

Einleitung

Therapeutisch genutzte Biopharmazeutika insbesondere monoklonale Antikörper haben in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Daten zur physikalisch-chemischen Stabilität der konzentrierten Stammlösungen und verdünnten Infusionslösungen, die über die Angaben in den Fachinformationen hinausgehen, fehlen oft.

Ziel dieser Studie war es, die physikalisch-chemische Stabilität von Infusions-Zubereitungen des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab über einen Zeitraum von 28 Tagen zu bestimmen. Die Integrität und Konzentration von Trastuzumab wurde mit Größenausschlusschromatographie, UV-VIS Spektroskopie und Gelelektrophorese analysiert.

Material und Methoden

Trastuzumab-Lyophilisat (Herceptin®, Roche Pharma AG) wurde mit Wasser für Injektionszwecke auf eine nominelle Konzentration von 7,2 mg/ml gelöst. Das rekonstituierte Trastuzumab-Konzentrat wurde mit 0,9% NaCl-Trägerlösung (freeflex®, Fresenius Kabi) auf therapeutisch übliche Konzentrationen (0,4 und 4,0 mg/ml) verdünnt. Die applikationsfertigen Trastuzumab-Infusionslösungen wurden während des 4-wöchigen Untersuchungszeitraums entweder gekühlt (2-8 °C) oder bei Raumtemperatur (lichtgeschützt / bei Tageslicht) gelagert.

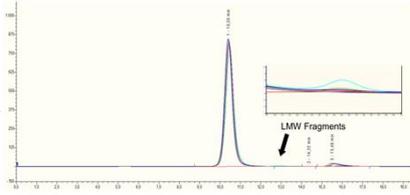
An den Tagen 0 (initial), 1, 3, 7, 14, 21 und 28 wurden Proben aus den Infusionsbehältnissen entnommen. Alle Versuchsschritte von Herstellung, Probenentnahme, bis hin zur Lagerung, fanden unter aseptischen Bedingungen statt. Die Stabilität der Infusionslösungen wurde mittels validierter Größenausschluss-Chromatographie (SE-HPLC), UV/Vis-Spektroskopie und SDS-Page analysiert. Zusätzlich wurde wöchentlich der pH-Wert gemessen und die Lösungen visuell hinsichtlich Farbveränderungen und sichtbaren Partikeln untersucht.

HPLC-Methode

Die Bestimmung der Trastuzumab-Konzentrationen erfolgte in Anlehnung an eine bekannte SE-HPLC-Methode zur Bestimmung von monoklonalen Antikörpern.^{1,2}

Säule:	TSK-Gel G3000SWXL (7,8 mm x 30 cm, Partikelgröße 5 µm)
Fließmittel:	25 % 0,02 M KH ₂ PO ₄ -Lösung 17,5 % 0,2 M NaOH-Lösung 57,5 % Wasser
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektionswellenlänge:	214 nm
Eignung der Methode:	Linearität 0,999577; Richtigkeit 100% ± 0,4; Intraday Präzision [RSD] 0,9% (0,4 mg/ml), 0,2% (1,0 mg/ml), 0,1% (2,0 mg/ml); Interday Präzision [RSD] 2,1% (0,4 mg/ml), 1,3% (1,0 mg/ml), 2,8% (2,0 mg/ml); Forcierte Zersetzung 65°C, pH 1 / pH 13

Abbildung 1:
Chromatogramm von Trastuzumab -
Lösungen zu verschiedenen Zeit-
punkten nach forcierter Zersetzung
bei 65°C (blau – 1h, pink – 2h, braun -
4h, grün – 6h, türkis – 24 h).



SDS-Page

Polyacrylamidgel:	Anamed 4-20% Tris-Glycin-Gel
Laufpuffer:	(10x) 250 mM Tris-base, 1,92 M Glycin, 1% Natrium-dodecylsulfat, pH 8,3
Probenpuffer:	62 mM Tris-base, 10% Glycerin, 2% Natriumdodecyl-sulfat, 0,05% Bromphenolblau, pH 6,8
Red. Probenpuffer:	+ 1% Mercaptoethanol
Färbelösung:	Coomassie® brilliant blue
Eignung der Methode:	Forcierte Zersetzung 65°C, pH 1 / pH 13

Material und Methoden

UV-Vis-Spektroskopie

Eine Parallelbestimmung der Trastuzumab-Konzentrationen erfolgte mit UV-Vis-Spektroskopie.

Detektionswellenlänge: 280 nm

Eignung der Methode: Linearität 0,9968;
Richtigkeit 102,0 ± 0,4%;
Intraday Präzision [RSD] 0,4% (50 µg/ml),
0,6% (100 µg/ml), 0,2% (150 µg/ml);
Interday Präzision [RSD] 6,5% (50 µg/ml),
5,0% (100 µg/ml), 5,6% (150 µg/ml);
Forcierte Zersetzung 65°C, pH1 /pH13

Ergebnisse

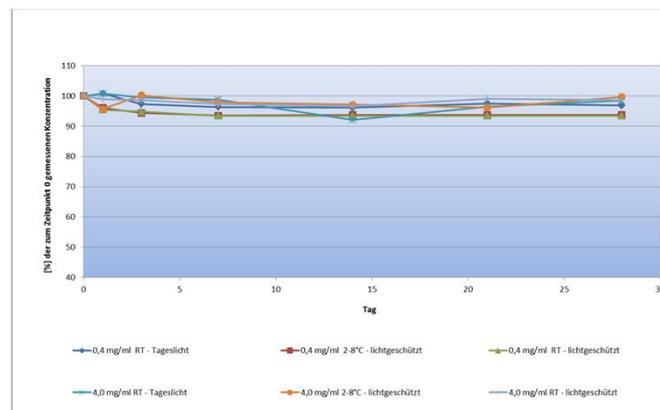


Abbildung 2: Stabilität der Trastuzumab-Infusionslösungen gemäß SE-HPLC unter verschiedenen Lagerbedingungen

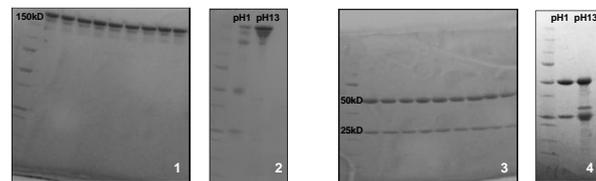


Abbildung 3: Banden in der SDS-Page unter nicht-reduzierenden (1+2) und reduzierenden Bedingungen (3+4). Proben der Trastuzumab-Infusionslösungen an Tag 28 (1+3) im Vergleich zu Banden nach forcierter Zersetzung (2+4). Größensstandard jeweils am linken Bildrand.

Die mittels SE-HPLC und UV-Vis-Spektroskopie (hier nicht dargestellt) gemessenen Trastuzumab-Konzentrationen betragen > 90% der initial gemessenen Konzentration während des gesamten Untersuchungszeitraums von 28 Tagen (Ausnahme: 0,4 mg/mL mit UV-Vis, 14 d). Es wurden keine Abbauprodukte detektiert. Auch im SDS-Gel wurden keine Fragmente oder Abbauprodukte von Trastuzumab festgestellt. Die pH-Werte der Infusionslösungen blieben über den Beobachtungszeitraum stabil zwischen pH 6,2 und 6,4 und es wurden keine Partikelbildung beobachtet. Die Lagertemperatur, und der Lichteinfluss hatten keinen Einfluss auf die Stabilität.

Schlussfolgerungen

Applikationsfertige Trastuzumab-Infusionszubereitungen, hergestellt mit 0,9% NaCl als Trägerlösung, sind unabhängig von den getesteten Lagerbedingungen über einen Zeitraum von 4 Wochen physikalisch-chemisch stabil. Infusionslösungen mit 5% Glucose als Trägerlösung wurden wegen der Gefahr der Proteinaggregation (s. Fachinfo) nicht geprüft. Aus mikrobiologischer Sicht sollte die Lagerung von Trastuzumab-Infusionslösungen bevorzugt kühl erfolgen.

Literatur

- Cleland JL, Lam X, Kendrick B, Yang J, Yang TH, Overcashier D et al.: A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. J Pharm Sci 2001, 90: 310-321.
- Xiao G, Bondarenko PV: Identification and quantification of degradations in the Asp-Asp motifs of a recombinant monoclonal antibody. J Pharm Biomed Anal 2008, 47: 23-30.