed before HPLC measurement, diluted with 0.9 % saline if necessary and measured in triplicates.

4.3. pH measurement

The pH values were determined with a Hanna pH meter (HI 2211 + HI1053). For this, 1 ml of the sample solution was placed in a test tube and the pH value was measured after a latency time of 10 min. On each measuring day, the pH meter was calibrated with ready-to-use buffer solutions (ROTI®Calipure).

4.4. HPLC

The HPLC system consisted of a degasser (Biotech Degasi® Classic), Waters™ 1525 binary HPLC pump, Waters™ 717plus autosampler, column oven (Techlab GmbH) and a Waters™ 2487 Dual λ absorbance detector (254 nm, 270 nm). An Agilent® Poroshell 120EC-C18, 2.7 µm, 3.0 mm × 50 mm column with Phenomenex® SecurityGuard™ Ultra cartridge, UHPLC C18 3.0 mm inclusive guard holder was used. The flow rate was set to 0.8 ml/min and a complex gradient was used. Mobile phase A consisted of a 10 mM sodiumphosphate buffer pH 3.2 and mobile phase B consisted of acetonitrile/sodiumphosphate buffer pH 3.2 60:40. The gradient started at 95 % A for 3 min, then changed to 80 % A within 2 min to continue to 40 % A until 16 min. Within another 2 min the mobile phase A decreased further to 30 % to remained there for 1 min. Then, the gradient changed within 1 minute to 95 % A and the re-equilibration started for 5 min. The entire gradient, including re-equilibration, ran for 25 minutes. The column oven was set to 20 °C. Waters™ Breeze™-software (version 3.3) was used for data acquisition and processing.
The HPLC method was validated according to ICH guideline. Therefore the linearity of the method was determined by a five-point calibration and the precision and reproducibility were checked measuring the maximum, middle and minimum concentrations of the range in triplicates. To validate the freezing process, the maximum and minimum concentrations were measured both before and after freezing and thawing in triplicates.

4.5. LC-MS coupling

LC-MS measurements were performed with an Agilent 1260 HPLC system (G1379B 1260 µ-degasser, G1312B bin pump, G1367E 1260 HiP ALS + G1330B, G1316A 1260 TCC, G4212B 1260 diode array detector) with gradient elution (A: 0.2 % acetic acid in water – B: 0.2 % acetic acid in acetonitrile) coupled to a Bruker Amazon SL mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) with an ion trap and MS^n facility. The gradient started with a flow rate of 1 ml/min at 95 % A for 2 min, then continued to 65 % A in 0.5 min and further to 20 % A in 3.5 min. The gradient changed to 3 % A in 0.5 min and remained there for 1.5 min. Finally, the gradient changed to 95 % A in 0.5 min and re-equilibration started at an increased flow rate of 1.3 ml/min for 1 min. The MS was switched on from min 2 to min 9.2 in positive mode. The column oven was set to 25 °C. A Phenomenex® Luna® 3 µm C18(2) 100 Å, 100 mm × 4.6 mm column inclusive Phenomenex® SecurityGuard™ Ultra cartridge, UHPLC C18 3.0 mm with guard holder was used. Hystar 3.2 SR 2 software was used to control the HPLC, Bruker Trap Control 7.0 software was used to control the MS and the MS data were analysed with Bruker Data Analysis 4.0.

4.6. Literature research

The chemical structure databases Reaxys® and Scifinder® were used to search for potential structures for the unknown compound.

4.7. Sample isolation for nuclear magnetic resonance spectroscopy

To isolate the relevant substance, the sample was obtained after several runs on an analytical HPLC column according to the procedure described above. The resulting sample solution was freeze-dried by the manufacturer's standard programme (Christ Alpha 2-4 LSCplus). After washing with D_2O and freeze-drying again, the sample was taken up in a mixture of D_2O and deuterated acetonitrile (1:1). This solution was used for all NMR experiments.

4.8. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR spectra were recorded using a Bruker Avance III 400 NMR spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany) operating at 400.33 MHz for the proton channel and at 100.66 MHz for the ^{13}C channel by means of a 5 mm PABBO broad-band probe with a *z* gradient unit. Measurements were performed at 298 K. Automatic tuning and matching of the probe was performed, as was automatic shimming of the on-axis shims (z to z^5). The Bruker Topspin software 3.6.0 was employed for spectra recording. The manufacturer´s pulse programs were used. q^1H NMR using the ERETIC method allowed the estimation of the sample amount. The HH-COSY spectrum was recorded with presaturation of the remaining water signal, additionally $^1H^{13}C$ HSQC and ^1H ^{13}C HMBC spectra (optimized for 6 Hz and alternatively for 12.8 Hz CH long range couplings) were recorded for structure identification and the determination of ^{13}C chemical shifts. All spectra and ^1H and ^{13}C shift data were calibrated to an external solution of sodium 3-trimethylsilyl propane sulfonate in D_2O.

Data availability: The data of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements: Special thanks to Melissa Zietz and Sven Wichmann for their support with the NMR and LC-MS measurements. We acknowledge financial support by DFG within the funding programme Open Access-Publikationskosten

References

Alisky JM, Tuttle TF (2003) Ethacrynic acid can be effective for refractory congestive heart failure and ascites. South Med J 96: 1148–1150.
Bell M, Jackson E, Mi Z, McCombs J, Carcillo J (1998) Low-dose theophylline increases urine output in diuretic-dependent critically ill children. Intensive Care Med 24: 1099–1105.
Berger S, Braun S (2011) 200 and more NMR experiments. A practical course, 2. expand. ed., 1. repr. WILEY-VCH, Weinheim.
Cohen EM (1971) Polarographic determination of ethacrynic acid. J Pharm Sci 60: 1702–1704.
Cragoe EJ (1967) (4-(3-(Polyazaheterocyclic)alkanoyl)phenoxy)alkanoic acids. US19670641122 C07D231/12;C07D231/56;C07D235/06;C07D249/04;C-07D249/08;C07D257/04;C07D473/08;C07D521/00;C07D57/48(US3585199 (A)).
Da Silva PSL, Aguiar VE de, Fonseca MCM (2012) Additive diuretic response of concurrent aminophylline and furosemide in children: a case series and a brief literature review. J Anesth 26: 118–123.
Dutt S, Goel V, Garg N, Choudhury D, Mallick D, Tyagi V (2020) Biocatalytic aza-Michael addition of aromatic amines to enone using α-amylase in water. Adv Synth Catal 362: 858–866.
Görlitzer K, Höbbel G (1979) Zur Reaktion von Etacrynsäure mit Natronlauge. Arch Intern Med 312: 633–634.
Gulevskaya AV, Pozharskii AF (1991) Synthesis of N-substituted xanthines (review). Chem Heterocycl Compd 27: 1–23.
Horváth A (1995) Michael adducts in the regioselective synthesis of N-substituted azoles. Synthesis 1995: 1183–1189.
Kim KE, Onesti G, Moyer JH, Swartz C (1971) Ethacrynic acid and furosemide. Am J Cardiol 27: 407–415.
Lister JH (1979) Current views on some physicochemical aspects of purines. In: Katritzky AR, Boulton AJ (eds): Advances in heterocyclic chemistry, vol 24. Academic Press, New York, pp 215–246.
Reisch J, Raghu Ram Rao A, Usifoh CO (1994) Acetylene chemistry, part 32: Alkinylation and cyclic rearrangement of theophylline with unsaturated alcohols by Mitsunobu reaction. Monatsh Chem 125: 79–83.
Ricci Z, Haiberger R, Pezzella C, Garisto C, Favia I, Cogo P (2015) Furosemide versus ethacrynic acid in pediatric patients undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial. Crit Care 19: 2.
Rybár A, Štibrányi L (1973) Purine derivatives. IV. 7-(3-Isothiocyanatopropyl)-8-alkyltheophyllines. Collect Czech Chem Commun 38: 1571–1578.
Schultz EM, Cragoe EJ, Bicking JB, Bolhofer WA, Sprague JM (1962) α,β-Unsaturated ketone derivatives of aryloxyacetic acids, a new class of diuretics. J Med Pharm Chem 91: 660–662.
Yarwood RJ, Moore WD, Collett JH (1987) The influence of the ammonium ion on the stability of ethacrynic acid in aqueous solution. J Pharm Biomed Anal 5: 369–378.

3.4. Identifikation eines Degradationsprodukts in der Mischung von Etacrynsäure und Natriumhydrogencarbonat

In den Mischungen von Etacrynsäure und Natriumhydrogencarbonat konnte ein weiteres Reaktionsprodukt von Etacrynsäure gefunden werden (siehe Jirschitzka et al.[38]). Dabei handelt es sich um die an der Methylengruppe hydratisierte Etacrynsäure (2-(2,3-dichloro-4-(2-(hydroxymethyl)butanoyl)phenoxy)essigsäure (OH-Eca)) (siehe Abbildung 3.4).

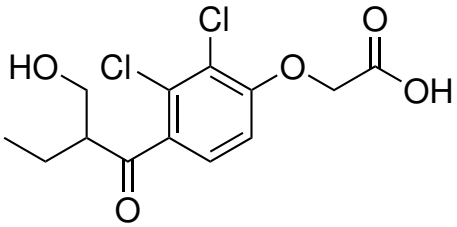


Abbildung 3.4.: Identifiziertes Degradationsprodukt aus Mischungen von Etacrynsäure und Natriumhydrogencarbonat (2-(2,3-dichloro-4-(2-(hydroxymethyl)butanoyl)phenoxy)essigsäure).

Dieses Produkt ist ein bekanntes Abbauprodukt und unter anderem von Görlitzer und Höbbel aus der Reaktion von Etacrynsäure mit 1 N NaOH nach Erhitzen beschrieben.[42],[43] Interessanterweise entstand OH-Eca in der hier vorgestellten Kompatibilitätsstudie unter deutlich milderen Bedingungen. Natriumhydrogencarbonat stellt zwar auch eine Base dar, jedoch eine weitaus schwächere als Natronlauge. Des Weiteren konnte das Auftreten von OH-Eca bei keiner anderen Mischung beobachtet werden, obwohl teilweise in den Mischungen ein höherer pH-Wert vorlag (siehe Tabelle 3.1). Es ist daher anzunehmen, dass

Tabelle 3.1.: Anfangs-pH-Werte der Mischungen mit Etacrynsäure

Arzneistoff A	Arzneistoff B	pH-Wert direkt nach dem Mischen †
Etacrynsäure	–	7,0 ± 0,7
	Theophyllin	9,1 ± 0,1
	Furosemid	7,9 ± 0,8
	Ampicillin + Sulbactam	9,0 ± 0
	Cefazolin	5,3 ± 0,3
	Glucose 50 %	5,0 ± 0,3
	Meropenem	8,0 ± 0
	Pantoprazol	9,0 ± 0,1
	Paracetamol	5,1 ± 0,1
	Natriumhydrogencarbonat 8,4 %	8,4 ± 0

† Mittelwert ± Standardabweichung verschieden konzentrierter Kombinationen

die Hydrogencarbonationen oder die im Gleichgewicht in geringerer Menge vorliegenden

Carbonationen direkt oder indirekt an der Reaktion teilnehmen und Natriumhydrogencarbonat nicht nur als Base fungiert.

3.5. Physikalische Kompatibilität von Furosemid mit anderen Arzneimitteln

Furosemid stellt neben Etacrynsäure ein weiteres Diuretikum dar, welches auf der Intensivstation der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des UKSH, Campus Kiel als Dauerinfusion verwendet wird. Daher wurde eine weitere Kompatibilitätsstudie durchgeführt, in der die physikalische Kompatibilität zwischen Furosemid und Ampicillin zusammen mit Sulbactam, Cefazolin, 50 % Glucoselösung sowie Paracetamol untersucht wurde. Die Ergebnisse der pH-Wert Bestimmungen und turbidimetrischen Messungen dieser Arzneistoffkombinationen sind in den Abbildungen 3.5 - 3.8 dargestellt. Auffällig ist die über die Lagerzeit kontinuierliche pH-Absenkung der Arzneimittelkombinationen bestehend aus Furosemid, Ampicillin und Sulbactam (siehe Abbildung 3.5). Innerhalb von 4 h sank der pH um 0,22 bzw. 0,24. Wie an anderer Stelle diskutiert [38] bewerten manche Autoren eine pH-Änderung von 0,1 bereits als Zeichen für eine vorliegende Inkompatibilität. In dieser Arbeit wurde jedoch ein Grenzwert von einer Änderung des pH-Wertes von maximal 1 festgelegt, daher wurden diese Kombinationen dennoch als kompatibel bewertet. Des Weiteren konnten Anzeichen von Inkompatibilitäten in den Arzneistoffkombinationen von Furosemid mit Cefazolin bzw. 50 % Glucoselösung festgestellt werden. Dabei konnten jedoch in jeweils einer Kombination (2 mg/ml Furosemid + 10 mg/ml Cefazolin und 2 mg/ml Furosemid + 50 % Glucose) nur geringfügige Änderungen innerhalb der vorher definierten Grenzwerte detektiert werden. Aufgrund der detektierten Inkompatibilitäten ist es jedoch wahrscheinlich, dass auch die beiden physikalisch unauffälligen Arzneistoffkombinationen inkompatibel sind. Daher wurden alle Kombinationen aus Furosemid mit Cefazolin und 50 % Glucoselösung als inkompatibel bewertet. Wie am Beispiel der Mischungen aus Etacrynsäure und Theophyllin gezeigt (siehe Abschnitt 3.3), ist es möglich, dass mit visuellen und physikalischen Untersuchungen Inkompatibilitäten übersehen werden können. Daher sollte in jedem Fall die physikalische Kompatibilität von Furosemid mit diesen Arzneistoffen noch durch Untersuchung der chemischen Kompatibilität vervollständigt werden. Dies soll Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

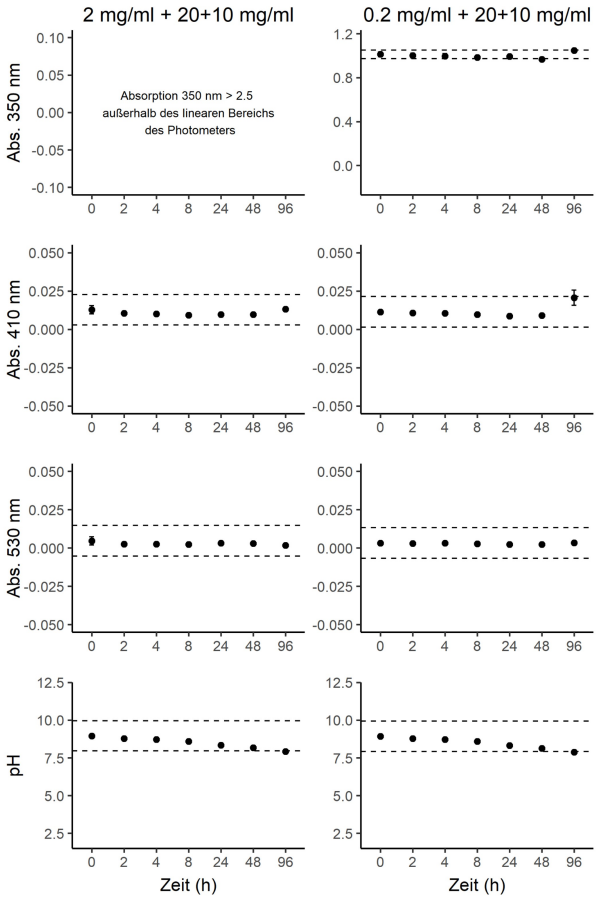


Abbildung 3.5.: Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Unacid (Ampicillin und Sulbactam). Gezeigt ist die Absorption bei 350 nm, 410 nm und 530 nm sowie der pH-Wert direkt nach dem Mischen und nach 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 96 h. Gestrichelte Linien zeigen die definierten Grenzwerte innerhalb derer eine Kombination als kompatibel bewertet wurde.

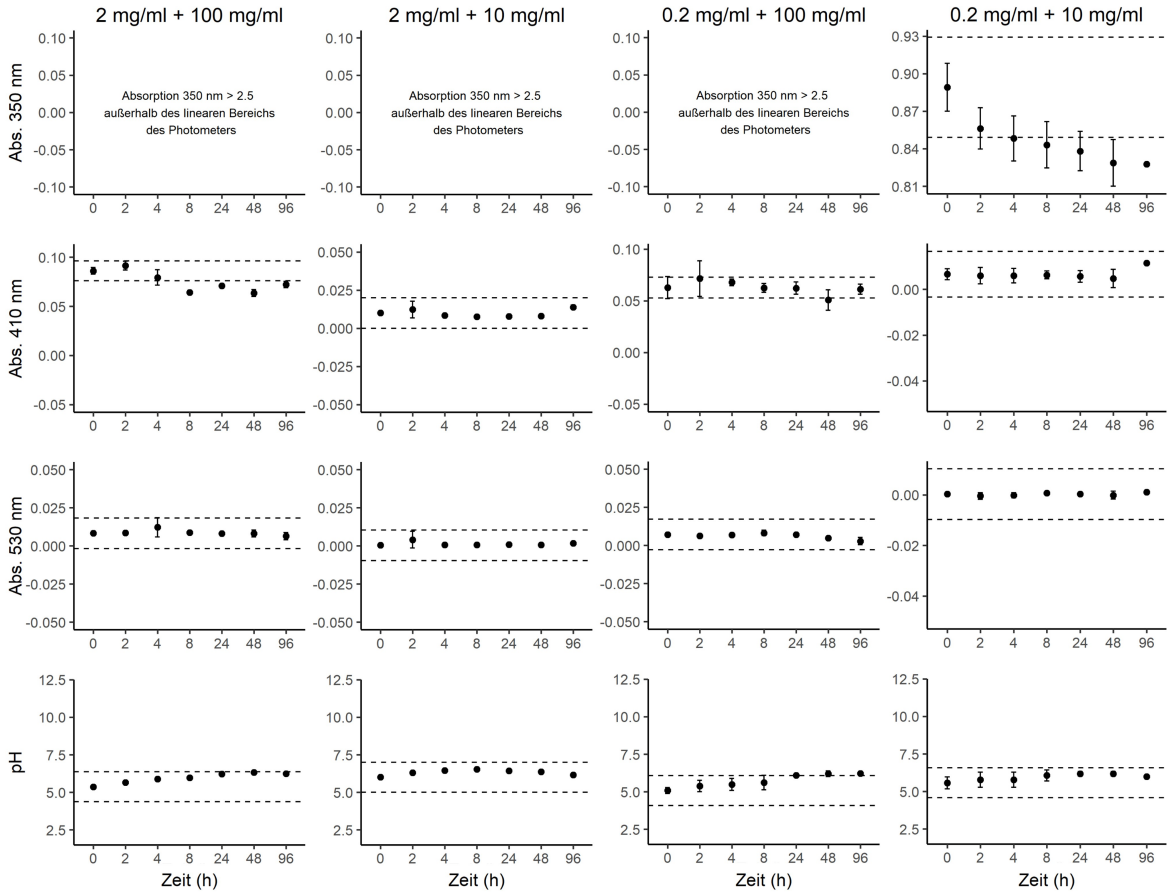


Abbildung 3.6.: Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Cefazolin-saar (Cefazolin). Gezeigt ist die Absorption bei 350 nm, 410 nm und 530 nm sowie der pH-Wert direkt nach dem Mischen und nach 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 96 h. Gestrichelte Linien zeigen die definierten Grenzwerte innerhalb derer eine Kombination als kompatibel bewertet wurde.

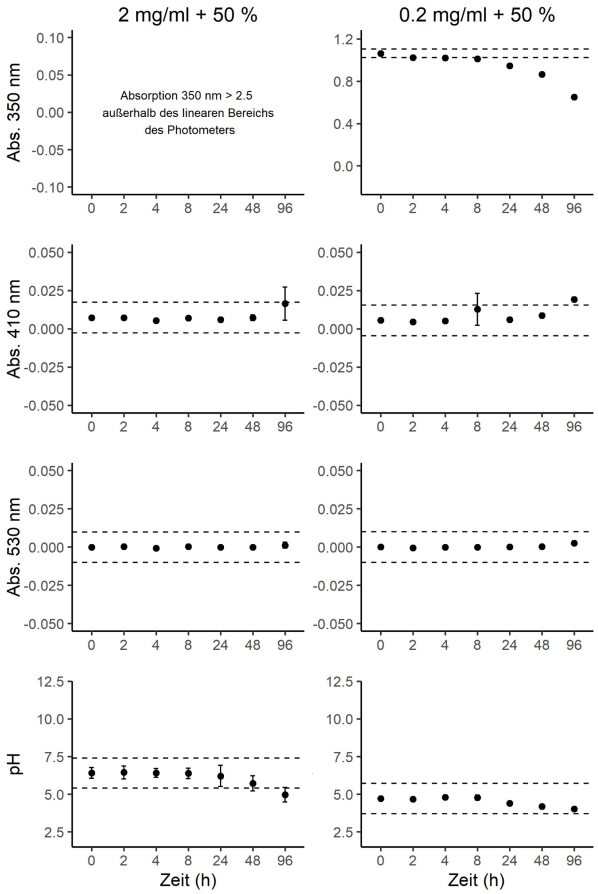


Abbildung 3.7.: Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Glucosteril 50 % (Glucoselösung 50 %). Gezeigt ist die Absorption bei 350 nm, 410 nm und 530 nm sowie der pH-Wert direkt nach dem Mischen und nach 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 96 h. Gestrichelte Linien zeigen die definierten Grenzwerte innerhalb derer eine Kombination als kompatibel bewertet wurde.

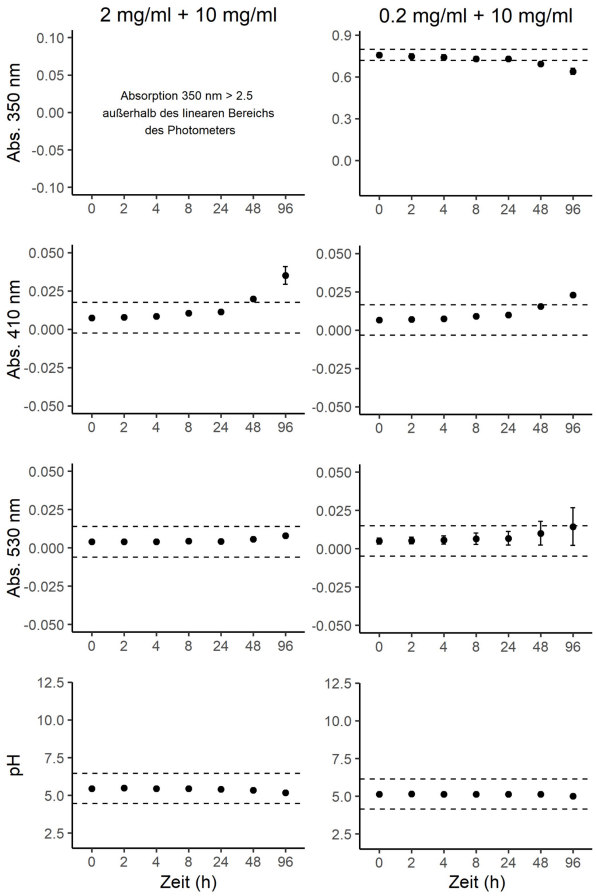


Abbildung 3.8.: Ergebnisse der physikalischen Kompatibilitätsuntersuchungen von Lasix (Furosemid) + Paracetamol B. Braun (Paracetamol). Gezeigt ist die Absorption bei 350 nm, 410 nm und 530 nm sowie der pH-Wert direkt nach dem Mischen und nach 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 96 h. Gestrichelte Linien zeigen die definierten Grenzwerte innerhalb derer eine Kombination als kompatibel bewertet wurde.

3.6. Weitere relevante Arzneistoffkombinationen

Die Arzneistoffe Heparin, Insulin, Metamizol sowie parenterale Ernährungslösungen (TPN) sind weitere interessante Kandidaten für Kompatibilitätsstudien. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, fehlen zu vielen Arzneimittelkombinationen dieser Arzneistoffe qualitativ hochwertige Kompatibilitätsdaten. Insbesondere die sehr niedrigen Konzentrationen von Heparin (teilweise $\leq$ 10 IE/ml) und Insulin (teilweise $\leq$ 0,2 IE/ml), wie sie bei einigen Neugeborenen eingesetzt werden, wären für Untersuchungen interessant gewesen. Diese beiden Arzneistoffe konnten jedoch nicht mit der entwickelten HPLC Methode aufgetrennt und quantifiziert werden. Darüber hinaus wird für Heparin im Europäsisches Arzneibuch (Ph. Eur.) zusätzlich zur Ionenaustauschchromatographie (mit einfacher Umkehrphasenchromatographie erfolgt keine Auftrennung von Heparin) eine Wertbestimmung (Anti-Faktor-IIa-Aktivität) empfohlen. Deshalb wurde zunächst die vorhandene Analytik zur Untersuchung der anderen Arzneistoffe genutzt und die Untersuchung von Heparin und Insulin für zukünftige Projekte zurückgestellt.

Metamizol (in angloamerikanischen Ländern auch als dipyrone bezeichnet) wurde zunächst auch mit der entwickelten HPLC-Methode vermessen. Jedoch zeigte sich dabei nach Verdünnung der 500 mg/ml konzentrierten Fertigarzneimittel-Lösung eine rasche Zersetzung in Form eines weiteren, kontinuierlich größer werdenden Peaks. Es ist bekannt, dass Metamizol in wässriger Lösung schnell zum 4-Methylaminoantipyrin (4-MAA) hydrolysiert wird.[44],[45] 4-MAA stellt dabei den pharmakologisch aktiven Hauptmetabolit von Metamizol dar. Nach Vermessung einer Referenzsubstanz konnte schließlich auch der entstandene Peak 4-MAA zugeordnet werden. Daher schien die Überlegung plausibel, beide Substanzen gemeinsam über die Summe der jeweiligen Peakflächen zu bestimmen.[46] Leider konnten die Substanzen (Metamizol und 4-MAA) nicht mit ausreichender Genauigkeit mit der entwickelten HPLC-Methode quantifiziert werden. Daher wurde eine für Metamizol beschriebene chromatographische Methode aus dem Ph. Eur. verwendet.[47, S. 4744] Mit dieser Methode wäre eine Quantifizierung in Summe möglich gewesen (siehe Abbildung 3.9), jedoch wurden damit Metamizol und 4-MAA nicht ausreichend von den anderen Arzneistoffen der Kompatibilitätsstudie getrennt. Zur Untersuchung der physikochemischen Kompatibilität von Metamizol müsste daher eine neue quantitative Methode etabliert werden. Dies soll Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

Auch Kombinationen der Arzneistoffe mit TPN wären für Kompatibilitätsuntersuchungen interessant. Für Neugeborene und Kinder werden parenterale Ernährungslösungen meist individuell hergestellt. Dabei kann es notwendig sein, dass die Zusammensetzung tagesaktuell angepasst werden muss. Neben Kohlenhydraten, Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen und Fetten (werden meist separat infundiert) sind für pädiatrisch-kardiologische Patient*innen im Vergleich zu anderen pädiatrischen Patient*innen höhere Konzentrationen an Magnesium und Calcium notwendig. Diese zweiwertigen Kationen sind für ihr Interaktionspotential und damit verbundenen Inkompatibilitäten bekannt (z.B. Komplexierung von Fluorchinolonen).[48] Aufgrund der Komplexität von Kompatibilitätsstudien mit individuell

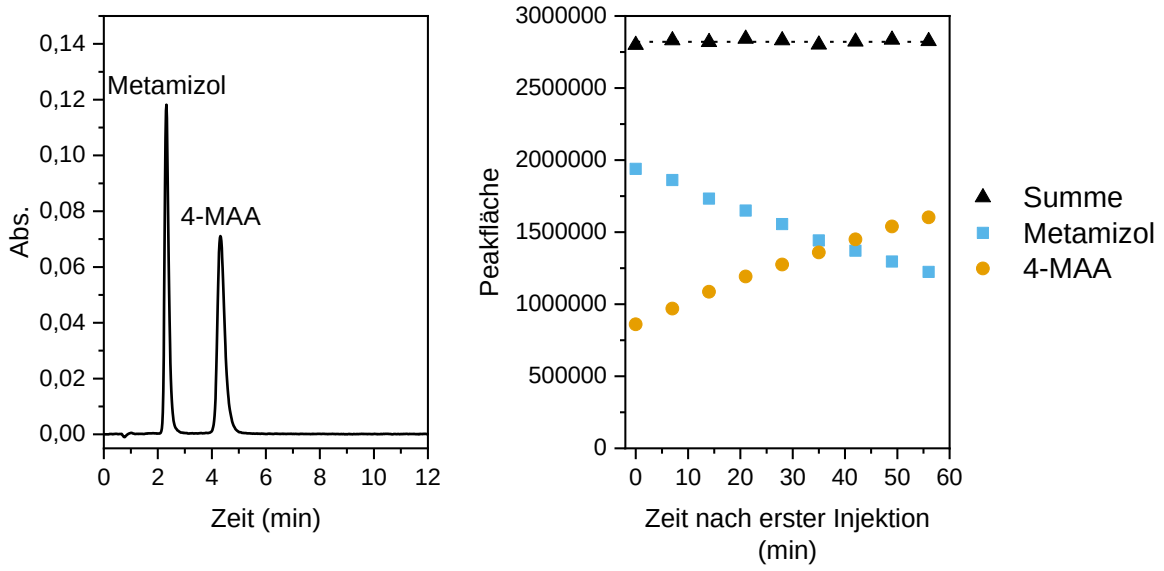


Abbildung 3.9.: HPLC-Messungen von Metamizol. Links: repräsentatives Chromatogramm einer mit NaCl auf 0,1 mg/ml verdünnten Metamizol-Lösung. Rechts: Aufgetragen sind die Flächen der Peaks von Metamizol und 4-Methylaminoantipyrin (4-MAA) nach dem Verdünnen auf 0,1 mg/ml. Der Zeitpunkt Null entspricht dabei dem Start der ersten Injektion, welche direkt nach dem Verdünnen erfolgte. Es wurden 9 Injektionen der selben Lösung in einem Abstand von 7 min durchgeführt. Zusätzlich ist die Summe der Peakflächen beider Substanzen (Metamizol + 4-MAA) aufgetragen. Über 60 min bleibt die Summe der Peakflächen nahezu konstant.

hergestellten parenteralen Ernährungslösungen, wurden die Kompatibilitätsuntersuchungen der Arzneistoffe mit TPN für zukünftige Forschungsprojekte zurückgestellt.

4. Zusammenfassung

Obwohl immer mehr Kompatibilitätsstudien von parenteralen Arzneimitteln durchgeführt wurden, sind noch immer viele Arzneistoffkombinationen nicht untersucht. Dies betrifft vor allem Arzneistoffe, welche bei besonderen Patientengruppen oder in niedrigen Dosierungen, wie es für die Behandlung von Neugeborenen oder Kindern notwendig ist, angewendet werden. In Kooperation mit einer pädiatrisch-kardiologischen Intensivstation, wurden solche Arzneistoffe identifiziert. Dazu gehören die als Dauerinfusion verabreichten Arzneistoffe Etacrynsäure, Theophyllin und Furosemid. In Kombination mit anderen auf der Intensivstation eingesetzten Parenteralia wurde die Kompatibilität dieser Arzneimittel in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die Konzentrationen entsprachen dabei den Minimal- und Maximalkonzentrationen der auf der Intensivstation verwendeten Arzneistoffe.

Es wurden 50 Kombinationen bestehend aus Etacrynsäure und/oder Theophyllin mit anderen Arzneistoffen physikochemisch untersucht. Davon konnten 37 Kombinationen als physikochemisch kompatibel bewertet werden. Zusätzlich wurde die physikalische Kompatibilität von Furosemid mit anderen Arzneistoffen untersucht. Von 10 getesteten Kombinationen konnten dabei vier als physikalisch kompatibel bewertet werden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 19 inkompatible Arzneistoffkombinationen identifiziert, welche als Konsequenz den Patienten stets getrennt (verschiedene venöse Zugänge oder Infusionslumen, zeitlich getrennte Infusion mit Zwischenspülen) appliziert werden sollten. In Abbildung 4.1 sind die Ergebnisse der Kompatibilitätsstudien zusammengefasst. Interessanterweise konnten mit

		Theophyllin		Furosemid		Ampicillin + Sulbactam	Cefazolin		Glucose	Meropenem		Pantoprazol	Paracetamol	Kaliumchlorid	Natriumhydrogen-carbonat
		4	0,8	2	0,2	20+10	100	10	50 %	20	2	1	10	7,46 %	8,4 %
Etacrynsäure	0,8									†				†††	††
	0,1									†		†			††
Theophyllin	4									†					
	0,8										†				
Furosemid	2					‡		‡‡	‡‡	†††		†††		†††	†††
	0,2					‡									

Abbildung 4.1.: Kompatibilitätstabelle nach Abschluss aller Kompatibilitätsuntersuchungen, modifiziert nach Jirschitzka et al.[38] hellgrün: physikalisch kompatibel, dunkelgrün: physikochemisch kompatibel, rot: inkompatibel. †: Gehaltsverlust $\geq$ 3 % aber $\leq$ 10 % in 4 h, ††: Auftreten eines Degradationsprodukts, †††: publizierte Daten, daher andere Arzneistoffkonzentration, ‡: pH-Änderung $\geq$ 0,2 aber $\leq$ 1 in 4 h, ‡‡: Inkompatibilität ist plausibel, konnte jedoch physikalisch nicht nachgewiesen werden.

den in physikalischen Kompatibilitätsstudien üblicherweise angewandten Methoden, drei von vier Mischungen aus Etacrynsäure mit Theophyllin nicht als inkompatibel klassifiziert werden. Erst nach Vermessung an der HPLC und dem damit verbundenen gemessenen Gehaltsverlust mussten diese Kombinationen als inkompatibel bewertet werden. Damit stellen Mischungen aus Etacrynsäure mit Theophyllin ein Beispiel für physikalisch-nicht-nachweisbar-inkompatible Arzneistoffkombinationen dar. Durch Auswertung der Chromatogramme konnte jedoch nicht nur der Gehaltsverlust bestimmt, sondern auch das Entstehen eines Reaktionsprodukts beobachtet werden. Dieses Reaktionsprodukt wurde vollständig strukturell aufgeklärt und als ein Aza-Michael-Addukt ([2-(2,3-dichloro-4-2-[(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-purin-7(6*H*) -yl)methyl]butanoylphenoxy)essigsäure]) identifiziert. Bereits 1967 wurde dieses Additionsprodukt als wahrscheinliches Produkt aus der Reaktion von Etacrynsäure mit Theophyllin beschrieben, jedoch konnte die exakte Struktur zum damaligen Zeitpunkt nicht bewiesen werden.[49] In der hier vorgestellten Arbeit konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass unter Bedingungen, welche im klinischen Alltag möglich sind, Etacrynsäure und Theophyllin miteinander in einer Aza-Michael-Addition reagieren und dass dabei ausschließlich das N-7 und nicht das N-9 Addukt entsteht.[41]

Aus den Mischungen von Etacrynsäure mit Natriumhydrogencarbonat konnte ein weiteres Abbauprodukt identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein bereits beschriebenes, für Etacrynsäure typisches Degradationsprodukt (2-(2,3-dichloro-4-(2-(hydroxymethyl)butanoyl)-phenoxy)essigsäure).[42],[43] Da sich jedoch der Gehalt an Etacrynsäure im klinisch relevanten Zeitraum von 4 h nur geringfügig ($\leq$ 3 %) änderte, wurden die Mischungen von Etacrynsäure mit Natriumhydrogencarbonat dennoch als physikochemisch kompatibel bewertet.[38]

Mit den Ergebnissen dieser Studien konnten weitere Datenlücken zur Kompatibilität von Etacrynsäure, Theophyllin und Furosmid geschlossen werden. Pflegekräfte, pharmazeutisches und ärztliches Personal können diese Daten nutzen, um die Infusionsregime anzupassen und weiter zu standardisieren. Zusätzlich bilden diese Daten eine Argumentationsgrundlage für die potenzielle Notwendigkeit weiterer (zentral-)venöser Zugänge.

Durch den Gebrauch dieser Kompatibilitätsdaten können die durch Inkompatibilitäten bedingten Risiken für die Patient*innen gesenkt werden. Somit leistet diese Arbeit einen deutlichen Beitrag zur Arzneimitteltherapiesicherheit.

Teil II.

Studien zur Stabilität eines monoklonalen Antikörpers

5. Einleitung

5.1. Monoklonale Antikörper als Arzneimittel

1984 bekamen Georges J.F. Köhler und César Milstein (gemeinsam mit Niels K. Jerne) den Nobelpreis in Physiologie und Medizin für die Entdeckung „of the principle for production of monoclonal antibodies“.[50] Dieses 1975 entdeckte Prinzip zur Herstellung monoklonaler Antikörper ist die Hybridoma-Technik.[50] Dabei werden zuvor isolierte spezifische Antikörper-produzierende B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert. Das Ergebnis sind Hybride welche Eigenschaften beider Zellen (Produktion hochspezifischer Antikörper und Immortalität) vereinen. Da die so gewonnenen Hybriden theoretisch nur von einem B-Lymphozyten bzw. dessen Klone abstammen und die davon sezernierten Antikörper somit nur gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet sind, werden sie als monoklonal bezeichnet. Bei der physiologischen Immunantwort werden hingegen immer mehrere B-Lymphozyten aktiviert, welche jeweils verschiedene Antikörper sezernieren. Dieses Gemisch von Antikörpern, welche zwar gegen ein spezifisches Antigen, jedoch gegen verschiedene Epitope gerichtet ist, wird als polyklonaler Antikörper bezeichnet. Auch polyklonale Antikörper werden therapeutisch angewendet. So sind polyklonale Antikörper beispielsweise Bestandteil von Immunglobulinpräperaten und Immunseren, welche aus dem Blut des Menschen oder von zuvor immunisierten Spendertieren gewonnen werden. Mit der Entwicklung der Hybridoma-Technik wurde der Grundstein für die Erfolgsgeschichte monoklonaler Antikörper in der Forschung, Diagnostik und Therapie von Krankheiten gelegt.

OKT3 (später umbenannt in Muromonab-CD3) stellte den ersten von der FDA im Jahr 1986 zugelassenen monoklonalen Antikörper dar (siehe Abbildung 5.1). Muromonab-CD3 ist ein mittels Hybridoma-Technik hergestellter, muriner monoklonaler Antikörper, der gegen den CD3-Rezeptor auf T-Lymphozyten gerichtet ist und zur Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktionen induziert war.[52] Aufgrund von Nebenwirkungen und wirksamerer Alternativen ist Muromonab-CD3 in den USA und in Teilen der EU jedoch nicht mehr im Handel.[53] Murine, also von der Maus abstammende Antikörper, haben einige Nachteile. Da diese Antikörper vom menschlichen Immunsystem selbst als Antigene wahrgenommen werden, werden humane-anti-Maus-Antikörper (HAMA) produziert. Bei wiederholter Gabe von murinen Antikörpern werden diese daher zunehmend neutralisiert (HAMA-Reaktion). Eine HAMA-Reaktion führt zu einer drastischen Verringerung der Halbwertszeit und schließlich zum Wirkverlust des Antikörpers. Darüber hinaus ist das Risiko für allergische und andere immunologisch bedingte Reaktionen wie bspw. Thrombozytopenien bei Verwendung muriner monoklonaler Antikörper erhöht.[54],[55] Ein weiterer Nachteil von murinen monoklonalen Antikörpern ist die geringe Fähigkeit zur Anlockung von Effektorzellen im Rahmen der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) oder zur komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC). Die Fähigkeit zur ADCC und CDC trägt jedoch bei einigen monoklonalen

Antikörpern entscheidend zur Wirksamkeit bei.[54]

Es wurden daher rekombinante (Nutzung der Gentechnologie) Techniken entwickelt, um monoklonale Antikörper herzustellen, welche ganz oder teilweise humanen Antikörpern identisch sind. Dabei werden je nach Ähnlichkeit zu humanen Antikörpern 4 Gruppen unterschieden: murin (stammen vollständig von der Maus), chimär (variabler Teil der Antikörper ist murin, konstanter Teil ist human), humanisiert (nur die hochvariablen Bereiche (complementarity-determining regions, CDR) sind murin, der Rest ist human) und schließlich human (vollständig humaner monoklonaler Antikörper).[56] Zum besseren Verständnis des strukturellen Aufbaus monoklonaler Antikörper sei auf den folgenden Abschnitt und insbesondere Abbildung 5.2 verwiesen.

Im Jahr 1994 wurde schließlich, der Thrombozytenaggregationshemmer Abciximab als erstes chimäres Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers von der FDA zugelassen. Drei Jahre später, 1997, wurde Rituximab, ein weiterer chimärer Antikörper zugelassen, welcher noch immer erfolgreich bei verschiedenen Krebsarten und Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird.[56] Mit 6,5 Milliarden US-Dollar gehörte Rituximab im Jahr 2019 sogar zu den 5-umsatzstärksten Antikörpern weltweit.[52] In den folgenden Jahren wurden weitere chimäre und humanisierte monoklonale Antikörper zugelassen (Abbildung 5.1). Besonders zu erwähnen sind hierbei Infliximab und Trastuzumab. 2002 wurde mit Adalimumab der erste, mittels Phagen-Display Technologie entwickelte, humane monoklonale Antikörper von der FDA zugelassen.[56]

Die Phagen-Display Technik wurde von George P. Smith in den 1980er Jahren entwickelt und von Gregory P. Winter 1990 für die Produktion von humanen monoklonalen Antikörpern optimiert. Bei der Phagen-Display Technik wird die Aminosäuresequenz eines gewünschten Peptids, Proteinfragments oder vollständigen Proteins mit dem Genom von Bakteriophagen, genauer mit der Sequenz des Membranproteins pIII des filamentösen Phagen M13 verknüpft.[57] Mit den so gentechnisch modifizierten Bakteriophagen werden Escherichia coli infiziert, welche nun neue Bakteriophagen produzieren. Diese neuen Phagen präsentieren das gewünschte Protein auf ihrer Oberfläche. Gleichzeitig ist das Protein auch im Phagengenom kodiert und dadurch eindeutig definiert. Diese Phagen stellen stabile und im Labor gut handhabbare Reagenzien dar, welche Phänotyp und Genotyp eines gewünschten Proteins verknüpfen.[56],[57] Außerdem ist es möglich die Phagen durch Infektion von Bakterien in großer Zahl (bis zu mehreren Milliarden) zu vervielfältigen. Gregory P. Winter entwickelte die Phagen-Display Technik weiter, indem er die Phagen Antikörperfragmente präsentieren ließ, welche für die Epitopbindung verantwortlich sind. Zunächst nutzte Winter dazu die über eine kurze Peptidsequenz verbundenen variablen Anteile der leichten und schweren Kette (single chain fragment variable, scFv).[58] Nach zahlreichen Optimierungen gelang es Winter schließlich, vollständig humane monoklonale Antikörper in vitro und ohne Hybridomatechnik mit der Phagen-Display Technologie herzustellen.[58] Indem der genetische Code der Antikörper gezielt oder ungerichtet mutiert wurde, konnten so große Phagen-Bibliotheken mit bis zu 10^{11} verschiedenen Klonen aufgebaut werden. Diese Bibliotheken enthalten beinahe

alle theoretisch möglichen variablen Ketten eines Antikörpers. Durch wiederholte Selektion der Phagen mittels Affinitätschromatographie, dem so genannten Bio-Panning, können aus einer bestehenden Phagenbibliothek monoklonale Antikörper identifiziert werden, welche mit hoher Affinität an gewünschte Antigene binden.[58]

Für ihre wissenschaftlichen Arbeiten „for the phage display of peptides and antibodies“ wurden George P. Smith und Gregory P. Winter (zusammen mit Frances A. Arnold) 2018 mit dem Nobelpreis in Chemie geehrt.[59] Inzwischen gibt es viele verschiedene Display Techniken bei der nicht nur Bakteriophagen sondern auch andere virale, eukaryotische (v.a. das Hefen-Display ist von Bedeutung) und sogar zellfreie Systeme (Ribosomen-Display) verwendet werden.[60],[61] Neben dem Phagen-Display stellt die Verwendung von transgenen Mäusen eine weitere Möglichkeit dar, humane monoklonale Antikörper herzustellen. Der erste im Jahr 2006 zugelassene humane monoklonale Antikörper, welcher mit genetisch veränderten Mäusen produziert wurde, war Panitumumab.[56]

Nach Daten der Antibody Society wurden bis April 2023 117 monoklonale Antikörper von der FDA zugelassen.[51] Von diesen 117 zugelassenen Antikörpern werden 49 im Bereich der Onkologie, 35 in der Immunologie, 9 bei Infektionskrankheiten, je 6 in Hämatologie und Neurologie, 4 zur Behandlung von Erbkrankheiten, 4 in der Augenheilkunde und je 2 zur Behandlung von Fettstoffwechselstörungen und muskuloskelettalen Erkrankungen eingesetzt (Abbildung 5.1). Darüber hinaus befinden sich aktuell beinahe 1200 Antikörper bzw. deren Derivate in der klinischen Prüfung. Für 23 dieser Antikörper wird die Zulassung noch im Jahr 2023 erwartet.[51],[62]. Von ein bis zwei Zulassungen pro Jahr in den 2000er Jahren, hat sich die Anzahl an jährlichen Zulassungen also mehr als verzehnfacht.[52] Neben den klassischen monoklonalen IgG Antikörpern wurden und werden auch andere Varianten entwickelt. Dazu gehören beispielsweise Antikörper-Wirkstoff Konjugate (z.B. Brentuximab Vedotin oder Trastuzumab Emtansin); bispezifische, also gegen zwei verschiedene Epitope gerichtete Antikörper (z.B. Emicizumab); Fragmente von Antikörpern (z.B. Abciximab oder Idarucizumab, beides Fab-Fragmente und Caplacizumab ein Nanobody) oder Kombinationen der genannten Varianten (z.B. Blinatumomab ein bispezifisches scFv).

Eine Besonderheit unter monoklonalen Antikörpern stellen die sogenannten Nanobodies dar. Nanobodies wurden von speziellen, nur aus zwei verbundenen schweren Ketten bestehenden Antikörpern, welche in Kamelen und Knorpelfischen vorkommen abgeleitet und bestehen nur aus der einzelnen variablen Domäne der schweren Kette.[63] Sie werden daher auch als Einzeldomänenantikörper bezeichnet. Nanobodies haben im Vergleich zu klassischen Antikörpern einige Vorteile bei gleichbleibend hoher Bindungsaffinität. Das geringe Molekulargewicht von etwa 15 kDa erlaubt eine verbesserte Gewebedurchlässigkeit und es konnte gezeigt werden, dass Nanobodies die Blut-Hirn-Schranke durch Transzytose überwinden können.[63],[64] Durch einen verlängerten Bereich, welcher für die Antigenbindung entscheidend ist, sind Nanobodies in der Lage an bestimmte Epitopregionen zu binden, welche klassischen Antikörpern nicht oder nur wenig zugänglich sind. Interessanterweise sind Nanobodies darüber hinaus extrem stabil. Sie können Temperaturen bis 90 °C, Säure

und Tenside sehr gut tolerieren.[63] Da Nanobodies kein Kristallfragment besitzen, lösen sie so gut wie keine immunologischen Reaktionen aus. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Nanobodies vor allem als Konjugate mit Wirkstoffen oder diagnostischen Molekülen extrem interessant und aktuell Bestandteil verschiedener klinischer Studien.[62],[63]

Hochspezifische monoklonale Antikörper haben die Forschung und insbesondere die Therapie von Krankheiten revolutioniert und stellen für Pharmaunternehmen lukrative Wirkstoffe dar. So schätzen Walsh und Walsh den weltweiten Jahresumsatz von Antikörperpräparaten für 2021 auf 228 Milliarden US-Dollar mit einer weiter wachsenden Tendenz.[65] Monoklonale Antikörper können schnell entwickelt werden, was sie unter anderem bei pandemischen Ereignissen, wie zum Beispiel der COVID-19 Pandemie interessant machte.[66] Der Bereich des Antibody Engineerings, also der gezielten Modifikation von Antikörpern hat sich in den letzten Jahren enorm entwickelt, sodass bereits bekannte Antikörper optimiert werden und als „Biobetter Antibodies“ erneut Anwendung finden.[61] Schließlich werden auch „Next Generation Antibodies“ wie Antikörper-Wirkstoff Konjugate und bispezifische Antikörper, welche zusätzlich zur Bindung an Krebszellen auch an Immunzellen binden und diese somit direkt rekrutieren können, eine weiter wachsende Rolle spielen.[61],[67]

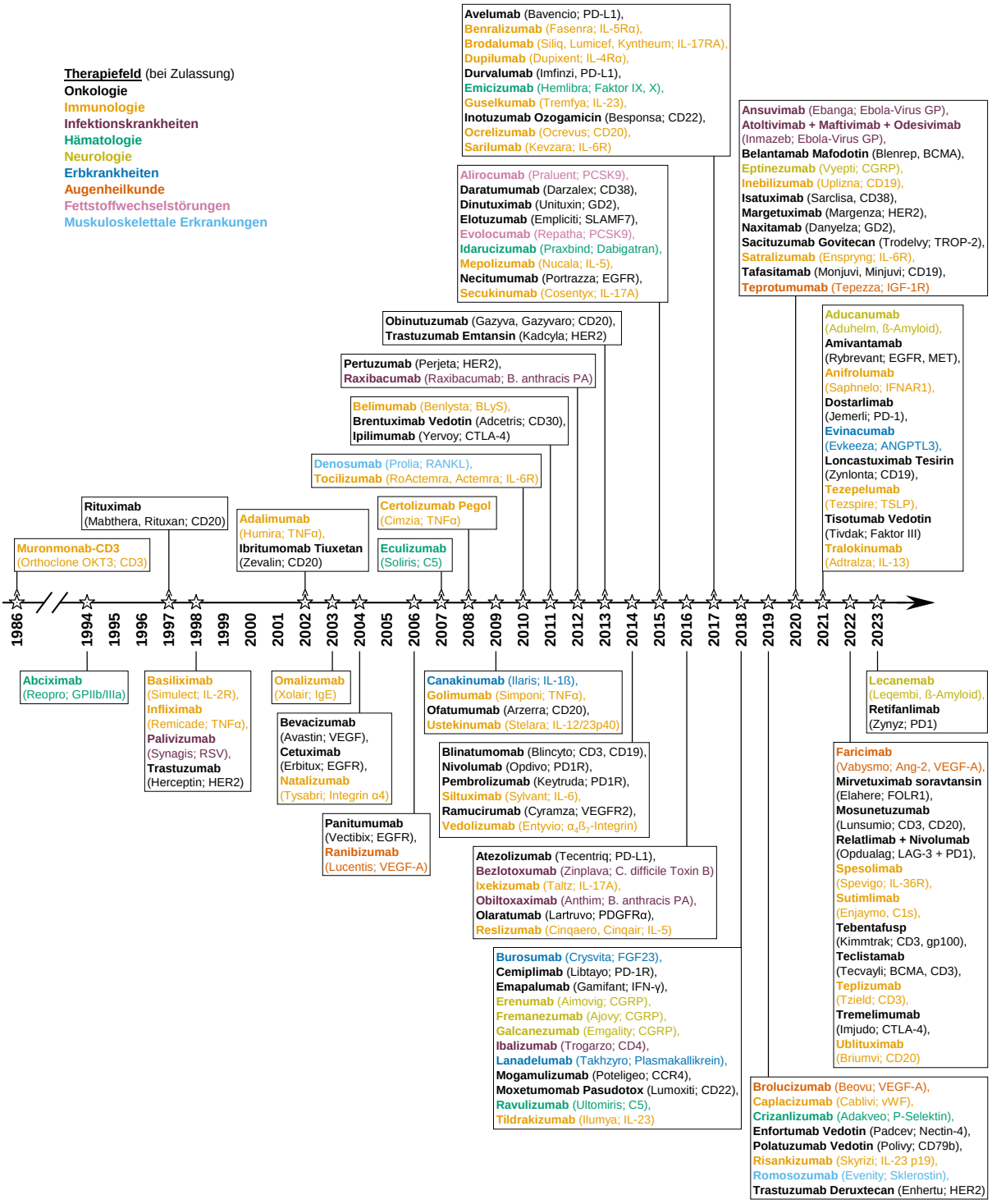


Abbildung 5.1.: FDA-Zulassungen monoklonaler Antikörper. Die Antikörper sind unter ihrem internationalen Freinamen (Handelsname; Target) aufgeführt. Das Therapiefeld der Antikörper zum Zeitpunkt der Zulassung ist farblich dargestellt. Die Daten basieren auf den Angaben der Antibody Society.[51]

5.2. Aufbau von monoklonalen Antikörpern

Monoklonale Antikörper sind von Immunglobulinen (Ig) abgeleitet. Im menschlichen Körper kommen 5 Klassen von Immunglobulinen vor: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Immunglobuline der Klasse G können wiederum in die Subtypen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilt werden. Alle aktuell zugelassenen monoklonalen Antikörper basieren auf IgG verschiedener Subtypen (jedoch v.a. IgG1).[56] IgG sind wie die anderen Immunglobuline Glykoproteine, also Proteine, welche posttranslational glykosyliert werden.

Proteine und damit auch monoklonale Antikörper, setzten sich zunächst aus einer Abfolge von peptidisch verknüpften Aminosäuren (Aminosäurensequenz) zusammen. Diese Abfolge wird als Primärstruktur bezeichnet. Zwischen den an der Peptidbindung beteiligten Amin- und Carbonylgruppen folgender Aminosäuren können sich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Abhängig von der räumlichen Organisation bilden sich α-Helices oder β-Faltblattstrukturen. Die Organisation in α-Helices oder β-Faltblattstrukturen wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Neben Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidketten können sich auch Wasserstoffbrücken und andere Wechselwirkungen z.B. hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen (z.B. Disulfidbrücken) zwischen den Seitenketten der Aminosäuren ausbilden. Aus all diesen Wechselwirkungen ergeben sich komplexe räumliche Strukturen mit geordneten und weniger geordneten Bereichen. Diese Gesamtstruktur stellt die Tertiärstruktur dar. Lagern sich mehrere Proteine (dann als Proteinuntereinheit bezeichnet) funktionell zusammen, spricht man von einer Quartärstruktur. So bilden beispielsweise IgA Dimere und IgM Pentamere.[68, S.391-392]

In Abbildung 5.2 a ist schematisch der Aufbau eines IgG-Antikörpers dargestellt. IgG-Antikörper haben eine Y-artige Struktur und bestehen aus zwei schweren Ketten (engl.: heavy chain, H) vom Typ γ und zwei leichten Ketten (engl.: light chain, L) vom Typ λ oder $\varkappa$. Schwere und leichte Ketten sind über vier Disulfidbrücken, zwei zwischen den schweren Ketten und je eine zwischen schwerer und leichter Kette miteinander verknüpft. Dieser Bereich wird als hinge Region oder Scharnier-Region bezeichnet. Innerhalb einer Kette gibt es weitere Disulfidbrücken.

Rodney Porter entdeckte in den 1950er Jahren, dass die Behandlung von Antikörpern mit der Protease Papain zu drei Fragmenten führt, von denen ein Fragment kristallisierbar war und schließlich auch nach dieser Beobachtung benannt wurde (Kristallfragment, Fragment crystallizable, Fc).[69] Das Kristallfragment besteht aus den konstanten Bereichen der schweren Kette c_{H2} und c_{H3}. Die anderen beiden, nach Papainspaltung entstehenden Fragmente sind die zwei identischen Fab-Fragmente. Ein Fab-Fragment besteht aus der gesamten leichten Kette und einem Anteil der schweren Kette, welche weiterhin über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Jede dieser Ketten lässt sich weiter in einen konstanten (c_L, c_{H1}) und einen variablen (v_L, v_H) Bereich einteilen. Im variablen Bereich einer Kette befinden sich drei exponierte Schleifen. Diese Schleifen werden als hochvariable Bereiche (engl.: complementary-determining region, CDR1-3) bezeichnet und sind maßgeblich für die

Antigenerkennung verantwortlich.

Wie bereits erwähnt sind monoklonale Antikörper Glykoproteine. Bei IgG-Antikörpern findet die Glykosylierung hoch konserviert am Asparagin$_{297}$ statt. Die Glycane bestehen aus einer N-Acetylglucosamin-Mannose Grundstruktur an die weitere Kohlenhydrate gebunden sind z.B. Fucose, Galactose oder Sialinsäure.[61]

In Abbildung 5.2 b sind schematisch weitere monoklonale Antikörpervarianten dargestellt. Bispezifische Antikörper bestehen aus verschiedenen schweren und leichten Ketten (zumindest verschiedene CDRs). Single chain fragment variable (scFv) sind Antikörperfragmente, welche nur aus den miteinander verknüpften variablen Bereichen der leichten und schweren Kette bestehen. Einzeldomänenantikörper oder auch Nanobodies bestehen nur aus dem variablen Anteil einer schweren Kette spezifischer Antikörper-Klassen.

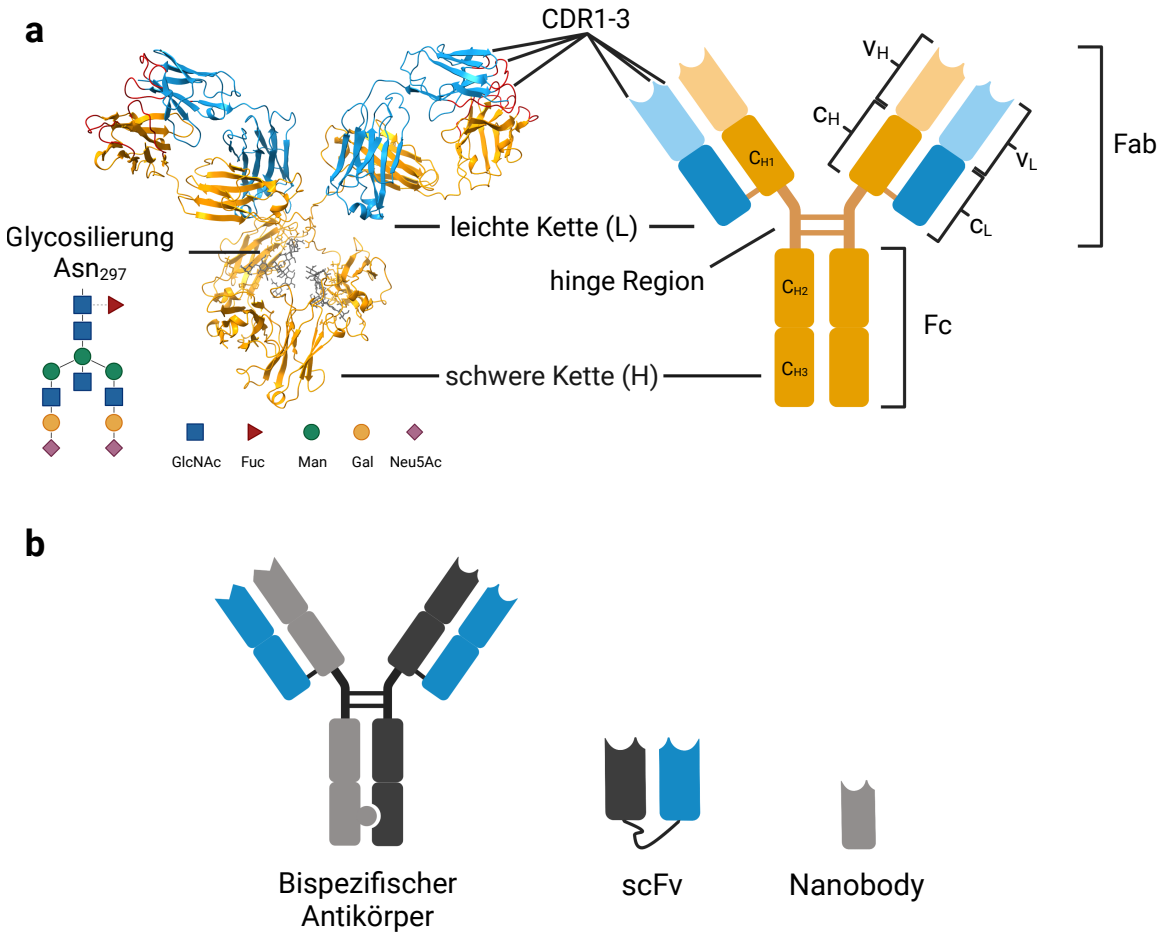


Abbildung 5.2.: Aufbau eines monoklonalen Antikörpers. a: Links ist eine Kristallstruktur (pdb: 1IGY), mit skizzierter Glykosylierung, rechts ein IgG-Antikörper schematisch dargestellt. Asn: Asparagin, CDR: complementary-determining region, Fuc: Fucose, Gal: Galactose, GlcNAc: N-Acetylglucosamin, Neu5Ac: Sialinsäure.[61] b: Auswahl an therapeutisch genutzten Antikörpermodifikationen. scFv: single chain fragment variable

5.3. Stabilität von monoklonalen Antikörpern

Die Stabilität eines Arzneimittels wird von der WHO als „die Fähigkeit eines pharmazeutischen Produkts, seine physikalischen, chemischen, mikrobiologischen und biopharmazeutischen Eigenschaften innerhalb bestimmter Grenzen während der Haltbarkeitsdauer zu erhalten“ definiert.[70] Im Sinne dieser Definition ist ein pharmazeutisches Produkt als eine Arzneimittelzubereitung zu verstehen. Die chemischen oder physikalischen Eigenschaften können aber auch auf den Wirkstoff an sich bezogen werden, also zum Beispiel auf einen monoklonalen Antikörper. In der Literatur und auch in dieser Arbeit wird häufig vereinfacht von der Stabilität eines bestimmten Antikörpers gesprochen. Damit ist zunächst auch die physikalische und chemische Stabilität eines Antikörpers gemeint, jedoch bezieht sich diese immer auch auf die entsprechende Arzneimittelformulierung (im einfachsten Fall eine wässrige Lösung). Die Aussage, ein Antikörper ist stabil oder zeigt Instabilitäten muss daher immer im Kontext des Arzneimittels gesehen werden. In diesem Abschnitt sollen zunächst generelle Mechanismen zur Entstehung von Instabilitäten von monoklonalen Antikörpern dargestellt werden. Im Abschnitt 5.4 wird dann der Einfluss der Arzneimittelzubereitung auf die Stabilität des Antikörpers erläutert.

Im Vergleich zu Enzymen oder anderen Proteinen sind IgG Antikörper relativ stabile Proteine. Dies zeigt sich auch an der langen Halbwertszeit im menschlichen Körper von etwa 21 Tagen (mit Ausnahme von IgG3 welche eine Halbwertszeit von 7 Tagen haben).[71] Dennoch sind monoklonale Antikörper, verschiedenen Degradationsprozessen unterworfen. Diese können in physikalische und chemische Prozesse oder Instabilitäten unterteilt werden. Zur physikalischen Instabilität zählen alle strukturellen Veränderungen (Quartär-, Tertiär-, Sekundär-Struktur) eines Antikörpers (Proteins). Dabei bleibt jedoch die Zusammensetzung (Primärstruktur) unverändert. Zu den strukturellen Veränderungen gehören Denaturierung und Aggregation, welche vor allem durch thermischen oder mechanischen Stress ausgelöst werden. Eine Denaturierung eines Proteins kann unter Umständen reversibel sein, wohingegen die Bildung von Aggregaten, insbesondere bedingt durch Ausbildung kovalenter Bindungen (v.a. Disulfidbrücken) meist irreversibel ist.[72] Aggregate können weiterhin löslich sein oder ausfallen. Bei einer entsprechend großen Anzahl an unlöslichen Aggregaten zeigt sich dies meist in einer Trübung der Lösung. Physikalische Veränderungen (Instabilitäten) gehen häufig mit einem Wirkverlust einher. Zusätzlich haben Aggregate oder nach Denaturierung falsch renaturierte Proteine ein hohes Potential für unerwünschte immunologische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock.[73]

Chemische Instabilitäten sind durch Veränderungen der Primärstruktur gekennzeichnet. Diese Veränderungen werden im wesentlichen durch drei Reaktionen hervorgerufen: Oxidation, Hydrolyse bzw. der damit verbundenen Desaminierung und Glykierung.

Oxidation findet hauptsächlich an den Aminosäuren Histidin, Methionin, Cystein, Tyrosin und Tryptophan statt, wobei insbesondere Methionin sehr leicht zum Methioninsulfoxid oxidiert werden kann.[72] Oxidative Prozesse werden durch Licht (UV-Strahlung), metallische

Verunreinigungen, welche beispielsweise in Hilfsstoffen enthalten sein können oder durch den in der Luft enthaltenen Sauerstoff begünstigt.

Hydrolyse kann theoretisch an jeder Peptidbindung stattfinden und zum Bruch der Peptidkette und damit zu Fragmenten führen. Vor allem die hinge Region eines Antikörpers scheint dafür anfällig zu sein.[72] In wässrigen Lösungen und bei Raumtemperatur läuft dieser Prozess jedoch extrem langsam ab. Neben der hinge Region findet eine hydrolytische Spaltung der Peptidbindung bevorzugt an Aspartatresten unter Beteiligung der Carboxylgruppe des Aspartats statt.[74] Zusätzlich zu der möglichen Hydrolyse der Peptidbindung können die Aminosäuren Asparagin und Glutamin auch zu ihren jeweiligen Säuren, Asparaginsäure und Glutaminsäure, hydrolysiert (desaminiert) werden. Die Desaminierung dieser Aminosäuren ist jedoch stark pH-Wert abhängig, wobei die geringste Hydrolyserate bei einem pH-Wert von 6 gefunden wurde.[72] Unter stark sauren Bedingungen (pH < 3) kann die direkte Hydrolyse unter Abspaltung von Ammoniak stattfinden. Liegen diese Bedingungen nicht vor, entsteht zunächst ein cyclisches Zwischenprodukt mit einer Imid-Struktur, welche anschließend zu der entsprechenden Säure hydrolysiert wird. Das dabei entstehende Succinimid (5-Ring) ausgehend vom Asparagin ist deutlich stabiler als das entstehende Glutarimid (6-Ring) ausgehend vom Glutamin. Daher findet die Desaminierung sehr viel häufiger an Asparaginresten und weniger an Glutaminresten statt.[72] Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit zur Desaminierung von Asparagin von benachbarten Aminosäuren abhängig ist. Insbesondere auf Asparagin folgende Glycin, Serin, Threonin, Asparagin oder Asparaginsäure-Reste begünstigen die Desaminierung.[72],[73]

Eine weitere Ursache für Instabilität eines Proteins ist die Glykierung auch bekannt als Maillard-Reaktion. Bei der Maillard Reaktion reagieren reduzierende Zucker mit Amingruppen von Aminosäuren. Unter Ausbildung einer Schiff´schen Base und Amadori-Umlagerung kann es dabei zu deutlichen strukturellen Veränderungen des Proteins kommen. Interessant ist, dass Arzneimittel mit monoklonalen Antikörpern häufig Saccharose zugesetzt wird. Saccharose, ein Disaccharid bestehend aus Glucose und Fructose, hat selbst keine reduzierenden Eigenschaften. Bei niedrigem pH kommt es jedoch zur säurekatalysierten Hydrolyse von Saccharose und die reduzierenden Zucker Glucose und Fructose werden freigesetzt.[73]

Es ist anzumerken, dass physikalische und chemische Instabilitäten nicht einzeln betrachtet werden dürfen, sondern sich vielmehr gegenseitig beeinflussen. So ist beispielsweise erst nach einer Konformationsänderung (Denaturierung) ein bestimmter Aminosäurerest für Reaktionen zugänglich. Andererseits haben bereits kleine Änderungen der Primärstruktur (einzelne Aminosäuren sind ausreichend) großen Einfluss auf die Gesamtstruktur des Antikörpers.[72] Dies ist insbesondere für das Antibody Engineering relevant und wird dort auch gezielt genutzt, um stabilere Antikörper zu entwickeln.

5.4. Arzneimittelformulierung für monoklonale Antikörper

In den wenigsten Fällen besteht ein Arzneimittel nur aus einem Wirkstoff und einem Träger (z.B. Wasser). Meist müssen einem Arzneimittel zusätzlich Hilfsstoffe hinzugefügt werden, um den Wirkstoff zu stabilisieren, die Bioverfügbarkeit oder die Pharmakokinetik zu beeinflussen oder unerwünschte Eigenschaften des Wirkstoffs abzumildern (z.B. reizende Eigenschaften oder bei Oralia ein schlechter Geschmack). Im Gegensatz zu festen Zubereitungen (z.B. Tabletten), halbfesten Zubereitungen (z.B. Salben und Cremes) oder flüssigen Oralia ist die Zusammensetzung von Parenteralia oft weniger komplex. Einige parenterale Arzneimittel von small molecule Wirkstoffen bestehen tatsächlich nur aus einem Wirkstoff, Wasser und Natriumhydroxidlösung oder Salzsäure zum pH-Wert einstellen, so zum Beispiel das Präparat Lasix, welches Furosemid als Natriumsalz enthält.[75]

Monoklonale Antikörper können auf Grund ihrer Molekülgröße nur parenteral verabreicht werden. Nanobodies stellen dabei zwar eine Ausnahme dar (Säureresistenz und gute Gewebepermeabilität würden eine orale oder dermale Applikation theoretisch ermöglichen)[63], jedoch liegt auch bei der Entwicklung von Nanobodies aktuell der Fokus auf parenteralen Zubereitungen. Zunächst lassen sich zwei Zubereitungsformen von antikörperenthaltenden Arzneimitteln unterscheiden. Zum einen Arzneimittel in denen der monoklonale Antikörper als Lyophylisat (z.B. Trastuzumab im Präparat Kanjinti) und zum anderen in denen der Antikörper gelöst (z.B. Rituximab im Präparat Mabthera) vorliegt.

Generell lassen sich drei Gruppen von Hilfsstoffen definieren welche bei monoklonalen Antikörperpräparaten eingesetzt werden. Eine gute Übersicht zur genauen Zusammensetzung der aktuell im Handel befindlichen Antikörperpräparate ist in der Arbeit von Strickley und Lambert zu finden.[76]

1. Puffersysteme: Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, hat der pH Wert enormen Einfluss auf die Stabilität eines monoklonalen Antikörpers. Im Gegensatz zu den meisten small molecule Wirkstoffen haben Proteine zwar auch schwach puffernde Eigenschaften, jedoch reicht dieser oft nicht aus, um den pH-Wert konstant zu halten (beispielsweise nach Verdünnung). Daher müssen häufig Puffer eingesetzt werden. Die häufigste Puffersubstanz ist Histidin gefolgt von Phosphat und Citrat.[76] Für Histidin konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es direkt mit monoklonalen Antikörpern interagiert und die Stabilität positiv beeinflusst.[72]

2. Grenzflächenaktive Substanzen: Insbesondere physikalische Instabilitäten können durch partielle Adsorption an Oberflächen bzw. Grenzflächen hervorgerufen werden. Dies kann im einfachsten Fall das Primärpackmittel sein oder aber auch die Wasser-Luft-Grenzfläche (aufgrund der relativ höheren Hydrophobie von Luft im Vergleich zu Wasser).[72] Darüber hinaus können auch Interaktionen zwischen lipophilen Bereichen mehrerer Proteinmoleküle auftreten. Die Wahrscheinlichkeit von physikalischen Instabilitäten kann daher durch Zusatz von amphiphilen Substanzen wie z.B. Polysorbat 80 (seltener Polysorbat 20) deutlich verringert werden.[76]

3. Zucker und Polyole: Zum einen sind Zucker und Polyole (z.B. Sorbitol oder Mannitol) typische Hilfsstoffe bei der Lyophilisation von Proteinen. Zum anderen können diese Substanzen über Wasserstoffbrücken mit dem Protein interagieren und die Hydrathülle vergrößern, was zu einer Erhöhung der Stabilität des Proteins führt.[73],[77] Der häufigste verwendete Zucker ist Saccharose.

Weiterhin konnte für die Zugabe von Arginin stabilisierende Effekte auf monoklonale Antikörper nachgewiesen werden.[73] Die hier aufgeführten Hilfsstoffe beeinflussen zusammen mit der Trägerlösung (meist NaCl) auch die Viskosität, Ionenstärke und Osmolarität des Arzneimittels.

Neben der intravenösen Applikation von Antikörperpräparaten wurden in den letzten Jahren zunehmend auch Formulierungen entwickelt, welche subkutan verabreicht werden können. Die Bioverfügbarkeit von subkutan verabreichten monoklonalen Antikörpern ist jedoch deutlich geringer (50 - 80 %) und die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Serumkonzentration deutlich länger.[78],[79] Daher wird diesen Präparaten das Enzym Hyaluronidase zugesetzt. Hyaluronidase erhöht durch Abbau von Hyaluronan die Permeabilität des Gewebes und beschleunigt dadurch die Absorption und Verteilung des monoklonalen Antikörpers (hauptsächlich über das lymphatische System).

5.5. Pertuzumab (Perjeta)

Pertuzumab ist ein rekombinanter, humanisierter, monoklonaler IgG1$\varkappa$ Antikörper. Zunächst wurde Pertuzumab von Genentech bzw. Roche experimentell mit der Hybridomatechnologie unter dem Namen 2C4 entwickelt.[80] Später, als 2C4 als aussichtsreicher Kandidat für die Entwicklung eines Arzneimittels galt, wurde die Produktion auf die Herstellung in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters mittels rekombinanter DNA Technologie umgestellt und 2C4 in Pertuzumab umbenannt. Im Jahr 2012 wurde Pertuzumab schließlich unter dem Handelsnamen Perjeta von der FDA zugelassen. Perjeta ist indiziert zur Behandlung von HER-2 positiven Brustkrebs in Kombination mit Trastuzumab und Chemotherapie. Pertuzumab liegt in Perjeta als ein Infusionslösungskonzentrat vor.[81] Zusätzlich zu Pertuzumab sind in Perjeta Essigsäure, L-Histidin, Saccharose, Polysorbat 20 und Wasser für Injektionszwecke enthalten. Ein Fläschchen enthält 15 ml Lösung (14 ml + 1 ml Überfüllung). Für die Initialdosis mit 840 mg sollen 28 ml, für alle Folgedosen mit 420 mg 14 ml in einem 250 ml Kochsalzbeutel verdünnt und schließlich den Patienten über 30 Minuten bis 1 Stunde intravenös verabreicht werden. Die Dosierung von Pertuzumab erfolgt also in Fixdosen und damit unabhängig von Körpergewicht, -oberfläche oder Clearance. Ein Zyklus bestehend aus Perjeta + Trastuzumab + Chemotherapie (meist ein Anthrazyclin und/oder Taxan) soll im Abstand von 3 Wochen wiederholt werden.[81]

Für die applikationsfertigen Zubereitungen wurde die Stabilität für 24 h bei 30 °C nachgewiesen. Im Dezember 2021 wurden die Angaben zur Haltbarkeit in der Fachinformation von Roche mit der Information, dass auch die Stabilität der applikationsfertigen Zubereitung

bei einer lichtgeschützten Lagerung bei 2 - 8 °C über 30 Tage nachgewiesen wurde, ergänzt. Zur Lagerung des Infusionskonzentrats, welches nach der Herstellung einer Zubereitung gegebenenfalls noch in den Fläschchen enthalten ist (ca. 1 ml Überfüllung) macht Roche keine Angaben. Roche gibt letztendlich an, dass Perjeta zur einmaligen Anwendung vorgesehen ist, sodass potenzielle Restmengen entsorgt werden sollen.[81]

Der Wirkmechanismus von Pertuzumab beruht auf der Bindung an eine extrazelluläre Domäne des HER2 Rezeptors. Dadurch wird die Dimerisierung des HER2 Rezeptors mit sich selbst oder mit anderen HER Rezeptoren verhindert. Der HER2 Rezeptor ist einer von vier transmembranen Tyrosinkinase Rezeptoren der HER-Rezeptorfamilie. Dazu gehören EGFR (HER1), HER2, HER3 und HER4. Binden Liganden an die Rezeptoren EGFR, HER3 oder HER4 kommt es zur Konformationsänderung und die Rezeptoren sind zur Dimerisierung befähigt. Der HER2 Rezeptor ist hingegen dauerhaft zur Dimerisierung in der Lage und stellt den bevorzugten Dimerisierungspartner für die anderen HER-Rezeptoren dar.[82] Nach Dimerisierung wird die intrazellulär gebundene Thyrosinkinaseeinheit aktiv (HER3 besitzt keine katalytische Aktivität) und es werden verschiedene Signalwege, vor allem PI3k/Akt und MAPK aktiviert. Über diese Signalwege wird unter anderem das Zellwachstum, -migration, -differenzierung, -adhäsion und Apoptosefähigkeit reguliert.[82],[83] Kommt es zur Hemmung der Dimerisierung des HER2-Rezeptors wird auch die Signalaktivität reduziert und schließlich beispielsweise das Zellwachstum verlangsamt. Das HER-Signaling-Netzwerk ist jedoch deutlich komplexer als hier dargestellt und mit anderen Signalwegen eng verknüpft. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das HER-Signaling-Netzwerk stark kinetisch beeinflussbar ist (z.B. anhand der Stimulationsdauer mit Liganden).[84] Eine gute Übersicht zum HER-Signaling-Netzwerk liefert die Arbeit von Yarden und Sliwkowski.[82] Neben der pharmakodynamischen Wirkung als Dimerisierungsinhibitor ist Pertuzumab in der Lage Effektorzellen für die ADCC zu rekrutieren. In Kombination mit Trastuzumab, welches an eine andere extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors bindet als Pertuzumab, wird die Fähigkeit zur ADCC sogar weiter erhöht.[85],[86]

Für die Zulassung von Perjeta wurden zwei multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte, doppelt verblindete Phase III Studien (CLEOPATRA Studien-ID: WO20698, $n = 808$; APHINITY Studien-ID: BO25126, $n = 4804$) und mehreren Phase II Studien (Studien-ID: BO17929, WO20697, BO22280, WO29217) herangezogen, in denen die Überlegenheit der Therapie von Pertuzumab + Trastuzumab + Chemotherapie im Vergleich zu Placebo + Trastuzumab + Chemotherapie bei verschiedenen Formen von HER-2 positiven Brustkrebs gezeigt werden konnte.[81] Seit 2012 wurden und werden auch weitere klinische Studien unter anderem auch zur Behandlung anderer Krebsformen (z.B. Ösophaguskarzinom, HER2 positive solide Tumore (unspezifiziert), nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, Magenkarzinom) mit Pertuzumab durchgeführt.[87]

Pertuzumab kommt mittlerweile in einem weiteren Arzneimittel, welches von Genentech bzw. Roche entwickelt wurde vor. Dieses wurde unter dem Handelsnamen Phesgo im Jahr 2020 zugelassen und stellt ein Kombinationspräparat bestehend aus Trastuzumab und

Pertuzumab zur subkutanen Anwendung dar.[88]

5.6. Ambulante Chemotherapie

Perjeta und viele andere Chemotherapeutika werden in der Regel im Rahmen der ambulanten Chemotherapie angewendet. Die ambulante Chemotherapie wird meist in spezialisierten Praxen oder Ambulanzen, welche auch an ein Krankenhaus angegliedert sein können, durchgeführt. Nach Festlegung der Therapieform ((neo)adjuvante Chemotherapie oder Strahlentherapie + Chemotherapie) wird ein Therapieplan für die eigentliche Chemotherapie erstellt. Je nach Chemotherapieprotokoll sind dabei die Anzahl und Abstände an Zyklen über einen langen Zeitraum festgelegt (beispielsweise 6 Zyklen im Abstand von 3 Wochen). Vor jedem Zyklus wird die Therapie überprüft und wenn nötig angepasst. So kann es notwendig sein, das aktuelle Körpergewicht (die zur Bestimmung der Körperoberfläche notwendige Körpergröße sollte sich bei Erwachsenen in der Regel nicht mehr ändern) oder bestimmte Laborparameter (z.B. Kreatinin-Clearance) zu bestimmen, um die richtige Dosierung der Arzneimittel zu berechnen. Außerdem kann es vorkommen, dass der Gesundheitszustand einer Patient*in eine Chemotherapie zunächst nicht zulässt, sodass ein Zyklus verschoben werden muss.

Die Infusionslösungen werden meist nicht in den Praxen oder Ambulanzen selbst, sondern zentral in spezialisierten Apotheken (u.a. auch Krankenhaus- oder krankenhausversorgende Apotheken) hergestellt. In Abbildung 5.3 ist beispielhaft ein möglicher Ablauf der Belieferung von patientenindividuell hergestellten Chemotherapeutika dargestellt. Die Ambulanz fordert die Chemotherapie patientenindividuell für den Tag, an dem der Zyklus stattfinden soll in der herstellenden Apotheke an. Dort wird die Anforderung überprüft, eventuelle Unstimmigkeiten besprochen und schließlich hergestellt. Die Zubereitung (bspw. eine Infusion) wird anschließend auf die Ambulanz geliefert. Nach erneuter Kontrolle durch das medizinische Personal kann die Zubereitung der Patient*in verabreicht werden.

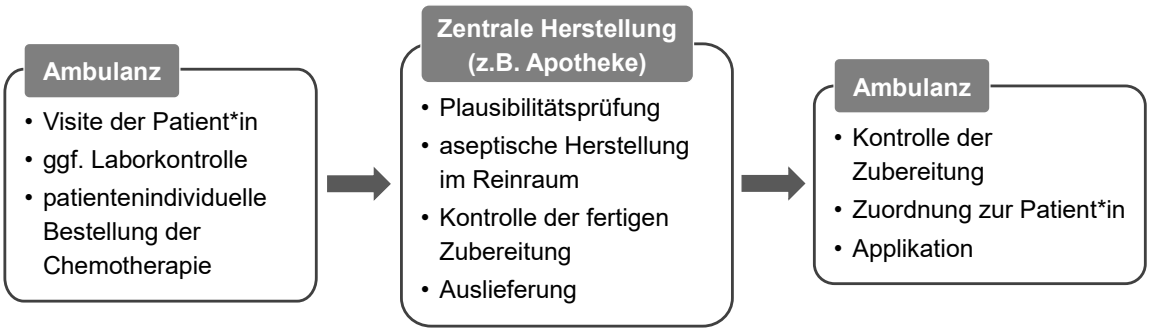


Abbildung 5.3.: Beispielhafter Ablauf der ambulanten Chemotherapiebelieferung bei zentralisierter Herstellung.

Dieser Prozess, mit Beginn der Anforderung in der herstellenden Apotheke bis zur erfolgten Auslieferung an die Ambulanz ist zeitintensiv, erfordert eine gute Organisation aller

beteiligten und stellt für die Patient*innen Wartezeiten dar. Daher gibt es Bestrebungen, möglichst viele Arzneimittel-Zubereitungen bereits im Voraus herzustellen und gegebenenfalls schon an die Ambulanz zu liefern. Für eine Vorproduktion sind jedoch einige Voraussetzungen notwendig. Zunächst muss das entsprechende Arzneimittel ausreichend stabil sein, sodass auch bei unbeabsichtigten Verzögerungen die Patient*in mit einem qualitativ hochwertigen Arzneimittel versorgt wird. Des Weiteren sollte sicher gestellt werden, dass die Chemotherapie tatsächlich wie geplant stattfinden kann. Dazu kann beispielsweise ein Tag vor der geplanten Applikation der Gesundheitszustand (bspw. ob ein akuter Infekt vorliegt) oder das aktuelle Körpergewicht der Patient*in telefonisch abgefragt werden. Generell sind häufig angewendete, günstige oder mit einer Fix-Konzentration dosierte Arzneimittel für eine Vorproduktion geeigneter, da bei einer kurzfristigen Therapieabsage die Zubereitung gegebenenfalls für andere Patient*innen benutzt werden kann oder bei einem notwendigen Verwurf vergleichsweise geringe Kosten entstehen.

6. Zielsetzung

Mit einer Inzidenz von 112,6 je 100.000 Frauen im Jahr 2018 in Deutschland stellte Brustkrebs mit großem Abstand die häufigste Krebsart bei Frauen dar.[89] Dabei ist der HER2-Rezeptor in 15 - 20 % der Brustkrebsfälle überexprimiert.[90] In der aktuellen „S3-Leitlinie Mammakarzinom“ wird Pertuzumab als Bestandteil verschiedener Therapieprotokolle zur Behandlung von HER2 positivem Brustkrebs empfohlen.[91] Pertuzumab gehört also mit Trastuzumab und verschiedenen Anthrazyklinen und Taxanen zu den häufig verwendeten Arzneimitteln in der Therapie des Mammakarzinoms. Obwohl seit 2021 Phesgo (Kombinationsarzneimittel aus Trastuzumab und Pertuzumab zur subkutanen Gabe) als weitere Therapieoption zur Verfügung steht, wird Perjeta bzw. die daraus hergestellten Infusionslösungen weiterhin angewendet.

Ziel dieser Arbeit war es, die Stabilität des Arzneimittels Perjeta unter verschiedenen Bedingungen über 42 Tage zu untersuchen. Bei der Planung zu dieser Stabilitätsstudie wurden von Roche keine über 24 h hinausgehenden Stabilitätsdaten zu den applikationsfertigen Infusionslösungen zur Verfügung gestellt. Auch nach Ergänzung der Stabilitätsdaten welche nun eine Kühlschranklagerung über 28 Tage unter Lichtschutz ermöglichen, gibt es einige Einschränkungen, welche für die herstellenden Apotheken nicht ideal sind. Zum einen ist eine zwingende lichtgeschützte Lagerung mit einem erhöhten Arbeitsaufwand verbunden. Zum anderen kann es vorkommen, dass die gekühlte Lagerung unterbrochen wird und pharmazeutisches Personal mit der Frage konfrontiert wird, inwieweit die Stabilität von Pertuzumab dadurch beeinflusst wird. Darüber hinaus stellt Perjeta ein relativ teures Arzneimittel dar. Es wäre daher vorteilhaft, die verbleibende Lösung in den Perjeta-Fläschchen zu lagern und für weitere Zubereitungen zu benutzen.

Daher sollte eine eigene Stabilitätsstudie durchgeführt werden, um folgende Fragen zu beantworten: Ist es möglich die applikationsfertigen Zubereitungen bei Raumtemperatur zu lagern? Ist ein Lichtschutz notwendig, um die Stabilität von Pertuzumab zu gewährleisten? Wird die Stabilität von Pertuzumab beeinflusst, wenn die Konzentrate nach einmaliger Öffnung und Entnahme der Lösung gelagert werden?

Eine bewiesene Stabilität von Pertuzumab unter diesen Bedingungen würde eine mögliche Vorproduktion von Zubereitungen von Perjeta erleichtern. Pflegekräfte und pharmazeutisches Personal hätten die Möglichkeit, Arbeitsabläufe bezüglich Bestellung, Herstellung und Belieferung von Perjeta-Zubereitungen zu optimieren, wodurch Zeit, Geld und Ressourcen eingespart werden könnten. Schließlich könnte so auch die Wartezeit der Patient*innen reduziert werden.

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Methodenentwicklung

Nach Bardin et al., Le Basle et al. und einer Leitlinie des National Health Service soll die Stabilität von monoklonalen Antikörpern mit einer umfangreichen Auswahl an orthogonalen Methoden untersucht werden.[5],[73],[92] Die verwendeten Methoden sollen sowohl die physikalische und chemische Stabilität als auch die biologische Aktivität des Antikörpers untersuchen, um so ein vollumfängliches Bild über die Integrität des Antikörpers abzubilden. Zunächst wurden daher verschiedene, vor allem durch die Verfügbarkeit bedingte Methoden ausgewählt, welche diese Anforderungen erfüllen. Neben methodisch eher einfachen und bereits etablierten Verfahren (visuelle Begutachtung, pH-Wertmessung, Turbidimetrie, Dynamische Lichtstreuung (DLS)), sollten in der Stabilitätsstudie auch die Derivativspektroskopie, Größenausschlusschromatographie (SEC), ein LC-MS/MS basiertes Peptide mapping und ein Reportergenassay zur Anwendung kommen. Diese komplexeren Methoden wurden vor der Durchführung der Stabilitätsstudie erfolgreich etabliert und validiert. In den folgenden Abschnitten wird auf die Entwicklung dieser Methoden detaillierter eingegangen.

7.1.1. Derivativspektroskopie

Da Proteine die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin enthalten, absorbieren sie ultraviolettes Licht im Bereich zwischen 250 nm und 300 nm.[93]. Diese Eigenschaft findet auch in der spektroskopischen Quantifizierung von Proteinen anhand der Absorption bei 280 nm Anwendung. In Abbildung 7.1 a sind beispielhaft drei Absorptionsspektren bei unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Absorption bei konzentrierteren Proteinlösungen zunimmt. Die Quantifizierung von Proteinen über die Absorption bei 280 nm hat jedoch einige Limitationen, sodass andere Methoden meist zu genaueren Ergebnissen führen.[94]

Die Absorption von ultraviolettem Licht von Proteinen ist jedoch nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Zusammensetzung und Struktur der Proteine abhängig. Dies führt dazu, dass jedes Protein Licht unterschiedlich stark absorbiert und sich verschiedene Extinktionskoeffizienten berechnen lassen. Darüber hinaus können auch strukturelle Änderungen innerhalb eines Proteins die Absorption von Licht beeinflussen. Kommt es zu Änderungen in der direkten Nachbarschaft (engl.: microenvironment) zu den aromatischen Aminosäuren, beispielsweise durch chemische Veränderungen der Aminosäuren oder durch Konformationsänderungen, so verändert sich auch das Absorptionsverhalten des Proteins.[93],[95] Werden mehrere Absorptionsspektren eines Proteins miteinander verglichen, beispielsweise die Spektren eines gestressten und eines ungestressten Proteins, so können Hinweise auf die Integrität des Proteins erhalten werden. Im Gegensatz zu Konzentrationsänderungen ist jedoch der Einfluss von Veränderungen der unmittelbaren Umgebung der

aromatischen Aminosäuren auf das Absorptionsverhalten sehr gering. Um diese kleinen Veränderungen dennoch auswerten zu können, kann das Absorptionsspektrum abgeleitet werden und man erhält ein Derivativspektrum der 1., 2., 3. oder 4. Ordnung. Zur Untersuchung der Integrität von Proteinen werden die Absorptionsspektren typischerweise in Derivativspektren der 2. Ordnung umgewandelt. Jedoch werden teilweise auch Derivativspektren höherer Ordnung herangezogen. Da das Signal-Rausch-Verhältnis aber mit höherer Ordnung sinkt, wird die 4. Ableitung als Maximum angesehen.[96] Die Derivativspektroskopie hat insbesondere mit der Zunahme der Digitalisierung von Analysemethoden an Bedeutung gewonnen. Einen Meilenstein stellte dabei der von Abraham Savitzky und Marcel J. E. Golay entwickelte und nach ihnen benannte mathematisch-digitale Filter dar.[97] Mit Hilfe des Savitzky-Golay-Filters war es möglich auf die aufwendige und vor allem gerätespezifische analoge Aufnahme von Derivativspektren zu verzichten und stattdessen Derivativspektren aus den aufgenommenen Spektren zu berechnen.[98]

Wie schon beschrieben absorbieren Proteine ultraviolettes Licht konzentrationsabhängig. Die daraus resultierenden Unterschiede zeigen sich auch im Derivativspektrum, wie es in Abbildung 7.1 b zu sehen ist. Damit strukturelle Änderungen des Proteins im Derivativspektrum nicht durch den stärkeren Einfluss der Konzentration auf das Absorptionsverhalten überlagert werden, wurden die Derivativspektren in dieser Arbeit über die Absorption bei 280 nm normalisiert. Damit war es möglich den Einfluss der Konzentration auszuschließen und Änderungen im Derivativspektrum ausschließlich auf strukturelle Änderungen des Proteins zurückzuführen. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 7.1 dargestellt. Die drei untersuchten Proben unterscheiden sich nur in der Konzentration an Pertuzumab. Dies zeigt sich auch an deutlichen Unterschieden in den Spektren. Durch Normalisierung wurde der Einfluss der Konzentration herausgerechnet, sodass drei nahezu identische Derivativspektren resultieren (siehe Abbildung 7.1 c).

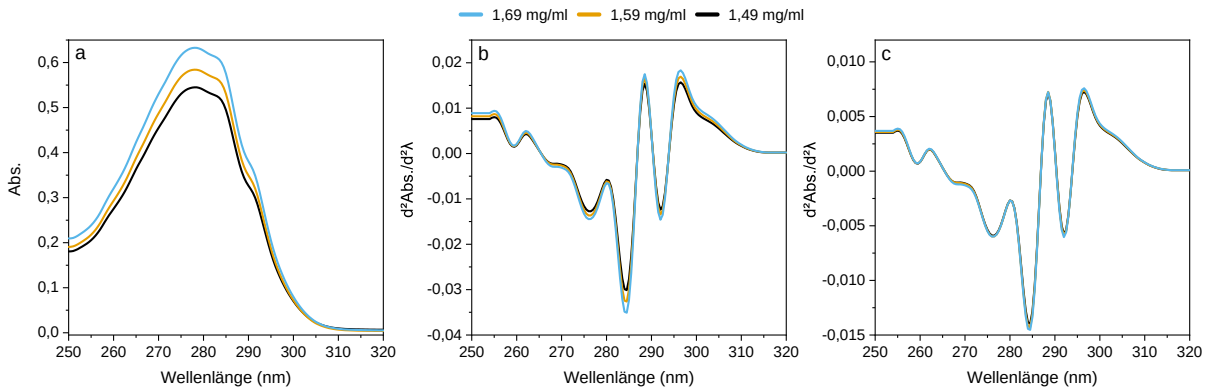


Abbildung 7.1.: UV-Spektren einer Lösung von Perjeta in unterschiedlichen Konzentrationen. a: Absorptionsspektrum (0. Ordnung). b: Derivativspektrum 2. Ordnung. c: Derivativspektrum 2. Ordnung, normalisiert über die Absorption bei 280 nm.

Die Derivativspektroskopie wurde in einem Stresstest (engl.: forced-degradation-study) va-

lidiert. Dabei wurde die 1,59 mg/ml konzentrierte Pertuzumab-Lösung mit Salzsäure (finaler pH 3.5), Natronlauge (finaler pH 10) und Wasserstoffperoxid (finale Konzentration 0,01 % und 0,05 %) versetzt und zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen (4 °C und 37 °C) gelagert. Es zeigten sich je nach Bedingung deutliche Veränderungen im Derivativspektrum der 2. Ordnung. Die Ergebnisse dieses Stresstests können in Jirschitzka et al.[99] in Abschnitt 7.2 gefunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Derivativspektroskopie geeignet ist, um mögliche chemische oder strukturelle Veränderungen in Pertuzumab zu detektieren. Auch vor dem Hintergrund der einfachen Durchführung dieser Methode, wurde die Derivativspektroskopie schließlich in die Methodenauswahl der Stabilitätsstudie aufgenommen.

7.1.2. SEC

Bei der Größenausschlusschromatographie (Synonym: Ausschlusschromatographie (Ph.Eur. 10 2.2.30), [47, S. 68] Gelpermeationschromatographie, GPC, SEC) werden die Moleküle allein aufgrund ihres hydrodynamischen Durchmessers getrennt. Dabei erfolgt im Gegensatz zur Normal- oder Umkehrphasenchromatographie keine Interaktion zwischen den Analyten und der stationären Phase. Die Stationäre Phase ist meist ein sehr poröses Harz, welches Hohlräume unterschiedlicher Größe innerhalb der Trennsäule ausbildet. Kleinere Proteine können in diese Hohlräume eindringen und legen somit einen längeren Weg durch die Säule zurück als größere Moleküle. Demzufolge eluieren größere Moleküle bei der SEC zuerst und kleinere Moleküle zuletzt.

Die Größenausschlusschromatographie erlaubt zum einen eine Quantifizierung von Proteinen und zum anderen eine Detektion von Aggregaten und Fragmenten. Damit stellt die SEC eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung von Proteinen im Rahmen von Stabilitätsstudien dar.[5],[73] Es wurde eine von Kwong Glover et al. bereits beschriebene SEC-Methode für Pertuzumab modifiziert und erfolgreich etabliert.[100] In Abbildung 7.2 sind repräsentative SEC-Chromatogramme einer Lösung von Perjeta und der in Perjeta enthaltenen Hilfsstoffe Histidin und Polysorbat 20 dargestellt.

Im Chromatogramm der Perjeta-Lösung sind zwei Peaks zu erkennen, wobei der erste Peak mit einer Retentionszeit von 6.7 Minuten dem Pertuzumab-Monomer entspricht. Der zweite Peak konnte durch Vermessung einer Histidin und einer Polysorbat 20 Lösung diesen beiden Hilfsstoffen zugeordnet werden. Nach Variation zahlreicher Methodenparameter (pH 5,5 - 6,8, Pufferzusammensetzung, Laufrate und Temperatur des Säulenofens), wurde die finale SEC-Methode nach ICH-Guideline validiert.[101] Der Symmetriefaktor (A_s) des Pertuzumab-Peaks beträgt 1,41 und liegt damit innerhalb der Quantifizierungsvorgaben des Ph. Eur. 10 2.2.46 ($0{,}8 < A_s > 1{,}5$).[47, S. 116] Schließlich konnte Pertuzumab mit ausreichender Präzision und einer Konzentration von 0,12 - 1,92 mg/ml quantifiziert werden. Die Vollständigen Ergebnisse der Validierung sind im Anhang der Publikation Jirschitzka et al.[99] in Abschnitt 7.2 dargestellt.

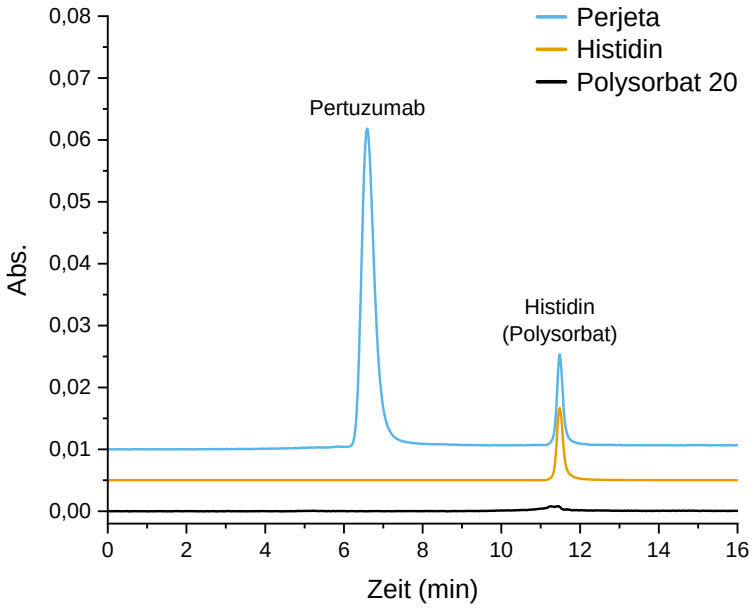


Abbildung 7.2.: Repräsentative SEC-Chromatogramme einer Lösung von Perjeta (blau), Histidin (orange) und Polysorbat 20 (schwarz).

7.1.3. Peptide mapping

Das Peptide mapping ist eine Methode zur Identifikation von Proteinen und wird häufig im Rahmen von Proteomik-Studien eingesetzt.[102]–[104] Dabei wird das Protein oder auch ein Proteingemisch, nach entsprechender Vorbehandlung (Denaturierung, Reduktion und Alkylierung der SH-Brücken) enzymatisch oder chemisch verdaut. Die so gewonnenen Peptide werden chromatographisch oder elektrophoretisch aufgetrennt und es resultiert ein komplexes, individuelles Peptidmuster (engl.: peptide fingerprint). Um die Identität der gewonnenen Peptide zu bestimmen, können diese entweder direkt (z.B. MALDI-MS) oder nach Kopplung massenspektroskopisch analysiert werden. Das damit erzeugte Peptidmassenmuster (engl.: peptide mass fingerprint) ist für ein bestimmtes Protein sehr spezifisch und kann zur Identifikation des Proteins durch Abgleich mit Datenbanken herangezogen werden. Durch Detektion von selektiven Markerpeptiden lassen sich einzelne Proteine so auch in Mischungen identifizieren und quantifizieren.[103]

Da ein Peptide mapping immer mit dem Verdau eines Proteins verbunden ist, ist es möglich, die Primärstruktur eines Proteins zu untersuchen. Daher ist das Peptide mapping sehr gut zur Untersuchung der chemischen Stabilität von Proteinen geeignet. Werden im Rahmen von Stabilitätsstudien oder auch innerhalb der Qualitätskontrolle mehrere Peptid(massen)muster des gleichen Proteins miteinander verglichen, so zeigen sich Instabilitäten aufgrund chemischer Veränderungen im Protein anhand einer verminderten oder verstärkten Generierung eines Peptids oder durch das Auftauchen eines neuen Peptids in Form eines neuen Peaks im Chromatogramm.[104]–[107]

Peptide mapping via HPLC-UV

Zunächst wurde eine Peptide mapping Methode nach Tokhadze et al. an einer HPLC mit UV Detektion durchgeführt und schrittweise optimiert.[108] Abbildung 7.3 zeigt die wichtigsten Ergebnisse der ersten Peptide mapping Experimente.

Zunächst ist ein sehr präsenter Peak im Chromatogramm mit einer Retentionszeit von 0,38 min zu erkennen (Abbildung 7.3 a). Dieser Peak konnte durch Vergleichsmessungen dem teilweise noch unverdauten Pertuzumab und dem zugesetzten Trypsin zugeordnet werden. Erst nach Vergrößerung des Chromatogramms ist das eigentliche Peptidmuster von

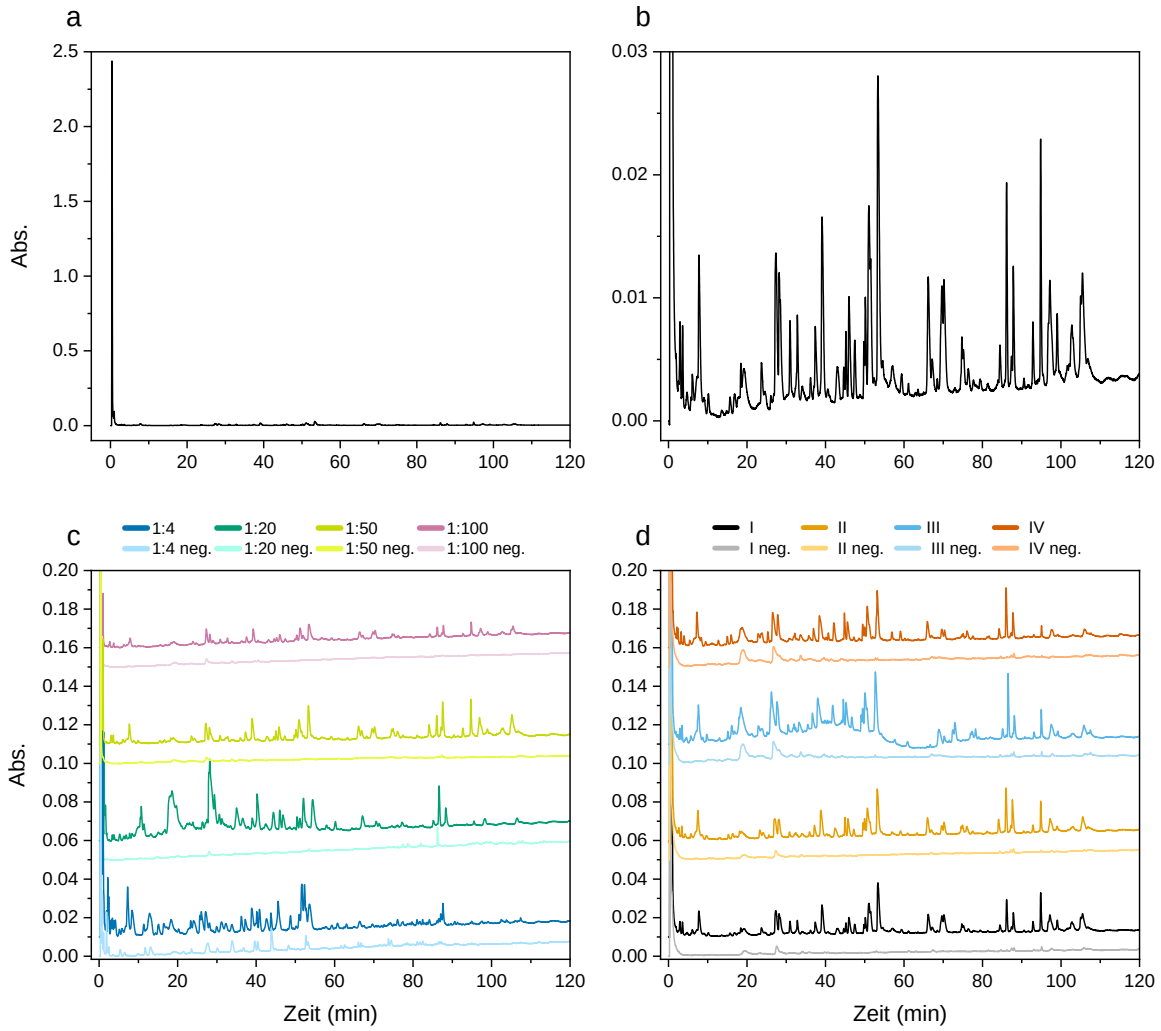


Abbildung 7.3.: Ergebnisse der ersten HPLC-UV-basierten Peptide mapping Experimente. a: repräsentatives Chromatogramm des Peptide mappings von Pertuzumab. b: vergrößertes repräsentatives Chromatogramm des Peptide mappings von Pertuzumab. c: verschiedene Trypsin:Protein Verhältnisse, inklusive Negativkontrollen mit Trypsin jedoch ohne Pertuzumab (neg.) d: Chromatogramme von an verschiedenen Tagen (I, II, III, IV) aufgearbeiteten und vermessenen Proben und Negativkontrollen (I neg., II neg., III neg., IV neg.) mit identischer Vorgehensweise jedoch ohne Zugabe von Pertuzumab.

Pertuzumab erkennbar (Abbildung 7.3 b). Ein wichtiger Parameter eines Peptide mapping Protokolls ist das Verhältnis des Verdaureagenz (hier Trypsin) zum Protein. Da das optimale Verhältnis für jedes Protein und Verdaureagenz individuell ist, sollte dies bei der Entwicklung eines Peptide mappings untersucht werden.[109] Bei den Optimierungsexperimenten wurden daher vier Trypsin-zu-Protein-Verhältnisse (T:P) untersucht (Abbildung 7.3 c). Ein optimales Trypsin-zu-Protein Verhältnis ist gegeben, wenn bei einer zur Detektion ausreichenden Peptidmenge möglichst keine, durch den Eigenverdau von Trypsin bedingten Artefakte vorhanden sind. In der Literatur sind Trypsin-zu-Protein Verhältnisse von 1:1 bis 1:100 (m/m) beschrieben.[109]–[111] Potentiell auftretende Artefakte konnten über die Auswertung von Kontrollproben, bei denen eine äquivalente Menge Trypsin jedoch ohne Pertuzumab den ansonsten identisch behandelten Proben hinzugegeben wurde, identifiziert werden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Eigenverdau in Lösungen, in denen außer Trypsin kein weiteres Protein vorliegt, zwangsläufig größer ist und daher das Auftreten von Artefakten in den Negativkontrollen nicht direkt quantitativ mit den tatsächlichen Proben gleichzusetzen ist. In Abbildung 7.3 c ist zu erkennen, dass ein T:P von 1:4 sehr viele Artefakte (Peptid-Peaks in der Negativkontrolle) produziert und somit ungeeignet ist. Bei geringeren Trypsinmengen (T:P von 1:20, 1:50 und 1:100) nimmt die Anzahl an Artefakten ab. Jedoch sinkt dabei auch die absolute Peptidmenge von Pertuzumab, was zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Ein T:P von 1:20 schien daher ein guter Kompromiss zwischen einem guten Signal-Rausch-Verhältnis und kaum auftretenden Artefakten zu sein und wurde schließlich für alle weiteren Peptide mapping Experimente verwendet. Neben verschiedenen T:P wurden auch unterschiedliche Inkubationszeiten (1 h, 2 h, 16 h) und Verfahren zum Stoppen des tryptischen Verdaus (Kühlen, pH-Absenkung, DTT-Zugabe) untersucht. Hier zeigten sich aber schnell die Grenzen der HPLC-Methode. Aufgrund der notwendigen langen Gradientenelution von 120 Minuten und zusätzlicher Re-Equilibrierzeit kam es zu häufigen chromatographischen Artefakten (siehe beispielhaft Chromatogramm III in Abbildung 7.3 d). Insbesondere die spät eluierenden und damit eher lipophileren Peptide konnten häufig nicht ausreichend reproduzierbar detektiert werden (7.3 d). Daher wurde schließlich eine LC-MS/MS basierte Methode entwickelt und zur Analyse der Peptide herangezogen.

Peptide mapping via LC-MS/MS

Zum Verdaustopp und auch als Ionenpaar-Reagenz für die chromatographische Auftrennung wurde im ursprünglichen Protokoll Trifluoressigsäure (TFA) verwendet. Für die Massenspektroskopie ist TFA jedoch ungeeignet, da es nur schwer aus dem MS-System entfernbar ist. Daher wurde TFA gegen Ameisensäure (FA) getauscht. Dies führte jedoch zu einem deutlichen Auflösungsverlust bei der Vermessung der Proben an der HPLC-UV. Da eine deutlich höhere Sensitivität an der LC-MS/MS zu erwarten war und schließlich erste LC-MS/MS Experimente eine ausreichende Sensitivität aufwiesen, wurde FA anstatt TFA als Fließmittelzusatz und zum Verdaustopp verwendet.

Des Weiteren wurden die aufgearbeiteten und verdauten Proben für die ersten LC-MS/MS Messungen mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Ziel war es, den Anteil an intaktem Protein (im Chromatogramm von 0 - 3 Minuten, siehe Abbildung 7.3 a) auf ein Minimum zu reduzieren. Anhand von ausgewählten Peakflächen-Verhältnissen zwischen aufgereinigten und nicht-aufgereinigten Proben konnte gezeigt werden, dass die Menge an intaktem Protein durch Festphasenextraktion auf etwa 5 % reduziert wird. Leider konnten aber die Peptide nach Festphasenextraktion nicht vollständig extrahiert werden, sodass lediglich 20 - 40 % des Peakflächenanteils später eluierender Peptide wiedergefunden werden konnten. Der durch Festphasenextraktion bedingte Peptidverlust führte schließlich dazu, dass die Festphasenextraktion nur für die Methodenentwicklung des LC-MS/MS basierten Peptide mappings und nicht für die finalen Validierungs- und Stabilitätsexperimente herangezogen wurde.

In Kooperation mit dem Arbeitskreis Schade und insbesondere durch Dr. Daniel Längle konnte schließlich eine LC-MS/MS basierte Methode im Multiple-Reaction-Monitoring Modus etabliert werden, welche es erlaubte, 54 Peptide und damit eine Sequenzabdeckung von 100 % der leichten Kette und 79,5 % der schweren Kette von Pertuzumab zu quantifizieren. Das finale LC-MS/MS basierte Peptide mapping wurde schließlich im Rahmen einer forced-degradation-study validiert. Es zeigte sich, dass es mit dem entwickelten Protokoll möglich ist, Veränderungen und Instabilitäten von Pertuzumab zu erkennen. Die Ergebnisse der forced-degradation-study sind in der Publikation Jirschitzka et al.[99] in Abschnitt 7.2 aufgeführt.

7.1.4. Entwicklung eines Reportergenassays

Stabilitätsstudien von monoklonalen Antikörpern sollen durch biologische Assays, entweder biochemische Assays (z.B. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) oder Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (engl.: surface plasmon resonance (SPR)) oder zellbasierte Assays ergänzt werden.[5] Insbesondere mit funktionellen biologischen Assays kann die Wirkung eines Antikörpers simuliert werden. Daher können mit biologischen Assays im Gegensatz zu physikochemischen Stabilitätsuntersuchungen auch Aussagen zur Wirksamkeit getroffen werden und schließlich alle Kriterien der pharmazeutischen Trias (Qualität, Wirksamkeit, Unbedenklichkeit) angesprochen werden. Auf der anderen Seite sollte die Aussagekraft von biologischen Assays nicht überbewertet, sondern immer gemeinsam mit den anderen Methoden der Stabilitätsstudie interpretiert werden.[5] Dies liegt zum einen daran, dass meist nur ein pharmakodynamischer Aspekt des Antikörpers in vitro untersucht wird. So sind die meisten monoklonalen Antikörper neben den spezifischen Effekten am Zielort (beispielsweise Inhibition eines Rezeptors) in der Lage zur ADCC.[54] Aufgrund des enormen methodischen Aufwands und letztendlich auch geringen Vergleichbarkeit von Assays zur Untersuchung der ADCC von in vitro zu in vivo, werden ADCC-Experimente nur selten im Rahmen von Stabilitätsstudien durchgeführt. Ein weiterer Nachteil biologischer Assays ist die im Vergleich zu instrumentell-analytischen Verfahren geringere Reproduzierbarkeit. Daher wird in der Leitlinie des National Health Service ein pragmatischer Umgang bezüglich der

Vergleichbarkeit von biologischen Assays empfohlen.[92]

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität von Pertuzumab kamen zunächst mehrere mögliche Assays in Frage. ELISA und SPR -Experimente wurden ausgeschlossen, da neben der reinen Bindungsaffinität ein Assay entwickelt werden sollte, welcher in der Lage ist, die Aktivität von Pertuzumab funktionell und damit realistischer abzubilden. Daher sollte ein zellbasierter Assay verwendet werden. Viabilitäts- und Proliferationsassays wurden jedoch als ungeeignet angesehen, da mit diesen Assays für Pertuzumab nur mäßige Effekte gezeigt werden konnten.[112]–[114] Pertuzumab ist ein Dimerisierungsinhibitor, daher lag die Verwendung eines Förster resonance energy transfer (FRET)-Assays nahe. Waterhouse et al. und Gaborit et al. haben bereits FRET-Assays zur Untersuchung der Dimerisierung des EGFR mit dem HER-2-Rezeptor beschrieben.[115],[116] Jedoch zeigte Pertuzumab in diesen FRET-FLIM-[115] und TR-FRET-Assays[116] zwar einen signifikanten aber dennoch nur mäßigen Effekt. Vor dem Hintergrund einen Assay mit möglichst hoher Sensitivität zu entwickeln, sollte schließlich ein Reportergenassay zur Aktivitätsuntersuchung von Pertuzumab entwickelt werden.

Cen et al. beschreibt einen Reportergenassay, zur Untersuchung der Expression des immediate-early-genes *c-fos*.[117] Für *c-fos* wurde gezeigt, dass die Expression unter anderem durch Stimulation des HER-Netzwerks (EGF oder HRG) vor allem über den MAPK-Signalweg aktiviert wird.[84],[118],[119] Der Luciferase-Vektor von Cen et al. enthält die Sequenz für die Fireflyluciferase reguliert durch den c-fos Promoter.[117] Werden Zellen mit diesem Vektor transfeziert, so kann die Luciferaseaktivität mit der Signalaktivität des HER-Netzwerks korreliert werden. Eine gesteigerte Luciferaseaktivität bedeutet also theoretisch eine erhöhte Signalaktivität des HER-Netzwerks. Aufgrund dieser Überlegung wurde schließlich der von Cen et al. beschriebene Luciferase-Vektor für die Entwicklung des Reportergenassays für Pertuzumab genutzt.

Auswahl der Zellen

Es gibt eine Vielzahl an Brustkrebs-Zelllinien, welche für in-vitro Untersuchungen herangezogen werden. Dai et al. teilt sie je nach Genexpression in die Gruppen Luminal A, Luminal B, HER2-positiv und Tripel-negativ ein.[120] In dieser Arbeit wurden zwei Brustkrebs-Zelllinien für die Entwicklung des Reportergenassays benutzt. Zum einen wurden HER2-positive SKBR-3 Zellen und zum anderen MCF-7 Zellen (Luminal A: Estrogen-Rezeptor-positiv, Progesteron-Rezeptor-positiv, HER2-negativ), welche nur eine basale HER2-Expression zeigen, verwendet. Mikroskopische Aufnahmen der beiden Zelllinien sind in Abbildung 7.4 dargestellt.

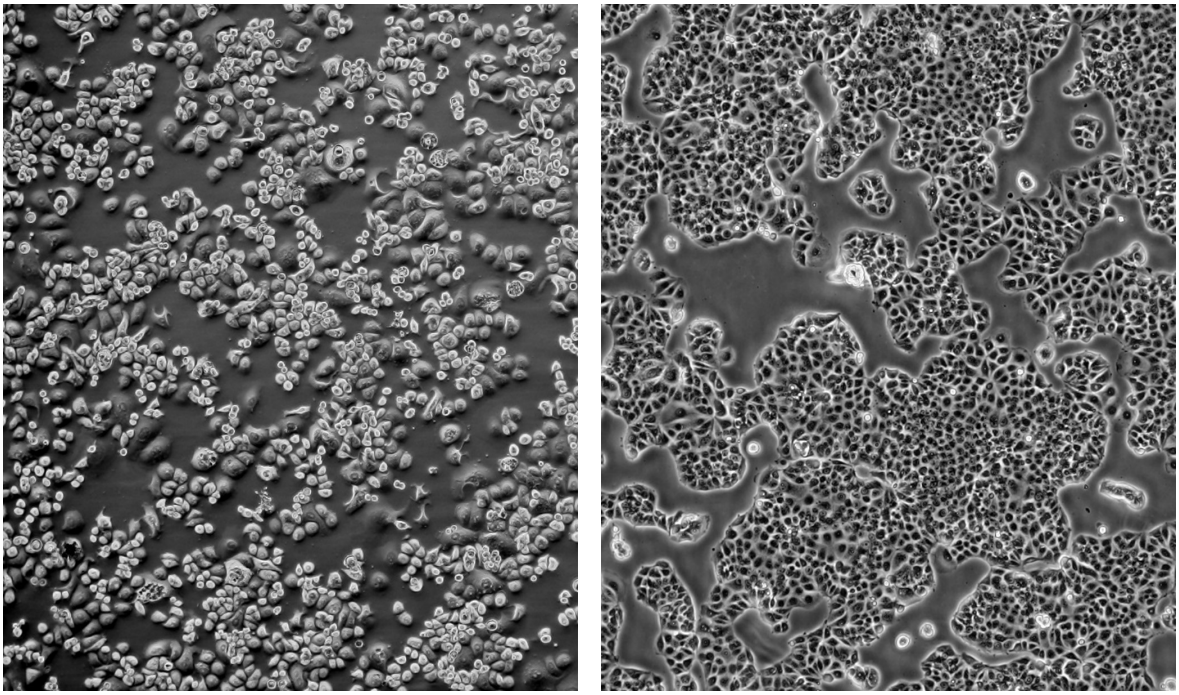


Abbildung 7.4.: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten SKBR-3 Zellen (links) und MCF-7 Zellen (rechts).

Transfektionsstudien

Zunächst wurden Transfektionsstudien mit Polyethylenimin (PEI) durchgeführt. PEI ist ein kationisches Polymer mit dem bereits SKBR-3 und MCF-7 Zellen erfolgreich transfeziert wurden.[121] Im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien stellt PEI eine extrem günstige Alternative dar. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zelltoxizität zu erhalten, wurden verschiedene Parameter variiert, um optimale Transfektionsbedingungen herauszufinden. Insbesondere wurden verschiedene Inkubationszeiten, DNA-Mengen und PEI:DNA Verhältnisse getestet. Tabelle 7.1 zeigt die optimierten Parameter der Transfektionsstudien mit PEI.

Tabelle 7.1.: Optimierte Bedingungen der transienten Transfektion mit PEI

	SKBR-3	MCF-7
DNA Menge / 60.000 Zellen	1000 ng	500 ng
DNA:PEI	1:5	1:8
Inkubationslösung	ohne FBS	
Inkubationszeit DNA:PEI	30 min	
Inkubation Transfektion	4 h	
Transfektionseffizienz	10 %	30 %

Des Weiteren sind in Abbildung 7.5 repräsentative mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach transienter Transfektion mit PEI, Hoechst-Färbung und Fixierung

mit Paraformaldehyd (PFA) dargestellt.

Zunächst fällt auf, dass bei der Transfektion mit PEI sehr große DNA Mengen notwendig sind, um eine maximale Transfektionseffizienz zu erreichen. Dabei konnte die Transfektionseffizienz jedoch bei den SKBR-3 Zellen nicht auf mehr als 10 % gesteigert werden, was für den Reportergenassay als zu gering erschien. Im Vergleich dazu konnten MCF-7 Zellen mit PEI zu 30 % transfeziert werden, was als ausreichend angesehen wurde. Interessanterweise waren nach der Transfektion mit PEI auf dem Boden der Zellkulturflaschen viele Partikel zu sehen, welche nach Hoechst-Färbung und Fluoreszenzanregung blau fluoreszierten. Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass es sich dabei um eine Kontamination handelte, musste es sich um PEI-DNA-Komplexe handeln. Dieses Phänomen zeigt auch, dass die DNA-PEI-Komplexe in einem großen Überschuss vorliegen und tatsächlich nur ein geringer Anteil in die Zellen gelangt. Die MCF-7 Zellen und insbesondere die SKBR-3 Zellen zeigten nach der Inkubation mit PEI häufig zelltoxische Merkmale. PEI selbst weist eine gewisse Zelltoxizität auf, welche noch durch den Umstand begünstigt wird, dass die Transfektion mit PEI nur in Abwesenheit von FBS möglich ist.

Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz und der starken Zelltoxizität wurde schließlich Lipofectamin 2000 als Transfektionsreagenz für die SKBR-3 Zellen benutzt. Mit Lipofectamin 2000 konnte eine Transfektionseffizienz von 25 % für die SKBR-3 Zellen erreicht werden. Da die Transfektion mit Lipofectamin 2000 nicht durch Serum inhibiert wird, konnte die Transfektion in Anwesenheit von fetalem Kälberserum (FBS) durchgeführt werden, was insbesondere die Viabilität der Zellen positiv beeinflusste. In Abbildung 7.6 sind beispielhaft mikroskopische Aufnahmen von SKBR-3 Zellen nach Transfektion mit Lipofectamin 2000 dargestellt.

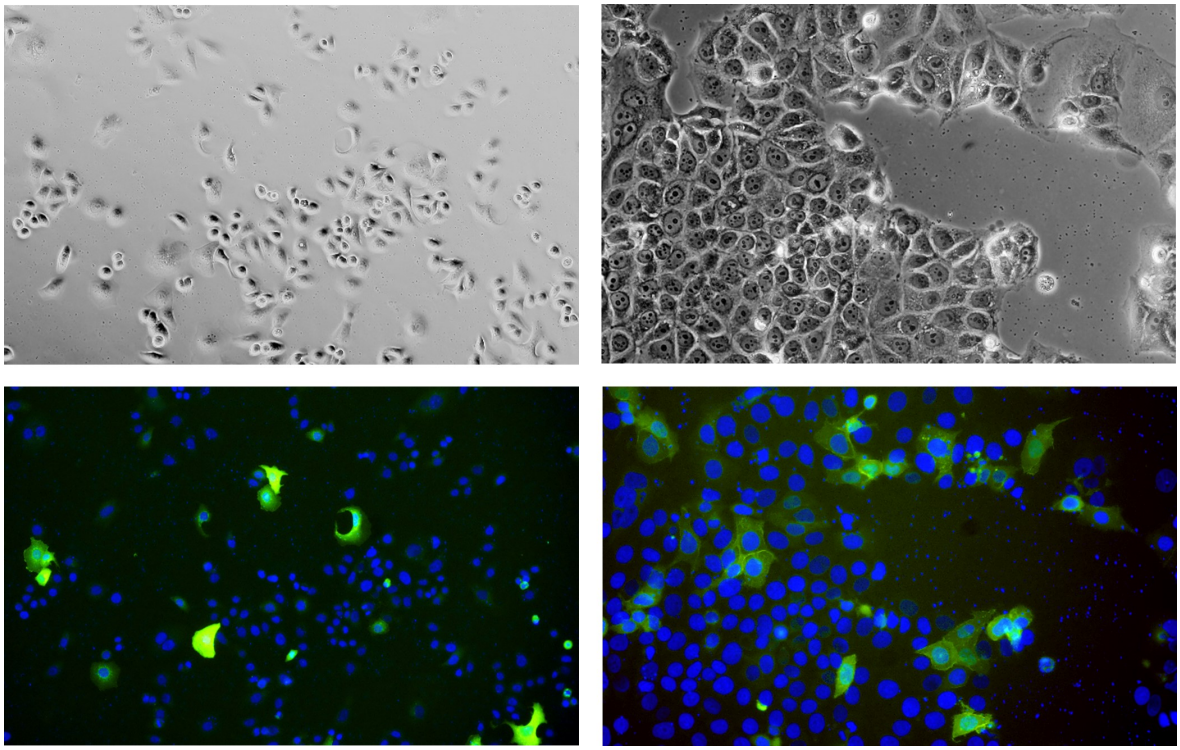


Abbildung 7.5.: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten SKBR-3 Zellen (links) und MCF-7 Zellen (rechts) nach Transfektion mit PEI, Hoechst-Färbung und Fixierung. Oben: Phasenkontrastaufnahmen. Unten: Überlagerte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. DNA und damit insbesondere die Zellkerne zeigen blaue Fluoreszenz, erfolgreich transfezierte Zellen zeigen grüne Fluoreszenz

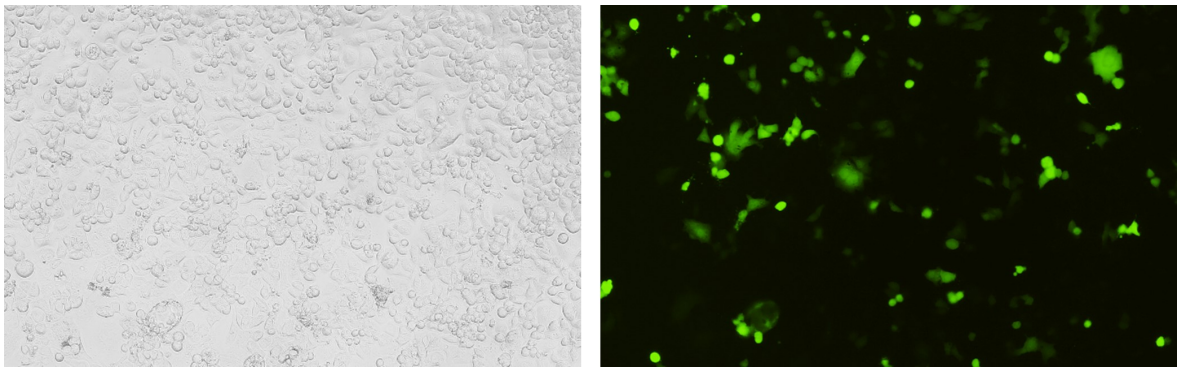


Abbildung 7.6.: Mikroskopische Aufnahmen von SKBR-3 Zellen nach Transfektion mit Lipofectamin 2000 (ohne Hoechst-Färbung und Fixierung). Links: Phasenkontrastaufnahme. Rechts: Aufnahme nach Fluoreszenzanregung.

Optimierungsexperimente

Die Abbildungen 7.7 - 7.12 stellen die wichtigsten Ergebnisse der Optimierungsexperimente des Reportergenassays dar. Da die Methodik der einzelnen Assays variiert, sind die Ergebnisse für jeden Assay einzeln als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei technischen Replikaten dargestellt.

Die ersten Experimente zur Entwicklung und Etablierung des Reportergenassays wurden mit SKBR-3 Zellen und dem Transfektionsreagenz PEI durchgeführt. Da wie zuvor beschrieben, die Transfektionseffizienz und die Reproduzierbarkeit aufgrund der Toxizität von PEI auf SKBR-3 Zellen gering war, wurden zunächst weitere Experimente mit MCF-7 Zellen durchgeführt. Außerdem wurden für die ersten Experimente zusätzlich zum experimentellen Vektor, welcher die durch den *c-fos*-Promotor kontrollierte Firefly-Luciferase enthält, ein Kontrollvektor mit einer codierten Renilla-Luciferase (unter Kontrolle des HSV-TK Promotor) verwendetet. In Reportergenassays werden häufig mehrere Luciferasen eingesetzt, wobei die Aktivität der einen Luciferase über die Aktivität der anderen Luciferase normalisiert wird. Die Normalisierung dient dazu, Schwankungen der Transfektionseffizienz und der Zellzahl zwischen einzelnen Replikaten auszugleichen. Es zeigte sich jedoch, dass eine Normalisierung der durch Stimulation mit epidermal growth factor (EGF) hervorgerufenen Firefly-Aktivität über die Renilla-Aktivität als Kontrollreporter ungeeignet ist, da die Stimulation auch die Expression der Renilla-Luciferase beeinflusste. Vor dem Hintergrund, dass die Transfektionen letztlich im batch-Verfahren durchgeführt wurden und somit Schwankungen der Transfektionseffizienz innerhalb eines Assays ausgeschlossen werden konnten, wurde schließlich auf eine Normalisierung über einen Kontrollvektor verzichtet.

Nakakuki et al. konnte zeigen, dass die *c-fos* mRNA Expression bzw. die *c-fos* Proteinexpression bereits nach einer Stimulationsdauer von 30 min bzw. 60 min mit EGF oder Heregulin-α (HRG) maximal ist und bei längerer Stimulationdauer wieder abnimmt.[84] In dem hier vorgestellten Reportergenassay war eine weitere Steigerung der Luciferaseaktivität nach 4 - 6 h Inkubation mit 100 ng/ml EGF maximal (siehe Abbildung 7.7). Um potentiell für EGF/HER2 unspezifische, bei längerer Inkubation wahrscheinlichere Signalaktivitäten zu vermeiden, wurde eine Stimulationsdauer von 4 h als geeignet angesehen.

Abbildung 7.8 zeigt die Luciferaseexpression (reguliert über den *c-fos*-Promoter) nach Zugabe von EGF in verschiedenen Konzentrationen. Es fällt auf, dass die Luciferasexpression bei der Zugabe von 100 ng/ml EGF nicht weiter gesteigert werden kann. Eine EGF-Konzentration von 100 ng/ml wurde auch in den von Waterhouse et al., Gaborit et al. und Jimeno et al. beschriebenen Assays zur Stimulation verschiedener Zellen genutzt.[115],[116],[119] Daher wurde für alle weiteren Experimente ebenfalls eine EGF-Konzentration von 100 ng/ml verwendet. Des Weiteren fällt in Abbildung 7.8 der deutlich kleinere dynamische Bereich des Assays mit MCF-7 Zellen im Vergleich zum Assay mit SKBR-3 Zellen auf. Dies ist auf die unterschiedliche Rezeptorexpression der beiden Zelllinien zurückzuführen. SKBR-3 Zellen exprimieren große Mengen HER2-Rezeptoren wohingegen MCF-7 Zellen nur eine

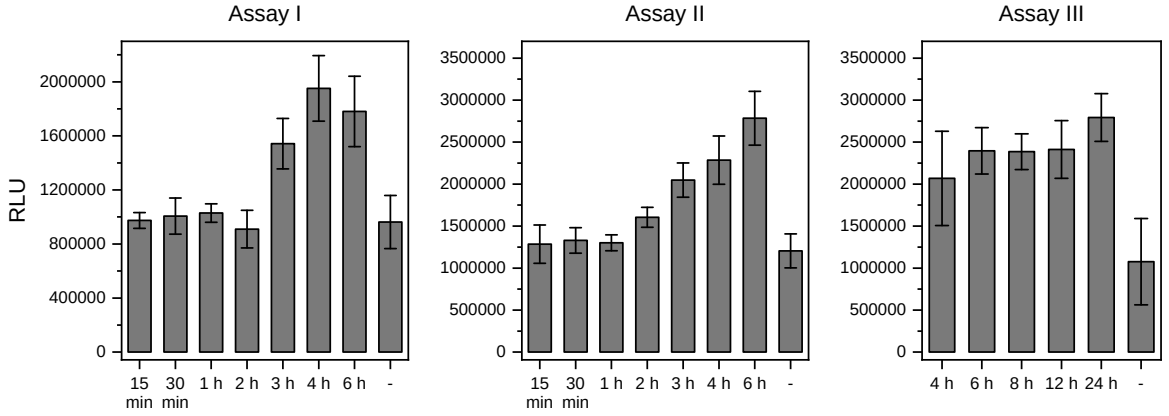


Abbildung 7.7.: Ergebnisse des Reportergenassays nach der Stimulation von MCF-7 Zellen mit 100 ng/ml EGF in unterschiedlichen Inkubationszeiten. Auf der y-Achse ist die Firefly-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt. **-** : keine Zugabe von EGF. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (Assay I - III), jeweils als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei technischen Replikaten (n = 1). Verwendet wurde die Methode Md.RGA.2 (Abschnitt 11.10.4).

basale Menge HER2-Rezeptoren exprimieren. Da jedoch die MCF-7 Zellen im Gegensatz zu SKBR-3 Zellen sehr gut mit PEI transfezierbar waren und daher zur Anwendung kommen sollten, wurde versucht die HER2-Rezeptordichte durch transiente Transfektion eines HER2-codierenden Vektors (Expression unter Kontrolle des CMV-Promoters) zu erhöhen. Da die Gesamtmenge an DNA für eine optimale Transfektionseffizienz nicht verändert werden konnte, wurden verschiedene Mengenverhältnisse der Vektoren untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 7.9 dargestellt. Interessanterweise konnte der dynamische Bereich durch die gleichzeitige Transfektion des HER2-Vektors nicht vergrößert werden und verringerte sich sogar deutlich. Auch der inhibitorische Effekt von Pertuzumab auf die Luciferaseaktivität konnte durch die gleichzeitige Transfektion des HER2-Vektors nicht erhöht werden (siehe Abbildung 7.10). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine HER2-Überexpression lediglich angenommen, jedoch nicht durch Westernblot- oder FACS-Analysen bestätigt wurde. Dies müsste in weiteren Experimenten überprüft werden.

Zusätzlich zum Wachstumsfaktor EGF wurde HRG getestet. HRG ist ein Ligand des HER3-Rezeptors. Bindet HRG an den HER3-Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung und schließlich zur Dimerisierung (analog zur Bindung von EGF an den EGFR). Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren der HER-Familie ist HER3 nicht zur Homodimerisierung in der Lage und benötigt stets andere HER-Rezeptoren zur Dimerisierung und schließlich Aktivierung verschiedener Signalwege. Es ist bekannt, dass die Dimerisierung des HER2-Rezeptor mit dem HER3-Rezeptor zur stärksten Signalaktivität innerhalb des HER-Netzwerks führt.[122] Bezüglich der Expression von *c-fos* konnte Nakakuki et al. eine zwei- bis dreimal stärkere Expression durch Stimulation mit HRG als mit EGF zeigen.[84] Mit dem Ziel den dynamischen Bereich des Reportergenassays unter Verwendung von MCF-7 Zellen und Transfektion mit PEI zu erhöhen, wurde daher auch die Stimulation mit HRG durchgeführt

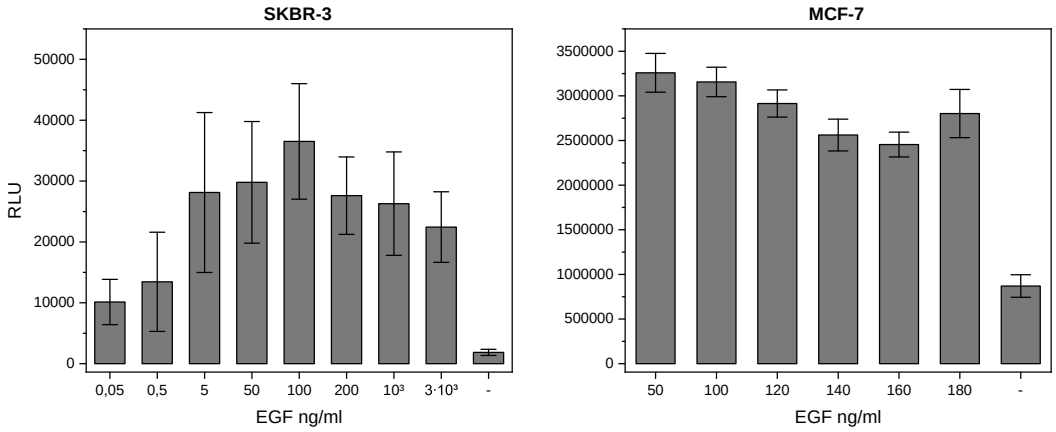


Abbildung 7.8.: Ergebnisse des Reportergenassays nach Stimulation von SKBR-3 Zellen (links) und MCF-7 Zellen (rechts) mit verschiedenen Konzentrationen von EGF (Inkubationszeit: 4 h). Auf der y-Achse ist die Firefly-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt. **-** : keine Zugabe von EGF. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens drei technischen Replikaten gezeigt (n = 1). Verwendet wurden die Methoden Md.RGA.1 und Md.RGA.3 (Abschnitt 11.10.4).

(siehe Abbildung 7.11). Die Stimulation mit HRG führte jedoch nicht zu einer deutlich stärkeren Signalaktivität als die Stimulation mit EGF, sodass der dynamische Bereich bei Verwendung von MCF-7 Zellen nicht auf mehr als 2,5 gesteigert werden konnte.

Vor dem Hintergrund, dass nicht die maximale Stimulationsfähigkeit durch EGF, sondern die Inhibition durch Pertuzumab für die Stabilitätsstudie entscheidend ist, wurde schließlich die Empfindlichkeit der MCF-7 Zellen auf Pertuzumab untersucht (siehe Abbildung 7.12). Es ist zu erkennen, dass zwar bereits eine Pertuzumab-Konzentration von 0,1 µg/ml das EGF Signal signifikant (t-Test, $p < 0{,}001$) inhibierte, jedoch durch eine weitere Konzentrationserhöhung (bis einschließlich 1000 µg/ml) nicht um mehr als 10 - 20 % inhibiert werden konnte. Für die Anwendung des Reportergenassays innerhalb der Stabilitätsstudie, wurde eine Signalinhibition von im besten Fall 20 % als unzureichend angesehen. Daher wurde die Verwendung von MCF-7 Zellen verworfen und erneut Experimente mit SKBR-3 Zellen, jedoch unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 durchgeführt.

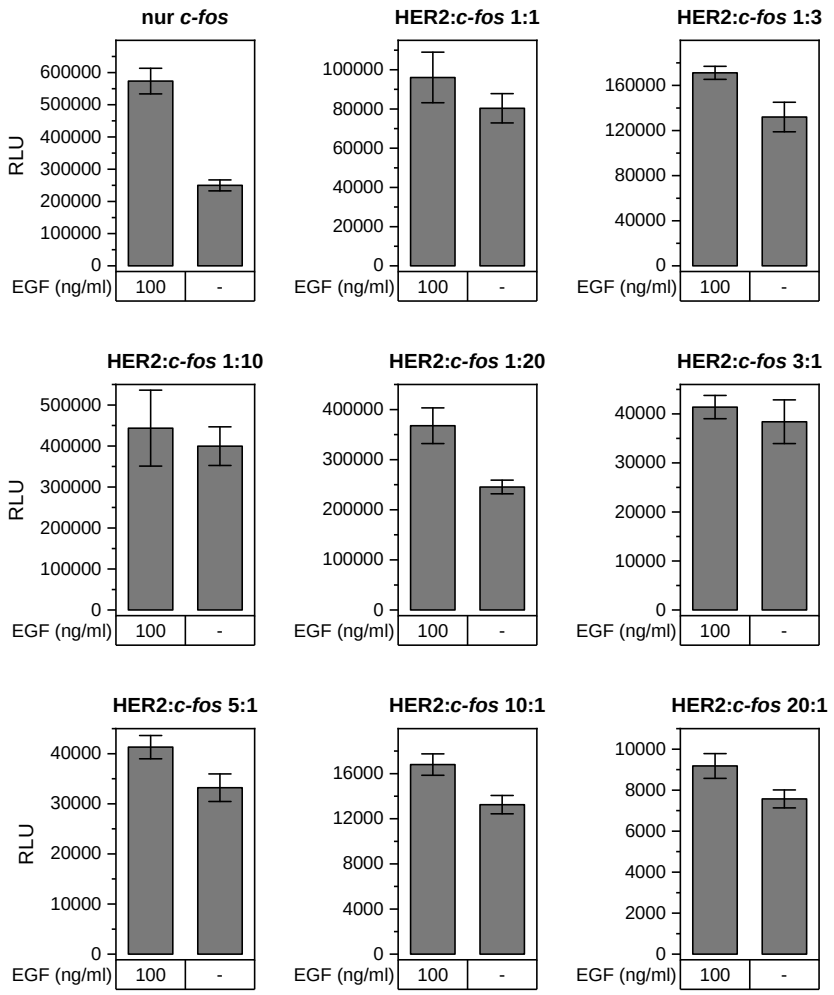


Abbildung 7.9.: Ergebnisse des Reportergenassays nach der simultanen Transfektion von MCF-7 Zellen mit dem experimentellen Luciferase-Vektor und einem HER2-Rezeptor codierenden Vektor mit anschließender Stimulation mit EGF (100 ng/ml, 4 h). Auf der y-Achse ist die Firefly-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen (bedingt durch die unterschiedlichen Mengen des *c-fos*-Vektors). **-** : keine Zugabe von EGF. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von mindestens drei technischen Replikaten gezeigt (n = 1). Verwendet wurde die Methode Md.RGA.4 (Abschnitt 11.10.4).

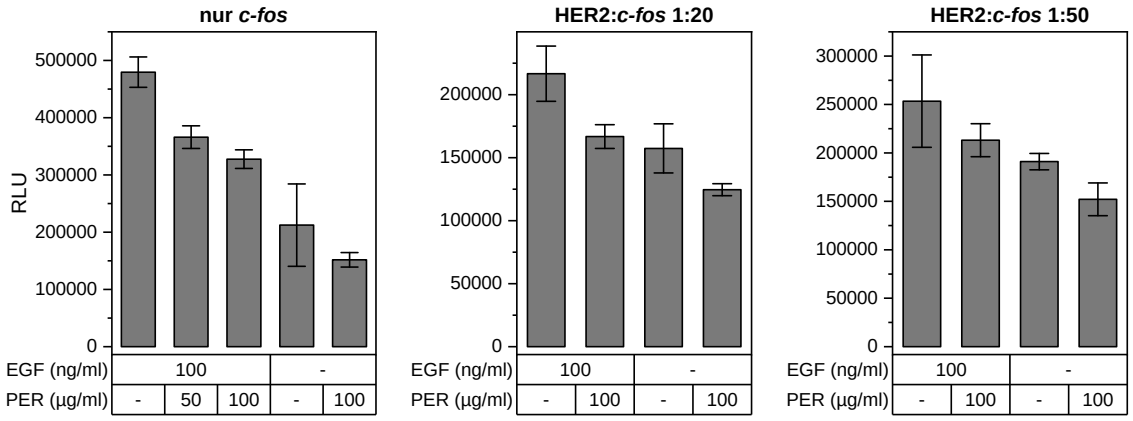


Abbildung 7.10.: Ergebnisse des Reportergenassays nach der simultanen Transfektion von MCF-7 Zellen mit dem experimentellen Luciferase-Vektor und einem HER2-Rezeptor codierenden Vektor mit Inkubation von Pertuzumab (30 min) und anschließender Stimulation mit EGF (100 ng/ml, 4 h). **-** : keine Zugabe von Pertuzumab bzw. EGF. Auf der y-Achse ist die Firefly-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens drei technischen Replikaten gezeigt (n = 1). Verwendet wurde die Methode Md.RGA.4 (Abschnitt 11.10.4).

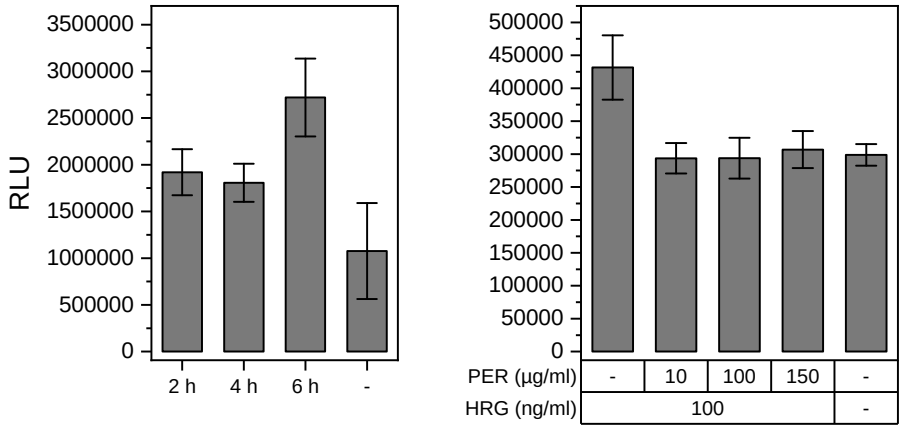


Abbildung 7.11.: Ergebnisse des Reportergenassays nach der Stimulation von MCF-7 Zellen mit Heregulin-α (HRG). links: verschiedene Inkubationszeiten mit HRG. rechts: Inkubation mit Pertuzumab (30 min) und anschließender Stimulation mit HRG (6 h). **-** : keine Zugabe von Pertuzumab bzw. HRG. Auf der y-Achse ist die Firefly-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens drei technischen Replikaten gezeigt (n = 1). Verwendet wurde die Methode Md.RGA.4 (Abschnitt 11.10.4).

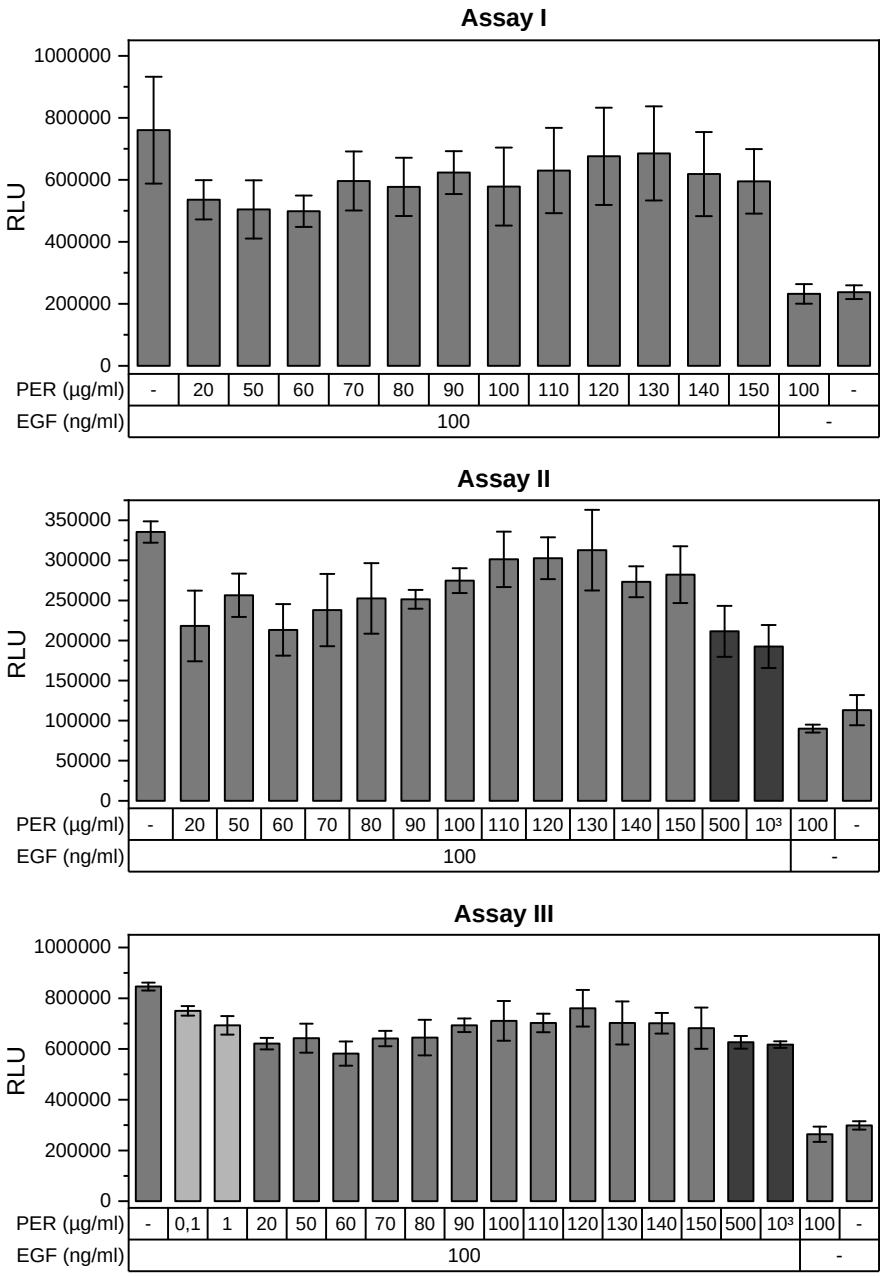


Abbildung 7.12.: Ergebnisse des Reportergenassays nach der Inkubation von MCF-7 Zellen mit verschiedenen Pertuzumab Konzentrationen. Inkubation von Pertuzumab erfolgte 30 min vor Stimulation mit EGF (100 ng/ml, 4 h). **-** : keine Zugabe von Pertuzumab bzw. EGF. Auf der y-Achse ist die Firefly-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt. Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (Assay I - III), jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens drei technischen Replikaten (n = 1). Verwendet wurde die Methode Md.RGA.4 (Abschnitt 11.10.4).

Validierung Reportergenassay

Durch Transfektion mit Lipofectamin 2000 konnten SKBR-3 Zellen zuverlässig mit dem experimentellen Luciferase Vektor transient transfeziert werden (optimierte Methode: Md.RGA.5 Abschnitt 11.10.4). Der dynamische Bereich des Reportergenassays konnte so auf deutlich über 10 erhöht und mit Pertuzumab das EGF Signal um mehr als 40 % inhibiert werden. Dies ermöglichte es, den optimierten Reportergenassay zu validieren. Zunächst wurde untersucht, welche Pertuzumab Konzentration für die Stabilitätsstudie am geeignetsten ist. Die verwendete Pertuzumab Konzentration sollte möglichst so groß sein, dass das durch EGF-Stimulation hervorgerufene Signal signifikant inhibiert wird, jedoch auch geringe potenzielle Aktivitätsverluste erkannt werden können. Es wurde schließlich eine zu verwendende Pertuzumab Konzentration von 0,8 µg/ml als optimale Konzentration ermittelt.

Des Weiteren wurden neben Pertuzumab auch der monoklonale, gegen den HER2-Rezeptor gerichtete Antikörper Trastuzumab und der EGFR/HER2-Kinase-Inhibitor Lapatinib getestet. Sowohl Trastuzumab als Lapatinib waren in dem etablierten Assay wirksam, wobei sich zeigte, dass die Kombination der Inhibitoren besser wirksam war als die jeweiligen Einzelsubstanzen. Der synergistische Effekt dieser Wirkstoffe wurde auch bereits an anderer Stelle gezeigt.[113],[123]–[125]

Für Lapatinib konnte eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und schließlich ein EC50 Wert von 35,36 $\pm$ 7,03 nM bestimmt werden. Andere Autor*innen haben für Lapatinib EC50-Werte zwischen 7 - 80 nM in HER2-sensitiven Zelllinien beschrieben.[126],[127] Sowohl die Ergebnisse für Pertuzumab als auch Trastuzumab und Lapatinib zeigen, dass der entwickelte Reportergenassay geeignet ist um im Rahmen der Stabilitätsstudie zur Anwendung zu kommen. Die Ergebnisse der Validierungsexperimente können in Abbildung S3 des Anhangs der Publikation Jirschitzka et al. [99] in Abschnitt 7.2 gefunden werden.

7.2. Stabilitätsstudie

Nachdem die Methoden für die Stabilitätsstudie erfolgreich etabliert und validiert wurden, konnte die eigentliche Stabilitätsstudie durchgeführt werden. Insgesamt wurden vier Lagerungsbedingungen von Pertuzumab über einen Zeitraum von 42 Tagen untersucht. Dabei wurden am Beginn der Studie sowie nach 14, 28 und 42 Tagen Proben entnommen und mit den verschiedenen Methoden untersucht.

Die Durchführung, Ergebnisse und Diskussion der Stabilitätsstudie sind in der Publikation **„Combined physicochemical and functional assessment of pertuzumab integrity supports extended in-use stability“** -Sven Jirschitzka, Daniel Längle, Hendrik Lück, Dennis Schade, Thomas Kunze (DOI: 10.1002/ardp.202300072) aufgeführt.[99]

Check for updates

Received: 7 February 2023 | Revised: 7 March 2023 | Accepted: 8 March 2023

DOI: 10.1002/ardp.202300072

FULL PAPER

ARCH PHARM Archiv der Pharmazie DPhG

Combined physicochemical and functional assessment of pertuzumab integrity supports extended in-use stability

Sven Jirschitzka[1] | Daniel Längle[2] | Hendrik Lück[3] | Dennis Schade[2,4] | Thomas Kunze[1]

[1]Department of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany

[2]Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany

[3]Hospital Pharmacy, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany

[4]Partner Site Kiel, DZHK, German Center for Cardiovascular Research, Kiel, Germany

Correspondence

Dennis Schade, Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany.
Email: schade@pharmazie.uni-kiel.de

Thomas Kunze, Department of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Germany, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany.
Email: tkunze@pharmazie.uni-kiel.de

Funding information

None

Abstract

Pertuzumab (Perjeta®) is a monoclonal antibody approved for the treatment of HER2-positive breast cancer. Before treatment, the concentrate must be diluted to obtain the ready-to-use infusion solution. Data on the storage stabilities of these preparations are lacking but important for all healthcare professionals in the area of outpatient chemotherapy. The aim of this study was to investigate the storage stability of the ready-to-use infusion bags and the concentrates from once-opened vials over a period of up to 42 days. For a comprehensive and unambiguous assessment of pertuzumab's integrity, a panel of orthogonal analytical methods was employed, including a newly established mass spectrometry-based peptide mapping procedure along with a reporter gene assay for monitoring cellular bioactivity. The herein presented data showed that the ready-to-use infusion solutions stored at 4 ± 2°C and at 20 ± 3°C without light protection, as well as the undiluted Perjeta® concentrates stored at 4 ± 2°C, were physicochemically stable and biologically active for 28 days. These results might eventually allow for infusion preparations in advance, thus improving the quality of patient care as well as the economic usage of pertuzumab.

KEYWORDS

antibody, pertuzumab, stability, storage

1 | INTRODUCTION

In 1986, the first therapeutic monoclonal antibody (OKT-3, muromonab-CD3) was approved by the Food and Drug Administration (FDA).[1] Since then, antibodies and related biologicals have played a rapidly growing role in the treatment of a wide range of diseases. Only 35 years later, in 2021, the 100th antibody was approved by the FDA.[1] The majority of antibodies are used as anticancer drugs.[1] One of these antibodies is pertuzumab (Perjeta®), which was approved by the FDA in 2012 for the treatment of HER2-positive breast cancer. Pertuzumab is a recombinant humanised monoclonal IgG1 antibody that inhibits the dimerisation of the HER2 receptor with itself and with other HER receptors.[2] As a 'dimerisation inhibitor', pertuzumab was the first member of this new class of drugs.[3] The HER2 (ErbB2) receptor is one of four tyrosine kinase receptors from this family, namely EGFR (HER1, ErbB1), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4).[4] Ligand binding to HER1, HER3 and HER4 leads to a conformational change enabling the receptors to homo- or heterodimerize.[4,5] HER2 is the only receptor subtype capable of dimerisation without prior binding of a ligand. Dimerisation of HER receptors with HER2 occurs preferentially and leads to strong activation of various signalling pathways that regulate the cell cycle, cell differentiation, apoptosis or cell growth.[4–8] However, the HER signalling network is complex and interacts with numerous other signalling pathways.[5]

wileyonlinelibrary.com/journal/ardp © 2023 Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft.

HER2 overexpression is present in 15%–20% of breast cancer patients and associated with a more aggressive form of breast cancer and poorer prognosis.[9] For these patients, pertuzumab is used in combination with trastuzumab and chemotherapy.[10]

Nowadays, most cancer patients receive their outpatient chemotherapy in specialised centres.[11] However, these centres are often also affiliated with a hospital. The ready-to-use infusion solutions used in chemotherapy are usually prepared individually for each patient by pharmacies or hospital pharmacies and distributed to the outpatient departments. To optimise the workflow of pharmacists and nurses, but also to save costs and provide the patient with a high-quality product with short waiting times, production in advance has become an expedient option.[12] Hence, the drug must remain stable for a sufficient period of time. The manufacturers' Summary of Product Characteristics (SmPCs) often lacks information on the stability of the opened, reconstituted or diluted drugs beyond a period of 24 h. Roche confirmed the stability of the diluted (ready-to-use) infusion solution of Perjeta® over 24 h at 30°C in the SmPCs until November 2021. In December 2021, the company extended the stability statement for storage of the diluted solution at 2–8°C under light protection for 30 days.[10] Unfortunately, the stability study data that led to this extended shelf life are not publicly available and do not necessarily meet the needs of hospital pharmacies to produce Perjeta® in advance. Thus, the aim of the herein presented study is to assess the stability of pertuzumab with a focus on actual practice in manufacturing pharmacies. To achieve this, an orthogonal set of assays is established that enable the profiling of several physicochemical and bioactivity features indicative of pertuzumabs' functional integrity.

1.1 | Study design

Perjeta® is an infusion solution concentrate with a concentration of 30 mg/mL, which must be diluted with 0.9% saline into an infusion bag to 3.02 mg/mL for the initial dose (840 mg) and to 1.59 mg/mL for the maintenance dose (420 mg) before administration.[10] In our study, four different storage conditions (**I**, **II**, **III** and **IV**) were to be tested as outlined in Figure 1.

First, the ready-to-use infusion bags with a concentration of 1.59 mg/mL pertuzumab, stored in a refrigerator (**I**), were analysed. This represents the common storage condition in hospital pharmacies in view of the suppression of microbial growth. The results of this investigation were intended as a complement to Roche's statement on stability.[10] In addition, we wanted to investigate the storage of the ready-to-use infusion bags with a concentration of 1.59 mg/mL pertuzumab at room temperature and under laboratory light (**II**). Assuming that the ready-to-use preparations are produced under validated aseptic conditions, storage of the infusion bags at room temperature can have logistic advantages. In addition, the cooling chain might be interrupted during transport to the outpatient clinic or during storage, with pharmacists facing the question of whether the drug preparation can still be safely used. The third storage condition we wanted to investigate was the storage of the ready-to-use infusion bags (i.e., 1.59 mg/mL pertuzumab) in a climate cabinet at

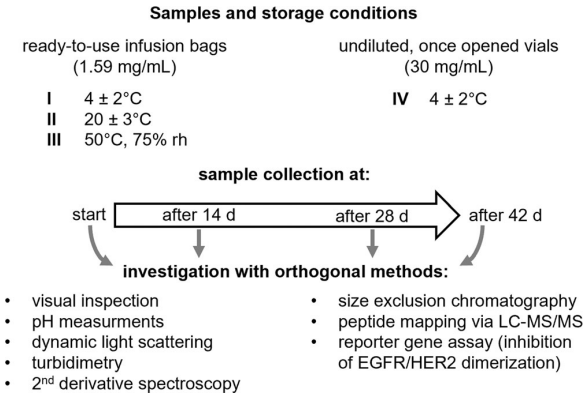


FIGURE 1 Study design of the pertuzumab (Perjeta®) stability assessment.

50°C and 75% relative humidity (rh) (**III**). Storage at 50°C represents an extreme storage condition, which was used to show the methodological ability to detect instabilities at all during our stability study. According to the SmPCs, Perjeta® vials contain 14 mL of concentrated solution, which should be diluted with 250 mL in a saline bag to prepare a ready-to-use infusion. However, the Perjeta® vials are overfilled by approximately 1 mL. Roche states that a vial of Perjeta® is intended for single use only. Also, no information on the storage stability of the opened vials is given in the SmPCs. To allow the use of the Perjeta® concentrate remaining in the bottle for further preparations, we also wanted to assess the stability of the undiluted Perjeta® concentrates after a vial was opened once stored in the refrigerator (**IV**). This would make it possible to save considerable costs.

To investigate the storage stability of these four Perjeta® solutions (**I**–**IV**), they were to be extensively tested for physicochemical instabilities and biological activity after 14, 28 and 42 days of storage. For this purpose, an orthogonal panel of analytical methods was established and employed in a parallel fashion to capture the integrity of pertuzumab as comprehensively as possible. These methods included visual inspection, pH measurements, turbidimetric measurements at different wavelengths, derivative spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), size exclusion chromatography (SEC), liquid chromatography–mass/mass spectrometry (LC-MS/MS)-based peptide mapping and a cellular bioactivity assay.

2 | RESULTS

2.1 | Visual examination

Figure 2 shows exemplary photos of different samples which were examined for visible changes in front of a black and white background.[13, p. 496] No visual changes or particles were detected over the complete storage period of 42 days, even for the samples stored at 50°C (**III**).

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

2.2 | pH measurement

The pH values of the samples are shown in Table 1. The pH value of all samples was constant over 42 days of storage.

2.3 | Turbidimetry and derivative spectroscopy

The turbidimetric measurements of the samples at 350, 410 and 530 nm showed no signs of aggregate formation, discolouration, or turbidity[14] over a storage period of 42 days. The absorbance values were constant over the entire storage period. Table 2 shows the absorbance of the solutions at the beginning and at the end of the stability study. Results after 14 and 28 days did not differ from those shown here and have been omitted for clarity.

With second order derivative spectroscopy, it is possible to detect chemical changes in direct proximity of the aromatic amino acids phenylalanine, tryptophan and tyrosine of a protein. Changes in this microenvironment can be identified by a wavelength shift of the peak maxima and minima in the derivative spectrum between 270 nm and 300 nm. Another parameter is a change of the ratio between peak maxima and minima, and thus, becomes detectable in compression of a part of the spectrum.[15,16] We conducted a forced degradation study to verify that this method is able to identify structural changes in pertuzumab. Since the absorbance intensity depends on protein concentration, each spectrum was normalised to the respective absorbance at 280 nm to detect chemical changes. Figure 3 summarises the results of the forced degradation study. Compared to the freshly prepared Perjeta® solution, the sample adjusted to a pH of 3.5 shows a 0.5 nm shifted peak minimum at 284.5 nm (284.5 → 284 nm) and the ratio of the peak maxima to the peak minima is significantly lower. Even more, pronounced changes can be seen in the sample that was adjusted to a pH of 10. Here, three shifts of the peak minima at 276.5 nm (276.5 → 275.5 nm), at 284.5 nm (284.5 → 283.5 nm), and at 288.5 nm (288.5 → 288 nm) can be observed. In addition, the derivative spectrum is significantly different from the freshly diluted Perjeta® solution. Derivative spectra of the other samples (stored in the refrigerator or at 37°C with and without the addition of hydrogen peroxide) reveal no significant changes compared with the freshly diluted Perjeta® solution.

In Figure 4, the derivative spectra of each storage condition are superimposed. No significant wavelength shifts are visible. The derivative spectra are also almost congruent between the individual measurement days apart from small deviations between 300 and 310 nm. These deviations were, however, not considered relevant.

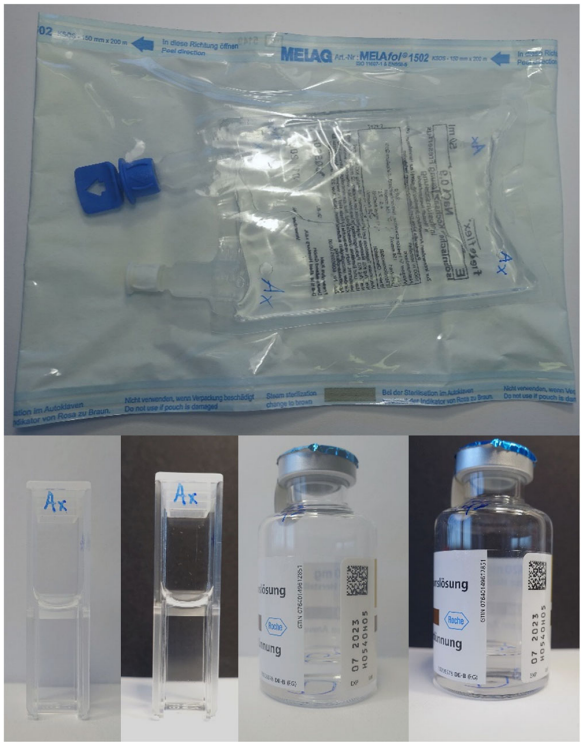


FIGURE 2 Representative pictures of visually examined pertuzumab samples. Top: Ready-to-use infusion bags packed in sterile bags. Bottom: Pertuzumab sample solution (1.59 mg/mL) in a semi-micro cuvette (left) and opened Perjeta® vials sealed with a blue ChemoPlus™ IVA Security Seal (right) each in front of a white and black background.

2.4 | DLS

Table 3 summarises the results of the DLS measurements. All parameters were calculated using a distribution by intensity. At the beginning of the stability study, all sample solutions were monodisperse and a particle distribution by intensity defined by the

TABLE 1 Determined pH values under different pertuzumab storage conditions.

Storage condition	pH values Start	After 14 days	After 28 days	After 42 days
4 ± 2°C	6.28 ± 0.04	6.22 ± 0.04	6.21 ± 0.02	6.21 ± 0.02
20 ± 3°C	6.22 ± 0.01	6.21 ± 0.01	6.21 ± 0.01	6.19 ± 0.01
50°C, 75% rh	6.22 ± 0.01	6.21 ± 0.01	6.23 ± 0.01	6.24 ± 0.01
Undiluted, 4 ± 2°C	6.17 ± 0.01	6.19 ± 0.04	6.20 ± 0.02	6.21 ± 0.02

Note: Data are shown as mean ± SD ($n = 3$).

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 2 Results of the turbidimetric measurements.

Storage condition	Absorbance at 350 nm			Absorbance at 410 nm			Absorbance at 530 nm		
	Start	After 42 days	Δ	Start	After 42 days	Δ	Start	After 42 days	Δ
4 ± 2°C	0.005 ± 0.000	0.007 ± 0.004	0.002	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.003	0.001	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.003	0.001
20 ± 3°C	0.005 ± 0.000	0.009 ± 0.003	0.003	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.003	0.002	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.002	0.002
50°C, 75% rh	0.006 ± 0.001	0.012 ± 0.000	0.006	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.003	0.001 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.001
Undiluted, 4 ± 2°C	0.006 ± 0.000	0.011 ± 0.002	0.005	0.003 ± 0.000	0.007 ± 0.002	0.004	0.001 ± 0.000	0.005 ± 0.002	0.004

Note: Data are shown as mean ± SD ($n = 3$). The absorbance on Day 0 of the stability study (=start) and after 42 days of storage as well as the maximum change in absorbance after 42 days of storage (Δ = |abs. start − abs. after 42 days|) at 350, 410 and 530 nm are shown.

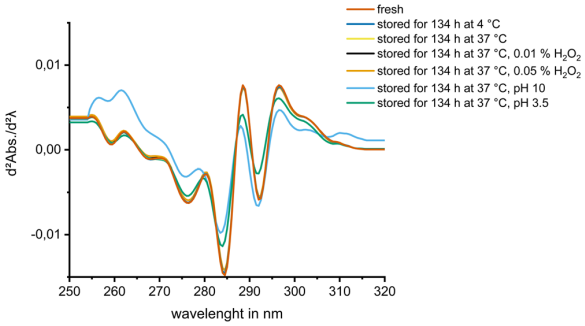


FIGURE 3 Derivative spectra analysis of pertuzumab under forced degradation conditions. Fresh: Freshly diluted and opened Perjeta® sample without storage; the other samples are stored for 134 h under the specified conditions. Spectra were normalised to absorbance at 280 nm.

hydrodynamic diameter and *z*-average was measured in a range around 9.61 and 9.85 nm, respectively. After 28 days of storage at 50°C (**III**), a new particle population with a significantly larger diameter was detected. After 42 days, the intensity of the light scattering of this particle population more than doubled. This observation suggests the formation of aggregates. To elucidate the possibility that the particles with a diameter of 283.98 ± 119.49 nm consist of substances from the saline bag material, a saline bag of the same batch but without Perjeta® was stored under the same conditions and analysed by DLS after 42 days. Since no particles were identified in this blank saline bag, it is very likely that the additional particle population of the stressed sample consists of aggregates of pertuzumab. The samples stored in the refrigerator (**I** and **IV**) and at room temperature (**III**) remained monodisperse until the end of the stability study, without any significant change in the particle distribution.

2.5 | SEC

An SEC method described by Kwong Glover et al. was modified and validated,[17] with pertuzumab eluting after 6.8 min and a second peak at 11.7 min, which could be assigned to the excipients histidine and polysorbate 20 (Figure 5).

The results of the validation of the SEC method can be found in Supporting Information: Table S1. To estimate the molecular weight of potentially occurring fragments using SEC, we have generated a calibration curve with standard substances (see Figure 6).

Table 4 summarises the pertuzumab content and the occurrence of higher and lower molecular weight species (HMW and LMW) over a storage period of 42 days as determined by SEC-high-performance liquid chromatography (HPLC). After 14 days, the samples stored at 50°C (**III**) already showed a significant increase in fragments, which increased further with continued storage (see Figure 7). Using the calibration curve (see Figure 6), the molecular weight of the fragments can be estimated to be 31.6 kDa. At the same time, the pertuzumab content of these samples decreases to an overall average of 95.5% after 42 days of storage. The ready-to-use solutions that were stored in the refrigerator and at room temperature under laboratory light (**I** and **II**) initially showed no changes related to the occurrence of HMW and LMW or to loss of content. However, after 42 days of storage, larger amounts of aggregates (HMW) were detected. The fraction of HMW in the samples stored in the refrigerator was significantly smaller than the fraction of HMW in the samples stored at room temperature. For the undiluted Perjeta® solution stored in the refrigerator (**IV**), neither an increase in HMW or LMW nor a loss of pertuzumab content was observed.

2.6 | Peptide mapping via LC-MS/MS

Pertuzumab samples from the forced degradation study (see Figure 3), were also used to validate the peptide mapping method. The results are represented in the form of a heatmap (Figure 8a). In addition, a biplot calculated by principal component analysis (PCA) can be found in the Supporting Information: Figure S1. To check the reproducibility of our peptide mapping protocol, we performed the forced degradation study twice on different days. In addition, three independent, freshly prepared pertuzumab samples were processed and measured on different days. A total of 54 peptides were deemed appropriate for evaluation. These peptides cover 100% of the light chain and 79.5% of the heavy chain. The amino acid sequences of the peptides and their respective locations are provided in Supporting Information: Figure S2 and Tables S2–S4. In general, we found a certain

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

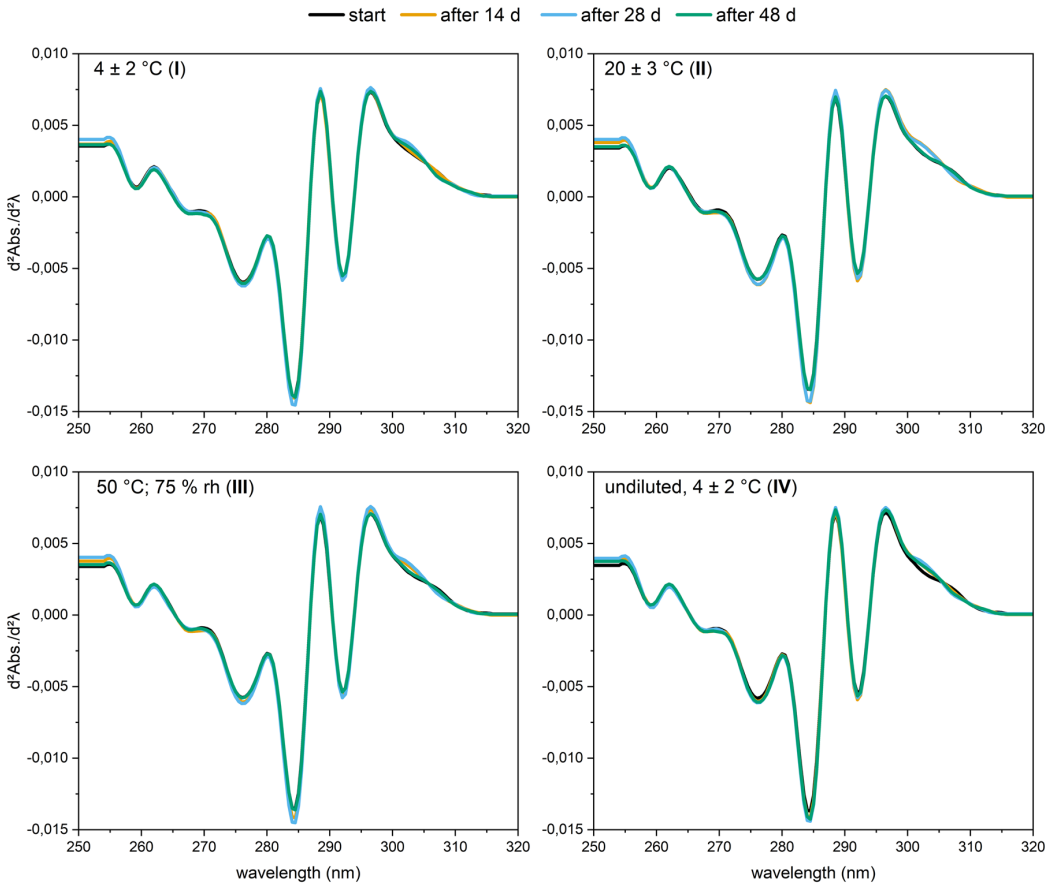


FIGURE 4 Derivative spectra analysis of the pertuzumab stability study. Spectra were normalised to absorbance at 280 nm ($n = 3$).

amount of noise in the raw data of the single measurements because of using a low-resolution mass spectrometer for detection. For that reason, the peak area of each peptide was normalised against two internal standards, and the normalised mean peak areas of at least three injections were used for analysis. This procedure allowed us to clearly distinguish the individually stressed samples from each other, whereas samples processed and measured on different days are clustered closely together (shown in the biplot, Supporting Information: Figure S1). In addition, the heatmap in Figure 8a revealed that specific peptides were generated significantly less after tryptic digestion, depending on the stress condition. Lower peak areas of peptides 9, 22, 29, 31, 33, 49 and 58 were observed in the samples treated with hydrogen peroxide and 15, 34 and 42 in the samples adjusted to a pH of 3.5 compared with the untreated samples. A basic pH produced the strongest changes in pertuzumab's peptide maps, since most of the 54 peptide areas are significantly lowered. For some of these peptides, it is already described in the literature that they react sensitively to influences such as pH changes or light (see Supporting Information: Table S5).[18–24] These susceptible peptides are marked in Figure 8. We found additional peptides strongly influenced by hydrogen peroxide (29 and 49), basic pH (14, 35, 40, 43, 47, 51, 53 and 59) and both acidic and basic pH (34 and 42).

Figure 8b summarises the peptide mapping results from the stability study. Throughout storage over 42 days, the heatmap shows only random distribution of peptide signals without evident decreases in specific peak areas. Notably, none of the peptides that we found to be sensitive in the forced degradation study (marked with a grey triangle pointing downwards) were significantly decreased. Thus, peptide mapping suggests that no significant chemical instabilities in pertuzumab have occurred during storage.

2.7 | Bioactivity

To test the biological activity of pertuzumab, we established a reporter gene assay. For this, SKBR-3 cells were transiently transfected with a firefly luciferase complementary DNA construct under the control of the *c-fos* promoter. Stimulation of cells with epidermal growth factor (EGF), as in our assay, leads to dimerisation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) with another EGFR

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 3 Results of the DLS measurements.

		4 ± 2°C	20 ± 3°C	50°C, 75% rh	Undiluted, 4 ± 2°C
Start	***I*** **(%):** ***d*** **(nm)**	100%: 9.9 ± 0.1	100%: 9.9 ± 0.1	100%: 9.8 ± 0.1	100%: 9.9 ± 0.1
	PDI	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	z-Average	9.7 ± 0.1	9.6 ± 0.1	9.6 ± 0.1	9.6 ± 0.1
After 14 days	***I*** **(%):** ***d*** **(nm)**	100%: 10.1 ± 0.2	100%: 9.8 ± 0.2	100%: 10.1 ± 0.1	100%: 9.7 ± 0.2
	PDI	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	z-Average	9.8 ± 0.1	9.6 ± 0.1	9.7 ± 0.1	9.5 ± 0.1
After 28 days	***I*** **(%):** ***d*** **(nm)**	100%: 10.1 ± 0.1	100%: 10.0 ± 0.1	95.3%: 10.2 ± 0.3 4.7%: 373.1 ± 370.4	100%: 9.8 ± 0.1
	PDI	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.03 ± 0.02
	z-Average	9.8 ± 0.1	9.7 ± 0.1	10.2 ± 0.2	9.6 ± 0.1
After 42 days	***I*** **(%):** ***d*** **(nm)**	100%: 10.2 ± 0.3	100%: 10.0 ± 0.2	89.6%: 10.0 ± 0.2 10.4%: 284.0 ± 119.5	100%: 9.6 ± 0.2
	PDI	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	z-Average	9.8 ± 0.2	9.6 ± 0.1	10.7 ± 0.2	9.5 ± 0.1

Note: Changes are marked in red. Data are shown as mean ± *SD* (*n* = 3).

Abbreviations: *d*, hydrodynamic diameter (calculated by intensity); DLS, dynamic light scattering; *I*, scattering intensity; PDI, polydispersity index.

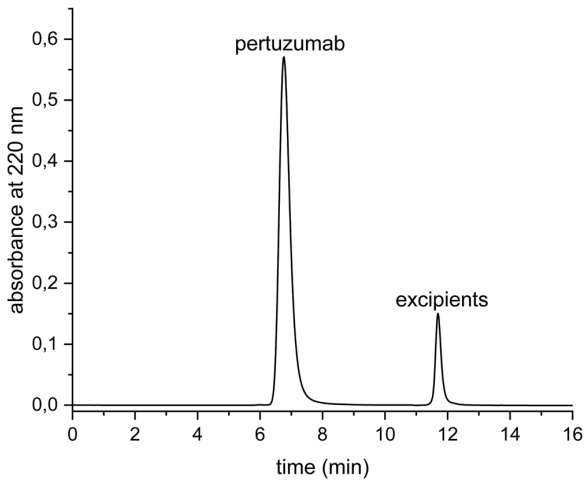


FIGURE 5 Representative size exclusion chromatography chromatogram of a diluted Perjeta® solution.

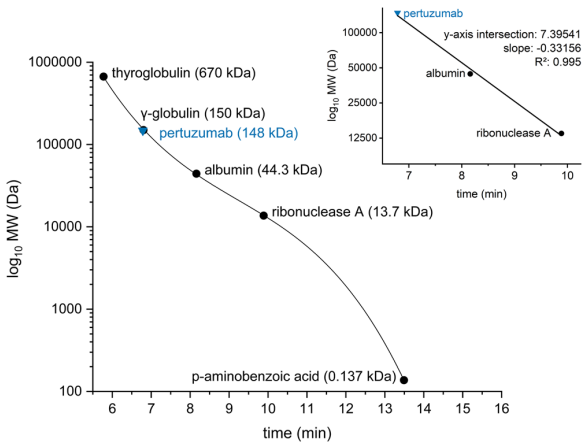


FIGURE 6 Size exclusion chromatography calibration curve employing a third order polynomial fit. Insert graph: Assumed linear fit in the molecular weight (MW) range from 148 kDa to 13.7 kDa.

or one of the other HER receptors, which in turn, activates the *c-fos* promoter downstream particularly via the MAPK signalling pathway.[25] SKBR-3 cells express high levels of the HER2 receptor,[26] leading to a high sensitivity for EGF-induced and HER2-dimerisation-mediated pathway activation, and thus, *c-fos*-luciferase reporter activity. Given that pertuzumab inhibits the dimerisation of the HER2 receptor with other HER family receptors, luciferase production is inhibited when pertuzumab is added to this assay setup.

Several parameters were systematically optimised to increase the dynamic range of the assay, including transfection procedures, cell densities, serum content, EGF dosing and assay duration before luminescence readout. The most suitable pertuzumab concentration

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 4 Quantification of pertuzumab and analysis of putative aggregates and fragments during storage by SEC-HPLC.

		4 ± 2 °C			20 ± 3 °C			50 °C, 75 % rh			Undiluted, 4 ± 2 °C		
		I_d	I_e	I_f	II_d	II_e	II_f	III_d	III_e	III_f	IV_d	IV_e	IV_f
Start	**Conc. (mg/ml)**	1.63	1.61	1.63	1.62	1.61	1.60	1.62	1.61	1.60	29.86	29.74	30.21
	Fraction of HMW of PER (%)	0.051	0.050	0.049	0.050	0.051	0.050	0.050	0.050	0.051	0.051	0.042	0.049
	Fraction of LMW of PER (%)	0.006	0.006	0.006	0.005	0.006	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
After 14 days	**Conc. (mg/ml)**	1.62	1.60	1.62	1.61	1.60	1.60	1.60	1.58	1.57	30.56	30.40	30.50
	Fraction of HMW of PER (%)	0.056	0.060	0.050	0.062	0.059	0.066	0.044	0.047	0.056	0.053	0.054	0.057
	Fraction of LMW of PER (%)	0.007	0.005	0.006	0.008	0.009	0.008	0.544	0.567	0.550	0.005	0.005	0.005
After 28 days	**Conc. (mg/ml)**	1.60	1.60	1.62	1.60	1.59	1.59	1.58	1.56	1.55	30.14	30.07	30.10
	Fraction of HMW of PER (%)	0.072	0.075	0.064	0.084	0.084	0.088	0.045	0.052	0.063	0.055	0.055	0.056
	Fraction of LMW of PER (%)	0.006	0.007	0.006	0.015	0.018	0.020	1.124	1.136	1.117	0.006	0.007	0.006
After 42 days	**Conc. (mg/ml)**	1.60	1.61	1.61	1.59	1.58	1.58	1.56	1.54	1.53	29.63	29.71	29.49
	Rec. (%)	98.57	99.69	98.86	98.58	98.61	98.76	95.92	95.32	95.25	98.76	99.03	98.28
	Fraction of HMW of PER (%)	0.126	0.158	0.143	0.188	0.180	0.200	0.042	0.057	0.067	0.056	0.056	0.056
	Fraction of LMW of PER (%)	0.012	0.009	0.008	0.030	0.031	0.034	1.670	1.696	1.671	0.007	0.008	0.008

Note: Changes are marked in red. Each sample (d, e, f) was measured in triplicates.

Abbreviations: conc., concentration (water loss caused by storage was included in all concentrations); HMW, higher molecular weight species; HPLC, high-performance liquid chromatography; LMW, lower molecular weight species; rec., recovery; SEC, size exclusion chromatography.

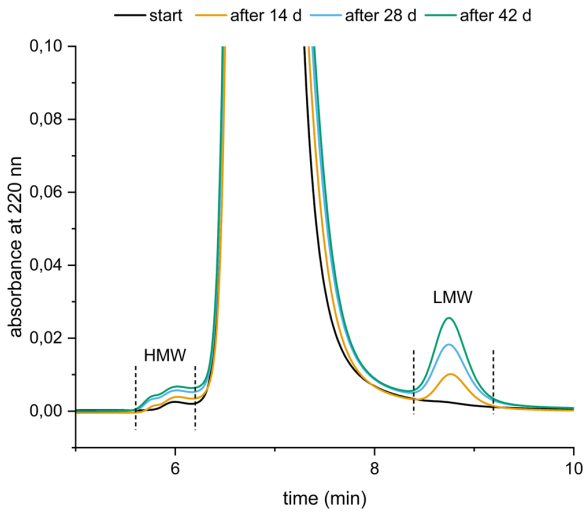


FIGURE 7 Superimposed size exclusion chromatography chromatograms of pertuzumab peaks from 50°C, 75% rh storage conditions showing an increasing peak of species with lower molecular weights (LMW) upon prolonged storage times.

for strong inhibition of the EGFR/HER2 signalling pathway and sensitive detection of small changes in its functional activity were determined to be 0.8 µg/mL (Supporting Information: Figure S3). The validity of the cellular assays was further assessed by profiling other HER receptor inhibitors such as trastuzumab and the EGFR/HER2-specific tyrosine kinase inhibitor lapatinib (see Supporting Information: Figure S3). Notably, none of the single antibodies nor combinations thereof were able to completely shut down the signalling pathway activity, but only lapatinib at 1 µM.

After 14 and 28 days of storage, the biological activity of pertuzumab samples was tested with the reporter gene assay (Figure 9). The positive control represents EGF-stimulated cells in the absence of pertuzumab, while the negative control was neither EGF- nor pertuzumab-treated. A diluted pertuzumab sample from a freshly opened Perjeta® vial served as the bioactive reference (i.e., normalised to 1). To check the equivalence between the control and the individual samples, a TOST equivalence test was performed. Given an assumed lower and upper equivalence limit of 0.9 and 1.10, which corresponds to a loss or increase in efficacy of 10% compared to the reference (significance level of 0.01), all stored samples performed equivalently.

3 | DISCUSSION

In this study, we investigated the storage stability of Perjeta®. Four storage conditions were investigated over 42 days. The study was conducted according to the guidelines and recommendations of Bardin et al., Le Basle et al. and a Protocol for Deriving and Assessment of Stability published by the British National Health

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

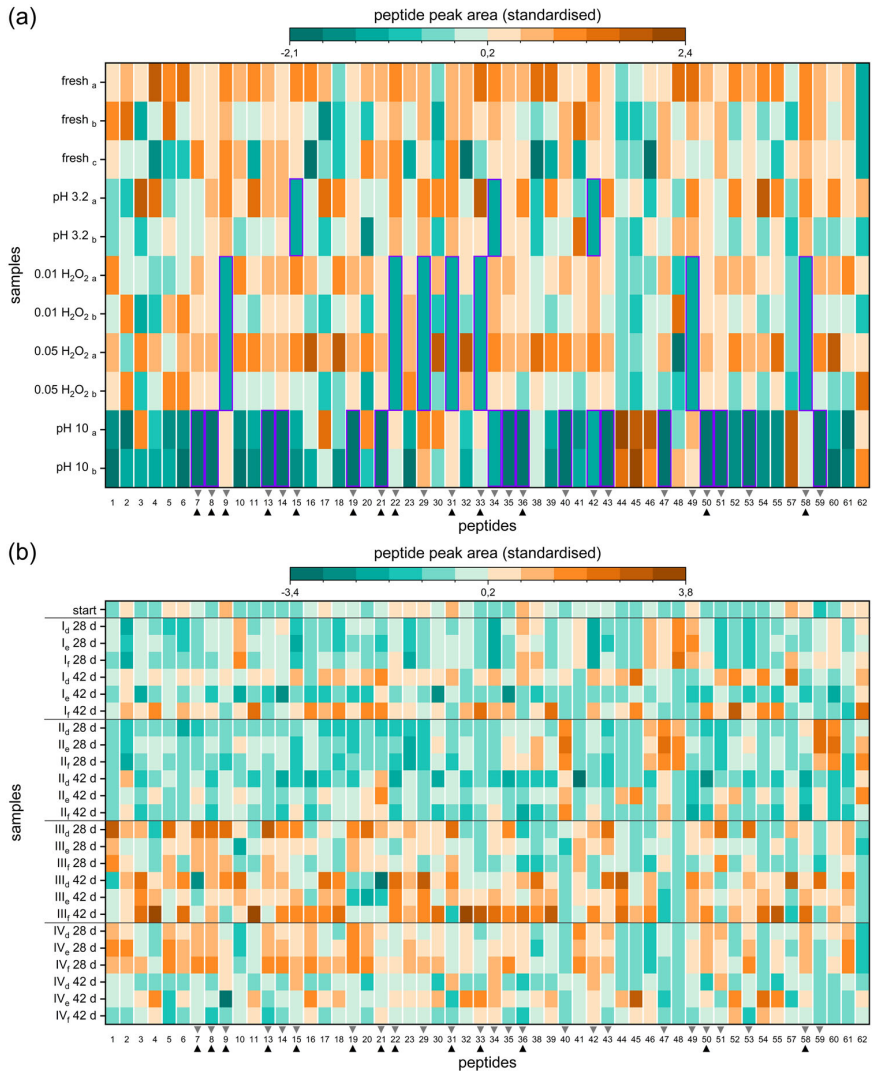


FIGURE 8 Liquid chromatography–mass/mass spectrometry-based peptide mapping results of the pertuzumab forced degradation study (a) and stability study (b) represented as a heatmap. Top: a, b, and c represents independent replicates on different days. Significant and reproducible decrease of a peptide is framed purple. Bottom: d, e, f represents independent replicates. Start: Mean peak areas of all samples at the beginning of the stability study, **I**: 4 ± 2°C, **II**: 20 ± 3°C, **III**: 50°C, 75% rh, **IV**: undiluted, 4 ± 2°C. ▲: Indicates sensitive peptides described in literature (see Supporting Information: Table S5).[18–24] After 14 days, the sample stored at 50°C (**III**) already showed a significant increase in fragments, which increased further with continued storage. ▼: Indicates sensitive peptides found by us in the forced degradation study.

Service (NHS).[14,27,28] All recommendations strongly suggest the use of different complementary analytical methods to study the stability of monoclonal antibodies. Based on a European consensus conference held in 2010, Bardin et al.[14] concluded that physical instability should be investigated at least by turbidimetry and SEC, and chemical instability should be investigated by at least three methods, for example, ion exchange chromatography, SEC, peptide mapping, capillary electrophoresis or mass spectrometry. In addition, a stability study should be complemented by a suitable method for testing the biological activity to ensure the functional integrity of the therapeutic modality.[14] Le Basle et al. evaluated stability studies of monoclonal antibodies according to three quality criteria. The first criterion is compliance with the recommendations of Bardin et al. and the second involves the demonstration that instabilities are detectable at all. The third criterion raises the question of whether the stability study was conducted independently of the manufacturer.[27] To comply with the NHS protocol, the examination of the colour and clarity of the solution, a test for visible and nonvisible particles, the measurement of the pH, the investigation of the physical and chemical stability and the biological activity as well as the assessment of degradation and aggregation products should be carried out.[28] It must be taken into account that the NHS protocol is rather aimed at

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

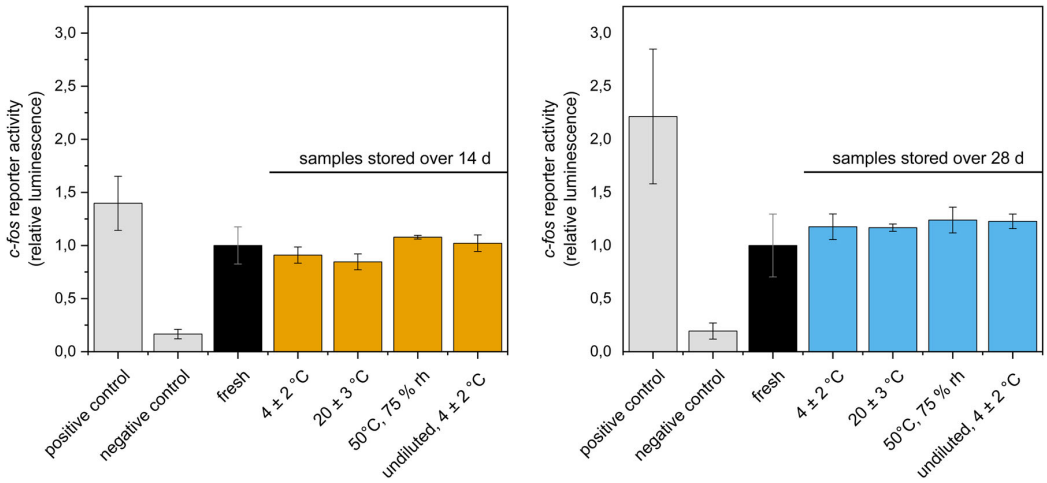


FIGURE 9 Cellular activity of pertuzumab samples from the stability study after 14 days (left) and 28 days (right). Data are shown as mean ± SD ($n = 3$), after normalisation to the fresh Perjeta® sample ($n = 1$). EGF treatment (100 ng/mL) in the absence of pertuzumab served as a positive control ($n = 1$), untreated cells were negative controls ($n = 1$). Pertuzumab was used at 0.8 µg/mL final concentration in all conditions.

TABLE 5 Summary of detected instabilities of Perjeta samples.

Storage condition	After 14 days	After 28 days	After 42 days
4 ± 2°C (**I**)	∅	∅	Slight increase of aggregates (SEC)
20 ± 3°C (**II**)	∅	∅	Slight increase of aggregates (SEC)
50°C, 75% rh (**III**)	Fragments (SEC)	Fragments (SEC); aggregates (DLS)	Fragments, content (SEC); aggregates (DLS)
Undiluted, 4 ± 2°C (**IV**)	∅	∅	∅

Abbreviations: DLS, dynamic light scattering; SEC, size exclusion chromatography; ∅, no relevant changes compared with the start of the study were observed.

pharmaceutical manufacturers, which results in more stringent requirements. In contrast, recommendations by Bardin et al. and Le Basle et al. are directly addressed to researchers external to the quality control of the pharmaceutical manufacturers. In our study, we established and employed an extensive set of orthogonal methods to assess the stability and integrity of Perjeta®, fulfilling all the above-mentioned criteria and recommendations on such studies. Table 5 summarises our key findings on which signs of instability could be detected for the Perjeta® samples with a given analytical method.

The visual and turbidimetric examination and the pH measurement did not show any signs of instability in any of the samples of our study. The SEC-HPLC-determined content of the samples remained almost at 100% over 42 days. Only in the stressed samples (**III**) the content dropped to nearly 95%. Notably, for monoclonal antibodies, a residual content of at least 95% is still accepted.[14,27,28] Complementary to the turbidimetric measurement, SEC and DLS analyses were used to check the physical stability and the occurrence of aggregates and fragments. Again, an increase in aggregates (DLS) and fragments (SEC) was only found in **III**. At first, it may seem contradictory that aggregates were detected in the DLS measurements, whereas fragments were detected in the SEC. However, it is in the nature of DLS that the intensity of the scattered light of larger particles is more intense than that of smaller particles. Therefore, even a small number of large particles is sufficient to obtain a strong signal.[29] Hence, it is all the more important to avoid any contamination by particles during the DLS measurement. We achieved this by filling the DLS samples into sealable cuvettes under the LAF. For the stressed samples (**III**), an additional particle population with an intensity of 10.4% and a mean hydrodynamic diameter of 284.0 ± 119.5 nm was determined after 42 days. However, it cannot be concluded that 10.4% of the pertuzumab monomers are aggregated. Instead, only 10.4% of the light scattering intensity can be attributed to this particle population. These aggregates were not detected by SEC, which may be due to the fact that they are too large to elute onto the column and if they do, the actual amount of aggregates is insufficient for UV detection. In the SEC measurements, however, fragments were observed that remained undetected with DLS as they might have been too small in

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

size and abundance. However, this data nicely illustrates the impact of the complementary nature of DLS and SEC to investigate physical instabilities. For the other samples (**I**, **II** and **IV**), no signs of physical instability were found except for a slight increase of HMW after 42 days in the ready-to-use infusions (**I** and **II**).

To check the chemical stability, second derivative spectra were recorded and peptide maps were generated via LC-MS/MS. For both methods, forced degradation studies were performed before conducting the stability study. Based on differences in the amounts of peptides, we were able to distinguish between the samples and identify individual peptides that were sensitive to specific stress conditions. These results strongly supported the validity of the methods to detect potential pertuzumab instabilities. In the actual stability study, the derivative spectra did not reveal any signs of instability. These findings were confirmed by peptide mapping analysis. In contrast to the samples from the forced degradation study, we found no peptides that were consistently lowered during storage. However, it should be considered that the performance level of peptide mapping by low-resolution MS is stretched to its limits when covering large parts of the protein sequence. Here, high-resolution MS typically reduces noise, and thus, improves the comparability of peptide fingerprints.[30] However, thanks to the broad sequence coverage, our low-resolution MS peptide mapping protocol still allowed us to obtain a comprehensive and meaningful overall picture of severe chemical instabilities for pertuzumab.

Finally, we complemented the stability assessment by including a cell-based assay for the functional activity of pertuzumab. Biological activity assays are sparsely used in stability studies. Among 25 stability studies on monoclonal antibodies reviewed by Le Basle et al, only seven made use of cell-based assays.[27] These mainly included mechanistically rather unspecific viability readouts. Here, we aimed at employing an assay that specifically evaluated the functionality of pertuzumab as a HER2 receptor dimerisation inhibitor. Therefore, a reporter gene assay setup was successfully established that recapitulates the EGF/HER2-dependent signalling pathway activation, which was downstream analysed via a *c-fos*-luciferase reporter. In line with our previous findings on the physicochemical integrity of pertuzumab samples upon storage, no significant loss of biological activity could be detected. However, it should be noted that the sensitivity and dynamic range of cellular assays is naturally not so high to detect small changes in activity. This is also taken into account in the European consensus recommendations of Bardin et al. in which the performance of biological assays is only required as a supplementary but not as the only method for indicating stability due to their analytical variability.[14]

A surprising outcome of our study was that even the heavily stressed pertuzumab samples (50°C, 75% rh) ultimately showed only minor changes or signs of instability. In fact, the loss of content was <5%, the appearance of aggregates and fragments <2%, no significant abnormalities were found in DLS and peptide mapping data, and its biological activity was not impaired. Consequently, following the recommendations of the NHS protocol, these pertuzumab preparations would still be considered stable.[28] Interestingly, several studies have already shown significant instability of monoclonal antibodies when stored at 40–50°C,[31–33] which speaks for the pronounced stability profile of Perjeta®.

Taken together, no physical or chemical instability or loss of biological activity was observed over a period of 28 days in the ready-to-use infusion bags stored in the refrigerator and at room temperature, and in the undiluted Perjeta® solution after once-opening and storage in the refrigerator. Our data do not support the need to protect the ready-to-use infusion solutions from light when stored for longer than 24 h as stated in the SmPCs.[10] Storage under standard laboratory light conditions did not have an effect on the stability of the infusion solutions, at least for 28 days. The undiluted Perjeta® solution was physicochemical stable even for 42 days when stored in the refrigerator.

4 | CONCLUSION

We examined the physicochemical stability of ready-to-use infusion bags of the antibody-drug Perjeta® and the undiluted solution of the once-opened original vials during storage of 42 days. In addition, their biological activities were examined after 14 days and after 28 days of storage. We used different complementary methods, which have not yet been reported for pertuzumab in this combination. This array enabled us to detect potential visually and nonvisually detectable physical and chemical instabilities. The ready-to-use infusion solutions stored in the refrigerator (**I**) and also those stored at room temperature and under laboratory light (**II**) were physicochemically stable over a period of 28 days. Importantly, even the undiluted Perjeta® solutions (**IV**) were physicochemically stable over a period of 42 days of refrigerated storage. All samples were as biologically active in a cell-based assay as a freshly prepared Perjeta® solution. Our data strongly suggest that storage of the ready-to-use infusion bags of Perjeta® is possible without signs of instability at room temperature and under standard laboratory light conditions. Production of the infusion bags in advance and storing them at room temperature and without light protection would considerably simplify the workflow in manufacturing pharmacies when providing Perjeta® to patients. Since we also did not find any signs of physicochemical or biological instabilities in the undiluted Perjeta® solution (**IV**), it appears feasible to even keep and store remainders of the Perjeta® vials to use them for further preparations. This data suggest possibilities for extended usage of the ready-to-use solutions and concentrates, potentially improving the quality of patient care and economic dealing with this drug. Therefore, the herein presented results might provide valuable information for all healthcare professionals in the area of outpatient chemotherapy.

5 | EXPERIMENTAL

5.1 | Sample preparation and sample collection

In this study, four different storage conditions were tested. First, the storage of the ready-to-use infusion bags as the preparations, as they are delivered to the patients, at different temperatures: 4 ± 2°C,

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

20 ± 3°C under laboratory light and 50°C, 75% rh (climatic cabinet, weisstechnik®) and, secondly, the storage of the undiluted Perjeta® solution after a vial was once opened at 4 ± 2°C. For each storage condition, three independent samples were prepared. All infusion bags were prepared under a laminar airflow cabinet (LAF) using aseptic techniques. Sample collection of the infusion bags and of the undiluted Perjeta® solution was also performed under the LAF immediately after preparation of the ready-to-use infusion and after 14, 28 and 42 days of storage. Fifty millilitres of polyolefin freeflex® 0.9% saline bags (batch: 13QBS021) were used. The infusion bags were weighed before the Perjeta® solution was added and before and after each sample was taken. On the one hand, this made it possible to determine the exact amount of saline in the bags before preparing the ready-to-use infusions, and, on the other hand, we were able to quantify the water loss during storage. After determining the exact volume of 0.9% saline in the infusion bags, a 3 mL syringe was used to add as much Perjeta® solution to the bags as was necessary to achieve a final concentration of 1.59 mg/mL pertuzumab. The ready-to-use infusion bags were gently inverted to mix the solution. For each sample collection, 5 mL of sample solution was taken from the ready-to-use infusion bags using a 5 mL syringe with a cannula, which was then split under the LAF into previously labelled reaction tubes (2 mL for pH and turbidimetric measurement, 1 mL for peptide mapping and SEC, 100 µL for the reporter gene assay). Additionally, 0.8 mL of the sample solution was filled into a semi-micro cuvette (Brand®, # 759115). The filled cuvettes were sealed with a plastic lid still under the LAF and set aside for the DLS measurement. A total of three vials of Perjeta® (batch: H0540H05, 07/23) were used and three infusion bags containing 1.59 mg/mL pertuzumab were prepared from each vial. The remaining undiluted Perjeta® solution, approximately 4–5 mL, was kept in the vials to investigate the storage stability of the undiluted Perjeta® solution after a vial was opened once. For each sample collection, 0.3 mL of the undiluted Perjeta® solution was taken from the vials using a 1 mL syringe. A quantity of 265 µL of the collected concentrate was then further diluted with 4735 µl of 0.9% saline (B. Braun Melsungen AG) to achieve a final concentration of 1.59 mg/mL. The resulting sample solution was divided for further analysis as described above. The opened vials were sealed with a ChemoPlus™ IVA Security Seal, packed in a zip bag and stored in the refrigerator. The ready-to-use infusion bags were packed in previously autoclaved sterile bags (Sogeva, # REV 06).

5.2 | Visual examination

The samples were examined for visual conspicuities using an adapted pharmacopoeia method (pH. Eur. 10.0 2.9.20 Particulate Contamination: Visible Particles) against a black and white background.[13, p. 496] For this purpose, both the ready-to-use infusion bags or Perjeta® vials and the sample solution filled into semi-micro cuvettes were examined for the appearance of particles, turbidity, gas development or discolouration. Photos (Sony Cybershot Rx100III) were also taken of each sample to document potential changes over the storage period.

5.3 | pH measurement

The pH values were determined using a Hanna pH metre (HI 2211 + HI 1053). On each measuring day, the pH metre was recalibrated. For pH measurement, 1 mL of sample solution was placed in a reaction tube and the pH was determined after an adjustment time of 2 min.

5.4 | Turbidimetric measurement and derivative spectroscopy

A Shimadzu 2600 spectrophotometer was used for turbidimetric measurement and derivative spectroscopy. Turbidimetric analyses were performed according to the recommendation of Bardin et al.[14] 0.8 mL of the sample solution was placed in a semi-micro UV-cuvette (Brand®, # 759150) and the absorbance was measured at 350, 410 and 530 nm in triplicates. For derivative spectroscopy, pertuzumab samples were diluted 1:10 with 0.9% saline and a spectrum was recorded from 250 to 320 nm against 0.9% saline. From the recorded spectra, the second order derivative spectrum was calculated by using the LabSolutions UV-Vis software.

5.5 | Forced degradation study

For the forced degradation study, we diluted Perjeta® with normal saline to 1.59 mg/mL and added hydrogen peroxide (final concentration 0.1% or 0.5%; Carl Roth, # 9681.4), sodium hydroxide (final pH 10; Carl Roth, # 6771.3) or hydrochloric acid (final pH 3.5; Honeywell, # 65938). Subsequently, the samples were stored under laboratory light for 134 h in a thermoblock (Eppendorf Thermostat 5320) at 37°C. The samples were finally analysed together with freshly prepared and thus unstressed pertuzumab samples using derivative spectroscopy and LC-MS/MS-based peptide mapping.

5.6 | DLS

For DLS a Malvern Zetasizer Nano ZS inclusive Zetasizer Nano software v3.30 was used. The viscosity of the Perjeta® solution diluted to 1.59 mg/mL was determined with a viscometer (AND SV-10) and the refractive index was measured using an Abbe refractometer (Carl Zeiss). Both parameters were entered into the measurement method with 1.11 mPa/s and 1.33. All samples were measured in triplicates in the automatic mode of the software with a 173° scattering angle and at a temperature of 20.0°C.

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

5.7 | SEC

An SEC method described by Kwong Glover et al.[17] was modified and used for quantification as well as the detection of degradation products. The SEC-HPLC system consisted of a Waters™ 1525 Binary HPLC Pump, a Waters™ 717plus Autosampler, a Waters™ 2487 Dual λ Absorbance Detector, a degasser (Biotech Degasi® Classic) and a column oven (Techlab GmbH) set to 20°C. A TSKgel G2000SWxl column was used. A buffer consisting of 0.2 M sodium phosphate and 0.25 M sodium chloride (Carl Roth, # K300.2, # P030.2, # HN00.2) adjusted to a pH value of 6.2 was used as a mobile phase, which was prepared fresh daily. The flow rate was 1 mL/min. Twenty microliters of the sample solution containing 1.59 mg/mL pertuzumab was injected and pertuzumab was detected at a wavelength of 220 nm. The SEC method was validated according to the ICH guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.[34] Therefore, a freshly prepared dilution series of the Perjeta® solution with a concentration of 0.12, 0.3, 1.2, 1.5, 1.8 and 1.92 mg/mL was measured in triplicates on three different days. A six-point calibration was made from the mean values of the peak areas; the coefficient of variance and the maximum and minimum recovery were determined. In addition, a calibration curve has been created using a standard mix (Sigma-Aldrich, # 69385) containing Thyroglobulin bovine (670 kDa), γ-globulin bovine (150 kDa), Albumin chicken (44.3 kDa), Ribonuclease A bovine (13.7 kDa) and *p*-aminobenzoic acid (0.137 kDa). Operation of the HPLC system and evaluation of the chromatograms was carried out using Waters™ Breeze-software (version 3.3).

5.8 | Peptide mapping

The peptide mapping was adapted from Tokhadze et al.[35] Myoglobin (Sigma-Aldrich, # M1882; 2 mg/mL aliquoted in saline and stored at −80°C, freshly thawed for each peptide mapping) was used as internal standard 1. Reduction and denaturation were carried out in the same step. A quantity of 400 µg pertuzumab and 100 µg myoglobin were diluted with 0.1 M ammonium bicarbonate buffer pH 8.5 (ABC; Carl Roth, # T871.2) to a volume of 500 µl. The reduction was carried out with a 1 M dithiotreitol solution (Sigma-Aldrich, # 43816; final concentration 10 mM) and denaturation with guanidine (Carl Roth, # 0037.3; final concentration 6 M) at 37°C in a thermoblock (Eppendorf Thermostat 5320) for 1 h. A freshly prepared iodoacetic acid solution (Sigma-Aldrich, # 14386; 0.5 mg/mL in ABC pH 8.5) was then added to the reaction mixture (final concentration 50 mM) and incubated for 15 min at room temperature under light protection. Using 10 kDa cut-off spin filters (VWR, # 516-0229 P), the buffer was switched from pH 8.5 to pH 7.6 and interfering reagents were removed. This was done by adding 500 µL of sample solution to the filter unit and centrifuging for 10 min in a tabletop centrifuge (Heraeus® Biofuge® Pico) at 14,000 g. The filtrate was discarded. The residue was mixed with 450 µL ABC pH 7.6 and centrifuged again at 14,000 g for 20 min. Afterwards, 50 µL ABC pH 7.6 was added to the residue and finally, 140 µL sample solution was transferred into a new vial. The trypsin solution (Carl Roth, # 2193.1, stored at −20°C) was always prepared fresh shortly before digestion. Trypsin was added to the sample solution in a mass ratio of 1:20 (trypsin:protein). The sample and trypsin solution were mixed and incubated for 2 h at 37°C in a thermoblock. The digestion was stopped by cooling and adding 1 µL of concentrated formic acid (Carl Roth, # 4724.1). Samples that had been digested were finally stored at −80°C until measurement on the LC-MS.

For measurement on the LC-MS, the samples were freshly thawed. Each 20 µL sample solution was mixed with 2 µL of an angiotensin II solution (Sigma-Aldrich, # A9525, stored aliquoted at −80°C and freshly thawed for each measurement) as internal standard 2 and measured on the LC-MS.

5.9 | LC-MS experimental

Liquid chromatography was performed using the ekspert nanoLC 400 with the ekspert nanoLC 425 pump module (loading pump: PN5057622, gradient pump: PN5057620). For the chromatographic separation, mixtures of solvent A (0.1% formic acid in aqua, VWR, # 84865.180) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile, VWR, # 34851) were used. Two microliters of the peptide digests were loaded via autosampler on a trap column (Phenomenex® Luna® 5 µm, C18(2), 100 Å, 20 × 0.3 mm, # 05M-4252-AC) for 5 min with 100% solvent A at 10 µL/min. Afterwards, the retained peptides were separated on a microLC column (Phenomenex® Kinetex 2.6 µm XB-C18 100 Å, 50 × 0.3 mm, # 00B-4496-AC) with a flow of 7 µL/min. The solvent composition changed during the run according to the following time programme: starting with 3% solvent B to 25% within 32 min, up to 95% B in 3 min, holding this composition for 5 min, returning to 3% B within 2 min and holding the initial conditions to re-equilibrate the column for 3 min.

Mass spectrometry analyses were performed on an AbSciex QTrap5500 in MRM mode (general MS parameters: curtain gas: 30 L/min, CAD gas: medium, ion spray voltage: 5500 V, TEM: 200°C, GS1: 20 psi, GS2: 20 psi, DP: 80.00 V, EP: 10.00 V, CXP: 13.00 V). A representative ion chromatogram and transition details on each examined peptide can be found in the Supporting Information: Figure S4 and Table S6–S8. For MS method development and optimisation, we utilised skyline.[36,37]

5.10 | Biological activity—Reporter gene assay

The SKBR-3 cells were a gift from Inken Flörkemeier (group of Dirk Bauerschlag, UKSH, Kiel). The cells were thawed 20 days before transfection and cultivated in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose, L-glutamine, sodium pyruvate and 3.7 g sodium bicarbonate (PAN™ Biotech, # P04-03590) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Gibco® Qualified FBS, # 10270106) in 25 cm^2 culture flasks (SARSTEDT, # 83.1810.002) in a humidified incubator at 37°C and 5% CO_2. A medium change was

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

performed every 2–3 days and the cells were split at a confluence of 70%–80%. After 11 days in culture, the cells were tested for the presence of mycoplasma (Mycoplasmacheck, eurofinsgenomics). At the time of transfection, all cells had the same number of passages and had tested negative for mycoplasma. Twenty-two hours before transfection, in two 25 cm^2 culture flasks 2×10^6 cells per flask were seeded in 4 mL DMEM supplemented with 10% FBS. The next day, transient transfection was carried out with Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, # 11668019). For both culture flasks, 40 µL lipofectamine was mixed with 970 µL Opti-MEM (Gibco™ Opti-MEM™, # 31985062) in a reaction tube and allowed to stand for 5 min. In the meantime, 16 µg DNA (pFOS WT-GL3) was diluted in 1 mL Opti-MEM. pFOS WT-GL3 was a gift from Ron Prywes (Addgene plasmid #11983; http://n2t.net/addgene:11983; RRID:Addgene 11983).[38] The diluted solution of Lipofectamine™ 2000 and the DNA solution were mixed and the mixture were incubated for 20 min at room temperature. One milliliter of this solution was then carefully dropped onto the cells of each of the two culture flasks, which now had a confluence of approximately 90%. The cells were incubated for 4 h. Afterwards, the medium was removed, and the cells were washed with 1 mL DPBS (PAN™ Biotech, # P04-36500) and detached with 1 mL trypsin solution (PAN™ Biotech, # P10-029500). Detached cells from two culture flasks were combined in a reaction tube, centrifuged and the resulting pellet was resuspended in DMEM supplemented with 2% FBS. Per well of a standard 96-well plate (SARSTEDT, # 83.3924), 35,000 cells were seeded into a total volume of 100 µL DMEM supplemented with 2% FBS. After an incubation time of 22 h, the cells had a confluence of 70% and pertuzumab (final concentration per well 0.8 µg/mL) was added to the cells (except positive and negative control) and incubated for 30 min in the incubator. Epidermal growth factor (Miltenyi Biotec, # 130-097-750) was reconstituted with sterile filtrated aqua, diluted in DPBS, and aliquoted; it was stored at −20°C, freshly thawed for each assay and used in a final concentration of 100 ng/mL per well. EGF was added to all cells except the negative control and the cells were incubated again for 4 h in the incubator. Finally, the medium was completely removed, and the cells were washed with DPBS and lysed with passive lysis buffer (Promega, # E1910, 50 µL per well). The 96-well plate with the lysed cells was stored at −20°C until the luminescence was measured. Fifteen minutes before measurement on a microplate reader (Spark, Tecan Group), the lysed cells were thawed at room temperature. In each well of a white half-well plate (Corning®, # 3693), 10 µL suspension of the lysed cells and 10 µL Bright-Glo™ reagent (Promega, # E2620) were added and the luminescence was determined directly afterwards.

For a graphical representation of the data (Figure 9), samples were normalised using a bioactive reference (freshly opened Perjeta® vial), which was set to an activity of 1. The mean and standard deviation of three independent samples (each as a technical 6-fold replicate) were calculated and presented in the form of a bar chart. For each assay, a positive and negative control, as well as a reference sample (each as a technical sixfold replicate), were measured. The standard deviation after normalisation of the controls and the reference was calculated by error propagation.

Lapatinib (Sigma-Aldrich, # SML2259) and trastuzumab (Kanjinti®, kindly provided by the hospital pharmacy of the UKSH, Kiel) were used to validate the assay.

5.11 | Software and statistical analysis

The means and standard deviations as well as the standardised (*Z*-score) peak areas for the evaluation of the peptide mapping were calculated in Excel 2021. TOST equivalence test and multivariate data analysis were performed in OriginPro® 2022. All graphs were also generated in OriginPro® 2022. TOC graphic was created with BioRender.com.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Celine Barbonus for her excellent support in performing the experiments and the hospital pharmacy of the UKSH, Campus Kiel, in particular the pharmaceutical assistants and pharmacists of the department of central cytostatic drug production, for their very kind and continuous support. Furthermore, we would like to thank Inken Flörkemeier (UKSH, Kiel) for providing the SKBR-3 cells.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Sven Jirschitzka http://orcid.org/0000-0002-7513-2900
Dennis Schade http://orcid.org/0000-0002-5515-1821
Thomas Kunze https://orcid.org/0000-0001-9884-8824

REFERENCES

[1] A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 491. https://doi.org/10.1038/d41573-021-00079-7
[2] N. Harbeck, M. W. Beckmann, A. Rody, A. Schneeweiss, V. Müller, T. Fehm, N. Marschner, O. Gluz, I. Schrader, G. Heinrich, M. Untch, C. Jackisch, *Breast Care* **2013**, *8*, 49. https://doi.org/10.1159/000346837
[3] P. Barthélémy, J. Leblanc, V. Goldbarg, F. Wendling, J.-E. Kurtz, *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1483.
[4] M. M. Moasser, *Oncogene* **2007**, *26*, 6469. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477
[5] Y. Yarden, M. X. Sliwkowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 127. https://doi.org/10.1038/35052073
[6] M. A. Olayioye, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3159. https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3159
[7] E. Tzahar, H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunagaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin, Y. Yarden, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 5276. https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5276
[8] D. Graus-Port, *EMBO J.* **1997**, *16*, 1647. https://doi.org/10.1093/emboj/16.7.1647
[9] J. S. Ross, E. A. Slodkowska, W. F. Symmans, L. Pusztai, P. M. Ravdin, G. N. Hortobagyi, *Oncologist* **2009**, *14*, 320. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0230

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

[10] CHMP, https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/perjeta (accessed: December 2021).

[11] T. Hofmarcher, P. Lindgren, N. Wilking, B. Jönsson, *Eur. J. Cancer* **2020**, *129*, 41. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.01.011

[12] J. Vigneron, E. D'Huart, B. Demoré, *Eur. J. Oncol. Pharm.* **2019**, *2*, e12. https://doi.org/10.1097/OP9.0000000000000012

[13] European Pharmacopoeia, *2019, English: Subscription to Main Volume + Supplement 1 + Supplement 2*, 10th ed., Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart **2019**.

[14] C. Bardin, A. Astier, A. Vulto, G. Sewell, J. Vigneron, R. Trittler, M. Daouphars, M. Paul, M. Trojniak, F. Pinguet, *Eur. J. Hosp. Pharm.* **2012**, *19*, 278. https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2012-000112

[15] H. Mach, C. R. Middaugh, *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 323. https://doi.org/10.1006/abio.1994.1499

[16] V. Vieillard, A. Astier, M. Paul, *GaBI J* **2018**, *7*, 101. https://doi.org/10.5639/gabij.2018.0703.022

[17] Z. W. Kwong Glover, L. Gennaro, S. Yadav, B. Demeule, P. Y. Wong, A. Sreedhara, *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 794. https://doi.org/10.1002/jps.23403

[18] C. Lew, J.-L. Gallegos-Perez, B. Fonslow, M. Lies, A. Guttman, *J. Chromatogr. Sci.* **2015**, *53*, 443. https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu229

[19] J. T. Shipman, E. P. Go, H. Desaire, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2018**, *29*, 2041. https://doi.org/10.1007/s13361-018-2010-2

[20] Q. Zhang, G. C. Flynn, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 34325. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.506915

[21] Q. Yan, M. Huang, M. J. Lewis, P. Hu, *Mabs* **2018**, *10*, 901. https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1478646

[22] S. Sinha, L. Zhang, S. Duan, T. D. Williams, J. Vlasak, R. Ionescu, E. M. Topp, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1573. https://doi.org/10.1002/pro.173

[23] Y. Miyahara, K. Shintani, K. Hayashihara-Kakuhou, T. Zukawa, Y. Morita, T. Nakazawa, T. Yoshida, T. Ohkubo, S. Uchiyama, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6333. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63078-5

[24] Y. Chen, E. Doud, T. Stone, L. Xin, W. Hong, Y. Li, *Mabs* **2019**, *11*, 1089. https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1625676

[25] T. Nakakuki, M. R. Birtwistle, Y. Saeki, N. Yumoto, K. Ide, T. Nagashima, L. Brusch, B. A. Ogunnaike, M. Okada-Hatakeyama, B. N. Kholodenko, *Cell* **2010**, *141*, 884. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.054

[26] D. L. Holliday, V. Speirs, *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 215. https://doi.org/10.1186/bcr2889

[27] Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze, A. Astier, V. Sautou, *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 169. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009

[28] NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee, NHS Pharmaceutical Production Committee, NHS Pharmaceutical Aseptic Services Group by the NHS, Pharmaceutical Research and Development Working Group, *Standard Protocol for Deriving and Assessment of Stability—Part 2: Aseptic Preparations (Biopharmaceuticals)*, London, **2021**, https://www.sps.nhs.uk/articles/standard-protocol-for-deriving-and-assessment-of-stability-part-2-aseptic-preparations-biopharmaceuticals/

[29] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6

[30] P. J. Villacorta, A. Salmerón-García, D. A. Pelta, J. Cabeza, A. Lario, N. Navas, *Analyst* **2015**, *140*, 1717. https://doi.org/10.1039/c4an01806k

[31] M. Paul, V. Vieillard, E. Jaccoulet, A. Astier, *Int. J. Pharm.* **2012**, *436*, 282. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.063

[32] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, J. Sun, *J. Chromatogr. B* **2006**, *837*, 35. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.053

[33] E. Jaccoulet, T. Daniel, P. Prognon, E. Caudron, *J. Pharm. Sci.* **2019**, *108*, 3252. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.06.004

[34] EMA, *ICH Q2(R2) Validation of Analytical Procedures: Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology(CPMP/ICH/381/95)*, London,**1995**, https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures

[35] N. Tokhadze, P. Chennell, Y. Le Basle, V. Sautou, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *150*, 386. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.012

[36] B. Maclean, D. M. Tomazela, S. E. Abbatiello, S. Zhang, J. R. Whiteaker, A. G. Paulovich, S. A. Carr, M. J. Maccoss, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 10116. https://doi.org/10.1021/ac102179j

[37] B. Maclean, D. M. Tomazela, N. Shulman, M. Chambers, G. L. Finney, B. Frewen, R. Kern, D. L. Tabb, D. C. Liebler, M. J. Maccoss, *Bioinformatics* **2010**, *26*, 966. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054

[38] B. Cen, A. Selvaraj, R. C. Burgess, J. K. Hitzler, Z. Ma, S. W. Morris, R. Prywes, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 6597. https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: S. Jirschitzka, D. Längle, H. Lück, D. Schade, T. Kunze, *Arch. Pharm.* **2023**, e2300072. https://doi.org/10.1002/ardp.202300072

15214184, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202300072 by Universitatsbibliothek Kiel, Wiley Online Library on [29/03/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Supplementary material

Combined physicochemical and functional assessment of Pertuzumab integrity supports extended in-use stability

Sven Jirschitzka[1], Daniel Längle[2], Hendrik Lück[3], Dennis Schade[2,4*], Thomas Kunze[1*]

[1] Department of Clinical Pharmacy, Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany
[2] Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany
[3] Hospital Pharmacy, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany
[4] Partner Site Kiel, DZHK, German Center for Cardiovascular Research, 24105 Kiel, Germany
* Corresponding authors: schade@pharmazie.uni-kiel.de, tkunze@pharmazie.uni-kiel.de

Table of content

page	Table	Figure
s2	Table S1. Results of the SEC validation.	
s3		Figure S1. Peptide mapping results of the forced degradation study represented as biplot.
s5		Figure S2. Amino acid sequence of pertuzumab.
s6	Table S2. Peptides and corresponding sequence of the light chain of pertuzumab found via LC-MS/MS after tryptic digestion.	
s7	Table S3. Peptides and corresponding sequence of the heavy chain of pertuzumab found via LC-MS/MS after tryptic digestion.	
s8	Table S4. Location of disulfide bonds in pertuzumab.	
s9	Table S5. Sensitive peptides of IgG1.	
s10		Figure S3: Validation of the reporter gene assay.
s11 - s14	Table S6. LC-MS/MS transition details of pertuzumab.	
s14	Table S7. LC-MS/MS transition details of angiotensin II.	
s15	Table S8. LC-MS/MS transition details of myoglobin.	
s15		Figure S4. Representative ion chromatogram.

s2

Validation of the size exclusion chromatography

The results of the validation of the SEC method are presented in Table S1. The areas of the pertuzumab peaks were linear to the absorbance at 220 nm in a range of 0.12 mg/ml - 1.92 mg/ml. Thus, this method allows quantification of 7.5 % - 120 % of the expected pertuzumab content. The maximum coefficient of variation and the minimum and maximum recovery rates were 2.5 % and 97.3 - 101.9 %, respectively, which were considered to be acceptable.

In addition to the Perjeta® solution, histidine (Carl Roth, # 1697.1) and polysorbate 20 (Carl Roth, # 9127.1) were injected separately. Both compounds elute after 11.7 min, thus the second peak in the chromatogram are assigned to these excipients of the Perjeta® solution.

Table S1. Results of the SEC validation.

	t_r (min)	λ (nm)	R^2	equation regression line	max. CV (%) [a]	recovery min. - max. (%) [a]
pertuzumab	6.78	220	0.9999	y = 18442064.6 x - 7.162.5	2.5 Ø 0.6 ± 0.7	97.3 – 101.9 Ø 100.1 ± 1.2

λ: wavelength, t_r: mean retention time, R^2: correlation coefficient, CV: coefficient of variation, Ø: mean ± sd, [a]: includes both intraday and interday iterations

s3

Validation of the peptide mapping via LC-MS

The results of the validation of the peptide mapping are shown in Figure S1 as a biplot. Samples from 2 identical forced degradation studies performed on different days (a, b) and 3 independent, freshly diluted and thus unstressed Perjeta® samples processed on different days (a, b, c) are shown. Each sample was injected 3 times (I, II, III) into the LC-MS.

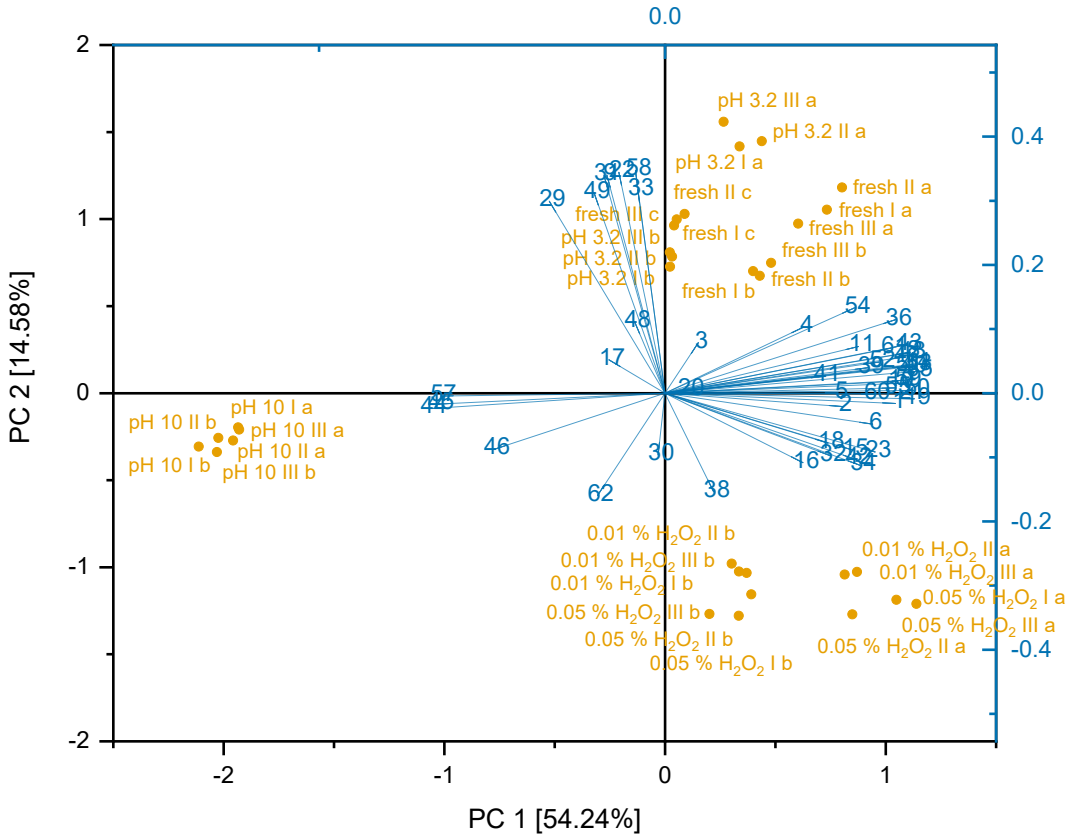


Figure S1. Peptide mapping results of the forced degradation study represented as biplot generated by principal component analysis (PCA). The samples (orange) are shown in two-dimensional space defined by the two principal components PC 1 and PC 2, covering 53.30 % respectively 14.62 % of the total variance. Loadings (blue) represent the influences of the peptides. For PCA the peak areas of the peptides were standardised. Roman numbers (I-III) represent the injection in to the LC-MS of a sample, a, b and c represent independent samples which were processed and tryptically digested on different

s4

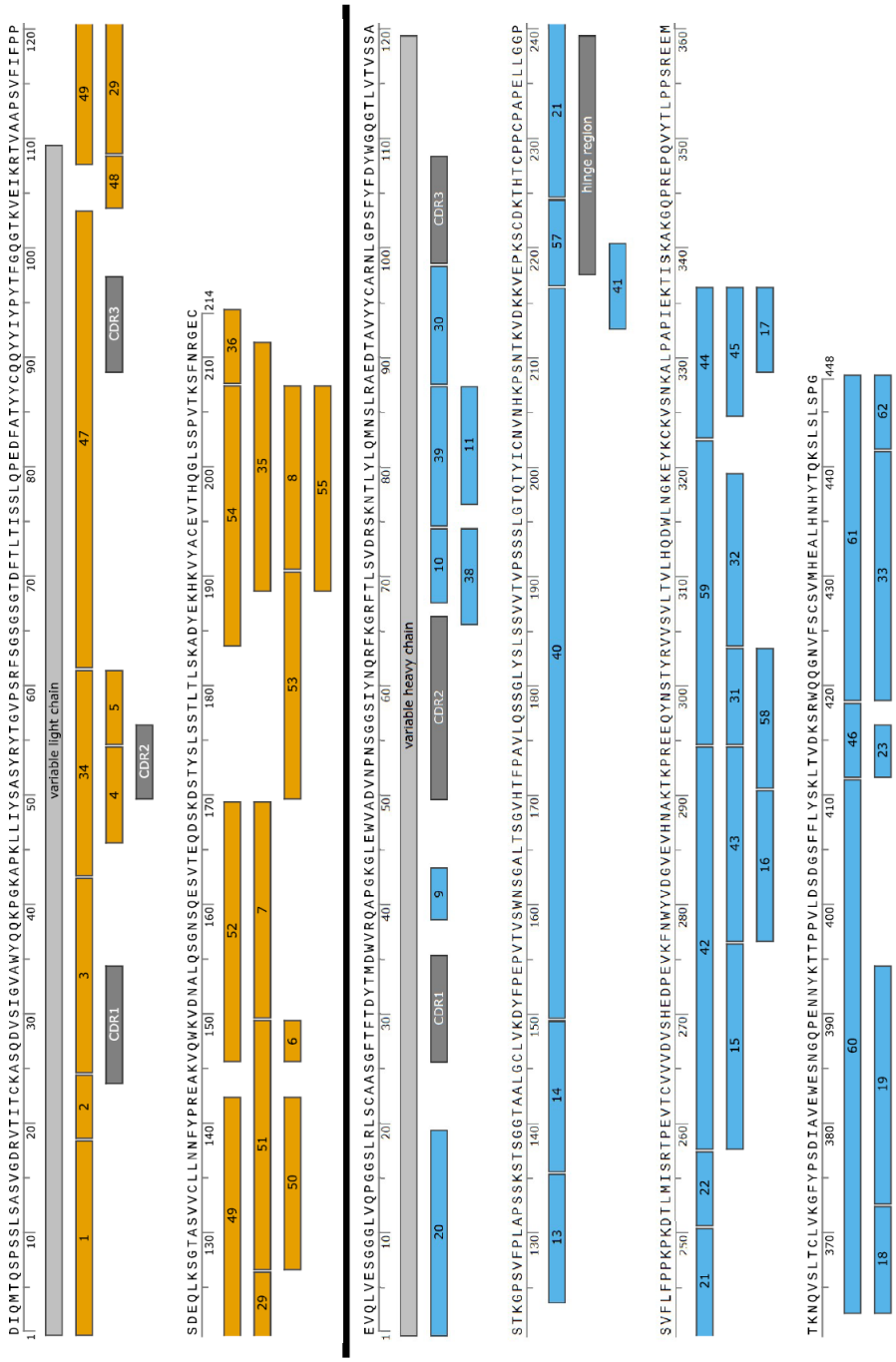


Figure S2. Amino acid sequence of pertuzumab. top: light chain, bottom: heavy chain. Orange and blue boxes represent corresponding peptides after tryptic digestion which were detected via LC-MS/MS. CDR: complementarity-determining regions. [1–3]

s5

Table S2. Peptides and corresponding sequence of the light chain of pertuzumab found via LC-MS/MS after tryptic digestion.

peptide no.	amino acid sequence	amino acid no.
1	DIQMTQSPSSLSASVGDR	1-18
2	VTITCK	19-24
3	ASQDVSIGVAWYQQKPGK	25-42
4	LLIYSASYR	46-54
5	YTGVPSR	55-61
6	VQWK	146-149
7	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	150-169
8	VYACEVTHQGLSSPVTK	191-207
29	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	109-126
34	APKLLIYSASYRYTGVPSR	43-61
35	HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR	189-211
36	SFNRGEC	208-214
47	FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTK	62-103
48	VEIKR	104-108
49	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR	108-142
50	SGTASVVCLLNNFYPR	127-142
51	SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK	127-149
52	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	146-169
53	DSTYSLSSTLTLSKADYEKHK	170-190
54	ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	184-207
55	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	189-207

s6

Table S3. Peptides and corresponding sequence of the heavy chain of pertuzumab found via LC-MS/MS after tryptic digestion.

peptide no.	amino acid sequence	amino acid no.
9	QAPGK	39-43
10	FTLSVDR	68-74
11	NTLYLQMNSLR	77-87
13	GPSVFPLAPSSK	124-135
14	STSGGTAALGCLVK	136-149
15	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	258-276
16	FNWYVDGVEVHNAK	277-290
17	ALPAPIEK	329-336
18	NQVSLTCLVK	363-372
19	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	373-394
20	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	1-19
21	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	225-250
22	DTLMISR	251-257
23	LTVDK	412-416
30	AEDTAVYYCAR	88-98
31	EEQYNSTYR	295-303
32	VVSVLTVLHQDWLNGK	304-319
33	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	419-441
38	GRFTLSVDR	66-74
39	SKNTLYLQMNSLR	75-87
40	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKK	150-216
41	VDKKVEPK	213-220
42	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR	258-294
43	FNWYVDGVEVHNAKTKPR	277-294
44	CKVSNKALPAPIEK	323-336
45	VSNKALPAPIEK	325-336
46	LTVDKSR	412-418
57	VEPKSCDK	217-224
58	TKPREEQYNSTYR	291-303
59	EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	295-322
60	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK	363-411
61	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	418-448
62	SLSLSPG	442-448

s7

Table S4. Location of disulfide bonds in pertuzumab. [4]

disulfide linkage between aa. no. – aa. no.	position	covered by peptide no.
22 – 96	hh	n.c. - 30
23 - 88	ll	2 - 47
134 - 194	ll	49, 50, 51 – 8, 35, 54, 55
146 - 202	hh	14 – 40
228 - 228	hh	57
222 - 214	hl	40 – 36
231 - 231	hh	21
263 - 323	hh	15, 42 - 44
369 - 427	hh	18, 60 – 33, 61

aa.: amino acid. h: heavy chain. l: light chain. n.c.: not covered

s8

In the literature, some peptides respectively regions of the amino acid sequence of IgG1 are already described as sensitive to stress conditions (see Table S5).

Table S5. Sensitive peptides of IgG1.

sample	peptide no.	feature of pertuzumab	type of modification in literature	reference
pH 3.2	15	S=S	oxidation	[5]
pH 10	7		oxidation	[5]
	8	S=S	oxidation	[5,6]
	13		oxidation	[5]
	19	PENNY-sequence	deamidation Hotspot oxidation	[5,7,8]
	21	hinge region S=S	oxidation	[5]
	36	S=S	Cys racemisation oxidation	[5,9]
	50	S=S	oxidation	[5]
0.01 % or 0.05 % H_2O_2	9	vh	oxidation	[5]
	22		oxidation	[5,10]
	31	Asn 299 main glycosylation site	deglycosilation	[5,11]
	33	S=S	oxidation	[5]
	58		oxidation	[5]

S=S: Involved in the formation of disulphide bridges. vh: variable heavy chain

s9

Validation of the reporter gene assay

Figure S3 shows the results of the initial experiments to validate the reporter gene assay. In Figure S3a it can be seen that above a concentration of 0.8 mg/ml pertuzumab, a further increase in concentration does not lead to further signal inhibition. Therefore, pertuzumab was finally used at a concentration of 0.8 mg/ml. Lapatinib demonstrated a good dose-response relationship in our assay and an EC50 value of 35.36 ± 7.03 nM was determined (Figure S3c-d).

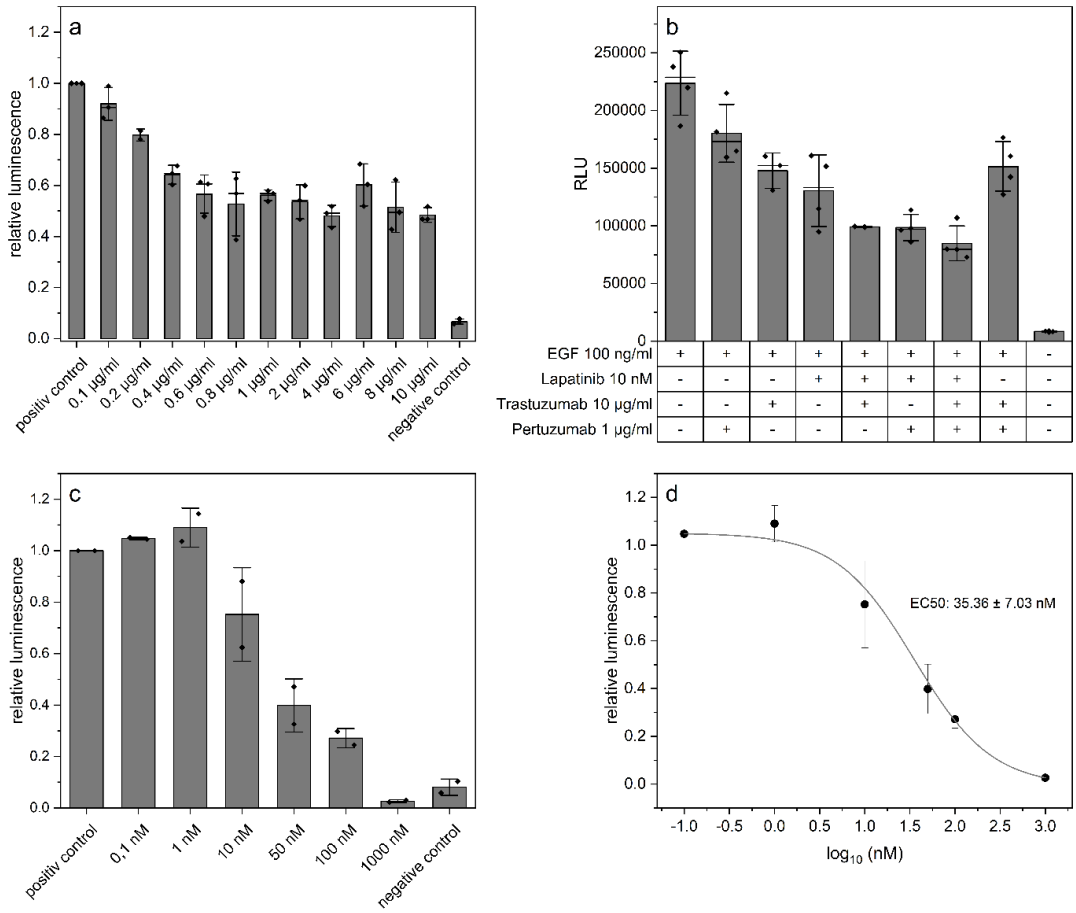


Figure S3. Validation of the reporter gene assay. a: different concentrations of pertuzumab (mean ± sd, $n \geq 2$). b: different HER2 inhibitors. + indicates addition of a substance (mean ± sd, $n = 1$), since lapatinib was dissolved in dimethyl sulfoxide, an equivalent amount of dimethyl sulfoxide was added to all samples. c – d: Different concentrations of lapatinib (mean ± sd, $n = 2$), an equivalent amount of dimethyl sulfoxide was added to all samples. EGF: epidermal growth factor, all concentrations are final concentrations.

s10

Experimental LC-MS/MS

Table S6 (part 1/4). LC-MS/MS transition details of pertuzumab.

Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_r (min)	ionized peptide	peptide no.	CE (V)
322.7	322.7	0.2	VEIKR.+2precursor	48	11.8
322.7	416.3		VEIKR.+2y3		17.8
288.2	288.2	0.6	LTVDK.+2precursor	23	10.1
288.2	262.1		LTVDK.+2y2		22.1
435.7	435.7	1.7	SFNRGEC[Cmc].+2precursor	36	11.3
435.7	522.2		SFNRGEC[Cmc].+2y4		23.3
280.7	280.7	2.0	VQWK.+2precursor	6	10.0
280.7	461.3		VQWK.+2y3		10.0
361.7	362.2	3.3	VTITC[Cmc]K.+2precursor[M+1]	2	10.7
361.7	409.2		VTITC[Cmc]K.+2y3		22.7
390.2	390.2	3.3	YTGVPSR.+2precursor	5	15.1
390.2	359.2		YTGVPSR.+2y3		18.1
633.9	633.9	6.8	VSNKALPAPIEK.+2precursor	45	21.1
633.9	654.4		VSNKALPAPIEK.+2y6		33.1
654.7	654.7	7.7	ASQDVSIGVAWYQQKPGK.+3precursor	3	23.4
654.7	557.3		ASQDVSIGVAWYQQKPGK.+3y5		38.4
712.7	712.7	7.7	VDNALQSGNSQESVTEQDSK.+3precursor	7	23.2
712.7	707.3		VDNALQSGNSQESVTEQDSK.+3y6		23.2
419.8	419.8	7.7	ALPAPIEK.+2precursor	17	10.0
419.8	654.4		ALPAPIEK.+2y6		10.0
712.4	712.4	7.7	THTC[Cmc]PPC[Cmc]PAPELLGGPSVFLFPPKPK. +4precursor	21	24.6
712.4	566.4		THTC[Cmc]PPC[Cmc]PAPELLGGPSVFLFPPKPK.+4y5		33.6
519.3	519.3	7.8	C[Cmc]KVSNKALPAPIEK.+3precursor	44	13.9
519.3	654.4		C[Cmc]KVSNKALPAPIEK.+3y6		25.9
861.7	861.7	7.9	WQQGNVFSC[Cmc]SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG. +4precursor	61	32.1
861.7	862.1		WQQGNVFSC[Cmc]SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG. +4y23+3		32.1
540.8	541.3	8.2	FNWYVDGVEVHNAKTKPR.+4precursor[M+2]	43	16.0
540.8	629.4		FNWYVDGVEVHNAKTKPR.+4y5		25.0
836.4	836.4	8.9	TKPREEQYNSTYR.+2precursor	58	34.0
836.4	721.8		TKPREEQYNSTYR.+2y11+2		46.0

Q1: quadrupole 1 setting (precursor ion), Q3: quadrupole 3 setting (product ion), t_r: retention time, CE: collision energy

s11

Table S6 (part 2/4). LC-MS/MS transition details of pertuzumab.

Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_r (min)	ionized peptide	peptide no.	CE (V)
418.2	418.2	9.0	DTLMISR.+2precursor	22	13.5
418.2	506.3		DTLMISR.+2y4		19.5
390.0	390.0	9.4	TVAAPSVFIFPPSDEQLK.+5precursor	29	11.5
390.0	517.3		TVAAPSVFIFPPSDEQLK.+5y4		17.5
647.8	648.2	9.4	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC[Cmc] LLNNFYPR.+6precursor[M+2]	49	21.4
647.8	648.8		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC[Cmc] LLNNFYPR.+6y10+2		21.4
536.3	536.3	9.5	HKVYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTK.+4precursor	55	15.8
536.3	618.3		HKVYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTK.+4y6		24.8
350.9	351.2	9.7	GRFTLSVDR.+3precursor[M+1]	38	11.8
350.9	389.2		GRFTLSVDR.+3y3		14.8
660.3	660.3	10.5	AEDTAVYYC[Cmc]AR.+2precursor	30	22.4
660.3	407.2		AEDTAVYYC[Cmc]AR.+2y3		37.4
330.7	330.7	10.5	SLSLSPG.+2precursor	62	12.2
330.7	373.2		SLSLSPG.+2a4		12.2
500.3	500.3	10.7	QAPGK.+1precursor	9	14.5
500.3	372.2		QAPGK.+1y4		32.5
397.2	397.5	10.7	EEQYNSTYR.+3precursor[M+1]	31	11.1
397.2	338.2		EEQYNSTYR.+3y2		26.1
550.5	550.7	11.2	ADYEKHKVYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTK. +5precursor[M+1]	54	16.5
550.5	444.3		ADYEKHKVYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTK.+5y4		22.5
419.2	419.2	12.0	FTLSVDR.+2precursor	10	10.0
419.2	476.2		FTLSVDR.+2y4		10.0
482.2	482.2	12.0	VEPKSC[Cmc]DK.+2precursor	57	13.6
482.2	368.2		VEPKSC[Cmc]DK.+2y6+2		22.6
626.3	626.3	12.8	VYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTK.+3precursor	8	19.1
626.3	444.3		VYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTK.+3y4		37.1
893.1	893.4	14.2	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK. +3precursor[M+1]	52	31.9
893.1	806.4		VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK.+3y7		43.9
543.3	543.3	14.7	LLIYSASYR.+2precursor	4	16.6
543.3	583.3		LLIYSASYR.+2y5		31.6

Q1: quadrupole 1 setting (precursor ion), Q3: quadrupole 3 setting (product ion), t_r: retention time, CE: collision energy

s12

Table S6 (part 3/4). LC-MS/MS transition details of pertuzumab.

Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_r (min)	ionized peptide	peptide no.	CE (V)
661.8	661.8	14.7	STSGGTAALGC[Cmc]LVK.+2precursor	14	22.4
661.8	577.3		STSGGTAALGC[Cmc]LVK.+2y5		28.4
662.3	662.3	14.7	HKVYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTKSFNR.+4precursor	35	22.1
662.3	523.3		HKVYAC[Cmc]EVTHQGLSSPVTKSFNR.+4y4		40.1
594.3	594.3	15.3	DSTYSLSSTLTLSKADYEKHK.+4precursor	53	18.7
594.3	553.3		DSTYSLSSTLTLSKADYEKHK.+4y9+2		33.7
593.8	593.8	15.4	GPSVFPLAPSSK.+2precursor	13	19.1
593.8	699.4		GPSVFPLAPSSK.+2y7		28.1
523.3	523.3	15.4	SKNTLYLQMNSLR.+3precursor	39	14.1
523.3	620.3		SKNTLYLQMNSLR.+3y5		23.1
627.0	627.0	15.8	DIQMTQSPSSLSASVGDR.+3precursor	1	19.1
627.0	691.3		DIQMTQSPSSLSASVGDR.+3y7		28.1
792.7	792.7	16.2	NQVSLTC[Cmc]LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSK.+7precursor	60	28.6
792.7	657.4		NQVSLTC[Cmc]LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSK.+7y5		37.6
581.8	581.8	17.1	NQVSLTC[Cmc]LVK.+2precursor	18	18.5
581.8	621.3		NQVSLTC[Cmc]LVK.+2y5		30.5
799.2	799.4	17.7	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYIC[Cmc]NVNHKPSNTKVDKK.+9pr ecursor[M+2]	40	29.0
799.2	617.4		DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYIC[Cmc]NVNHKPSNTKVDKK.+9y5		32.0
799.2	799.5	17.7	FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC[Cmc]QQYYIYP YTFGQGTK.+6precursor[M+2]	47	29.0
799.2	782.0		FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC[Cmc]QQYYIYP YTFGQGTK.+6y18+3		32.0
559.9	559.9	17.8	FNWYVDGVEVHNAK.+3precursor	16	15.9
559.9	469.3		FNWYVDGVEVHNAK.+3y4		33.9
850.4	850.4	17.8	EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK.+4precursor	59	31.5
850.4	849.8		EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK.+4y21+3		31.5
409.7	409.7	17.9	LTVDKSR.+2precursor	46	10.1
409.7	505.3		LTVDKSR.+2y4		25.1
628.0	628.0	18.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLR.+3precursor	20	25.1
628.0	586.3		EVQLVESGGGLVQPGGSLR.+3y6		25.1

Q1: quadrupole 1 setting (precursor ion), Q3: quadrupole 3 setting (product ion), t_r: retention time, CE: collision energy

s13

Table S6 (part 4/4). LC-MS/MS transition details of pertuzumab.

Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_r (min)	ionized peptide	peptide no.	CE (V)
676.9	676.9	18.4	NTLYLQMNSLR.+2precursor	11	23.2
676.9	748.4		NTLYLQMNSLR.+2y6		23.2
701.3	701.6	19.8	WQQGNVFSC[Cmc]SVMHEALHNHYTQK.+4precursor[M+1]	33	24.1
701.3	539.3		WQQGNVFSC[Cmc]SVMHEALHNHYTQK.+4y4		39.1
714.0	714.0	20.0	TPEVTC[Cmc]VVVDVSHEDPEVK.+3precursor	15	23.3
714.0	472.3		TPEVTC[Cmc]VVVDVSHEDPEVK.+3y4		35.3
714.4	714.4	20.1	TPEVTC[Cmc]VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR.+6precursor	42	24.7
714.4	629.4		TPEVTC[Cmc]VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR.+6y5		42.7
714.7	715.1	20.2	APKLLIYSASYRYTGVPSR.+3precursor[M+1]	34	23.3
714.7	515.3		APKLLIYSASYRYTGVPSR.+3y5		41.3
848.7	848.7	24.6	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK.+3precursor	19	29.7
848.7	764.4		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK.+3y6		29.7
890.1	890.5	26.8	SGTASVVC[Cmc]LLNNFYPREAKVQWK.+3precursor[M+1]	51	31.7
890.1	571.3		SGTASVVC[Cmc]LLNNFYPREAKVQWK.+3y9+2		43.7
603.3	603.3	28.1	VVSVLTVLHQDWLNGK.+3precursor	32	18.0
603.3	318.2		VVSVLTVLHQDWLNGK.+3y3		36.0
600.3	600.3	31.0	SGTASVVC[Cmc]LLNNFYPR.+3precursor	50	17.8
600.3	582.3		SGTASVVC[Cmc]LLNNFYPR.+3y4		23.8
471.8	471.8	31.8	VDKKVEPK.+2precursor	41	13.1
471.8	472.3		VDKKVEPK.+2y4		13.1

Q1: quadrupole 1 setting (precursor ion), Q3: quadrupole 3 setting (product ion), t_r: retention time, CE: collision energy

Table S7. LC-MS/MS transition details of angiotensin II.

Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_r (min)	ionized peptide	CE (V)
523.8	523.8	13.7	DRVYIHPF.+2precursor	15.7
523.8	400.2		DRVYIHPF.+2y3	27.7
349.5	349.5		DRVYIHPF.+3precursor	11.8
349.5	263.1		DRVYIHPF.+3y2	20.8

Q1: quadrupole 1 setting (precursor ion), Q3: quadrupole 3 setting (product ion), t_r: retention time, CE: collision energy

s14

Table S8. LC-MS/MS transition details of myoglobin.

Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_r (min)	ionized peptide	CE (V)
636.3	636.3	8.7	LFTGHPETLEK.+2precursor	21.2
636.3	716.4		LFTGHPETLEK.+2y6	33.2
803.9	803.9	13.0	VEADIAGHGQEVLIR.+2precursor	29.4
803.9	814.5		VEADIAGHGQEVLIR.+2y7	47.4
374.7	374.7	14.9	ALELFR.+2precursor	14.4
374.7	435.3		ALELFR.+2y3	20.4

Q1: quadrupole 1 setting (precursor ion), Q3: quadrupole 3 setting (product ion), t_r: retention time, CE: collision energy

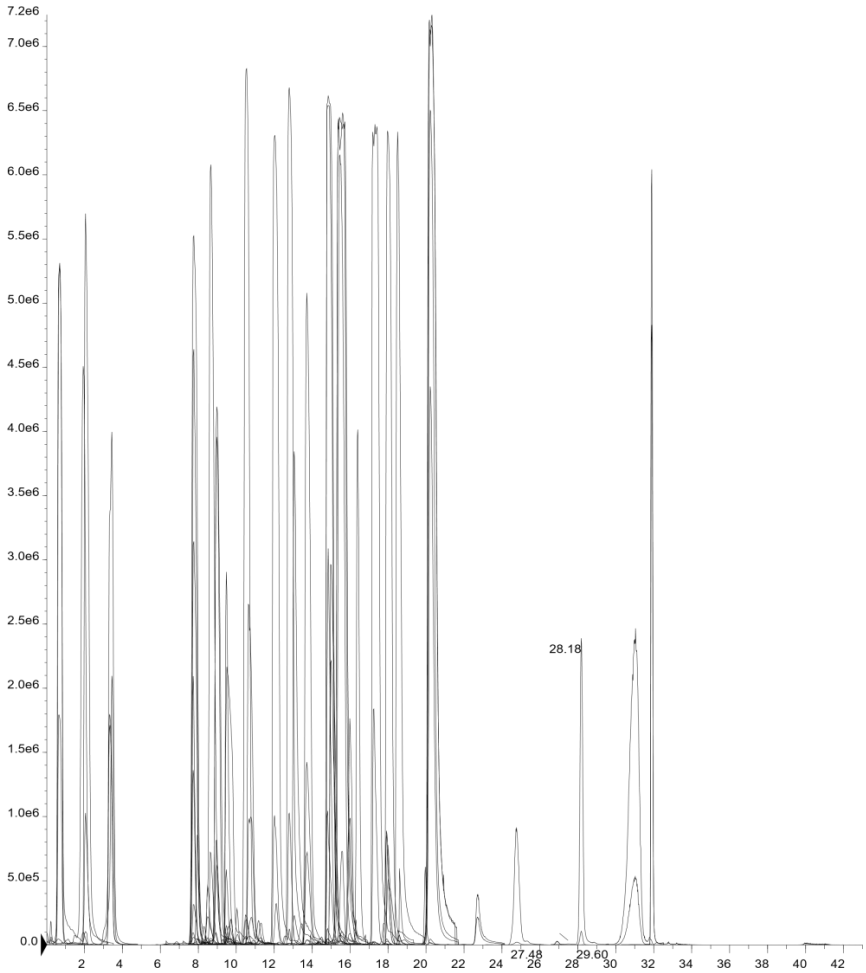


Figure S4. Representative ion chromatogram.

s15

References

[1] C. W. Adams, D. E. Allison, K. Flagella, L. Presta, J. Clarke, N. Dybdal, K. McKeever, M. X. Sliwkowski, *Cancer Immunol Immunother* **2006**, *55*, 717. DOI: 10.1007/s00262-005-0058-x.

[2] D. S. Tomar, L. Li, M. P. Broulidakis, N. G. Luksha, C. T. Burns, S. K. Singh, S. Kumar, *MAbs* **2017**, *9*, 476. DOI: 10.1080/19420862.2017.1285479.

[3] F. F. Vajdos, C. W. Adams, T. N. Breece, L. G. Presta, A. M. de Vos, S. S. Sidhu, *J Mol Biol* **2002**, *320*, 415. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00264-4.

[4] L. A. Gennaro, Y. H. Kao, Y. Zhang, *Pertuzumab variants and evaluation thereof*, *C07K16/30;C07K16/32;G01N33/68* **2019**.

[5] Y. Chen, E. Doud, T. Stone, L. Xin, W. Hong, Y. Li, *MAbs* **2019**, *11*, 1089. DOI: 10.1080/19420862.2019.1625676.

[6] Y. Miyahara, K. Shintani, K. Hayashihara-Kakuhou, T. Zukawa, Y. Morita, T. Nakazawa, T. Yoshida, T. Ohkubo, S. Uchiyama, *Sci Rep* **2020**, *10*, 6333. DOI: 10.1038/s41598-020-63078-5.

[7] S. Sinha, L. Zhang, S. Duan, T. D. Williams, J. Vlasak, R. Ionescu, E. M. Topp, *Protein Sci* **2009**, *18*, 1573. DOI: 10.1002/pro.173.

[8] Q. Yan, M. Huang, M. J. Lewis, P. Hu, *MAbs* **2018**, *10*, 901. DOI: 10.1080/19420862.2018.1478646.

[9] Q. Zhang, G. C. Flynn, *J Biol Chem* **2013**, *288*, 34325. DOI: 10.1074/jbc.M113.506915.

[10] J. T. Shipman, E. P. Go, H. Desaire, *J Am Soc Mass Spectrom* **2018**, *29*, 2041. DOI: 10.1007/s13361-018-2010-2.

[11] C. Lew, J.-L. Gallegos-Perez, B. Fonslow, M. Lies, A. Guttman, *J Chromatogr Sci* **2015**, *53*, 443. DOI: 10.1093/chromsci/bmu229.

8. Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurde eine Stabilitätsstudie für den monoklonalen Antikörper Pertuzumab aus dem Arzneimittel Perjeta vorgestellt. Innerhalb der Stabilitätsstudie wurde eine umfangreiche Auswahl an analytischen Methoden angewendet. Dazu gehörten die visuelle Begutachtung nach Ph. Eur., pH-Wert Messung, Turbidimetrie, Derivativspektroskopie, DLS, SEC, ein LC-MS/MS basiertes Peptide mapping, sowie ein zellbasierter Reportergenassay. Mit diesen Methoden war es möglich die physikalische und chemische Stabilität sowie die biologische Aktivität von Pertuzumab zu untersuchen. Zuvor mussten jedoch einige dieser Methoden etabliert werden. Die Derivativspektroskopie und die SEC konnten zügig für die Stabilitätsstudie optimiert und schließlich validiert werden. Das LC-MS/MS basierte Peptide Mapping und der Reportergenassay erforderten jedoch umfangreichere Optimierungsexperimente und methodische Anpassungen. Insbesondere der Umstieg von einer HPLC-UV basierten Peptide mapping Methode zur LC-MS/MS basierten Methode brachte eine enorme Verbesserung der Aussagekraft bezüglich potenzieller Instabilitäten von Pertuzumab. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit wäre hier die Verwendung der hochaufgelösten Massenspektroskopie. Gleichwohl konnte gezeigt werden, dass mit einer hohen Sequenzabdeckung des Proteins und unter Verwendung von zwei internen Standards auch ein Peptide mapping mit niedrig aufgelöster Massenspektroskopie geeignet ist, um Aussagen zur Stabilität von Proteinen treffen zu können.

Bei der Entwicklung des Reportergenassays stellte die zuverlässige Transfektion von SKBR-3 Zellen die größte Herausforderung dar. Zunächst wurde PEI als Transfektionsreagenz verwendet. Obwohl SKBR-3 Zellen erfolgreich mit PEI transfeziert werden konnten, konnte dieses Transfektionsreagenz aufgrund der geringen Transfektionseffizienz und starker Zelltoxizität letztendlich nicht im Rahmen des Reportergenassays angewandt werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass PEI eine sehr preisgünstige Alternative zu anderen Transfektionsreagenzien darstellt und durchaus zur Transfektion in weniger komplexen Assays angewendet werden kann. Unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000 wurde der Reportergenassay optimiert und schließlich mit Pertuzumab und weiteren Wirkstoffen erfolgreich validiert.

In der Stabilitätsstudie wurden über einen Zeitraum von 42 Tagen die gebrauchsfertigen Infusionslösungen mit einem Gehalt von 1,59 mg/ml Pertuzumab bei einer Lagerung im Kühlschrank, bei Raumtemperatur ohne Lichtschutz und im Klimaschrank bei 50 °C, 75 % relative Luftfeuchtigkeit (rL) untersucht. Zusätzlich wurden die Perjeta-Konzentrate, nachdem die Fläschchen einmal angestochen und geöffnet wurden, nach einer Lagerung im Kühlschrank untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die gebrauchsfertigen Infusionslösungen, welche im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur gelagert wurden über 28 Tage physikochemisch stabil sind. Die Notwendigkeit einer lichtgeschützten Lagerung wie es in der Fachinformation

von Perjeta angegeben ist, konnte nicht bestätigt werden.[81] Diese Daten legen nahe, dass die Infusionsbeutel auch ohne Lichtschutz gelagert werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die einmal geöffneten Perjeta-Konzentrate über einen Zeitraum von 48 Tagen physikochemisch stabil sind. Verglichen mit Pertuzumab eines frisch geöffneten Perjeta-Fläschchens waren alle untersuchten Pertuzumab-Proben in dem Reportergenassay über einen Zeitraum von 28 Tagen gleich wirksam.

Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, Pertuzumab im Voraus zu produzieren und, eine Produktion unter aseptischen Bedingungen vorausgesetzt, bei Raumtemperatur ohne Lichtschutz zu lagern. Dies würde die Verpackung (Lichtschutz heißt in der Regel eine zusätzliche Umhüllung der Infusionsbeutel) und Lagerung von Pertuzumab-Zubereitungen für die herstellenden Apotheken vereinfachen. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass die Lagerung und Nutzung von Perjeta-Restmengen von einmal geöffneten Perjeta-Fläschchen nicht die Stabilität von Pertuzumab beeinflusst und dieses Vorgehen in der Praxis möglich ist. Damit ließen sich erhebliche Kosten einsparen und es kann ein Beitrag zur nachhaltigen Nutzung von aufwendig produzierten und qualitativ hochwertigen Ressourcen, wie sie Arzneimittel darstellen, geleistet werden.

Teil III.

Experimentalteil

9. Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Laborgeräte

In den Tabellen 9.1 bis 9.4 sind die verwendeten Materialien und Geräte aufgelistet. Die HPLC- und LC-MS-Systeme sowie das NMR-Spektrometer sind in separaten Kapiteln aufgeführt.

Tabelle 9.1.: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie oder Reagenz	Bezugsquelle
4-Methylaminoantipyrin (4-MAA)	Sigma-Aldrich, # 92939
Acetonitril (ACN) gradient grade 99,9 %	honeywell, # 34851; VWR, # 34851
Acetonitril (ACN) deuteriert	DEUTERO GmbH
Ameisensäure (FA)	Carl Roth, # 4724.1; VWR, # 84865.180
Ammoniumhydrogencarbonat (ABC)	Carl Roth,# T871.2
Ampicillin (zur Selektion)	Genaxxon BioScience
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, # A9525
Bright Glo	Promega, # E2620
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, # P030.2
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, # A994.1
Dithiotreitol (DTT) 1 M Lösung	Sigma-Aldrich, # 43816
Dual-Luciferase-Reporterassay	Promega, # E1910
Dulbecco's phosphate buffered saline ohne Ca, Mg (DPBS)	PAN Biotech, # P04-36500
Dulbecco's modified eagle's medium mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat, 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat (DMEM-HG)	PAN Biotech, # P04-03590
epidermal growth factor (EGF)	Miltenyi Biotec, # 130-097-750
Essigsäure	Sigma-Aldrich, # 1.00066
Ethanol LC-MS grade	Carl Roth, # 1HP8.1
fetales Kälberserum (FBS)	Gibco, # 10270106
Formaldehyd 37 %	Labochem , # LC-5936.3
Glycerin	Carl Roth, # 3783.1
Guanidin	Carl Roth, # 0037.3
Heregulin-α (HRG)	R&D Systems, # 296-HR
Hoechst 33342	Invitrogen, # H1399
Histidin	Carl Roth, # 1696.1
Iodessigsäure	Sigma-Aldrich, # 14386

Tabelle 9.1.: Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Chemikalie oder Reagenz	Bezugsquelle
Isopropanol	Carl Roth, # 0733.1
Kalibrierlösung pH-Meter	Carl Roth, # A517.1; # P713.1; # 8086.4
LB-Medium Lennox (Pulver)	Carl Roth, # X964.2
Lipofectamin 2000	ThermoFisher, # 11668019
Methanol Gradienten-Qualität HPLC	J.T.Baker
Myoglobin (Pferd)	Sigma-Aldrich, # M1882
Natrium-3-Trimethylsilylpropansulfonat	Sigma-Aldrich, # 178837
Natriumchlorid (Feststoff)	Carl Roth, # HN00.2
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, # K300.2
Natronlauge	Carl Roth, # 6771.3
Opti-minimum essential media (Opti-MEM)	Gibco, # 31985062
Passive Lysis Puffer	Promega, # E1910
Polyethylenimin (PEI)	Alfa Aesar, # 43896
Polysorbat 20 (Tween 20)	Carl Roth, # 9127.1
Proteinstandard-Mix	Sigma-Aldrich, # 69385
Salzsäure	Carl Roth, # 65938
Lapatinib	Sigma-Aldrich, # SML2259
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth, # P088.1
Triethylamin	Carl Roth, # X875.1
Trypsin (Peptide mapping)	Carl Roth, # 2193.1
Trypsin-Lösung (Zellkultur)	PAN Biotech, # P10-029500
Wasser LC-MS grade	VWR, # 83645.320
Wasser deuteriert (D_2O)	DEUTERO GmbH
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, # 9681.4

Tabelle 9.2.: Arzneimittel modifiziert nach Jirschitzka et al.[38]

Wirkstoff	Charge	Handelsname (Hersteller)
Ampicillin + Sulbactam	DA787402; DL253401	Unacid 1,5 g (Pfizer)
Cefazolin	3075900; 3076000; 3117100	Cefazolin-saar 2000 mg i.v. (Chephasaar)
Etacrynsäure	063162; 079178	Reomax 50 mg/20 ml (Bioindustria L.I.M.)

Tabelle 9.2.: Arzneimittel modifiziert nach Jirschitzka et al.[38] (Fortsetzung)

Wirkstoff	Charge	Handelsname (Hersteller)
Furosemid	G0767; J0712; J0273; J1033; K0933	Lasix 20 mg/2 ml (Sanofi-Aventis)
Glucose 50 %	14NE48	Glucosteril 50 % (Fresenius Kabi)
Isotonische Kochsalzlösung (50 ml Polyolefin-Beutel)	13QBS021	freeflex 50 ml (Fresenius Kabi)
Isotonische Kochsalzlösung (Infusionsflaschen, verschiedene Größen)	–	B. Braun Melsungen AG oder Fresenius Kabi
Kaliumchlorid 7,46 %	2000317	Kaliumchlorid-Lösung 7,46 % (SERAG-WIESSNER)
Meropenem	MDEA1230; MDEA1091	Meropenem Hikma 1 g (Hikma Pharma)
Metamizol	U12281A	Novaminsulfon ratiopharm (Ratiopharm)
Natriumhydrogencarbonat 8,4 %	227182	Natriumhydrogencarbonat 1 molar 8,4 % (SERAG-WIESSNER)
Pantoprazol	R6681; R7FE1; R75V1	Pantoprazol EVER Pharma 40 mg (EVER Pharma)
Paracetamol	20185406; 20183403; 21187413	Paracetamol B. Braun 10 mg/ml (B. Braun)
Pertuzumab	H0540H05; H0549H01	Perjeta (Roche)
Trastuzumab	1121878A	Kanjinti (Amgen)
Theophyllin	70601; 80641; 90371	afpred forte-THEO 200 mg (Leyh-Pharma)

Die verwendeten Arzneimittel und Medizinprodukte wurden freundlicherweise von der Krankenhausapotheke des UKSH, Campus Kiel zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9.3.: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
96-Halb-Well Platten (weiß)	Corning, # 3693
24-Well Platten	SARSTEDT, # 83.3922.005
96-Well Platten	SARSTEDT, # 83.3924
C18 ZipTip Pipettenspitzen	ThermoFisher, # 87782
Combi-Stopper	B. Braun Melsungen AG
Falcons (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT, # 62.554.502; # 62547254
Halb-Mikro Küvetten	Brand, # 759150
Kulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2)	SARSTEDT, # 83.1810.002; # 83.3911
Kryo-Gefäße (unsteril)	FluidX
Kryo-Gefäße (steril)	SARSTEDT, # 72.379.992
Perfusor 50 ml	Original Perfusor B. Braun Melsungen AG oder BD Medical Plastipak
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, # 12143
Reaktionsgefäße 0,2 ml	LLG-PCR EYDAM # 6313401
serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	SARSTEDT, # 86.1253.001; # 86.1254.001
Zentrifugalfilter (10 kDa cut-off)	VWR # 516-0229P

Tabelle 9.4.: Laborgeräte

Laborgerät	Bezeichnung
Dewargefäß (Dauerlagerung)	Cryosystem 2000 MVE
Dewargefäß (Transport)	KGW ISOTHERM
Digitalkamera	Sony Cybershot Rx100III
Fluoreszenzmikroskop	Olympus CKX53, U-HGLGPS, DP74
Gefrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Fisher
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr MediLine
Gefrierschrank (-80 °C)	Kryotec
Gefriertrockner	Christ Alpha 2-4 LSCplus
Inkubator	Heraeus Function Line
Inversmikroskop	Olympus CK2
Klimaschrank	weisstechnik
Kühlschrank	Liebherr Mediline
Laminar-Flow Werkbank	Heraeus LaminAir HB2448
pH-Meter	HI 2211 + HI 1053
Photometer	Varian Cary 50 UV-Vis Spektrophotometer Shimadzu 2600
Pipettensauger (Zellkultur)	VACUUBRAND BVC professional

Tabelle 9.4.: Laborgeräte (Fortsetzung)

Laborgerät	Bezeichnung
Plattenleser	Tecan Spark Group
Plattenschüttler	Skyline Shaker DTS-4
Thermoblock	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge Pico
Vortex-Schüttler	LLG-uniTEXER 4
Wasserbad	Büchi
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 10 R

10. Methoden der Kompatibilitätsstudie

10.1. Literaturrecherche der Kompatibilitätsdaten

Es wurde eine Umfassende Literaturrecherche zu bereits publizierten Kompatibilitätsdaten durchgeführt. Dazu wurden die Datenbanken » King Guide « (03/2020), » ASHP Injectable drug information « (06/2020) und » stabilis « (02/2023) durchsucht. Zusätzlich wurde in der Datenbank » pubmed « mit den Stichworten „compatibility“, „incompatibility“, „Y-site“, „stability“ oder „coinfusion“ und dem Namen des Arzneistoffs in englischer oder INN-Schreibweise nach Kompatibilitätsdaten gesucht.

10.2. Probenvorbereitung

Die Handelsnamen und Chargen der verwendeten Arzneistoffe können in Tabelle 9.2 gefunden werden. Alle Arzneistoffe wurden, sofern notwendig mit NaCl rekonstituiert, und gegebenenfalls mit NaCl weiter verdünnt. Etacrynsäure wurde nach Fachinformation mit der beiliegenden Glucose 5 % Lösung rekonstituiert und anschließend mit NaCl weiter verdünnt. Die Arzneistoffe befanden sich zum Testzeitpunkt vor dem jeweiligen Verfallsdatum. Die auf die Minimal-, Maximal- oder Fix-Konzentrationen verdünnten Arzneistofflösungen wurden im Verhältnis 1:1 in 50 ml Perfusoren gemischt. Direkt nach dem Zusammenmischen, sowie nach 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 96 h wurden die Lösungen visuell begutachtet und es wurden Proben für die pH-Wertbestimmung und die turbidimetrischen Messungen entnommen. Zusätzlich wurden direkt nach dem Mischen, sowie nach 2 h, 4 h, 24 h und 96 h 0,4 ml entnommen, in 0,2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, welche wiederum in Kryo-Gefäße gesteckt wurden. Die Kryo-Gefäße samt den Reaktionsgefäßen mit der Probenlösung wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Vermessung an der HPLC bei - 80 °C gelagert.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum (96 h) wurden die Perfusoren mit den Arzneistoffmischungen ständigem Laborlicht (Standard Deckenbeleuchtung) ausgesetzt.

10.3. Visuelle Begutachtung

Das Ph. Eur. beschreibt eine Apparatur zur Prüfung auf sichtbare Partikel (Ph.Eur. 10 2.9.20).[47, S. 496] Diese Apparatur wurde in leicht abgewandelter Form nachgebaut (siehe Abbildung 10.1) und die Perfusoren bzw. die Mischungen wurden damit vor schwarzem und weißem Hintergrund auf Partikel, Verfärbungen, Gasentstehung oder sonstige Auffälligkeiten untersucht. Um potenzielle Veränderungen besser nachvollziehen zu können, wurden alle Proben an jedem Untersuchungszeitpunkt fotografiert (Sony Cybershot Rx100III).

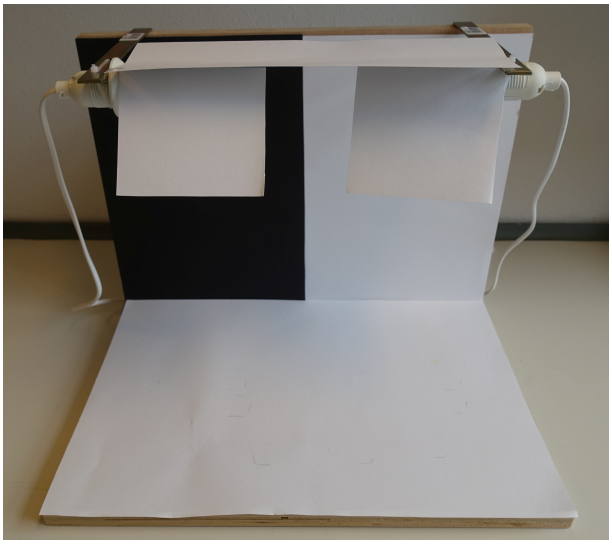


Abbildung 10.1.: Apparatur modifiziert nach Ph. Eur. 10 2.9.20 zur Prüfung auf sichtbare Partikel.

10.4. pH Messung

Die pH-Messungen erfolgten an einem Hanna pH-Meter (HI 2211 + HI 1053). Dazu wurde ein Milliliter der zu untersuchenden Lösung in ein Reagenzglas gegeben und der pH-Wert nach einer Einstellzeit von 10 Minuten abgelesen. Das pH-Meter wurde täglich kalibriert.

10.5. Turbidimetrie

Die turbidimetrischen Messungen der Kompatibilitätsstudie fanden an einem Varian Cary 50 UV-Vis Spektrophotometer statt. Dazu wurden 0,8 ml der zu untersuchenden Lösung in eine Halb-Mikroküvette gefüllt. Die Absorption wurde gegen NaCl bei 350 nm, 410 nm, und 530 nm in Triplikaten vermessen.[5]

10.6. HPLC

Zur Untersuchung der chemischen Kompatibilität wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Das verwendete HPLC-System ist in Tabelle 10.1 aufgeführt. Es wurde eine C18 Säule (Agilent Poroshell 120EC-C18, 2,7 µm, 3,0 mm × 50 mm) mit Vorsäule (Phenomenex SecurityGuard Ultra cartridge, UHPLC C18 3,0 mm + Vorsäulenadapter) verwendet. Eine komplexe Gradientenelution wurde durchgeführt. Fließmittel A bestand aus einem auf pH 3,2 eingestellten 10 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer und Fließmittel B aus einer Mischung bestehend aus Acetonitril (ACN) und 10 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer (pH 3,2) in einem Verhältnis von 60:40 (V/V). Die Flussrate betrug 0,8 ml/min und es wurden 5 µl Probenlösung injiziert. Die Elution begann mit 95 % Fließmittel A für 3 min, gefolgt in einem Wechsel der Zusammensetzung innerhalb von 2 min auf 80 % Fließmittel A und innerhalb von weiteren 13 min zu 40 % Fließmittel A. Diese Fließmittelzusammensetzung wurde für 1 min

beibehalten. Im Anschluss wurde innerhalb einer Minute die Ausgangszusammensetzung wiederhergestellt und das System wurde für 5 min re-equilibriert. Der Säulenofen wurde auf eine Temperatur von 20 °C eingestellt und die Arzneistoffe wurden anhand der Absorption bei 254 nm und 270 nm (Ampicillin und Sulbactam bei 220 nm) detektiert. Die HPLC-

Tabelle 10.1.: Verwendetes HPLC-System

Komponente	Bezeichnung
Entgaser	Biotech Degasi Classic
Pumpe	Waters 1525 binary HPLC pump
Autosampler	Waters 717plus autosampler
Säulenofen	Techlab GmbH
Detektor	Waters 2487 Dual λ absorbance detector
Software	Waters Breeze software (Version 3.3)

Methode wurde nach ICH-Guideline validiert.[101] Die Linearität der Arzneistoffe wurde über eine 5-Punkt Kalibrierung durchgeführt. Präzision und Reproduzierbarkeit wurden durch eine Dreifache Vermessung eines jeden Arzneistoffs jeweils in einer minimalen, mittleren und maximalen Konzentration innerhalb des linearen Bereichs bestimmt. Um den Gefrierprozess der Proben in flüssigem Stickstoff zu validieren, wurden die minimale und maximale Konzentration innerhalb des linearen Bereichs vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen in Triplikaten vermessen und die Wiederfindung bestimmt.

10.7. LC-MS und LC-MS/MS

Ein Agilent 1260 HPLC-System (G1379B 1260 µ-degasser, G1312B bin pump, G1367E 1260 HiP ALS + G1330B, G1316A 1260 TCC, G4212B 1260 DAD) gekoppelt mit einem Bruker Amazon SL Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) mit Ionenfalle und einer MSn-Gruppe stellte das LC-MS System dar. Es wurde ein Gradient mit den Fließmitteln A: 0,2 % Essigsäure in Wasser und B: 0,2 % Essigsäure in Acetonitril benutzt. Der Gradient begann mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem Anteil von 95 % Fließmittel A für 2 min. Innerhalb von 0,5 min wechselte der Anteil von Fließmittel A auf 65 % und in weiteren 3,5 min auf 20 %. Nach einer erneuten Verringerung des Anteils von Fließmittel A auf 3 % blieb die Fließmittelzusammensetzung für 1,5 min konstant. Schließlich wurde die Ausgangszusammensetzung mit einem Anteil von 95 % Fließmittel A innerhalb von 0,5 min wieder hergestellt und das System wurde bei einer erhöhten Flussrate von 1,3 ml/min für 1 min re-equilibriert. Der Säulenofen wurde auf 25 °C eingestellt und es wurde eine Phenomenex Luna 3 µm C18(2) 100 Å, 100 mm × 4,6 mm Säule mit Vorsäule (Phenomenex Security Guard Ultra cartridge, UHPLC C18 3,0 mm + Vorsäulenhalter) benutzt. Die MS wurde im positiven Modus zwischen 2 und 9,2 min zugeschaltet. Zur Bedienung der LC wurde die Software Hystart 3.2 SR 2 und zur Bedienung der MS die Software Bruker Trap

Control 7.0 genutzt. Die MS Daten wurden mit Bruker Data Analysis 4.0 ausgewertet.

10.8. Probenvorbereitung für NMR-Messungen

Die unbekannte Verbindung aus den Mischungen von Etacrynsäure mit Theophyllin wurde in mehreren Läufen mit der in Abschnitt 10.6 beschriebenen analytischen HPLC-Methode isoliert. Die erhaltene Lösung wurde gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde mit D_2O gewaschen, erneut gefriergetrocknet und in einer Mischung aus D_2O und deuteriertem ACN im Verhältnis 1:1 (V:V) aufgenommen. Diese Lösung wurde für alle NMR-Messungen verwendet.

10.9. NMR Spektroskopie

Alle NMR Spektren wurden an einem Bruker Avance III 400 NMR Spektrometer mit einem 5 mm PABBO Breitband Probenkopf und einer z Gradienten Einheit aufgenommen. Die verwendeten Frequenzen für ^{1}H und ^{13}C betrugen 400,33 MHz bzw. 100,66 MHz. Die Vermessung erfolgte bei 298 K mit der Bruker Topspin 3.6.0 Software. Die vom Hersteller angegeben Puls-Programme wurden verwendet und Tuning, Matching und Shimming wurde der Automatik des Spektrometers überlassen. Die Quantifizierung der unbekannten Verbindung konnte mit q^{1}H Messungen unter Verwendung der ERETIC Methode durchgeführt werden.[128] Das HH-COSY wurde mit Unterdrückung des Wassersignals aufgenommen. Des Weiteren wurden ^{1}H^{13}C HSQC- und ^{1}H^{13}C HMBC-Spektren (sowohl mit 6 Hz als auch 12,8 Hz um CH Fernkopplungen besser identifizieren zu können) zur Identifizierung und Strukturaufklärung aufgenommen. Alle Spektren und chemischen Verschiebungen wurden gegen einen externen Standard (Natrium-3-Trimethylsilylpropansulfonat in D_2O) kalibriert.

10.10. HPLC für Metamizol

Es wurde eine im Ph. Eur. angegebene chromatographische Methode verwendet.[47, S. 4744] Das HPLC-System entsprach dabei dem System aus Tabelle 10.1. Als Fließmittel wurde eine 28:72 (V:V) Mischung aus Methanol und einem Puffer bestehend aus einem 4 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer versetzt mit 0,1 % (V/V) Triethylamin mit einem pH von 7 verwendet. Es wurden 10 µl Probenlösung injiziert und bei einer Flussrate von 0,8 ml/min isokratisch an einer C18-Säule (Agilent Poroshell 120EC-C18, 2,7 µm, 3,0 mm × 50 mm) mit Vorsäule (Phenomenex SecurityGuard Ultra cartridge, UHPLC C18 3,0 mm + Vorsäulenadapter) eluiert. Die Detektion erfolgte bei 254 nm und der Säulenofen wurde auf 20 °C beheizt.

11. Methoden der Stabilitätsstudie

11.1. Herstellung und Vorbereitung der Proben

Die Herstellung der Probelösungen wurde innerhalb einer Laminar-Flow Werkbank durchgeführt. Es wurden 4 Lagerungsbedingungen untersucht. Zum einen wurden die applikationsfertigen Perjeta-Zubereitungen mit einer Konzentration von 1,59 mg/ml untersucht, welche im Kühlschrank, bei Raumtemperatur und Lichteinfluss und bei 50 °C, 75 % rL in einem Klimaschrank gelagert wurden. Zum anderen wurden die unverdünnten Konzentrate von einmalig geöffneten Perjeta Fläschchen nach Lagerung im Kühlschrank untersucht. Für jede Lagerungsbedingung wurden drei biologische Replikate hergestellt. Es wurden 50 ml Polyolefin NaCl-Beutel verwendet. Um die genaue Füllmenge der Beutel zu bestimmen, wurden diese vor der Zugabe der Perjeta-Lösung gewogen und die Füllmenge mit den Angaben des Herstellers berechnet. Im Anschluss wurde mit Hilfe einer 3 ml-Spritze soviel Konzentrat in die Beutel gegeben, dass eine Konzentration von etwa 1,59 mg/ml Pertuzumab resultierte. Die befüllten Beutel wurden vorsichtig geschwenkt, um die Lösung zu mischen und in zuvor autoklavierten Beuteln verpackt. Aus einem Perjeta Fläschchen konnten so drei applikationsfertige Infusionsbeutel hergestellt werden. Die restliche Menge (etwa 4 - 5 ml) an Konzentrat verblieb in den Perjeta Fläschchen. Die Einstichstelle der Perjeta Fläschchen wurde mit einem ChemoPlus IVA Sicherheits-Siegel abgedeckt und in Zip-Beuteln verpackt. Direkt nach dem Herstellen der Infusionslösungen (entspricht dem Beginn der Studie) sowie nach 14, 28 und 42 Tagen Lagerung, wurden Proben entnommen. Die Probenentnahme wurde ebenfalls innerhalb der Laminar-Flow Werkbank durchgeführt. Aus den Perjeta Fläschchen wurden mit Hilfe einer 1 ml-Spritze 0,3 ml Konzentrat entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. 265 µl dieser Lösung wurden mit 4735 µl NaCl verdünnt. Die daraus resultierende Lösung enthielt 1,59 mg/ml Pertuzumab und wurde für die weiteren Analysen verwendet. Aus den applikationsfertigen Infusionsbeuteln wurden 5 ml Lösung entnommen und noch innerhalb der Laminar-Flow Werkbank aufgeteilt. 2 ml wurden für die pH- und photometrischen Messungen, 1 ml für das Peptide mapping und die SEC und 100 µl für den Reportergenassay in zuvor beschriftete Reagiergefäße gefüllt. Zusätzlich wurden für die DLS Messungen 0,8 ml der Probenlösung in Halb-Mikroküvetten gefüllt und diese mit einem Deckel verschlossen. Mit den auf 1,59 mg/ml verdünnten, aus den Perjeta-Fläschchen entnommenen Lösungen wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren. Die Infusionsbeutel wurden vor und nach jeder Probenentnahme gewogen, um einen während der Lagerung auftretenden Wasserverlust nachvollziehen zu können.

11.2. Visuelle Begutachtung

Das Vorgehen entspricht der in Abschnitt 10.3 beschriebenen Methode. Es wurden jeweils die Infusionsbeutel bzw. die angebrochenen Perjeta Fläschchen, sowie die in Halb-

Mikroküvetten abgefüllten Lösungen untersucht und zur besseren Nachvollziehbarkeit fotografiert.

11.3. pH Messung

Das Vorgehen entspricht der in Abschnitt 10.4 beschriebenen Methode. Der pH-Wert wurde jedoch bereits nach einer Einstellzeit von 2 min abgelesen.

11.4. Turbidimetrie

Das Vorgehen entspricht der in Abschnitt 10.5 beschriebenen Methode. Jedoch wurde ein Shimadzu 2600 Photometer verwendet.

11.5. Derivativspektroskopie

Für die Derivativspektroskopie wurden die Proben 1:10 mit NaCl verdünnt (Vermessungskonzentration entspricht einem theoretischen Gehalt von 0,159 mg/ml Pertuzumab) und in Halb-Mikroküvetten gefüllt. Von jeder Probe wurden drei Spektren zwischen 250 nm und 320 nm an einem Shimadzu 2600 Photometer aufgenommen. Aus diesen Spektren wurden die Derivativspektren der 2. Ordnung mit der LabSolutions UV-Vis Software berechnet.

11.6. Dynamische Licht Streuung (DLS)

Die Untersuchung der Proben mittels dynamischer Lichtstreuung wurde an einem Malvern Zetasizer Nano ZS durchgeführt. Bedienung und Auswertung erfolgte mit der Zetasizer Nano software v3.30. Die Viskosität der auf 1,59 mg/ml verdünnten Pertuzumablösung sowie der Brechungsindex wurden mit einem AND SV-10 Viskosimeter und einem Carl Zeiss Abbe Refraktometer auf 1,11 mPa/s bzw. 1,33 bestimmt. Die Proben wurden dreifach im automatischen Modus der Software bei einem Detektionswinkel von 173° und bei einer Temperatur von 20 °C vermessen.

11.7. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die SEC wurde an dem in Tabelle 10.1 beschriebenen HPLC-System nach einer modifizierten Methode von Kwong Glover et al. durchgeführt.[100] Es wurde eine TSKgel G2000SWxl Säule (TOSOH Bioscience) benutzt, welche im Säulenofen auf 20 °C temperiert wurde. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. 20 µl der auf 1,59 mg/ml Pertuzumab verdünnten Lösung wurden injiziert. Es wurde ein auf pH 6,2 eingestellter Puffer (0,2 M Natriumphosphat und 0,25 M Natriumchlorid) mit einer Flussrate von 1 ml/min bei isokratischer Elution verwendet. Die SEC-Methode wurde nach ICH Guideline validiert.[101] Die Linearität der Methode wurde mit einer 6-Punkt Kalibrierung bestimmt. Dazu wurde an drei verschiedenen Tagen

frisch geöffnetes Perjeta-Konzentrat verdünnt (0,12 mg/ml, 0,3 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,8 mg/ml und 1,92 mg/ml) und in Triplikaten mittels SEC vermessen. Aus den Mittelwerten der Peakflächen wurde eine Kalibriergerade erstellt. Außerdem wurden die Wiederfindung und die Varianzkoeffizienten berechnet. Zur Abschätzung des Molekulargewichts, von mit dieser Methode vermessenen Molekülen wurde eine Mischung bestehend aus Thyroglobulin (bovin, 670 kDa), γ-Globulin (bovin, 150 kDa), Albumin (Huhn, 44,3 kDa), Ribunuclease A (bovin, 13,7 kDa) und p-Aminobenzoesäure (0,1337 kDa) vermessen. Mit den erhaltenen Retentionszeiten wurde eine Kalibrierkurve erstellt.

11.8. Peptide mapping

11.8.1. Probenaufarbeitung, Verdau, Festphasenextraktion

Es wurde eine von Tokhadze et al. beschriebene Peptide mapping Methode modifiziert.[108] Ein Volumen entsprechend einer Menge von 500 µg Pertuzumab wurde mit 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat (ABC) Puffer pH 8,5 ad 500 µl verdünnt. Für die LC-MS/MS Messungen wurden 400 µg Pertuzumab und 100 µg Myoglobin (in NaCl auf 2 mg/ml rekonstituiert, aliquotiert, bei -80 °C gelagert und für jedes Peptide mapping frisch aufgetaut) gemischt und in gleicher Weise verdünnt. Denaturierung und Reduktion wurden zusammen in einem Schritt durchgeführt. Dazu wurden Guanidin (finale Konzentration 6 M) und eine 1 M Dithiotreitol (DTT) Lösung (finale Konzentration 10 mM) zur Pertuzumablösung hinzugefügt und gemischt. Die Mischung wurde anschließend 1 h bei 37 °C in einem Thermoblock inkubiert. Eine frisch hergestellte Iodessigsäure Lösung (0,5 mg/ml in ABC Puffer pH 8,5) wurde zu dem Reaktionsgemisch gegeben (finale Konzentration 50 mM) und die Mischung 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss fand ein Pufferwechsel zu einem ABC Puffer mit pH 7,6 statt. Dazu wurden 500 µl der Lösung in eine 10 kDa cut-off Zentrifugalfiltereinheit gegeben und diese 10 min bei 14.000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde entfernt, der Überstand mit 450 µl ABC Puffer pH 7,6 vermischt und erneut für 20 min bei 14.000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit 50 µl ABC Puffer pH 7,6 verdünnt und es wurden 140 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine frisch zubereitete Trypsinlösung wurde in einem Massenverhältnis von 1:20 (Trypsin:Protein) hinzugefügt und der Verdau erfolgte über 2 h in einem Thermoblock bei 37 °C. Schließlich wurde der Verdau durch Kühlen der Proben und Hinzugabe von 1 µl TFA (für LC-MS/MS Messungen ohne vorherige Festphasenextraktion 1 µl FA) gestoppt. Die aufgearbeiteten und verdauten Proben wurden bis zur Vermessung bei -80 °C gelagert.
Für die Etablierungsexperimente der LC-MS/MS Methode wurden die verdauten Peptide mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Dazu wurden C18-ZipTip Pipettenspitzen und ein nach den Herstellerangaben modifiziertes Pipettierschema verwendet (siehe Tabelle 11.1). Im Anschluss an die Festphasenextraktion wurden die aufgereinigten Proben unter dem Einfluss eines Stickstoffstroms getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 3 % ACN in

Wasser + 0,1 % FA aufgenommen und bis zur Vermessung an der LC-MS/MS bei -80 °C gelagert.

Tabelle 11.1.: Pipettierschema der Festphasenextraktion mit ZipTip Pipettenspitzen

Pipettierschritt	zu benutzende Lösung
Aktivierung	3 × 10 µl **A**
Equilibrierung	3 × 10 µl **B**
Probe binden	10 × 10 µl Probenlösung (langsam aufnehmen, 10 s in der Pipettenspitze belassen, langsam abgeben)
Waschen	3 × 10 µl **C**
Eluieren	2 × 10 µl **D** + 1 × 10 µl **E**

A: ACN, **B**: 5 % ACN in Wasser + 0,1 % TFA, **C**: 3 % ACN in Wasser + 0,1 % TFA, **D**: 50 % ACN in Wasser + 0,1 % FA, **E**: 70 % ACN in Wasser + 0,1 % FA.

11.8.2. HPLC-UV (Peptide fingerprint)

Das HPLC-System entspricht dem System aus Tabelle 10.1. Es wurde eine Agilent Poroshell 300 SB C18 2,1 µm, 3,0 mm × 75 mm mit Vorsäule (Phenomenex SecurityGuard Ultra cartridge, UHPLC C18 3,0 mm + Vorsäulenadapter) verwendet. Ein linearer Gradient beginnend mit einem Anteil von 95 % Fließmittel A (0,1 %TFA in Wasser) zu 35 % Fließmittel B (0,09 %TFA in ACN) in 120 min wurde verwendet. Im Anschluss erfolgte die Re-Equilibrierung für 10 min. 20 µl der aufgearbeiteten und verdauten Probenlösung wurden injiziert. Die Flussrate wurde auf 1 ml/min und der Säulenofen auf 40 °C eingestellt. Die Detektion erfolgte bei 215 nm und 280 nm.

11.8.3. LC-MS/MS (Peptide mass fingerprint)

Die verdauten und bei -80 °C gelagerten Proben wurden vor der Vermessung frisch aufgetaut. 20 µl dieser Lösung wurden mit 2 µl Angiotensin II Lösung (in Wasser rekonstituiert, auf 2 mg/ml verdünnt, aliquotiert bei -80 °C gelagert und für jede Messung frisch aufgetaut) gemischt und im auf 4 °C eingestellten Autosampler der LC gelagert.

Das Flüssigchromatographie-System bestand aus einer ekspert nanoLC 400 mit nanoLC 425 Pump-Modul (Beladungspumpe: PN5057622 und Gradientenpumpe: PN5057620). Fließmittel A bestand aus 0,1 % FA in Wasser und Fließmittel B aus 0,1 % FA in ACN. Zunächst wurden 2 µl Probenlösung injiziert und mit einer Flussrate von 10 µl/min und einem Fließmittelanteil von 100 % A für 5 min auf eine Trap-Säule (Phenomenex Luna 5 µm, C18(2), 100 Å, 20 x 0.3 mm) geladen. Im Anschluss erfolgte die chromatographische Auftrennung an einer microLC Säule (Phenomenex Kinetex 2.6 µ XB-C18 100 Å, 50 x 0.3 mm) mit einer Flussrate von 7 µl/min und einem Gradienten beginnend mit einem Anteil von 97 % Fließmittel A. Innerhalb von 32 min sank der Anteil von Fließmittel A auf 75 % und in weiteren 3 min auf 5 %. Diese Fließmittelzusammensetzung wurde für 5 min beibehalten, bevor die

ursprüngliche Zusammensetzung von 97 % A innerhalb von 2 min wiederhergestellt und das System für 3 min re-equilibriert wurde.

Die Massenspektrometrische Vermessung wurde an einem AbSciex QTrap5500 im MRM (Multiple Reaction Monitoring) Modus durchgeführt. Die folgenden Einstellungen wurden zur Vermessung vorgenommen. Curtain Gas: 30 ml/min, CAD-Gas: mittel, Ion Spray Voltage: 5500 V, Temperatur Trocknungsgas: 200 °C, Zerstäubergas: 20 psi, Trocknungsgas: 20 psi, Declustering Potential: 80,00 V, Entrance Potential: 10,00 V, Collision Cell Exit Potential: 13,00 V

11.9. Stresstest von Pertuzumab

Pertuzumab wurde mit NaCl auf 1,59 mg/ml verdünnt und je nach Bedingung mit Wasserstoffperoxid (finale Konzentration 0,1 % oder 0,5 %), Natriumhydroxid (finaler pH 10) oder Salzsäure (finaler pH 3,5) versetzt. Die Proben wurden in einem Thermoblock 134 h bei 37 °C unter kontinuierlichem Lichteinfluss (Standard-Laborbeleuchtung) gelagert. Schließlich wurden die Proben mittels Derivativspektroskopie und über das LC-MS/MS basierte Peptide mapping analysiert. Als Kontrolle dienten frisch verdünnte und somit ungestresste Pertuzumab-Proben.

11.10. Zellkultur

11.10.1. Routinemethoden der Zellkultur

Auftauen, Einfrieren, Lagerung

MCF-7 Zellen als Lebendkultur waren ein Geschenk von Linda Heintze (Arbeitskreis Christian Peifer, Pharmazeutisches Institut der CAU Kiel). SKBR-3 Zellen wurden freundlicherweise von Inken Flörkemeier (Arbeitskreis Dirk Bauerschlag, UKSH, Campus Kiel) als Kryokultur zur Verfügung gestellt. Zur Inkulturnahme wurde eine Kryokultur rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, suspendiert und die Zellsuspension in ein auf 37 °C vorgewärmtes mit 7 ml Dulbecco's modified eagle's medium mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat, 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat (DMEM-HG) + 10 % FBS befülltes 15 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 5 ml DMEM-HG + 10 % FBS resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wurde in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche überführt und bis zum nächsten Tag im Inkubator inkubiert. Ein Tag nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel oder je nach Bedarf bereits eine Teilung der Kultur. Experimente wurden frühestens nach einer Woche in Kultur durchgeführt. Aus den kultivierten Zellen wurden mehrere Kryokulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen in 75 cm^2 Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit Dulbecco's phosphate buffered saline ohne Ca^{2+}, Mg^{2+} (DPBS) gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit DMEM-HG + 10 %

FBS versetzt, in 15 ml Falcons überführt und 4 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in zuvor gemischtem Einfriermedium resuspendiert (SKBR-3: 10 % FBS + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in DMEM-HG, MCF-7: 20 % FBS + 10 % DMSO in DMEM-HG). Die Lösung wurde in sterile Kryo-Gefäße aliquotiert. Aus einer 75 cm^2 Kultur wurden 2 Aliquote zu je 1 ml Zellsuspension hergestellt. Die Aliquote wurden in einem Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Thermo Fisher, # 5100-0001) über Nacht bei -80 °C gelagert. Für eine dauerhafte Lagerung wurden die Kryokulturen in die Gasphase eines mit flüssigem Stickstoff befüllten Tanks überführt.

Kultivierung

SKBR-3 und MCF-7 Zellen wurden in mit 10 % FBS versetztem DMEM-HG in 25 cm^2 Kulturflaschen in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und einem CO_2 Gehalt von 5 % kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal in der Woche und die Kulturen wurden bei einer Konfluenz zwischen 70 - 95 % geteilt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 1 ml Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert (SKBR-3: 4 min, MCF-7: 10 min). Die Trypsinaktivität wurde durch Hinzugabe von 1 ml DMEM-HG + 10 % FBS gestoppt, die Zellen mit serologischen Pipetten in sterile 15 ml Falcons überführt und 4 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 1 ml DMEM-HG + 10 % FBS resuspendiert. Die Zellzahl dieser Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt und im Anschluss die für weitere Kulturen oder Experimente benötigte Zellmenge ausgesät.

Der Phänotyp der Zellen wurde regelmäßig mit einem Inversmikroskop überprüft. Neu aufgetaute Zellen wurden auf mögliche Mycoplasmenkontaminationen untersucht (Mycoplasmacheck, eurofinsgenomics). Alle offenen Arbeiten an den Zellen wurden innerhalb einer Laminar-Flow Werkbank durchgeführt.

11.10.2. Übersicht der verwendeten Vektoren

In dieser Arbeit wurden vier Plasmide verwendet.

pEGFP2 war ein Geschenk von Gregor Dombrowsky (Arbeitskreis Marc-Phillip Hitz, Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie, UKSH, Campus Kiel). Abbildung 11.1 zeigt die Vektorkarte dieses Plasmids. pEGFP2 wurde für die Transfektionsstudien benutzt.

pRL-TK (Promega, #E2241) enthält eine unter der Kontrolle des HSV-Thymidinkinase-Promoter stehende Renilla Luciferase und diente als Kontrollvektor. Die Vektorkarte ist in Abbildung 11.2 zu finden.

pFos WT-GL3 war ein Geschenk von Ron Prywes (Addgene plasmid # 11983; http://n2t.net/addgene:11983; RRID:Addgene_11983) und enthält eine unter der Kontrolle des c-fos Promoters stehende Firefly Luciferase (siehe Abbildung 11.3).[117]

HER2 WT war ein Geschenk von Mien-Chie Hung (Addgene plasmid # 16257; http://n2t.

net/addgene:16257; RRID:Addgene_16257) und enthält die Sequenz des HER2 Rezeptors, kontrolliert durch den CMV-Promoter. Die Vektorkarte ist in Abbildung 11.4 dargestellt.[129]

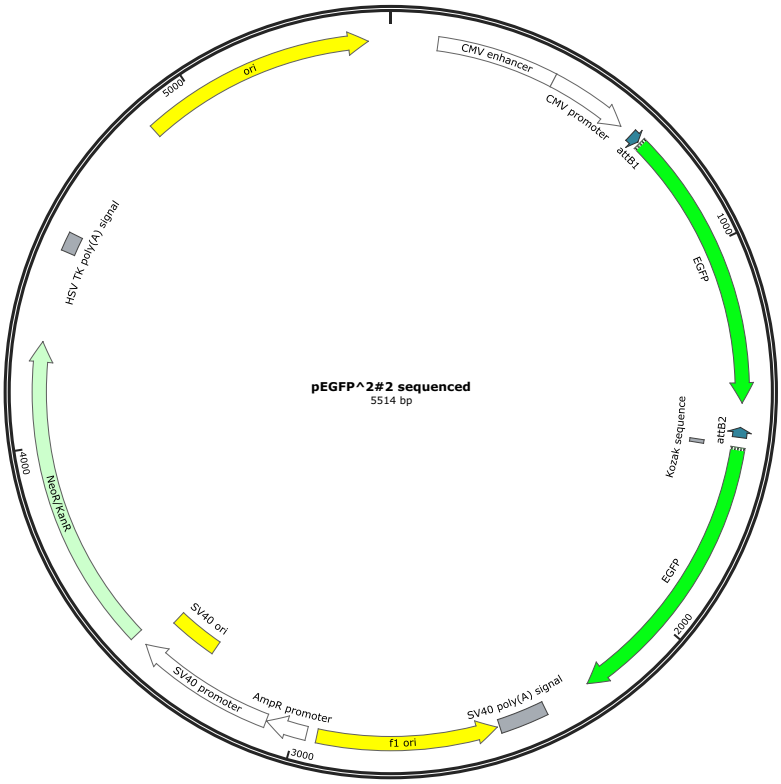


Abbildung 11.1.: Vektorkarte von pEGFP2.

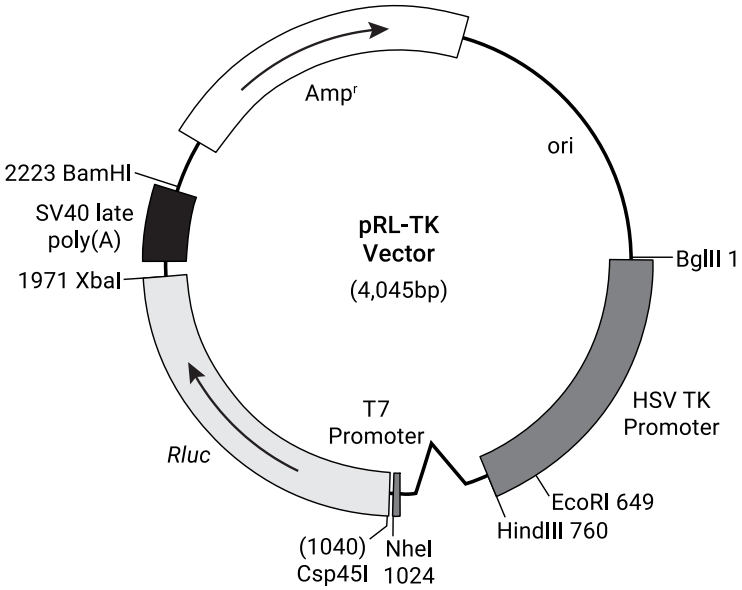


Abbildung 11.2.: Vektorkarte von pRL-TK (Promega, #E2241), GeneBank: AF025846.2.

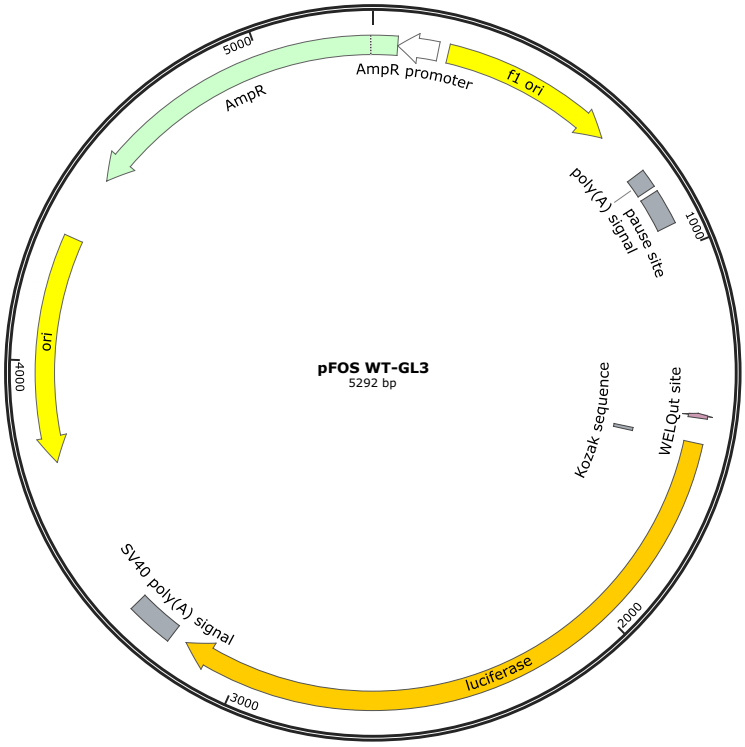


Abbildung 11.3.: Vektorkarte von pFos WT-GL3 (Addgene #11983).

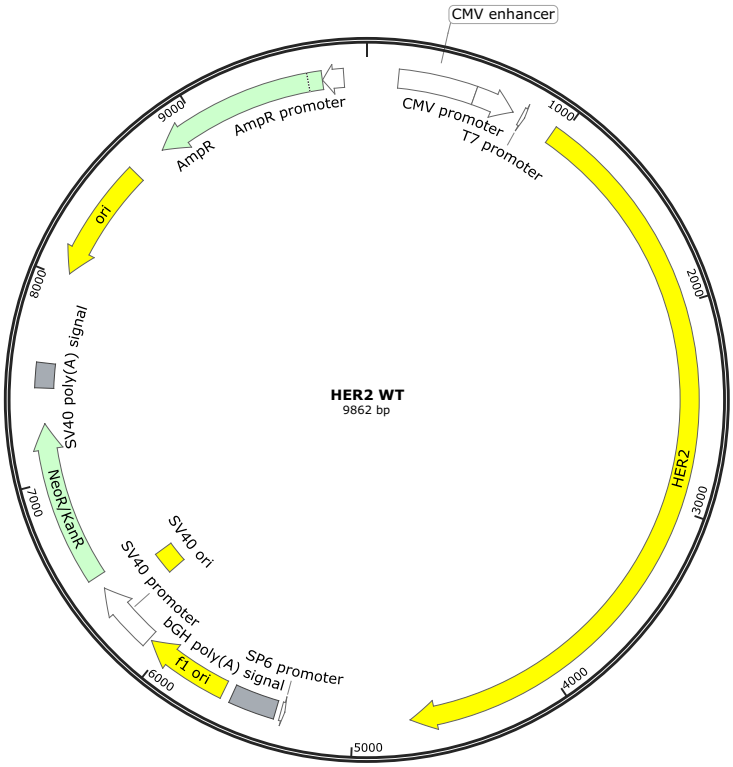


Abbildung 11.4.: Vektorkarte von HER2 WT (Addgene #16257).

Von den Plasmiden pFos WT-GL3 und HER2 WT wurde je ein Glycerolstock (1:1 Mischung aus Glycerol und Bakteriensuspension) in DH5α angelegt. Die Plasmide wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit nach Herstelleranweisung aufgereinigt und die DNA Konzentration sowie die Reinheit mit einem NanoDrop Lite Spektralphotometer bestimmt. Die finalen Validierungsexperimente des Reportergenassays sowie die Assays der Stabilitätsstudie wurden mit Aliquoten der gleichen Charge an aufgereinigten pFos WT-GL3 durchgeführt.

11.10.3. Transfektionsstudien

Es wurden Transfektionsstudien durchgeführt um die Transfektionseffizienz verschiedener Protokolle zu bestimmen und schließlich die optimalen Bedingungen identifizieren zu können. Die Transfektionseffizienz wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und anschließendem Auszählen der transfezierten und untransfezierten Zellen bestimmt. Im folgenden sind jeweils die optimierten Protokolle für die Transfektion mit PEI und Lipofectamin 2000 aufgeführt.

PEI-Transfektion

Die Zellen wurden im batch-forward Verfahren transient transfeziert. Zunächst wurde eine 1 mg/ml konzentrierte PEI Lösung nach dem Protokoll von Tom et al. hergestellt.[130] Diese Lösung wurde aliquotiert und für maximal drei Monate bei -80 °C gelagert. 24 h vor der Transfektion wurden $1{,}6 \cdot 10^6$ Zellen in 4 ml DMEM-HG + 10 % FBS in einer 25 cm^2 Kulturflasche ausgesät und bis zur Transfektion am nächsten Tag im Inkubator inkubiert. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die in Tabelle 7.1 aufgeführten Mengen an PEI und DNA jeweils ad 500 µl mit DMEM-HG ohne FBS verdünnt. Die verdünnte PEI-Lösung wurde mit der verdünnten DNA-Lösung vereinigt, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium der Zellen entfernt, die Zellen mit DPBS gewaschen und es wurden 3 ml DMEM-HG ohne FBS hinzugefügt. Schließlich wurde die PEI-DNA-Mischung vorsichtig auf die Zellen getropft und die Zellen wurden über 4 h im Inkubator inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und die Zellen erneut für 2 h in DMEM-HG + 10 % FBS im Inkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen trypsinisiert (siehe Abschnitt Abschnitt 11.10.1) und die für weitere Experimente benötigte Menge an transfezierten Zellen ausgesät.

Lipofectamin-Transfektion

Die Zellen wurden im batch-forward Verfahren transient transfeziert. In 25 cm^2 Kulturflaschen wurden 22 h vor der Transfektion $2 \cdot 10^6$ Zellen in DMEM-HG + 10 % FBS ausgesät und im Inkubator inkubiert. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden 20 µl Lipofectamin 2000 in 500 µl Opti-minimum essential media (Opti-MEM) gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 8 µg DNA in 500 µl Opti-MEM verdünnt. Beide Lösungen wurden vereinigt, gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 min wurde

die Lipofectamin 2000-DNA Mischung vorsichtig auf die Zellen getropft und die Zellen für 4 h im Inkubator inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen trypsinisiert (siehe Abschnitt Abschnitt 11.10.1) und die für weitere Experimente benötigte Menge an transfezierten Zellen ausgesät.

Hoechst-Färbung und Fixierung

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellkerne der Zellen mit dem Hoechst 33342 Farbstoff angefärbt und die Zellen mit PFA fixiert. Färbung und Fixierung wurden zeitgleich im 24-Well Format durchgeführt. Vor der Färbung wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen. Je Well wurde im Anschluss eine Mischung aus 0,15 µl Hoechst-Stammlösung (10 mg/ml in Aqua), 125 µl 16 %iger PFA-Lösung und 375 µl DPBS auf die Zellen gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt, die fixierten Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und schließlich mit 200 µl DPBS benetzt.

11.10.4. Methoden zur Entwicklung des Reportergenassays (Md.RGA.)

Md.RGA.1

SKBR-3 Zellen oder MCF-7 Zellen wurden mit PEI mit den Vektoren pFos WT-GL3 und pRL-TK im forward Verfahren transient transfeziert. Dazu wurden 24 h vor Beginn der Transfektion 48.000 Zellen je Well einer 96-Well Platte in DMEM-HG + 10 % FBS ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit PEI. Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und das Medium wurde zu DMEM-HG ohne FBS gewechselt. 24 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit den entsprechenden Mengen EGF (mit sterilfiltriertem Wasser rekonstituiert und aliquotiert bei -20 °C gelagert) für 4 h im Inkubator inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 50 µl Passive Lysis Puffer (frisch 1:5 in DPBS verdünnt) 25 min bei 20 °C und 800 rpm in einem Plattenschüttler lysiert. Als Substrat für die Luciferasen wurden die Reagenzien des Dual-Luciferase-Reporterassay Kits (Stop&Glo Reagenz wurde nach Herstellerangaben für jeden Assay frisch hergestellt, Luciferase Assay Substrat wurde nach Herstellerangaben rekonstituiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert) verwendet. 10 µl Zelllysat wurden jeweils mit 10 µl Substrat in einer weißen 96-Halb-Well Platte gemischt und die Lumineszenz sofort im Anschluss mit einem Plattenleser gemessen.

Md.RGA.2

MCF-7 Zellen wurden mit PEI mit den Vektoren pFos WT-GL3 und pRL-TK im batch-forward Verfahren transient transfeziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen, für 2 h mit DMEM-HG + 10 % FBS inkubiert und anschließend trypsinisiert. Je Well einer 96-Well Platte wurden 30.000 Zellen in DMEM-HG ohne FBS

ausgesät. 24 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit den entsprechenden Mengen an EGF für 4 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zelllyse, Substratzugabe und Lumineszenzmessung wie in Md.RGA.1 beschrieben.

Md.RGA.3

MCF-7 Zellen wurden mit PEI mit den Vektoren pFos WT-GL3 und pRL-TK im batch-forward Verfahren transient transfeziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen, für 2 h mit DMEM-HG + 10 % FBS inkubiert und anschließend trypsinisiert. Je Well einer 96-Well Platte wurden 40.000 Zellen in DMEM-HG + 10 % FBS ausgesät. 24 h nach Beginn der Transfektion wurde das Medium zu DMEM-HG ohne FBS gewechselt, die Zellen für weitere 4 h inkubiert, bevor die Zellen mit 100 ng/ml (finale Konzentration) EGF für die angegebenen Inkubationszeiten inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Zelllyse, Substratzugabe und Lumineszenzmessung wie in Md.RGA.1 beschrieben.

Md.RGA.4

MCF-7 Zellen wurden mit PEI mit den Vektoren pFos WT-GL3 und (sofern benötigt) HER2 WT im batch-forward Verfahren transient transfeziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen, für 2 h mit DMEM-HG + 10 % FBS inkubiert und anschließend trypsinisiert. Je Well einer 96-Well Platte wurden 40.000 Zellen in DMEM-HG + 10 % FBS ausgesät. 24 h nach Beginn der Transfektion wurde das Medium zu DMEM-HG ohne FBS gewechselt, die Zellen für 4 h inkubiert, bevor die Zellen schließlich mit Pertuzumab bzw. HRG oder EGF inkubiert wurden. Die Pertuzumab Inkubation erfolgte dabei 30 min vor der Stimulation mit HRG oder EGF. Im Anschluss wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 50 µl Passive Lysis Puffer (frisch 1:5 in DPBS verdünnt) 25 min bei 20 °C und 800 rpm in einem Plattenschüttler lysiert. Je 10 µl Zelllysat und 10 µl Bright-Glo Reagenz (nach Herstellerangaben rekonstituiert, aliquotiert bei -20 °C gelagert und für jeden Assay frisch aufgetaut) wurden in einer weißen 96-Halb-Well Platte gemischt und die Lumineszenz am Plattenleser gemessen.

Md.RGA.5 - optimiertes Protokoll

SKBR-3 Zellen wurden mit Lipofectamin 2000 mit dem Vektor pFos WT-GL3 im batch-forward Verfahren transient transfeziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und es wurden je Well einer 96-Well Platte 35.000 Zellen ad 100 µl DMEM-HG + 2 % FBS ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 22 h im Inkubator wurden die Zellen mit Pertuzumab für 30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Zellen mit EGF (finale Konzentration 100 ng/ml) für 4h. Schließlich wurden die Zellen wie in Md.RGA.1 beschrieben lysiert. Die 96-Well Platte mit den lysierten Zellen wurde bis zur Substratzugabe bei -20 °C gelagert. 15 min vor der Lumineszenzmessung wurden die Platten bei Raumtemperatur aufgetaut. 10 µl Zelllysat wurde mit 10 µl Bright-Glo Reagenz in einer 96-Halb-Well Platte

gemischt und die Lumineszenz am Plattenleser gemessen.

12. Software und Statistik

Die Abbildungen 11.1, 11.3 und 11.4 wurden mit SnapGene erstellt. Die Kristallstruktur in Abbildung 5.2 wurde mit ChimeraX visualisiert. Abbildungen der Graphischen Kurzzusammenfassung bzw. des graphical abstract, sowie die Abbildungen 1.1, 1.2 und 5.2 wurden mit Biorender erstellt. Alle anderen Abbildungen wurden mit R oder OriginPro 2022 erstellt. Statistitische Berechnungen wurden in Excel 2021 oder in OriginPro 2022 durchgeführt. Diese Arbeit wurde in LaTeX erstellt.

Literaturverzeichnis

Literatur

[1] L. A. Trissel, “Institute for Safe Medication Practices Lifetime Achievement Award 2011,” *International journal of pharmaceutical compounding*, Jg. 16, Nr. 1, S. 54–56, 2012, ISSN: 1092-4221.

[2] O. Machotka, J. Manak, A. Kubena und J. Vlcek, “Incidence of intravenous drug incompatibilities in intensive care units,” *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, Jg. 159, Nr. 4, S. 652–656, 2015, ISSN: 1213-8118. DOI: 10.5507/bp.2014.057.

[3] N. R. Marsilio, D. Da Silva und D. Bueno, “Incompatibilidades medicamentosas em centro de tratamento intensivo adulto de um hospital universitário,” *Revista Brasileira de terapia intensiva*, Jg. 28, Nr. 2, S. 147–153, 2016. DOI: 10.5935/0103-507X.20160029.

[4] K. D. B. Leal, R. W. D. Leopoldino, R. R. Martins und L. M. Veríssimo, “Potential intravenous drug incompatibilities in a pediatric unit,” *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, Jg. 14, Nr. 2, S. 185–189, 2016. DOI: 10.1590/S1679-45082016AO3723.

[5] C. Bardin, A. Astier, A. Vulto u. a., “Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: a European consensus conference: Table 1,” *European Journal of Hospital Pharmacy*, Jg. 19, Nr. 3, S. 278–285, 2012, ISSN: 2047-9956. DOI: 10.1136/ejhpharm-2012-000112.

[6] K. Taxis und N. Barber, “Incidence and severity of intravenous drug errors in a German hospital,” *European journal of clinical pharmacology*, Jg. 59, Nr. 11, S. 815–817, 2004, ISSN: 0031-6970. DOI: 10.1007/s00228-003-0689-9.

[7] M. Gikic, E. R. Di Paolo, A. Pannatier und J. Cotting, “Evaluation of physicochemical incompatibilities during parenteral drug administration in a paediatric intensive care unit,” *Pharmacy world & science : PWS*, Jg. 22, Nr. 3, S. 88–91, 2000, ISSN: 0928-1231. DOI: 10.1023/a:1008780126781.

[8] M. Benlabed, A. Martin Mena, R. Gaudy u. a., “Analysis of particulate exposure during continuous drug infusion in critically ill adult patients: a preliminary proof-of-concept in vitro study,” *Intensive care medicine experimental*, Jg. 6, Nr. 1, S. 38, 2018, ISSN: 2197-425X. DOI: 10.1186/s40635-018-0205-2.

[9] F. Flamein, L. Storme, A. Maiguy-Foinard u. a., “Avoid Drug Incompatibilities: Clinical Context in Neonatal Intensive Care Unit (NICU),” *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy*, Jg. 2, Nr. 2, 2017, ISSN: 2365-2411. DOI: 10.1515/pthp-2017-0009.

[10] E. D’Huart, J. Vigneron und B. Demoré, “Physical Compatibility of Intravenous Drugs Commonly Used in Intensive Care Units: An Observational Study and Physical Compatibility Laboratory Tests on Anti-Infective Drugs,” *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy*, Jg. 4, Nr. 1, S. 29–40, 2019, ISSN: 2365-2411. DOI: 10.1515/pthp-2019-0005.

[11] M. P. Neininger, P. Buchholz, W. Kiess, M. Siekmeyer, A. Bertsche und T. Bertsche, “Incompatibilities in paediatric intensive care - pitfalls in drug information,” *Die Pharmazie*, Jg. 73, Nr. 10, S. 605–608, 2018, ISSN: 0031-7144. DOI: 10.1691/ph.2018.8585.

[12] C. Häni, P. Vonbach, C. Fonzo-Christe, S. Russmann, V. Cannizzaro und D. F. Niedrig, “Evaluation of Incompatible Coadministration of Continuous Intravenous Infusions in a Pediatric/Neonatal Intensive Care Unit,” *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG*, Jg. 24, Nr. 6, S. 479–488, 2019, ISSN: 1551-6776. DOI: 10.5863/1551-6776-24.6.479.

[13] G. Marx, E. Muhl, K. Zacharowski und S. Zeuzem, Hrsg., *Die Intensivmedizin* (Springer Reference Medizin), 12. Aufl. 2015. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, ISBN: 978-3-642-54952-6. DOI: 10.1007/978-3-642-54953-3. Adresse: https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-54953-3.

[14] L. Négrier, A. Martin Mena, G. Lebuffe, P. Odou, S. Genay und B. Décaudin, “Strategies to prevent drug incompatibility during simultaneous multi-drug infusion in intensive care units: a literature review,” *European journal of clinical pharmacology*, Jg. 77, Nr. 9, S. 1309–1321, 2021, ISSN: 0031-6970. DOI: 10.1007/s00228-021-03112-1.

[15] Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) am Robert Koch-Institut, “Prävention von Infektionen, die von Gefäßkathetern ausgehen : Teil 1 – Nichtgetunnelte zentralvenöse Katheter Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut,” *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, Jg. 60, Nr. 2, S. 171–206, 2017. DOI: 10.1007/s00103-016-2487-4.

[16] W. Geerts, “Central venous catheter-related thrombosis,” *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, Jg. 2014, Nr. 1, S. 306–311, 2014. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.306.

[17] C. Wall, J. Moore und J. Thachil, “Catheter-related thrombosis: A practical approach,” *Journal of the Intensive Care Society*, Jg. 17, Nr. 2, S. 160–167, 2016, ISSN: 1751-1437. DOI: 10.1177/1751143715618683.

[18] R. R. Johnson und E. V. S. Faustino, “Central venous catheter-associated deep vein thrombosis in critically ill pediatric patients: risk factors, prevention, and treatment,” *Current opinion in pediatrics*, Jg. 34, Nr. 3, S. 273–278, 2022. DOI: 10.1097/MOP.0000000000001128.

[19] A. Puri, H. Dai, M. Giri, C. Wu, H. Huang und Q. Zhao, “The incidence and risk of venous thromboembolism associated with peripherally inserted central venous catheters in hospitalized patients: A systematic review and meta-analysis,” *Frontiers in cardiovascular medicine*, Jg. 9, S. 917 572, 2022, ISSN: 2297-055X. DOI: 10.3389/fcvm.2022.917572.

[20] S. Sriram, S. Aishwarya, A. Moithu, A. Sebastian und A. Kumar, “Intravenous Drug Incompatibilities in the Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital in India: Are they Preventable?” *Journal of research in pharmacy practice*, Jg. 9, Nr. 2, S. 106–111, 2020, ISSN: 2319-9644. DOI: 10.4103/jrpp.JRPP_20_11.

[21] N. K. Bradford, R. M. Edwards und R. J. Chan, “Normal saline (0.9% sodium chloride) versus heparin intermittent flushing for the prevention of occlusion in long-term central venous catheters in infants and children,” *The Cochrane database of systematic reviews*, Jg. 4, S. CD010996, 2020. DOI: 10.1002/14651858.CD010996.pub3.

[22] G. A. Goossens, “Flushing and Locking of Venous Catheters: Available Evidence and Evidence Deficit,” *Nursing research and practice*, Jg. 2015, S. 985 686, 2015, ISSN: 2090-1429. DOI: 10.1155/2015/985686.

[23] J. Hanot, A. R. Dingankar, V. B. Sivarajan, C. Sheppard, D. Cave und G. Garcia Guerra, “Fluid Management Practices After Surgery for Congenital Heart Disease: A Worldwide Survey,” *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, Jg. 20, Nr. 4, S. 357–364, 2019, ISSN: 1529-7535. DOI: 10.1097/PCC.0000000000001818.

[24] E. Schindler, G. J. Schears, S. R. Hall und T. Yamamoto, “Ultrasound for vascular access in pediatric patients,” *Paediatric anaesthesia*, Jg. 22, Nr. 10, S. 1002–1007, 2012. DOI: 10.1111/pan.12005.

[25] G. Schwedler, A. Lindinger, P. E. Lange u. a., “Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in Germany : a study of the Competence Network for Congenital Heart Defects,” *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, Jg. 100, Nr. 12, S. 1111–1117, 2011. DOI: 10.1007/s00392-011-0355-7.

[26] U. Blum, H. Meyer, P. Beerbaum und M. Peuster, *Kompendium angeborene Herzfehler bei Kindern*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2021, ISBN: 978-3-662-61288-0. DOI: 10.1007/978-3-662-61289-7.

[27] D. Ramonfaur, X. Zhang, A. P. Garza, J. F. García-Pons und S. C. Britton-Robles, “Hypoplastic Left Heart Syndrome: A Review,” *Cardiology in review*, Jg. 31, Nr. 3, S. 149–154, 2023. DOI: 10.1097/CRD.0000000000000435.

[28] A. K. Furck, A. Uebing, J. H. Hansen u. a., “Outcome of the Norwood operation in patients with hypoplastic left heart syndrome: a 12-year single-center survey,” *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 139, Nr. 2, S. 359–365, 2010. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.07.063.

[29] I. Michel-Behnke, N. Haas, P. Murin und B. Reich, *S2k-Leitlinie Hypoplastisches Linksherzsyndrom / Hypoplastischer Linksherzkomplex*, Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und angeborene Herzfehler e.V., Hrsg., 2022. Adresse: https://register.awmf.org/assets/guidelines/023-030l_S2k_Hypoplastisches-Linksherzsyndrom-Hypoplastischer-Linksherzkomplex-Kinder-Jugendliche_2023-01.pdf (besucht am 16. 05. 2023).

[30] A. K. Birla, S. Brimmer, W. D. Short u. a., “Current state of the art in hypoplastic left heart syndrome,” *Frontiers in cardiovascular medicine*, Jg. 9, S. 878 266, 2022, ISSN: 2297-055X. DOI: 10.3389/fcvm.2022.878266.

[31] R. Larsen, *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, ISBN: 978-3-662-52986-7. DOI: 10.1007/978-3-662-52987-4.

[32] G. Schumacher, J. Hess und K. Bühlmeyer, *Klinische Kinderkardiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, ISBN: 978-3-540-71900-7. DOI: 10.1007/978-3-540-71901-4.

[33] J.-H. Höpner, A. Schulte, J. Thiessen, M. Knuf und R. G. Huth, “Erstellung einer Kompatibilitätstabelle für die intravenöse Pharmakotherapie auf neonatologischen und pädiatrischen Intensivstationen,” *Klinische Padiatrie*, Jg. 219, Nr. 1, S. 37–43, 2007, ISSN: 0300-8630. DOI: 10.1055/s-2005-836937.

[34] D. W. Newton, “Drug incompatibility chemistry,” *American Journal of Health-System Pharmacy*, Jg. 66, Nr. 4, S. 348–357, 2009, ISSN: 1079-2082. DOI: 10.2146/ajhp080059.

[35] S. Kanji, J. Lam, C. Johanson u. a., “Systematic review of physical and chemical compatibility of commonly used medications administered by continuous infusion in intensive care units,” *Critical care medicine*, Jg. 38, Nr. 9, S. 1890–1898, 2010. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181e8adcc.

[36] G. Castells Lao, M. Rodríguez Reyes, J. Roura Turet, M. Prat Dot, D. Soy Muner und C. López Cabezas, “Compatibilidad de los fármacos administrados en «Y» en las unidades de cuidados intensivos: revisión sistemática,” *Medicina intensiva*, Jg. 44, Nr. 2, S. 80–87, 2020. DOI: 10.1016/j.medin.2018.08.004.

[37] L. Knudsen, S. Eisend, N. Haake und T. Kunze, “Physicochemical compatibility of commonly used analgesics and sedatives in the intensive care medicine,” *European Journal of Hospital Pharmacy*, Jg. 21, Nr. 3, S. 161–166, 2014, ISSN: 2047-9956. DOI: 10.1136/ejhpharm-2014-000444.

[38] S. Jirschitzka, R. Kirstin, E. Swantje und K. Thomas, “Compatibility study of etacrynic acid and theophylline with other commonly used drugs in a paediatric cardiological intensive care unit,” 2023 (Manuskript eingereicht in PTHP am 25.05.2023).

[39] B. P. Kershaw, H. L. Monnier und J. H. Mason, “Visual Compatibility of Premixed Theophylline or Heparin with Selected Drugs for i.v. Administration,” *American Journal of Health-System Pharmacy*, Jg. 50, Nr. 7, S. 1360, 1993, ISSN: 1079-2082. DOI: 10.1093/ajhp/50.7.1360.

[40] L. V. Allen, R. S. Levinson und D. Phisutsinthop, “Compatibility of various admixtures with secondary additives at Y-injection sites of intravenous administration sets,” *American Journal of Health-System Pharmacy*, Jg. 34, Nr. 9, S. 939–943, 1977, ISSN: 1079-2082. DOI: 10.1093/ajhp/34.9.939.

[41] S. Jirschitzka, U. Girreser und T. Kunze, “An Aza-michael Addition Product Causes Incompatibility Between Etacrynic Acid and Theophylline in a Paediatric Cardiological ICU,” *Die Pharmazie*, Jg. 78, Nr. 5, S. 27–30, 2023, ISSN: 0031-7144. DOI: 10.1691/ph.2023.2564.

[42] R. J. Yarwood, W. D. Moore und J. H. Collett, “The influence of the ammonium ion on the stability of ethacrynic acid in aqueous solution,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Jg. 5, Nr. 4, S. 369–378, 1987, ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/0731-7085(87)80043-2.

[43] K. Görlitzer und G. Höbbel, “Zur Reaktion von Etacrynsäure mit Natronlauge,” *Archives of internal medicine*, Jg. 312, Nr. 7, S. 633–634, 1979, ISSN: 0003-9926. DOI: 10.1002/ardp.19793120716.

[44] R. C. A. Isaacs, M. M. Harper und E. C. Miller, “Analytical challenges in the confirmative identification of dipyrone as an adulterant in illicit drug samples,” *Forensic science international*, Jg. 270, S. 185–192, 2017. DOI: 10.1016/j.forsciint.2016.08.023.

[45] M. Levy, E. Zylber-Katz und B. Rosenkranz, “Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites,” *Clinical pharmacokinetics*, Jg. 28, Nr. 3, S. 216–234, 1995, ISSN: 0312-5963. DOI: 10.2165/00003088-199528030-00004.

[46] C. Rémi, “Mischinfusionen in der Palliativmedizin: Kompatibilität und Stabilität palliativmedizinisch-relevanter Arzneimittelmischungen,” Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2017. DOI: 10.5282/edoc.20951. Adresse: https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20951/.

[47] BfArM, *Europäisches Arzneibuch 10. Ausgabe: Amtliche deutsche Ausgabe (Ph. Eur. 10.0)*, 4 Bände und Registerheft im Halskarton. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2020, ISBN: 9783769275155.

[48] K. J. Suda, K. W. Garey und L. H. Danziger, “Treatment failures secondary to drug interactions with divalent cations and fluoroquinolone,” *Pharmacy world & science : PWS*, Jg. 27, Nr. 2, S. 81–82, 2005, ISSN: 0928-1231. DOI: 10.1007/s11096-004-7040-0.

[49] E. J. Cragoe, “(4-(3-(Polyazaheterocyclic)alkanoyl)phenoxy)alkanoic acids,” US3585199 (A), 1971.

[50] Nobel Committee for Physiology or Medicine, *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984*, Nobel Prize Outreach AB 2023, Hrsg., 2023. Adresse: https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1984/summary/ (besucht am 21. 04. 2023).

[51] The Antibody Society, *Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the EU or US*, 2023. Adresse: www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/ (besucht am 24. 03. 2023).

[52] A. Mullard, “FDA approves 100th monoclonal antibody product,” *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 20, Nr. 7, S. 491–495, 2021. DOI: 10.1038/d41573-021-00079-7.

[53] J. M. Reichert, “Marketed therapeutic antibodies compendium,” *mAbs*, Jg. 4, Nr. 3, S. 413–415, 2012. DOI: 10.4161/mabs.19931.

[54] A. Vaisman-Mentesh, M. Gutierrez-Gonzalez, B. J. DeKosky und Y. Wine, “The Molecular Mechanisms That Underlie the Immune Biology of Anti-drug Antibody Formation Following Treatment With Monoclonal Antibodies,” *Frontiers in immunology*, Jg. 11, S. 1951, 2020, ISSN: 1664-3224. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01951.

[55] T. T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer, J. A. Mitchell und A. J. T. George, “The safety and side effects of monoclonal antibodies,” *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 9, Nr. 4, S. 325–338, 2010. DOI: 10.1038/nrd3003.

[56] R.-M. Lu, Y.-C. Hwang, I.-J. Liu u. a., “Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases,” *Journal of biomedical science*, Jg. 27, Nr. 1, S. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12929-019-0592-z.

[57] G. P. Smith, “Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish (Nobel Lecture),” *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, Jg. 58, Nr. 41, S. 14 428–14 437, 2019. DOI: 10.1002/anie.201908308.

[58] G. Winter, “Harnessing Evolution to Make Medicines (Nobel Lecture),” *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, Jg. 58, Nr. 41, S. 14 438–14 445, 2019. DOI: 10.1002/anie.201909343.

[59] Nobel Committee for Chemistry, *The Nobel Prize in Chemistry 2018*, Nobel Prize Outreach AB 2023, Hrsg., 2023. Adresse: https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/ (besucht am 21. 04. 2023).

[60] W. Jaroszewicz, J. Morcinek-Orłowska, K. Pierzynowska, L. Gaffke und G. Węgrzyn, “Phage display and other peptide display technologies,” *FEMS microbiology reviews*, Jg. 46, Nr. 2, 2022. DOI: 10.1093/femsre/fuab052.

[61] Z. Elgundi, M. Reslan, E. Cruz, V. Sifniotis und V. Kayser, “The state-of-play and future of antibody therapeutics,” *Advanced drug delivery reviews*, Jg. 122, S. 2–19, 2017. DOI: 10.1016/j.addr.2016.11.004.

[62] H. Kaplon, S. Crescioli, A. Chenoweth, J. Visweswaraiah und J. M. Reichert, “Antibodies to watch in 2023,” *mAbs*, Jg. 15, Nr. 1, S. 2 153 410, 2023. DOI: 10.1080/19420862.2022.2153410.

[63] B.-K. Jin, S. Odongo, M. Radwanska und S. Magez, “Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics,” *International journal of molecular sciences*, Jg. 24, Nr. 6, 2023. DOI: 10.3390/ijms24065994.

[64] E. Ruiz-López und A. J. Schuhmacher, “Transportation of Single-Domain Antibodies through the Blood-Brain Barrier,” *Biomolecules*, Jg. 11, Nr. 8, 2021. DOI: 10.3390/biom11081131.

[65] G. Walsh und E. Walsh, “Biopharmaceutical benchmarks 2022,” *Nature biotechnology*, Jg. 40, Nr. 12, S. 1722–1760, 2022. DOI: 10.1038/s41587-022-01582-x.

[66] D. Focosi, S. McConnell, A. Casadevall, E. Cappello, G. Valdiserra und M. Tuccori, “Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2,” *The Lancet. Infectious diseases*, Jg. 22, Nr. 11, e311–e326, 2022. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00311-5.

[67] K. Tsumoto, Y. Isozaki, H. Yagami und M. Tomita, “Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies,” *Immunotherapy*, Jg. 11, Nr. 2, S. 119–127, 2019. DOI: 10.2217/imt-2018-0130.

[68] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie* (Springer-Lehrbuch), 7. komplett überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008, ISBN: 978-3-540-76511-0. DOI: 10.1007/978-3-540-76512-7.

[69] I. A. Wilson und R. L. Stanfield, “50 Years of structural immunology,” *The Journal of biological chemistry*, Jg. 296, S. 100 745, 2021. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100745.

[70] World Health Organization. Pharmaceuticals Unit, *WHO guidelines on stability testing of pharmaceutical products containing well-established drug substances in conventional dosage forms*, World Health Organization, Hrsg., 1994. Adresse: https://apps.who.int/iris/handle/10665/62169 (besucht am 21. 04. 2023).

[71] T. Yamada, “Therapeutic monoclonal antibodies,” *The Keio journal of medicine*, Jg. 60, Nr. 2, S. 37–46, 2011. DOI: 10.2302/kjm.60.37.

[72] M. C. Manning, D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne und D. S. Katayama, “Stability of protein pharmaceuticals: an update,” *Pharmaceutical research*, Jg. 27, Nr. 4, S. 544–575, 2010. DOI: 10.1007/s11095-009-0045-6.

[73] Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze, A. Astier und V. Sautou, “Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review,” *Journal of pharmaceutical sciences*, Jg. 109, Nr. 1, S. 169–190, 2020, ISSN: 0022-3549. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.08.009.

[74] A. B. Joshi, M. Sawai, W. R. Kearney und L. E. Kirsch, “Studies on the mechanism of aspartic acid cleavage and glutamine deamidation in the acidic degradation of glucagon,” *Journal of pharmaceutical sciences*, Jg. 94, Nr. 9, S. 1912–1927, 2005, ISSN: 0022-3549. DOI: 10.1002/jps.20405.

[75] Sanofi, *Fachinformation: Lasix 20mg/-40 mg Injektionslösung, Lasix 250 mg Infusionslösung*, Rote Liste Service GmbH, Hrsg., 2018. Adresse: https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media_all/83160.pdf.

[76] R. G. Strickley und W. J. Lambert, “A review of Formulations of Commercially Available Antibodies,” *Journal of pharmaceutical sciences*, Jg. 110, Nr. 7, 2590–2608.e56, 2021, ISSN: 0022-3549. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.03.017.

[77] T. Arakawa und S. N. Timasheff, “Stabilization of protein structure by sugars,” *Biochemistry*, Jg. 21, Nr. 25, S. 6536–6544, 1982, ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00268a033.

[78] B. Bittner, W. Richter und J. Schmidt, “Subcutaneous Administration of Biotherapeutics: An Overview of Current Challenges and Opportunities,” *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, Jg. 32, Nr. 5, S. 425–440, 2018. DOI: 10.1007/s40259-018-0295-0.

[79] J. T. Ryman und B. Meibohm, “Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies,” *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*, Jg. 6, Nr. 9, S. 576–588, 2017. DOI: 10.1002/psp4.12224.

[80] B. M. Fendly, M. Winget, R. M. Hudziak, M. T. Lipari, M. A. Napier und A. Ullrich, “Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product,” *Cancer research*, Jg. 50, Nr. 5, S. 1550–1558, 1990, ISSN: 0008-5472.

[81] Roche, *Perjeta: EPAR - Medicine overview*, EMA/CHMP, Hrsg., 20130402. Adresse: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/perjeta.

[82] Y. Yarden und M. X. Sliwkowski, “Untangling the ErbB signalling network,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jg. 2, Nr. 2, S. 127–137, 2001, ISSN: 1471-0072. DOI: 10.1038/35052073.

[83] N. Harbeck, M. W. Beckmann, A. Rody u. a., “HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer,” *Breast care (Basel, Switzerland)*, Jg. 8, Nr. 1, S. 49–55, 2013, ISSN: 1661-3791. DOI: 10.1159/000346837.

[84] T. Nakakuki, M. R. Birtwistle, Y. Saeki u. a., “Ligand-specific c-Fos expression emerges from the spatiotemporal control of ErbB network dynamics,” *Cell*, Jg. 141, Nr. 5, S. 884–896, 2010. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.054.

[85] G. Tóth, Á. Szőőr, L. Simon, Y. Yarden, J. Szöllősi und G. Vereb, “The combination of trastuzumab and pertuzumab administered at approved doses may delay development of trastuzumab resistance by additively enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,” *mAbs*, Jg. 8, Nr. 7, S. 1361–1370, 2016. DOI: 10.1080/19420862.2016.1204503.

[86] P. Mandó, S. G. Rivero, M. M. Rizzo, M. Pinkasz und E. M. Levy, “Targeting ADCC: A different approach to HER2 breast cancer in the immunotherapy era,” *Breast (Edinburgh, Scotland)*, Jg. 60, S. 15–25, 2021. DOI: 10.1016/j.breast.2021.08.007.

[87] U.S. National Library of Medicine, *ClinicalTrials.gov*. Adresse: https://clinicaltrials.gov (besucht am 21. 04. 2023).

[88] Roche, *Phesgo: EPAR - Medicine overview*, EMA/CHMP, Hrsg., 2021. Adresse: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/phesgo-epar-product-information_de.pdf.

[89] F. Erdmann, C. Spix, A. Katalinic u. a., *Krebs in Deutschland für 2017/2018*, 2021. DOI: 10.25646/8353.

[90] J. S. Ross, E. A. Slodkowska, W. F. Symmans, L. Pusztai, P. M. Ravdin und G. N. Hortobagyi, “The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine,” *The oncologist*, Jg. 14, Nr. 4, S. 320–368, 2009. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0230.

[91] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, 2021, AWMF Registernummer: 032-045OL*, 2021. (besucht am 25. 04. 2023).

[92] NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee, NHS Pharmaceutical Production Committee, NHS Pharmaceutical Aseptic Services Group by the NHS, Pharmaceutical Research and Development Working Group, *Standard Protocol for Deriving and Assessment of Stability – Part 2: Aseptic Preparations (Biopharmaceuticals)*, NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee 2021, Hrsg., 2012. Adresse: https://www.sps.nhs.uk/articles/standard-protocol-for-deriving-and-assessment-of-stability-part-2-aseptic-preparations-biopharmaceuticals/.

[93] H. Mach und C. R. Middaugh, “Simultaneous monitoring of the environment of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine residues in proteins by near-ultraviolet second-derivative spectroscopy,” *Analytical biochemistry*, Jg. 222, Nr. 2, S. 323–331, 1994, ISSN: 0003-2697. DOI: 10.1006/abio.1994.1499.

[94] T. G. Mayerhöfer und J. Popp, “Beer’s Law - Why Absorbance Depends (Almost) Linearly on Concentration,” *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, Jg. 20, Nr. 4, S. 511–515, 2019. DOI: 10.1002/cphc.201801073.

[95] V. Vieillard, A. Astier und M. Paul, “Extended stability of a biosimilar of trastuzumab (CT-P6) after reconstitution in vials, dilution in polyolefin bags and storage at various temperatures,” *Generics and Biosimilars Initiative Journal*, Jg. 7, Nr. 3, S. 101–110, 2018, ISSN: 20336403. DOI: 10.5639/gabij.2018.0703.022.

[96] Q. Lüthi-Peng und Z. Puhan, “Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry,” *Analytica Chimica Acta*, Jg. 393, Nr. 1-3, S. 227–234, 1999, ISSN: 00032670. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00823-X.

[97] A. Savitzky und M. J. E. Golay, “Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures,” *Analytical Chemistry*, Jg. 36, Nr. 8, S. 1627–1639, 1964, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac60214a047.

[98] S. Kuś, Z. Marczenko und N. Obarski, “Derivative UV-VIS Spectrophotometry in Analytical Chemistry,” *Chemia Analityczna*, Jg. 41, S. 899–929, 1996.

[99] S. Jirschitzka, D. Längle, H. Lück, D. Schade und T. Kunze, “Combined physicochemical and functional assessment of pertuzumab integrity supports extended in-use stability,” *Archiv der Pharmazie*, e2300072, 2023. DOI: 10.1002/ardp.202300072.

[100] Z. W. Kwong Glover, L. Gennaro, S. Yadav, B. Demeule, P. Y. Wong und A. Sreedhara, “Compatibility and stability of pertuzumab and trastuzumab admixtures in i.v. infusion bags for coadministration,” *Journal of pharmaceutical sciences*, Jg. 102, Nr. 3, S. 794–812, 2013, ISSN: 0022-3549. DOI: 10.1002/jps.23403.

[101] EMA, *ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures: Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology(CPMP/ICH/381/95)*, 1995. Adresse: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures.

[102] T. M. Maia, A. Staes, K. Plasman u. a., “Simple Peptide Quantification Approach for MS-Based Proteomics Quality Control,” *ACS omega*, Jg. 5, Nr. 12, S. 6754–6762, 2020. DOI: 10.1021/acsomega.0c00080.

[103] O. N. Jensen, A. V. Podtelejnikov und M. Mann, “Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching,” *Analytical Chemistry*, Jg. 69, Nr. 23, S. 4741–4750, 1997, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac970896z.

[104] J. Bongers, J. J. Cummings, M. B. Ebert u. a., “Validation of a peptide mapping method for a therapeutic monoclonal antibody: what could we possibly learn about a method we have run 100 times?” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Jg. 21, Nr. 6, S. 1099–1128, 2000, ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/S0731-7085(99)00181-8.

[105] D. Allen, R. Baffi, J. Bausch u. a., “Validation of peptide mapping for protein identity and genetic stability. Biologics and biotechnology section, pharmaceutical research and manufacturers of America,” *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, Jg. 24, Nr. 3, S. 255–274, 1996, ISSN: 1045-1056. DOI: 10.1006/biol.1996.0034.

[106] D. Chelius, G. Xiao, A. C. Nichols u. a., “Automated tryptic digestion procedure for HPLC/MS/MS peptide mapping of immunoglobulin gamma antibodies in pharmaceutics,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Jg. 47, Nr. 2, S. 285–294, 2008, ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.01.018.

[107] P. J. Villacorta, A. Salmerón-García, D. A. Pelta, J. Cabeza, A. Lario und N. Navas, “Cluster-based comparison of the peptide mass fingerprint obtained by MALDI-TOF mass spectrometry. A case study: long-term stability of rituximab,” *The Analyst*, Jg. 140, Nr. 5, S. 1717–1730, 2015. DOI: 10.1039/c4an01806k.

[108] N. Tokhadze, P. Chennell, Y. Le Basle und V. Sautou, “Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Jg. 150, S. 386–395, 2018, ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.012.

[109] L. W. Dick, D. Mahon, D. Qiu und K.-C. Cheng, “Peptide mapping of therapeutic monoclonal antibodies: improvements for increased speed and fewer artifacts,” *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Jg. 877, Nr. 3, S. 230–236, 2009, ISSN: 1570-0232. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.009.

[110] S. V. Egeland, L. Reubsaet und T. G. Halvorsen, “The pros and cons of increased trypsin-to-protein ratio in targeted protein analysis,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Jg. 123, S. 155–161, 2016, ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.02.011.

[111] S. Hildonen, T. G. Halvorsen und L. Reubsaet, “Why less is more when generating tryptic peptides in bottom-up proteomics,” *Proteomics*, Jg. 14, Nr. 17-18, S. 2031–2041, 2014. DOI: 10.1002/pmic.201300479.

[112] K. El-Sahwi, S. Bellone, E. Cocco u. a., “In vitro activity of pertuzumab in combination with trastuzumab in uterine serous papillary adenocarcinoma,” *British journal of cancer*, Jg. 102, Nr. 1, S. 134–143, 2010. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605448.

[113] R. Nahta, M.-C. Hung und F. J. Esteva, “The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells,” *Cancer research*, Jg. 64, Nr. 7, S. 2343–2346, 2004, ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-3856.

[114] K. Sakai, H. Yokote, K. Murakami-Murofushi, T. Tamura, N. Saijo und K. Nishio, “Pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, inhibits the growth of human lung cancer cells mediated by the HER3 signaling pathway,” *Cancer science*, Jg. 98, Nr. 9, S. 1498–1503, 2007, ISSN: 1347-9032. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00553.x.

[115] B. R. Waterhouse, M. Gijsen, P. R. Barber, I. D. C. Tullis, B. Vojnovic und A. Kong, “Assessment of EGFR/HER2 dimerization by FRET-FLIM utilizing Alexa-conjugated secondary antibodies in relation to targeted therapies in cancers,” *Oncotarget*, Jg. 2, Nr. 9, S. 728–736, 2011. DOI: 10.18632/oncotarget.313.

[116] N. Gaborit, C. Larbouret, J. Vallaghe u. a., “Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) to analyze the disruption of EGFR/HER2 dimers: a new method to evaluate the efficiency of targeted therapy using monoclonal antibodies,” *The Journal of biological chemistry*, Jg. 286, Nr. 13, S. 11 337–11 345, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M111.223503.

[117] B. Cen, A. Selvaraj, R. C. Burgess u. a., “Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes,” *Molecular and cellular biology*, Jg. 23, Nr. 18, S. 6597–6608, 2003, ISSN: 0270-7306. DOI: 10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003.

[118] C. Souriau, P. Fort, P. Roux, O. Hartley, M. P. Lefranc und M. Weill, “A simple luciferase assay for signal transduction activity detection of epidermal growth factor displayed on phage,” *Nucleic acids research*, Jg. 25, Nr. 8, S. 1585–1590, 1997, ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/25.8.1585.

[119] A. Jimeno, P. Kulesza, E. Kincaid u. a., “C-fos assessment as a marker of anti-epidermal growth factor receptor effect,” *Cancer research*, Jg. 66, Nr. 4, S. 2385–2390, 2006, ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2882.

[120] X. Dai, H. Cheng, Z. Bai und J. Li, “Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping,” *Journal of Cancer*, Jg. 8, Nr. 16, S. 3131–3141, 2017, ISSN: 1837-9664. DOI: 10.7150/jca.18457.

[121] S. Venkiteswaran, T. Thomas und T. J. Thomas, “Selectivity of polyethyleneimines on DNA nanoparticle preparation and gene transport,” *ChemistrySelect*, Jg. 1, Nr. 6, S. 1144–1150, 2016, ISSN: 23656549. DOI: 10.1002/slct.201600026.

[122] M. M. Moasser, “The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis,” *Oncogene*, Jg. 26, Nr. 45, S. 6469–6487, 2007, ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1210477.

[123] W.-y. Leung, I. Roxanis, H. Sheldon u. a., “Combining lapatinib and pertuzumab to overcome lapatinib resistance due to NRG1-mediated signalling in HER2-amplified breast cancer,” *Oncotarget*, Jg. 6, Nr. 8, S. 5678–5694, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.3296.

[124] W. Scheuer, T. Friess, H. Burtscher, B. Bossenmaier, J. Endl und M. Hasmann, “Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models,” *Cancer research*, Jg. 69, Nr. 24, S. 9330–9336, 2009, ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4597.

[125] G. E. Konecny, M. D. Pegram, N. Venkatesan u. a., “Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells,” *Cancer research*, Jg. 66, Nr. 3, S. 1630–1639, 2006, ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1182.

[126] F. O'Neill, S. F. Madden, S. T. Aherne u. a., "Gene expression changes as markers of early lapatinib response in a panel of breast cancer cell lines," *Molecular cancer*, Jg. 11, S. 41, 2012. DOI: 10.1007/978-3-642-54953-3.

[127] D. M. Collins, N. T. Conlon, S. Kannan u. a., "Preclinical Characteristics of the Irreversible Pan-HER Kinase Inhibitor Neratinib Compared with Lapatinib: Implications for the Treatment of HER2-Positive and HER2-Mutated Breast Cancer," *Cancers*, Jg. 11, Nr. 6, 2019, ISSN: 2072-6694. DOI: 10.3390/cancers11060737.

[128] S. Akoka, L. Barantin und M. Trierweiler, "Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method," *Analytical Chemistry*, Jg. 71, Nr. 13, S. 2554–2557, 1999, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac981422i.

[129] Y. M. Li, Y. Pan, Y. Wei u. a., "Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis," *Cancer cell*, Jg. 6, Nr. 5, S. 459–469, 2004, ISSN: 1535-6108. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.09.027.

[130] R. Tom, L. Bisson und Y. Durocher, "Transfection of HEK293-EBNA1 Cells in Suspension with Linear PEI for Production of Recombinant Proteins," *CSH protocols*, Jg. 2008, pdb.prot4977, 2008. DOI: 10.1101/pdb.prot4977.

Danksagung

Auf dem Weg der Promotion haben mich zahlreiche Menschen immer wieder ein Stück begleitet, daher möchte ich die Gelegenheit nutzen, Danke zu sagen.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Professor Thomas Kunze bedanken: Thomas, ich danke dir für die konstruktiven Diskussionen, dein Vertrauen und die Freiheit, die du mir gewährt hast, diese Arbeit zu Meiner zu machen. Auch wenn Ergebnisse mal nicht so waren, wie ich sie gern hätte, hast du es (meist) geschafft, mich mit deinem Optimismus anzustecken. Der ein oder andere Segeltörn hat dabei natürlich auch sehr geholfen. Vielen Dank dafür!

Des Weiteren möchte ich Professor Dennis Schade danken: Vielen Dank für deine Unterstützung, während meiner gesamten Promotionszeit. Die Treffen mit dir waren stets produktiv und haben oft auch eine neue Sichtweise gebracht. Ich möchte dir auch für das kontinuierliche nachschleifen des Perjeta-papers danken, das ist wirklich gut geworden!

Ich danke außerdem dem gesamten Team der Krankenhausapotheke des UKSH Campus Kiel: Ohne eure Unterstützung, sei es durch das zur Verfügung stellen von Materialien oder dem fleißigen Sammeln von Perjeta-Fläschchen wäre diese Arbeit nicht gelungen. Auch für die vielen netten Gespräche und Nachfragen, wie die Arbeit denn so läuft, danke ich euch. Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Swantje Eisend: Danke, dass Sie den Stein ins Rollen gebracht und mich mit der Idee zu promovieren infiziert haben - auch wenn ich zwischendurch auf einige Symptome dieser Infektion gern verzichtet hätte.

Dr. Daniel Längle danke ich für die Entwicklung der LC-MS/MS-Methode für das Peptide mapping. Danke für deine Geduld, Zeit und Arbeit die du darein investiert hast. Ein großer Dank geht auch an Dr. Ulrich Girreser. Danke für deine Ideen, deine NMR-Messungen und für deine Nachhilfe im NMR-Spektren-Auswerten.

Jeder, der einmal in der Zellkultur gearbeitet hat, weiß, dass es ein guter Ort zum Verzweifeln ist. Daher danke ich Linda Heintze und Sophia Rixen, für die (trotzdem) entspannte und gute Laborathmosphäre. Till, Daniel, Inken und Theo: danke für eure Tipps und Hilfe, gerade bei den ersten Zellkulturexperimenten.

Sven Wichmann gilt ein besonderer Dank: Danke, dass du für unzählige HPLC-Probleme stets eine Lösung gefunden hast. Während meiner Zeit am Institut habe ich gelernt, was an einer HPLC so alles kaputt gehen kann - dank dir weiß ich, wie man es wieder repariert.

Melissa Zietz und Martin Schütt danke ich für ihre technische Hilfe angefangen beim Gefriertrockner bis zur Versorgung mit flüssigem Stickstoff.

Ich möchte weiterhin meiner Hilfswissenschaftlerin Celine Barbonus danken. Danke fürs Mitdenken und deine tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten der Stabilitätsstudie.

Unserer kleinen, aber feinen Arbeitsgruppe gilt ein großer Dank: Maddi, danke für das wahrscheinlich schönste Büro des gesamten Instituts und die vielen interessanten Gespräche und Diskussionen über Gott und die Welt. Meera, danke dass ich mit dir in der guten alten Wald-Zeit schwelgen konnte. Thommy, danke für deine Unterstützung bei allen technischen Fragestellungen, die vielen Loppo-Kaffees und Diskussionen über die Uni und deren Eigenheiten.

Ilka, Antje, Karsten, Petra, Lena und Meike: danke für die sehr angenehme gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Erst-Semesterpraktikums. Es hat mit euch immer Spaß gemacht, die Studierenden zu betreuen.

Bei den Menschen die das Institut am Laufen halten, vor allem Susanne, Thomas, Kalle, Philipp, Dirk, Volkmar und Detlef möchte ich mich bedanken. Danke, dass ihr für alle Fragen und Wünsche eine Lösung gefunden habt.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, meinen Großeltern und meinen Brüdern danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt haben. Jens, danke für die Beantwortung zahlreicher Nachfragen statistischer Natur. Jan, danke für das Korrekturlesen und deine Anmerkungen.

Da die Promotion nicht ohne das vorherige Studium möglich gewesen wäre, möchte ich mich auch bei Felix, Andre, Anne, Flo, Thea und Julian bedanken. Danke für die schöne gemeinsame Zeit und dass ihr mir zeigt, dass es außerhalb der Promotion auch noch ein Leben gibt.

Schließlich möchte ich mich bei einer Person besonders bedanken: Gregor, ohne dich wären die letzten Jahre so nicht möglich gewesen und diese Arbeit vermutlich nicht entstanden. Danke, dass du an meiner Seite bist.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Professor Thomas Kunze im Fachbereich Klinische Pharmazie am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Zeitraum von November 2018 bis Juni 2023 angefertigt.

Hiermit erkläre ich, Sven Jirschitzka, an Eides statt, dass die Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer nach Inhalt und Form die eigene Arbeit und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Publikation eingereicht. Außer den angegebenen Teilen ist die Abhandlung an keiner anderen Stelle veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Ein akademischer Grad wurde nicht entzogen.

Sven Jirschitzka