

Diplomarbeit

**Nivolumab und Pembrolizumab in der Krebstherapie:
Evaluierung der Machbarkeit einer s.c. Verabreichung**

eingereicht von

Jürgen Götz

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Onkologie

unter der Anleitung von Betreuer

**Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ.et scient.med. MBA Armin
Gerger**

und Zweitbetreuerin

Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat Eva Roblegg

Graz, 02.06.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 02.06.2022

Jürgen Götz eh.

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ.et scient.med. MBA Armin Gerger und meiner Diplomarbeitsbetreuerin Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat Eva Roblegg für ihre Unterstützung bedanken.

Weiters möchte ich mich bei meiner Familie, für die jahrelange Unterstützung während meines Medizinstudiums bedanken, ohne die es unmöglich gewesen wäre diesen Weg einzuschlagen. Ein besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, Großeltern und meiner Frau Sandra, die immer Verständnis und Ruhe ausstrahlten in prüfungsintensiven Phasen. Ich möchte erwähnen, dass ohne meine Großmutter Ludmilla, ich nie auf die Idee gekommen wäre Medizin zu studieren. Die Tatsache, dass sie schwer erkrankte führte mich auch zum Thema dieser Diplomarbeit.

Im Anschluss möchte ich mich auch bei meinem besten Freund Alex bedanken, der mir immer das Gefühl vermittelte, dass ich alles schaffen kann.

Meine Diplomarbeit möchte ich meinem Großvater Josef widmen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	4
3	Ergebnisse.....	5
3.1	Monoklonale Antikörper.....	5
3.1.1	Nomenklatur und Struktur von mAbs	5
3.1.2	Pharmakokinetik von i.v. und s.c. applizierten mAbs.....	7
3.2	MAbs in der Tumorthherapie	8
3.2.1	Malignes Melanom.....	8
3.2.1.1	Epidemiologie	9
3.2.1.2	Ätiologie.....	11
3.2.2	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)	11
3.2.2.1	Epidemiologie	11
3.2.2.2	Ätiologie.....	13
3.3	Wirkmechanismen der PD-1 Checkpoint Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab	14
3.4	s.c. Applikation versus i.v. Applikation am Beispiel Trastuzumab.....	16
3.5	Möglichkeiten der Stabilisierung einer subkutanen Applikationsform	19
3.5.1	Trocknung.....	21
3.5.2	Saccharide.....	22
3.5.3	Puffer-Systeme	24
3.5.4	Enzyme	25
3.5.5	Tenside/Surfactants	25
4	Diskussion	27
4.1	Konklusion.....	30
5	Literaturverzeichnis	32

Abkürzungsverzeichnis

i.v.	intravenös
s.c.	subkutan
FDA	food and drug administration
AK	Antikörper
mAbs	monoklonale Antikörper
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
NSCLC	nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
EMA	European Medicines Agency
ASR	Age-standardised rate (altersstandartisierte Rate)
IgG4	Immunglobulin G4
PD-1	programmiertes Zelltodprotein 1
PD-L1	programmiertes Zelltodprotein 1 Ligand 1
PD-L2	programmiertes Zelltodprotein 1 Ligand 2
EGFR	epidermal growth factor receptor
Bspw	beispielsweise
Fc	kristallisierbares Fragment
Fab	antigenbindendes Fragment
CDR1	komplementaritätsbestimmende Region 1
CDR2	komplementaritätsbestimmende Region 2
CDR3	komplementaritätsbestimmende Region 3
Ag	Antigen
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
FcRn	neonataler kristallisierbarer Fragment Rezeptor
MHC	major histocompatibility complex
HER 2	human epidermal growth receptor 2
mg	Milligramm
ml	Milliliter
m²	Quadratmeter

kg	Kilogramm
FD	Freeze-Drying/ Gefriertrocknung
SD	Sprühtrocknung
T_g	Glasübergangstemperatur der gefriergetrockneten Probe
cP	Centipoise
iP	isoelektrischer Punkt
α	Alpha
aTTP	thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura
ICH	Internationalen Conference on Harmonisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktur eines Antikörpers erstellt mit BioRender (20,24,25)	6
Abbildung 2 Melanom, altersstandardisierte jährliche Inzidenz und Mortalität in Abhängigkeit von Geschlecht, geographischer Region und Entwicklung (62).....	9
Abbildung 3 Weltweite, altersstandardisierte jährliche Inzidenz des Melanoms in Abhängigkeit des Alters (62).....	11
Abbildung 4 Inzidenz und Mortalität des Lungenkrebses (67)	12
Abbildung 5 Wirkmechanismus (69)	14
Abbildung 6 Übersicht der Studie über die Präferenz der Applikationsart bei Trastuzumab Therapie, selbsterstellt mit BioRender.com (79).....	17

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung der in Phase 3 befindlichen mAbs (8)	1
Tabelle 2 Darstellung der Vor- und Nachteile der s.c. bzw. i.v. Applikation (81)	30

Zusammenfassung

Hintergrund. Die Zahl an neuen Biologika, die Proteine (und monoklonale Antikörper), Nukleinsäuren oder auch genetisch veränderte humane Zellen enthalten und von den Behörden wie der Food and Drug Administration (FDA) und der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) für den Arzneimittelmarkt zugelassen werden, nimmt stetig zu. Es wird prognostiziert, dass diese Gruppe von Arzneimitteln zukünftig die Top 100 der Medikamente auf dem Markt dominieren wird. Leider gibt es zum jetzigen Zeitpunkt Herausforderungen in der Herstellung bzw. Art der Applikation, da Biologika eine hohe Sensitivität aber auch Komplexität aufweisen. Um diese reproduzierbar und kostengünstig herzustellen und gleichzeitig die Stabilität zu gewährleisten, können herkömmliche pharmazeutisch technologische Methoden und Technologien oftmals nicht verwendet werden. Weiters ist die Hauptapplikationsroute parenteral, genauer gesagt intravenös, da die fragilen Strukturen leicht durch Enzyme abgebaut werden. Die intravenöse Applikation weist jedoch einen zusätzlichen Stressfaktor für PatientInnen auf, die Einführung in die Vene kann problematisch sein und der Wirkeintritt erfolgt ausschließlich rasch. Auch die Gesundheitskosten aufgrund des nötigen medizinischen Personals sind hoch. Eine Verabreichung, die von PatientInnen selbst durchgeführt werden kann, wäre daher ein Lösungsansatz, um die Bereitschaft zur aktiven Mitwirkung der therapeutischen Maßnahmen zu steigern.

Material und Methoden. Für diese Diplomarbeit wurden Studien, Fachbücher, medizinische Journale und wissenschaftliche Artikel recherchiert, um den Stand der Technik im Bereich Biologika zusammenzufassen. Als Literaturdatenbank wurde PubMed herangezogen, da die meisten der wissenschaftlichen Studien frei zugänglich sind (Zugang über die Universität Graz). Für die Erstellung der Abbildungen wurde das Programm BioRender benutzt. Aufgrund der Vielzahl der am Markt befindlichen Checkpoint-Inhibitoren beschäftigt sich diese Arbeit mit den zwei häufigsten Vertretern, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, Pembrolizumab und Nivolumab. Da beide intravenös verabreicht werden, wird am Beispiel von Trastuzumab die subkutane Applikation als alternative Verabreichungsrouten erklärt.

Ziel Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, basierend auf Studien zu evaluieren, ob eine subkutane Applikationsform von Nivolumab und Pembrolizumab möglich und auch nützlich wäre.

Abstract

Background: The number of new biologics, which contain proteins (and monoclonal antibodies), nucleic acids or even genetically modified human cells and are approved for the drug market by authorities such as the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA), is steadily increasing. It is predicted that this group of drugs will dominate the top 100 drugs on the market in the future. Unfortunately, at this point in time, there are challenges in the manufacturing or method of application, as biologics have a high sensitivity but also complexity. Accordingly, in order to manufacture them in a reproducible and cost-effective manner while ensuring stability, conventional pharmaceutical technological methods and technologies often cannot be used. Furthermore, the main route of application is parenterally, or more precisely intravenously, as the fragile structures are easily degraded by enzymes. However, intravenous application has an additional stress factor for the patient, the insertion into the vein can be problematic and the onset of action is exclusively rapid. Healthcare costs due to the necessary medical staff are also high. An administration that can be performed by patients themselves would therefore be a potential approach to increase the willingness of patients to actively participate in the therapeutic measures.

Material and Methods: For this thesis, studies, reference books, medical journals and scientific articles were searched to summarize the state of the art in the field of biologics. PubMed was mainly used as a database since most of the scientific studies are freely available (access via the University of Graz). The program BioRender was used to create the figures. Due to the large number of antibodies on the market, this thesis focuses on the two most common antibodies used in tumor therapy, i.e., pembrolizumab and nivolumab. Since both are administered intravenously, the example of trastuzumab is used to explain subcutaneous administration as an alternative route of administration.

Aim: The aim of this thesis is to obtain different studies and opinions of scientists and based on them to evaluate if and how it would be feasible to administer the two representatives Pembrolizumab and Nivolumab for example subcutaneously. For this purpose, the advantages and disadvantages are carefully evaluated.

1 Einleitung

Die europäische Gesetzgebung definiert ein Biologikum als „Ein Arzneimittel, das einen oder mehrere Wirkstoffe biologischen Ursprungs enthält“(1) Diese Wirkstoffe können biotechnologisch in lebenden Systemen, wie etwa Mikroorganismen, Pflanzen- oder Tierzellen hergestellt werden. Dazu zählen neben Nucleinsäuren, therapeutischen Proteinen und (monoklonalen) Antikörpern (monoclonal Antibody, mAb) auch humane Zellen sowie Impfstoffe (z.B. Grippe, Tetanus). Mittlerweile werden jährlich mehr als zehn neue Biologika von den Behörden zugelassen, 2021 waren es beispielsweise 14 (2–5). Es sind 94 FDA und 82 EMA zugelassene mAb gelistet (6–8). Die Top 10 der meistverkauften Biologika im Jahr 2016 umfassten fünf mAb und 1 Fc-Fusionsprotein und generierten einen weltweiten Umsatz von \$53.599 Mio. Studien prognostizieren, dass Biologika bis 2023 50% der Top 100 Medikamente ausmachen werden. Adalimumab (Handelsname: Humira), ein mAb gegen Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) ist der aktuelle Spitzenreiter unter den meistverkauften Produkten weltweit. Der am zweithäufigsten verwendete mAb ist Pembrolizumab, (Handelsname: Keytruda©). Während Adalimumab vor allem bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt wird, stellt Pembrolizumab einen wichtigen Checkpoint-Inhibitor in der Krebsimmuntherapie dar. Eine Auflistung der in der Phase 3 befindlichen monoklonalen Antikörper zeigt Tabelle 1 (8).

Tabelle 1 Auflistung der in Phase 3 befindlichen mAbs (8)

Name	Molekulare Form	Zielrezeptoren	Krankheitsgebiet
Omburtamab	Murin IgG1	B7H3	Neuroblastom und Leptomeningeale Metastasen
Oregovomab	Murin IgG1	CA125	Epithelialer Ovarialtumor
Ublituximab	Chimer IgG1	CD20	Chronische lymphatische Leukämie, Non-Hodgkin Lymphom, Multiple Sklerose
Felzartamab	Humane IgG1	CD38	Multiples myelom
Magrolimab	Humanisierter IgG4	CD47	Myelodysplastisches Syndrom

Zelbetuximab	Chimer IgG1	Claudin-18-2	Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs
Amivantamab	Human IgG1	EGFR	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
Bemarituzumab	Humanisierter IgG1	FGFR2b	Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs
Disitamab	Humanisierter IgG1	HER2	Urothelkarzinom, Mammakarzinom, Magenkarzinom
Feladilimab	Humanisierter IgG4	ICOS	Kopf und Hals Plattenepithelkarzinom
Monalizumab	Humanisierter IgG4	NKG2A	Kopf/Hals Tumoren
Retifanlimab	Humanisierter IgG4	PD-1	Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Plattenepithelkarzinom des Analkanals
Sasanlimab	Humanisierter IgG4	PD-1	Nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom
Penpulimab	Humanisierter IgG1	PD-1	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Hepatozelluläres Karzinom, Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs
Adebrelimab	Humanisierter IgG4	PD-L1	Kleinzelliges- und nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
Sugemalimab	Human IgG4	PD-L1	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Ösophageales

			Plattenepithelkarzinom, Hodgkin Lymphom, Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs
Tiragolumab	Human IgG1	TIGIT	Kleinzelliges- und nicht- kleinzelliges Lungenkarzinom, Ösophaguskarzinom, Ösophageales Plattenepithelkarzinom
Sabatolimab	Humansierter IgG4	TIM-3	Myelodysplastisches Syndrom

Trotz des schnellen Wachstums von mAbs weisen sie ein hohes Risiko an Misserfolgen auf, da speziell die Formulierung, Herstellung und Stabilisierung sehr schwierig und vor allem die Kosten durch zeitintensive präklinische und klinische Studie sehr hoch sind. Dadurch haben mAbs ihr volles Potential noch nicht voll ausgeschöpft (3–5)(9).

Im Rahmen dieser Arbeit wird speziell auf Nivolumab und Pembrolizumab, die am häufigsten eingesetzten mAbs zur Behandlung von malignem Melanom und Lungenkarzinom eingegangen. Im ersten Teil der Arbeit wird die Nomenklatur und Struktur von Antikörpern erklärt und die Pharmakokinetik diskutiert. Im zweiten Teil der Arbeit wird kurz auf das maligne Melanom und das nicht kleinzellige Lungenkarzinom eingegangen und anschließend die genauen Wirkmechanismen von Nivolumab und Pembrolizumab besprochen. Danach wird die subkutane Applikation am Beispiel Trastuzumab diskutiert. Im vorletzten Teil der Arbeit wird die Möglichkeit einer subkutanen Applikation anhand von Hilfsstoffen evaluiert, um danach im letzten Teil der Arbeit Rückschlüsse auf eine subkutane Applikationsformulierung von Pembrolizumab und Nivolumab zu ziehen.

2 Material und Methoden

Für diese Diplomarbeit wurden Studien, Fachbücher, medizinische Journale und wissenschaftliche Artikel recherchiert, um den Stand der Technik im Bereich Biologika zusammenzufassen. Als Literaturlatenbank wurde PubMed und Google Scholar herangezogen, da die meisten der wissenschaftlichen Studien frei zugänglich sind (Zugang über die Universität Graz). Als Suchbegriffe wurden „subcutaneous application of monoclonal Antibodies, antibodies to watch, HER-2 study, FDA, ICH, EMA, EZM, subcutaneous layer Nivolumab, Pembrolizumab, Trastuzumab, nomenclature of monoclonal antibodies, stability problems of monoclonal antibodies, onkopedia melanoma and NSCLC, antibody structure, instability and formulation, antibody therapeutics approved, enhancement of antibody functions through Fc multiplications, human antibody increasing, improvement of pharma pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies, pharmacodynamic and pharmacokinetic of monoclonal antibodies, physiochemical and biochemical factors influencing the pharmacokinetics of antibody therapeutics, Implications of monoclonal antibody therapeutics use for clinical laboratory testing, humanized monoclonal antibodies, antibody freeze-drying formulations, n-glycosylation and thermal stability, opposite i.v. and s.c. application of mAbs, dosage finding for subcutaneous application, monoclonal antibodies, checkpoint inhibitors, PrefHer study, animal testing antibody therapy“ verwendet. Es wurden ausschließlich peer reviewed Publikationen für die Evaluierung herangezogen. Für die Erstellung der Abbildungen wurde das Programm BioRender benutzt. Aufgrund der Vielzahl der am Markt befindlichen Antikörper, beschäftigt sich diese Arbeit mit den beiden Checkpoint-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab. Da beide intravenös verabreicht werden, wird am Beispiel von Trastuzumab die subkutane Applikation als technische Möglichkeit bei gleicher Wirksamkeit untersucht. Weiters wurden auch verschiedenste Hilfsstoffe und Verfahren evaluiert, die bereits bei subkutanen Applikationsmöglichkeiten anderer auf dem Markt befindlicher mAbs als Formulierungsbestandteile verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Monoklonale Antikörper

3.1.1 Nomenklatur und Struktur von mAbs

Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden können, werden in fünf verschiedene Klassen eingeteilt. Diese werden IgA, IgD, IgE, IgG und IgM genannt. Dabei kann die Bezeichnung auf die Art der schweren Kette, die die Antikörper enthalten, zurückgeführt werden. Diese schweren Ketten werden nach den jeweiligen griechischen Anfangsbuchstaben eingeteilt in alpha, delta, epsilon, gamma und micro. Der größte Anteil, der auf dem Markt befindlichen monoklonalen Antikörper, ist jener aus der Klasse der IgGs und deren Subkategorien 1-4 (10–15).

Proteine repräsentieren die größte Klasse der biologisch medizinischen Produkte, wobei mAbs zu der größten Kategorie zählen. Die Nomenklatur der mAbs erfolgt je nach Ursprung. Dabei wird jeder mAb mit einem **Unterstamm A** und einen **Unterstamm B** klassifiziert. Unterstamm A stellt den Angriffspunkt und/oder die zu behandelnde Krankheit (beispielsweise tu(m) für Tumor, oder li(m) für Lymphozyten)) dar. Bei Unterstamm B handelt es sich um die Art des Antikörpers (16,17). Des Weiteren erhält jeder Antikörper die Endung -mab. Je nach Entwicklungsursprung werden dem -mab ein oder mehrere Buchstaben hinzugefügt. So spricht man bei der Endung -zumab (**Pembrolizumab**) von humanisierten Antikörpern, bei -omab von Antikörpern mit Ursprung der Maus, bei -ximab von einer chimären Herkunft und bei -umab (**Nivolumab**) von einer ausschließlich humanen Herkunft. Es handelt sich bei jedem mAb um verschiedene Aminosäuresequenzen (18,19). Dabei sollte hervorgehoben werden, dass die verschiedenen mAbs dieselbe Struktur aufweisen unabhängig davon, welchen Ursprung sie haben.

Antikörper weisen die Form eines Y auf und sind aus zwei identischen Antigenbindungssegmenten aufgebaut. Diese befinden sich an den beiden oberen Enden des Antikörpers und bestehen aus vier verschiedenen Polypeptidketten, zumeist Glykoproteinen. Man spricht hierbei von zwei leichten und zwei schweren Ketten. Die beiden leichten Ketten befinden sich im oberen Teil des Antikörpers, wohingegen die beiden identischen schweren Ketten an der Basis der Struktur lokalisiert sind (20). Die Antikörper werden von kovalenten und nicht kovalenten Bindungen, die die Polypeptide untereinander bilden, zusammengehalten. Jede Kette (schwer und leicht) besteht aus einer konstanten und einer variablen Region (Abbildung 1). Die konstante Region wird als kristallisierbares Fragment

(Fc) bezeichnet. Die variable Region stellt das antigenbindende Fragment (Fab) dar. An jeder Fab-Domäne gibt es drei komplementaritätsbestimmende Regionen. Diese werden komplementaritätsbestimmende Region 1,2 und 3 (CDR1, CDR2 und CDR3) genannt und bilden gemeinsam das Paratop. Dies bezeichnet die Bindungsstelle für das komplementäre Antigen (Epitop, der immunantwortauslösende Molekülabschnitt des Antigens (Ag)) (21). Somit kann ein Ag an die Fab-Bindungsstelle des Antikörpers gebunden werden. Ein modifizierter Antikörper, wird in dieser Region so manipuliert, dass dieser nur für ein Ag spezifisch ist. Diese Art bezeichnet man als mAb (19). Diese Regionen sind verantwortlich für die Spezifität des Antikörpers. Durch das hohe Maß an Variation führt diese Region zu einer großen Diversität in der Ag-Bindung (16).

Am anderen Ende der Struktur befindet sich die Fc-Region, die entweder an einen zugehörigen Fc-Rezeptor oder an einen neonatalen Fc-Rezeptor binden kann. Als neonataler Fc-Rezeptor (FcRn) wird ein Rezeptor bezeichnet der biochemisch einem Molekül der major histocompatibility complex 1 (MHC-Klasse 1) ähnelt. FcRn ist für den Transport und das Wiederherstellen von IgG verantwortlich (22). FcRn Rezeptoren finden sich in verschiedensten Zelltypen, wie zum Beispiel auf Enterozyten, Endothelzellen und dendritischen Zellen. Dadurch spielen sie auch eine wesentliche Rolle in der Pharmakokinetik von mAbs. Durch die spezifische oder unspezifische Bindung einer Fc-Region an den FcRn wird der mAb vor dem lysosomalen Abbau geschützt, wodurch die Zirkulationshalbwertszeit des mAbs erhöht wird (20,23,24).

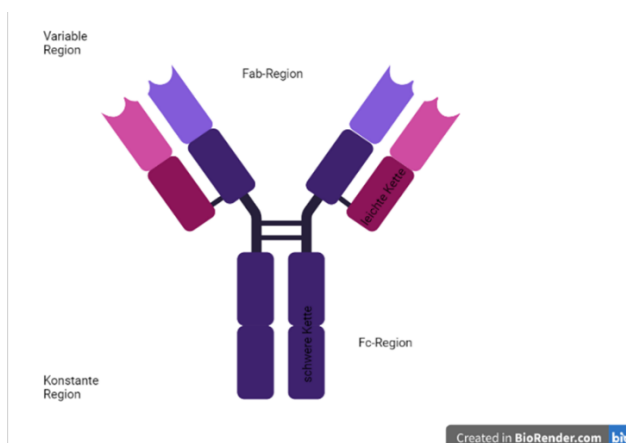


Abbildung 1 Struktur eines Antikörpers erstellt mit BioRender (20,24,25)

3.1.2 Pharmakokinetik von i.v. und s.c. applizierten mAbs

Die Applikation von mAbs erfolgt primär i.v., wodurch eine hohe Bioverfügbarkeit erreicht wird. Die i.v. Applikation geht direkt ins Blut während bei der subkutanen Form zuerst einige Barrieren überwunden werden müssen, um in den systemischen Kreislauf zu gelangen. (26–28).

Die Subkutis besteht hauptsächlich aus Fettgewebe, Blut- und Lymphgefäßen und Bindegewebe. Der fettreiche Anteil ist aus läppchenartigen Fettgewebsinseln, sogenannten Lobuli aufgebaut. Im Gegensatz dazu besteht das Bindegewebe aus Fibroblasten, die Glykosaminoglykane, Kollagene und Elastin, produzieren. Diese bilden gemeinsam die sogenannte Extrazellulärmatrix (EZM). Die Ladung zwischen diesen Bestandteilen wird wie folgt aufgeteilt: Kollagen, der Hauptbestandteil des Bindegewebes weist eine positive Ladung auf. Hyaluronsäure sowie Chondroitinsulfat, die beide negativ geladen sind, sind für die gelartige Struktur verantwortlich und steuern den interstitiellen Flüssigkeitsfluss. Somit ist die Nettoladung des Interzellularraums, der einen Teil der EZM bildet, und einen pH-Wert von 7,4 besitzt, negativ (29–31). Die Hauptenzyme, die in der Subkutis enthalten sind, sind Proteasen. Sie sind für die Spaltung und den Abbau von Proteinen verantwortlich. Demzufolge können diese Proteasen die Bioverfügbarkeit s.c. applizierter mAbs durch ihre katabole Aktivität verringern. Obwohl die Subkutis schwierig zu durchdringen ist, sind die Wände der Kapillaren dünn, was wiederum die Arzneimitteldiffusion erleichtert (32).

Die Absorption von mAbs hängt sowohl von der Applikationsart als auch von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen mAbs ab (33). Zu den Faktoren, die die Aufnahme der mAbs in das Blut beeinflussen, zählen Ladung, Größe, Hydrophobie und Glykosylierung (20,34). Aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit können mAbs entweder hydrophil, lipophil oder amphiphil sein. Diese Beschaffenheiten hängen von der strukturellen Komplexität und den organischen Verbindungen, die in den mAbs enthalten sind, ab (35–37). Für am Markt befindliche mAbs zeigte sich, dass amphiphile oder hydrophobe Eigenschaften die Pharmakokinetik verbessern. Aufgrund der Interaktion mit den überwiegend lipophilen Bestandteilen der Subkutis erfolgt die Aufnahme in den systemischen Kreislauf deutlich langsamer als bei der i.v. Verabreichung (28–38). Diese langsamere Aufnahme kann zu einem Depoteffekt führen, der nicht nur die Resorption, sondern auch die spätere Verteilung im Gewebe beeinflusst. Somit kommt es zu einer verlängerten Verweildauer des mAbs in der Subkutis, was einerseits zu einem vermehrten Abbau durch Proteasen und/oder Immunzellen führen kann, wodurch der applizierte mAb

seine Wirkung nicht adäquat entfalten kann (39–41). Die Konsequenzen dieser verlängerten Verweildauer spiegeln sich in einer verringerten Bioverfügbarkeit wider. Diese ist bei der s.c. Applikation im Vergleich zur i.v. Gabe um ca. 50% reduziert (25,42). Andererseits kann jedoch, wenn es zu keinem enzymatischen Abbau kommt, eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung in die Blutbahn erreicht werden.

Weitere wichtige Faktoren, die die Absorption beeinflussen können, sind die Oberflächenladung der mAbs (33,43–45), das Molekulargewicht und der interstitielle Fluss (20). Ebenso können Hilfsstoffe, wie beispielsweise Sialinsäure, Fructose, Galactose und Mannose, die in einer Produktformulierung enthalten sein können, die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von mAbs, hauptsächlich die Serumhalbwertszeit beeinflussen (43). Dementsprechend müssen diese sorgfältig gewählt und eingesetzt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Absorption von mAbs von sehr vielen Faktoren abhängt. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass es auch zu Konformationsänderungen des mAbs während der Verabreichung, zum Beispiel durch fehlerhafte Anwendung, kommen kann, wodurch die therapeutische Wirkung nicht mehr erreicht wird. Ein weiterer wichtiger Punkt, der hier anzumerken ist, dass viele wissenschaftliche Daten zumeist aus Tierversuchen stammen. In präklinischen Studien werden s.c. Verabreichungen in der Regel an Labortieren wie Ratten, Mäuse, Minischweinen oder Affen untersucht. Dies führt jedoch häufig zu interindividueller und interspezifischer Variabilität, da kritische Parameter wie die Blutverfügbarkeit s.c.-verabreichter Arzneimittel auch von wirtsspezifischen Faktoren wie Motilität, Alter und Geschlecht des Tieres, strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Interstitiums und der Lymphgefäße sowie extrinsischen Faktoren abhängen (46).

Folglich wurde bis heute kein präklinisches s.c. Modell identifiziert, das die klinischen Ergebnisse beim Menschen korrekt vorhersagen kann (47). Daher ist es nur eingeschränkt möglich das „Verhalten“ von mAbs für die s.c. Verabreichung in frühen Stadien der Arzneimittelentwicklung (i.e., präklinische Phase) vorherzusagen (48–53).

3.2 MAbs in der Tumorthherapie

3.2.1 Malignes Melanom

Als Melanom wird ein maligner Tumor ausgehend von einer unkontrollierten Proliferation von Melanozyten bezeichnet. In den meisten Fällen ist die Haut davon betroffen, jedoch gibt

es auch Schleimhautmelanome, Aderhautmelanome und Melanome der Leptomeningen (54,55).

3.2.1.1 Epidemiologie

Das kutane maligne Melanom zählt unter den bösartigen Hautkrebsarten zu jenen, die am häufigsten zum Tode führen. Ca. 5% aller bösartigen Hauttumore entfallen auf maligne Melanome. Die Inzidenz von Melanomen stieg in den letzten Jahrzehnten an (56–61). Des Weiteren spielen der geographische Aspekt, das Alter und das Geschlecht eine wesentliche Rolle. Anhand von Studien wurde festgestellt, dass spezielle Regionen besonders häufig an malignen Melanomen erkranken. Dazu zählen vor allem Neuseeland, Skandinavien, Australien, England und die USA (Abbildung 2) (54,62).

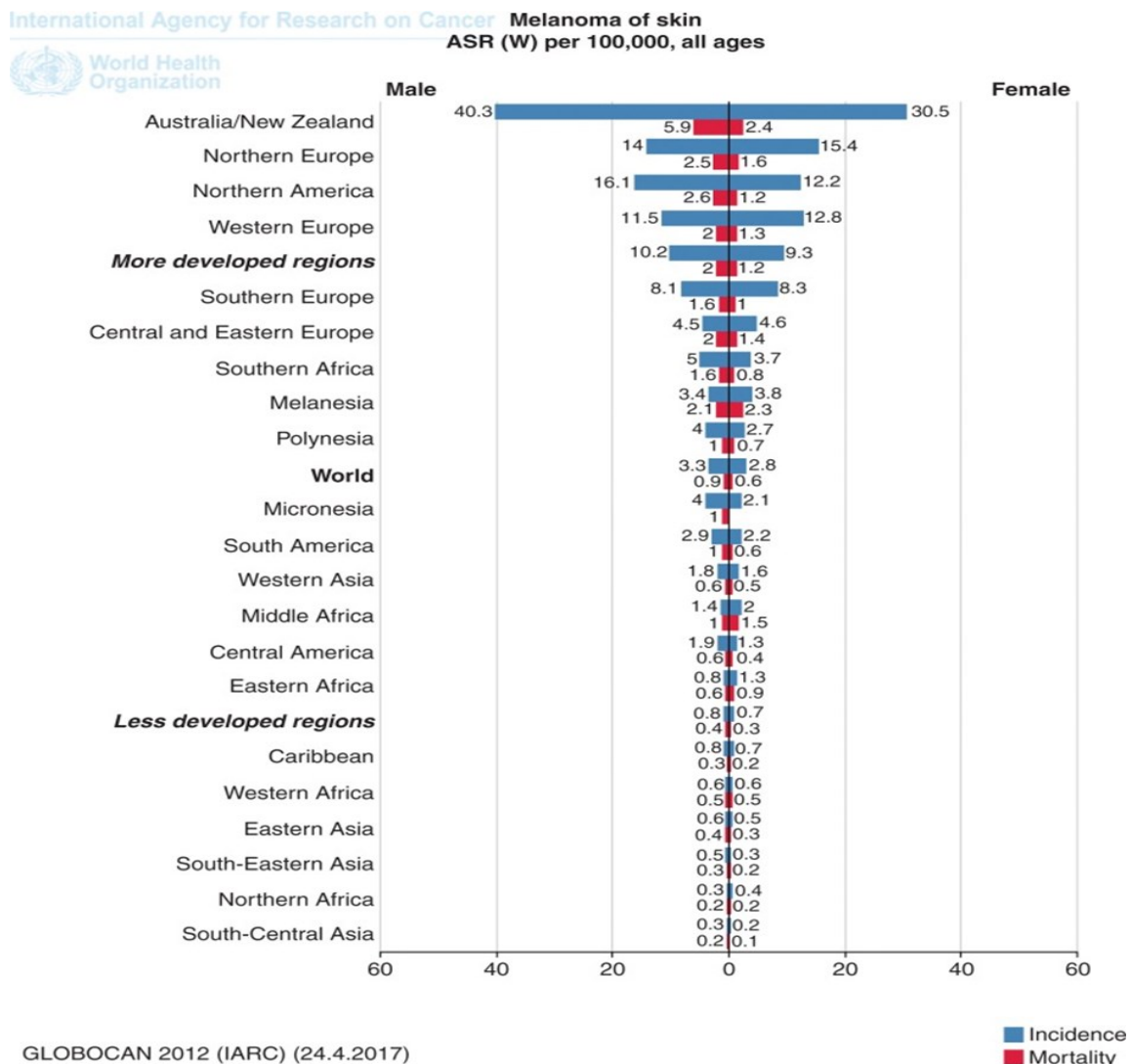


Abbildung 2 Melanom, altersstandardisierte jährliche Inzidenz und Mortalität in Abhängigkeit von Geschlecht, geographischer Region und Entwicklung (62)

Das Melanom der Haut hat das höchste Metastasierungsniveau der gesamten Hauttumoren und ist für mehr als 90% aller Sterbefälle an Hauttumoren verantwortlich. Als Eckpfeiler für eine bestmögliche Behandlung ist die Melanomfrüherkennung durch den Hautarzt/-ärztin von essenzieller Wichtigkeit. Der wichtigste Grund für die Zunahme der malignen Melanome ist die deutlich vermehrte UV-Exposition in den letzten 50-60 Jahren. Durch Urlaubs- und Freizeitbeschäftigung ist das zu begründen. Für die Mortalität des malignen Melanoms sind weitgehend exakte Zahlen vorhanden, jedoch nicht für die Inzidenz. So kann die Inzidenz nur anhand der Krebsregisterdaten, hier am Beispiel Deutschland, herangezogen und geschätzt werden. In Deutschland werden hierfür Krebsregisterdaten aus verschiedenen Bundesländern evaluiert. Da dieses System noch nicht vollständig ausgereift ist, und eine flächendeckende Krebsregistrierung in allen deutschen Bundesländern noch nicht erreicht wurde, wird diese Zahl geschätzt. Länder mit der höchsten Inzidenzrate sind Neuseeland und Australien, hier schätzt man auf 50-60 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr. In Europa sind weitestgehend die skandinavischen Länder der Spitzenreiter, jedoch wurde auch in den mittel- und südeuropäischen Ländern ein deutlicher Anstieg der Inzidenz in den letzten Jahren beobachtet. Als Regionen mit der niedrigsten Inzidenz, stellen sich die mediterranen Länder dar. Diese Unterschiede werden dadurch erklärt, dass Menschen in den mediterranen Ländern eine widerstandsfähigere Haut gegenüber der UV-Strahlung besitzen und ihre Freizeitgewohnheiten mit weniger Sonnenexposition einhergehen.

Die Mortalitätsrate hat in den letzten Jahren auch eine erhebliche Steigerung erfahren. Zwischen den Jahren 1999 und 2012 stieg die Mortalitätsrate bei beiden Geschlechtern erheblich an. Man spricht von einer Steigerung der Mortalität von 2,6 auf 4,1 Fälle pro 100.000 Einwohner bei Männern und von 2,3 auf 3,0 pro 100.000 Einwohner bei Frauen. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Mortalitätsrate nicht im gleichen Ausmaß steigt wie die Inzidenzrate, man kann somit von einer relativen Stabilisierung der Mortalitätsrate sprechen. Dafür verantwortlich ist vor allem die verbesserte Frühdiagnose von prognostisch günstigeren Tumoren (55,63) Wie unten beschrieben steigt die Inzidenz der Diagnose von malignen Melanomen mit dem Alter deutlich an. So spricht man ab 75 Jahren schon von einer Inzidenz von 24,7 pro 100.000 Einwohner (Abbildung 4) (62).

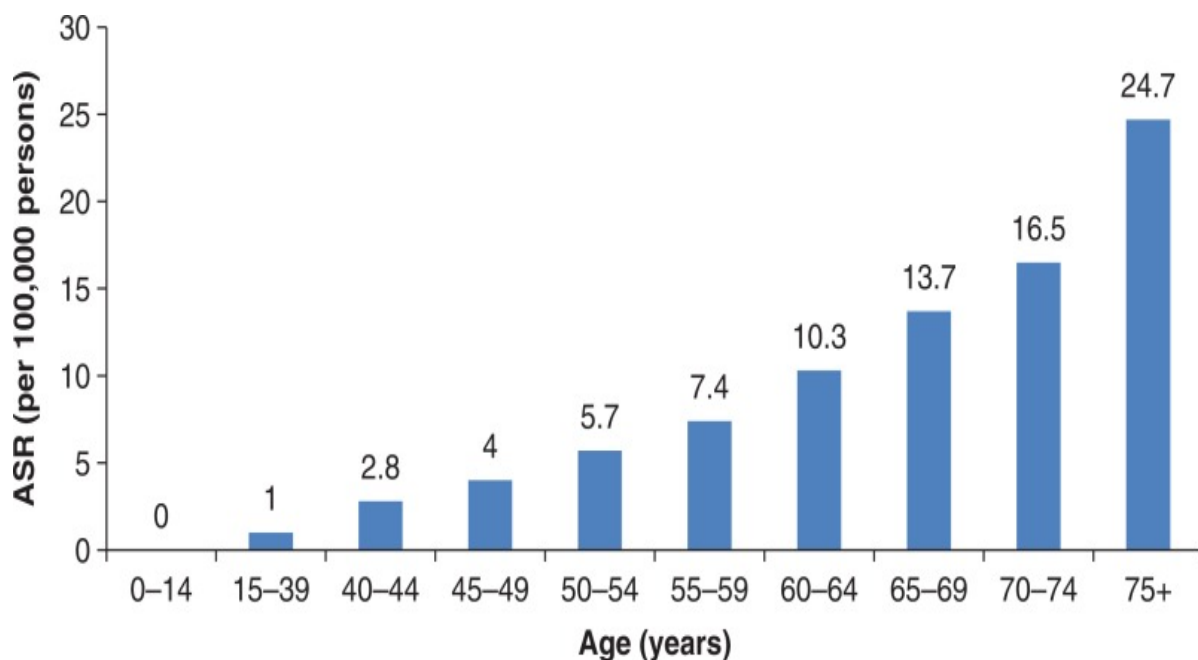


Abbildung 3 Weltweite, altersstandardisierte jährliche Inzidenz des Melanoms in Abhängigkeit des Alters (62)

3.2.1.2 Ätiologie

Das maligne Melanom zählt zu den Erkrankungen mit multifaktorieller Genese. Neben familiärer Prädisposition und Umweltfaktoren stellt die UV-Exposition die größte Ursache der Entstehung eines malignen Melanoms dar (28,29)(64,65). Des Weiteren kann sich ein malignes Melanom aus einem seit Jahren bestehendem Nävuszellnävus entwickeln (55).

3.2.2 Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)

3.2.2.1 Epidemiologie

Das Bronchialkarzinom zählt europaweit zu einem der häufigsten bösartigen Erkrankungen. Es betrifft 25% aller männlichen und 12% aller weiblichen KrebspatientInnen. Die Inzidenz liegt bei 52/100.000 Personen pro Jahr, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. In den Industrieregionen gilt es als die häufigste Krebstodesursache bei Männern. Bei Frauen liegt es nach Brustkrebs auf Platz zwei aller Krebstodesursachen (66).

Bei zirka 80% der Lungenkarzinome handelt es sich um nicht-kleinzellige Lungenkarzinome. Es werden jährlich ungefähr 36.000 Neuerkrankungen bei Männern und 21.000 bei Frauen in Deutschland beschrieben. In Österreich konnte man im Jahr 2018 2.060

Fälle und bei Frauen 2.741 diagnostizieren. Lungenkrebs ist somit die zweithäufigste, und bei Frauen die dritthäufigste Tumorlokalisation.

Die Relevanz in Bezug auf die Mortalität ist eine sehr große, denn so entfallen etwa 16% aller Krebstodesfälle bei Frauen auf Lungenkrebs. Bei Männern ist diese Zahl mit zirka 25% eine noch erheblich höhere. Somit ist Lungenkrebs bei Männern die mit Abstand häufigste Krebstodesursache. Bei Frauen beträgt das Erkrankungsalter gemittelt 69, und bei Männern 70 Jahre. Wenn man sich die alterstandardisierten Erkrankungsraten ansieht, so erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Während die Anzahl der Neuerkrankungen bei Männern seit Jahren sinkt, steigt die Inzidenz bei Frauen deutlich an.

Bei Männern konnte ein Sinken von 1,3% pro Jahr, seit 2003 belegt werden, wobei bei den Frauen die Inzidenz steigt (Abbildung 5). Jedoch liegt das Erkrankungs- und Sterberisiko der Männer noch immer 2-mal höher als bei Frauen (66).

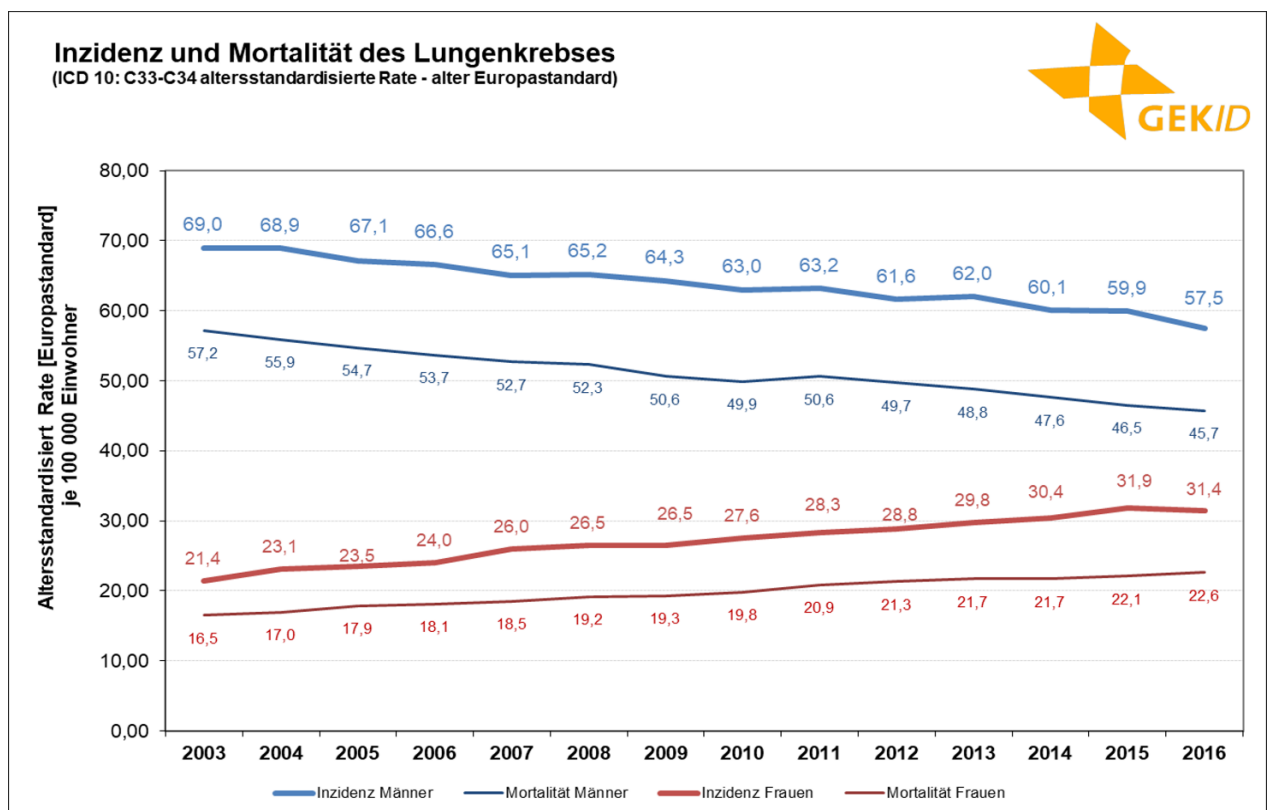


Abbildung 4 Inzidenz und Mortalität des Lungenkrebses (67)

3.2.2.2 *Ätiologie*

Sogenannte Karzinogene gelten als häufigste Ursache für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms. Zu 85% ist Zigarettenrauchinhalation für die Entstehung von Bronchialkarzinomen verantwortlich. Dabei bestimmen die Dauer und die Häufigkeit des Zigarettenkonsums das Lungenkrebsrisiko. Die restlichen 15% entfallen auf u.a. auf Asbestexposition, genetische Faktoren, oder chronische Entzündungen (66,67).

Man unterscheidet auch zwischen erworbene, exogenen und genetisch, endogenen Ursachen. Zu den exogenen Ursachen gehören: Rauchen, ionisierte Strahlung, Feinstaub, Abgase, Absbestexposition, Quarzstäube und chronische Infektionen. Zu den endogenen Ursachen zählen: Personen mit einer positiven Familienanamnese bei Verwandten ersten Grades. Jedoch zählt das aktive Rauchen mit großem Abstand zu den anderen als Hauptursache für die Entstehung eines Lungenkarzinoms (67)

3.3 Wirkmechanismen der PD-1 Checkpoint Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab

Pembrolizumab ist ein humanisierter Immunglobulin G4 kappa anti-programmierter Zelltodprotein-1 Antikörper (IgG4 kappa anti-PD-1 Ak), der durch i.v. Verabreichung u.a. zur Behandlung von PatientInnen mit NSCLC oder metastasierten Melanomen eingesetzt werden kann. Der PD-1 Rezeptor, ein Oberflächenprotein an T-Zellen wird mittels programmiertes Zelltodprotein 1 Ligand 1 (PD-L1) und programmiertes Zelltodprotein 1 Ligand 2 (PD-L2) blockiert und verhindert die Aktivierung von T-Zellen. Tumorzellen können diesen Rezeptor nutzen, um sich vor den ihn vernichtenden T-Zellen zu schützen, indem sie entweder PD-L1 oder PD-L2 bilden. Pembrolizumab greift in eben diese Kaskade ein und bindet an den T-Zell inhibierenden PD-1 Rezeptor. Dieser wird dadurch für die entsprechenden Liganden PD-L1 und PD-L2 des Tumors blockiert, was zu einer Aktivierung der T-Zellen führt. Das Ziel der Behandlung ist es durch diese Bindung des AKs, die Tumorzellen durch das körpereigene Immunsystem in Form von T-Zellenaktivierung angreifbar zu machen (Abbildung 5) (68,69).

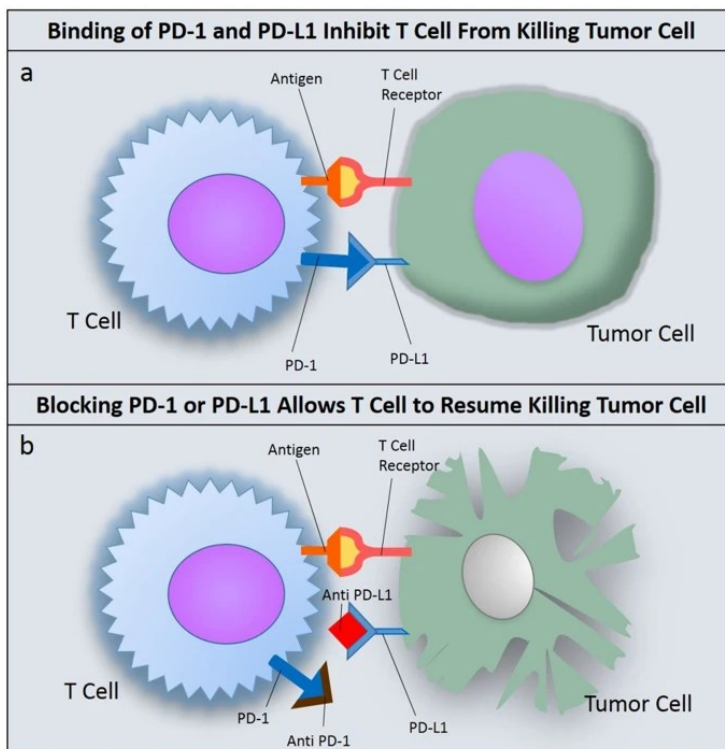


Abbildung 5 Wirkmechanismus (69)

Der zweite monoklonale Antikörper, der im Rahmen dieser Arbeit angesprochen werden soll, ist Nivolumab. Nivolumab ist ein vollständig und ausschließlich humaner, monoklonaler IgG4-AK, der ebenfalls i.v. appliziert wird und an den PD-1 Rezeptor bindet. Dadurch wird der Rezeptor für die von Tumorzellen exprimierte Bindungsproteine blockiert. Somit kann der Tumor die Blockade der T-Zellen nicht durchführen (70–72).

Basierend auf klinischen Studien haben Checkpoint-Inhibitoren einen wesentlichen Stellenwert in der Behandlung von PatientInnen mit NSCLC und Melanomen. Hierzu ein kurzer Auszug der Studie (Reck), die einen Vergleich zwischen NSCLC-Therapie mit Chemotherapie versus mit zusätzlicher Checkpoint-Inhibitoren Therapie, in Form von Pembrolizumab (200mg alle 3 Wochen), untersucht haben. Dazu wurden PatientInnen mit PD-L1 positiven NSCLC gearbeitet. Es wurden in einer offenen Phase drei Studie 305 PatientInnen mit unbehandelten fortgeschrittenen NSCLC mit PD-L1 Expression auf mindestens 50% der Tumorzellen und ohne EGFR Mutation, oder Translokation des anaplastisch randomisierten Lymphom-Kinase-Gens untersucht und behandelt. Der primäre Endpunkt der Studie war das progressionsfreie Überleben, und wurde mittels einer verblindeten, unabhängigen, radiologischen Untersuchung bewertet. Ein wichtiger Aspekt der Studie war, dass man bei Krankheitsprogression von der Chemotherapie-Gruppe auf die Pembrolizumab Gruppe wechseln durfte. Sekundäre Endpunkte waren das Gesamtüberleben, die objektive Ansprechrates und die Sicherheit. In der Gegenüberstellung des medianen progressionsfreien Überlebens betrug dieses bei der Pembrolizumab-Gruppe 10.3 Monate, und bei der Chemotherapie-Gruppe 6.0 Monate. Auch die geschätzte Überlebensrate, mit 80.2% in der Pembrolizumab-Gruppe, versus 72.4% in der Chemotherapie-Gruppe, war deutlich höher. Die Ansprechrates war auch höher in der Pembrolizumab-Gruppe (44.8% versus 27,8%) und auch die Nebenwirkungen stellten sich in der Pembrolizumab-Gruppe betreffend aller möglichen Nebenwirkungen als viel geringer dar (73,74).

3.4 s.c. Applikation versus i.v. Applikation am Beispiel Trastuzumab

Trastuzumab ist seit 2013 für PatientInnen mit human epidermal receptor 2 (HER2) positivem Mammakarzinom (MammaCa) in Form der subkutanen Applikation zugelassen. In der HannaH-Studie wurde gezeigt, dass sich die s.c. von der i.v. Therapie im neoadjuvanten und adjuvanten Setting in Pharmakokinetik, Verträglichkeit und Wirksamkeit nicht signifikant unterscheidet (75,76).

Die HannaH-Studie beschäftigte sich in einer randomisierten internationalen offenen Phase 3 Studie mit dem neoadjuvanten Setting. Einschlusskriterien waren PatientInnen mit HER2-positivem, operablem, lokal fortgeschrittenem oder entzündlichem Brustkrebs. Diese PatientInnen wurden randomisiert acht Zyklen einer neoadjuvanten Chemotherapie zugeteilt, die alle 3 Wochen zur gleichen Zeit wie Trastuzumab verabreicht wurden. Die Applikation erfolgte entweder i.v. mittels 8mg/kg Aufsättigungsdosis und 6mg/kg Erhaltungsdosis oder s.c. mit einer festen Dosierung von 600 mg. Die Chemotherapie wurde aus verschiedenen Zyklen verschiedenster Chemotherapeutika aufgebaut. Die Aufteilung bestand aus vier Zyklen Docetaxel ($75\text{mg}/\text{m}^2$), gefolgt von vier Zyklen Fluorouracil ($500\text{mg}/\text{m}^2$), Epirubicin ($75\text{mg}/\text{m}^2$) und Cyclophosphamid ($500\text{mg}/\text{m}^2$), die alle drei Wochen verabreicht wurden. Die primären Endpunkte der Studie waren die beobachtete Serumtalkonzentration von Trastuzumab vor der Operation, also Vordosis an Tag 1 von Zyklus 8; ein Zyklus dauerte 21 Tage. Zur Ermittlung des Prozentsatzes der TeilnehmerInnen mit pathologisch vollständiger Remission, wurden die TeilnehmerInnen nach acht Behandlungszyklen und nach der Operation auf das Fehlen von neoplastischen invasiven Zellen in der Brust gemäß pathologischer Diagnostik untersucht. Die Serum-Talkonzentration wurde aufgezeichnet, gemittelt und in Mikrogramm pro Milliliter angegeben (77,78).

Im Vergleich zur i.v. Applikation zeigte die s.c. Applikation bei gleichem Nutzen für die PatientInnen einen wesentlich geringeren Zeitaufwand, da diese nur etwa 5 min dauerte. Im Gegensatz dazu ist ein Zeitaufwand von rund 90 min für die Applikation der i.v. Initialdosis notwendig. Die positiven Auswirkungen der Zeitersparnis konnten auch in Umfragen bestätigt werden, da die befragten PatientInnen vor allem die kürzere Applikationszeit als wichtigsten Aspekt/Vorteil der s.c. Darreichungsform nannten (79,80).

In den Analysen der internationalen PrefHer-Studie (Abbildung 6) wurden deutliche Präferenzen hinsichtlich einer s.c. Injektion gegenüber der i.v. Applikation dargestellt. Dabei

bestand diese randomisierte zwei Kohorten-Studie aus 488 PatientInnen, die auf zwei Gruppen (245 PatientInnen bzw. 243 PatientInnen) aufgeteilt wurden. Eine Gruppe erhielt zunächst die s.c. Therapie mit anschließender i.v. Applikation, bei der anderen Gruppe erfolgte das Procedere genau umgekehrt. Die Ergebnisse zeigten, dass 88,9% die s.c. Applikation der i.v. Gabe vorziehen. Nur etwa 9,6% der ProbandInnen bevorzugten eine i.v. Verabreichung. 1,5% der PatientInnen hatten keine Präferenz. Zusätzlich bestätigte die Studie, dass die Applikationsart in Punkto Sicherheit und Verträglichkeit keine signifikanten Nachteile gegenüber der i.v. Anwendung mit sich brachte (79).

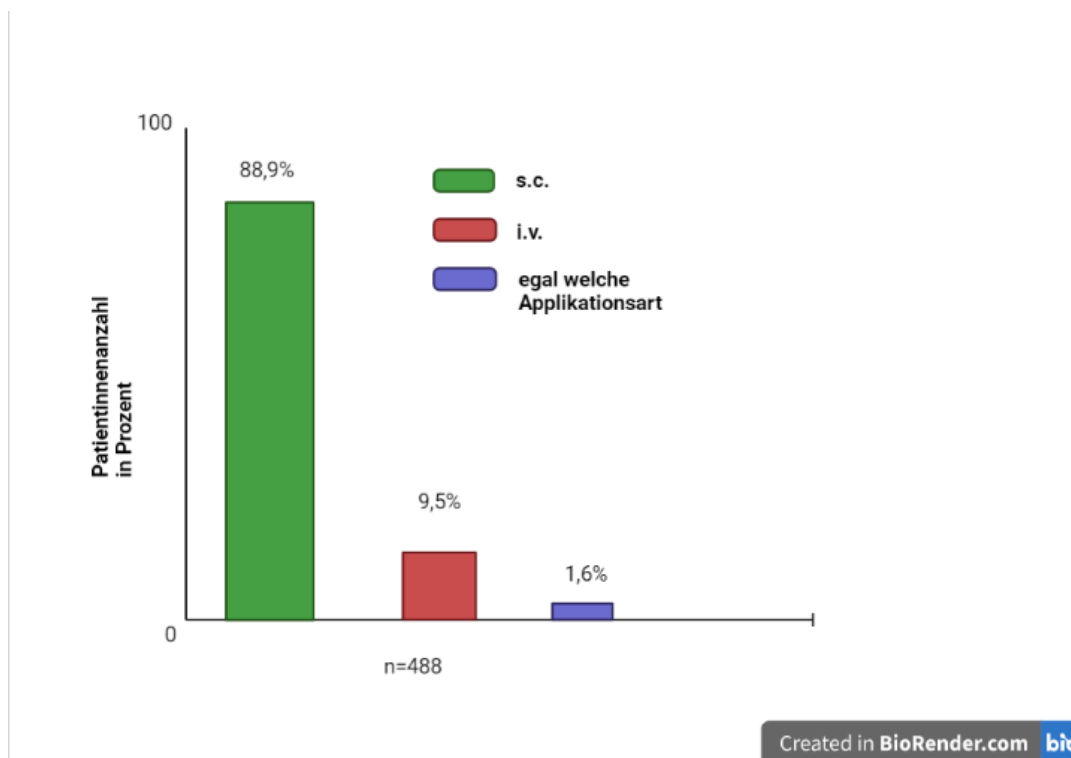


Abbildung 6 Übersicht der Studie über die Präferenz der Applikationsart bei Trastuzumab Therapie, selbsterstellt mit BioRender.com (79)

Ein wichtiger Punkt, der hier anzumerken ist, ist dass das maximale Volumen, das appliziert werden kann, um einen ausreichend hohen Arzneimittelspiegel im Blut zu erreichen aufgrund des gelartigen Zustandes der EZM bei 1-2 ml liegt (81,82). Um dennoch eine Wirkung zu gewährleisten, wurde das Enzym Hyaluronidase in die Formulierung eingearbeitet (79,82). Die Hyaluronidase spaltet die Hyaluronsäure durch Hydrolyse und kann somit die Gewebspermeabilität von Trastuzumab erhöhen. Dadurch können höhere Arzneimittelspiegel im Blut erreicht werden. Somit steht PatientInnen mit HER2-positivem Mammakarzinom mit dieser Variante eine weniger invasive und weniger zeitintensive Applikationsform zur Verfügung (81,82).

Eine weitere Herausforderung in der s.c. Applikation ist die Dosisanpassung. In klinischen Untersuchungen wurde herausgefunden, dass eine Dosis von 8 mg/kg Trastuzumab s.c alle drei Wochen verabreicht, einer Dosierung von 6 mg/kg Trastuzumab i.v., 3x wöchentlich appliziert entspricht (81). Um mögliche Fehlerquellen wie Fehldosierungen zu vermeiden, wurde eine gewichtsunabhängige Dosierung entwickelt. Dabei sollten die Rezeptoren für Trastuzumab im gleichen Ausmaß gesättigt werden, wie es mit der intravenösen Applikation der Fall ist. Da jedoch die Sättigung mit einer i.v. Initialdosis schneller erreicht werden kann, stellte sich dies als sehr schwierig dar. In zahlreichen Modellsimulationen aus verschiedenen Dosierungsfindungsstudien wurde schließlich eine Dosis von 600 mg für die s.c. Anwendung evaluiert. Damit konnte nachweislich eine mindestens gleichwertige Trastuzumab Exposition über dasselbe Dosierungsintervall wie bei der i.v. Applikation erzielt werden. Eine ausreichende Rezeptorsättigung kann somit mit der fixen Dosierung von 600 mg s.c. Applikation im ersten Zyklus erreicht werden (81).

Die Infusionslösung wird in einer 15 ml Durchstechflasche aus Klarglas geliefert und enthält 150 mg Trastuzumab. L-Histidinhydrochlorid-Monohydrat, L-Histidin, α,α -Trehalosedihydrat und Polysorbat 20 sind dabei wichtige Bestandteil der Infusionslösung. Die Verdünnung erfolgt unter aseptischen Bedingungen in Polyvinylchlorid-, Polyethylen- oder Polypropylenbeuteln mit einer 0.9-prozentigen Natriumchloridlösung. Die chemische und physikalische Stabilität von Herceptin wurde für bis zu 30 Tage bei einer Temperatur von 2 bis 8°C angegeben. Bei einer Temperatur bis 30°C ist die Stabilität nur für 24 Stunden gegeben. Die subkutane 6 ml Durchstechflasche enthält 5 ml Lösung mit 600 mg Trastuzumab. Diese Lösung wird bereits injektionsfertig geliefert und darf nicht mit anderen Arzneimitteln verdünnt oder gemischt werden. L-Histidinhydrochlorid-Monohydrat, L-Histidin, α,α -Trehalosedihydrat und Polysorbat 20 bilden sind auch bei der s.c. Formulierung wichtige Bestandteil. Weitere wesentliche Bestandteile im Vergleich zur i.v. Darreichungsform sind die rekombinante Hyaluronidase, die zur Überwindung der EZM notwendig ist, L-Methionin und Wasser für Injektionszwecke (83).

3.5 Möglichkeiten der Stabilisierung einer subkutanen Applikationsform

Da mAbs immunologisch aktive Proteine sind, kann der Proteinabbau durch verschiedenste Instabilitätsmechanismen verursacht werden. Diese werden in physikalische und chemische Instabilitäten unterteilt. Zu den physikalischen Instabilitäten zählen Aggregation, Präzipitation, Adsorption und Denaturierung, zu den chemischen Instabilitäten Deamidierungen, Oxidationen, Isomerisierungen, Hydrolysen, Racemisierungen und β -Eliminationen. So kann beispielsweise der Abbau von Checkpoint-Inhibitoren durch Faktoren wie Temperatur, Licht, pH-Wert, Bewegung, Scherkräfte, Metalle, organische Lösungsmittel und Enzyme forciert werden, wodurch die therapeutische Wirksamkeit des jeweiligen Arzneimittels herabgesetzt bzw. verloren gehen kann. Daher müssen diese Faktoren bei der Formulierungsentwicklung und der Auswahl der geeigneten Herstellungstechnologie berücksichtigt werden (36,84).

Hitze kann beispielsweise eine Denaturierung verursachen, die zu Schäden an Proteinstrukturen führt. Aufgrund der längeren Dauer einer intravenösen Applikation kann das Arzneimittel über einen längeren Zeitraum Licht ausgesetzt sein, womit die Gefahr einer Oxidationsreaktion steigt. Vor allem schwere, aber auch leichte Aminosäuren, wie Methionin und Cystein neigen dabei eher zur Oxidation. Aminosäuresequenzen einschließlich Glutamin und Asparagin können desamidieren. Der Isoelektrische Punkt (iP) von mAbs kann durch diese chemischen Modifikationen verändert werden und zu einer Ladungsheterogenität führen. Bei einer Zunahme der negativen Ladungen mit sinkendem iP, wie dies bei Desamidierung auftritt, wird der mAb zu einer saureren Variante. Im Vergleich dazu wird der mAb bei einer Oxidation mit zunehmender positiver Ladung und steigendem iP zur basischen Variante. Diese Mechanismen beeinflussen die Pharmakokinetik in Bezug auf Gewebeaufnahme und Serumhalbwertszeit. Flüssige Formulierungen zeigen auch die Gefahr am Verpackungsmaterial haften zu bleiben, oder mit diesem zu interagieren, was zu einer Aggregation und dadurch zu einem Funktionsverlust führen kann (37).

Die Aggregation, die zu den physikalischen Instabilitäten zählt, ist eine der wichtigsten und häufigsten. Dabei kommt es zur Entfaltung der Proteine, der Prozess kann dabei irreversibel oder reversibel sein. Genauer gesagt, können Aggregate durch Selbstassoziation über schwache unspezifische Bindungen, bei denen keine Änderung der Primärstruktur auftritt, oder durch kovalente Bindungen gebildet werden. Die Aggregation ist ein schrittweiser, oft irreversibler Prozess, wobei dieser Prozess meist unterhalb der Schmelztemperatur des

jeweiligen Proteins beginnt und die Aggregationsgeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur steigt (37,85). Dementsprechend werden viele mAb Zubereitungen bei 2-8°C gelagert. Bei der Verabreichung in die Subkutis kommt es wiederum zu einem deutlichen Temperaturanstieg und damit auch zur Möglichkeit der Aggregation. Um diesen schnellen Temperaturunterschied und die damit verbundenen Schäden und Risiken zu vermindern, kann die Temperaturdifferenz durch Angleichung an die Raumtemperatur vor der Applikation angepasst werden(28). Im Vergleich dazu können auch niedrige Temperaturen, wie beispielweise durch Einfrieren eine Denaturierung von mAbs aufgrund von Kolloid- und Konformationsänderungen auslösen. Interessanterweise sind mAbs gegenüber mäßigem thermischen, aber auch mechanischen Stress weniger empfindlich.

Da bei der Verabreichung einer s.c. Injektion (per direkt Pen oder Fertigspritze) im Vergleich zur i.v. Applikation einige Schritte entfallen, minimiert sich auch das Risiko einer chemischen bzw. physikalischen Stabilität. So entfällt beispielsweise der Verdünnungsschritt, wodurch Aggregation aber auch die Wechselwirkungen mit dem Verpackungsmaterial reduziert werden (86). Einen wesentlichen Nachteil der s.c. Formulierung ist jedoch wie bereits erwähnt das kleine Volumen von 2 ml. Durch die hohe Konzentration des mAbs in dieser Applikationsform nimmt die Viskosität zu. Dadurch kann es zu einer sterischen Destabilisierung des Proteins in Lösung kommen, ebenso zu Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und somit zu den Aggregaten (87–89).

Um zu bewerten, wann und wie Instabilitäten auftreten, werden Belastungstests zur Simulation der Produkt-, Lager-, und Handhabungsbedingungen durchgeführt. Die Proteinformulierung wird dazu bei verschiedenen Temperaturen, erhöhter Lichteinwirkung (sichtbar und UV-Bereich) und mechanischer Belastung, wie Abfüllen, Applizieren und Verpacken, getestet. Diese Stress- und Stabilisationstests werden durch Richtlinien der Internationalen Conference on Harmonisation (ICH) geregelt. Genauer gesagt in den Punkten ICH Q1A für Arzneimittel und ICH Q5C für biotechnologische Produkte (90–92).

Diese Punkte zeigen klar auf, dass verschiedenste Überlegungen getätigt werden müssen, um das angestrebte Target durch Formulierungsanpassung im Körper zu erreichen aber auch um die Stabilität von mAbs zu gewährleisten.

3.5.1 Trocknung

Biologika werden hauptsächlich als flüssige Darreichungsformen formuliert. Die Überführung von flüssigen Biologika-Formulierungen in ein festes Pulver hat den großen Vorteil die Gesamtstabilität entlang der gesamten Wertschöpfungskette (Lagerung und Transport) zu verbessern und dabei die Struktur des mAbs zu erhalten und somit die Sicherheit zu steigern. Die Handhabung von Pulvern stellt sich im Allgemeinen auch einfacher und kostengünstiger dar. Um stabile Pulver herzustellen, die auch zugelassen werden können, müssen diese ebenso Stabilitätskriterien erfüllen. Zur jetzigen Zeit sind Trocknungstechnologien mit hohen Kosten und langen Entwicklungs-/ Forschungszeiten verbunden. Außerdem sind die zugrundeliegenden Prozesse aufgrund der Komplexität der mAbs schwierig zu identifizieren (3,93–95). Die bisher bekannten und benutzten Trocknungstechnologien haben das gemeinsame Ziel Wasser zu entfernen, unterscheiden sich jedoch konzeptionell voneinander (3,96). Bei der Auswahl des Trocknungsverfahrens spielt nicht nur die Art der zur Verfügung stehenden Energiequelle, die Belastungen, die bei der Trocknung entstehen, und das Equipment eine Rolle, sondern auch die chemisch-physikalischen Eigenschaften des jeweiligen Biologikums (97). Die größte Herausforderung stellt wiederum die hohe Viskosität der flüssigen Zubereitung dar. Weiters kann es zur sterischen Destabilisierung und zur irreversible Aggregation nach der Rekonstitution des Pulvers kommen, was zu schweren immunologischen Komplikationen bei PatientInnen führen kann (5,95).

Das zurzeit wichtigste Trocknungsverfahren ist die Gefriertrocknung (GT) (98,99). Die Vorteile, die die GT mit sich bringt, sind vor allem - laut FDA - die einfache Verarbeitung einer Flüssigkeit in ein Pulver und die damit verbundene vereinfachte aseptische Handhabung zur Rekonstitution. (100,101). Um die Überführung des Pulvers in die zu applizierende Lösung zu gewährleisten, müssen die physikalischen und chemischen Eigenschaften des biologischen Kandidaten im getrockneten Zustand genauestens verstanden werden, um ein qualitativ hochwertiges, effizientes und sicheres Medikament für PatientInnen zu gewährleisten (102).

Der große Nachteil des GT ist jedoch, dass die Herstellung langwierig und komplex ist und mit hohen Investitions- und Betriebskosten einhergeht (96,101)

Alternativ zur GT wird daher im Forschungs- und Entwicklungsbereich an schonenden Trocknungsverfahren wie Sprühtrocknung (SD), Sprühgefriertrocknung, mikrowellen-

unterstützte Trocknung und Schaumtrocknung, gearbeitet (94,103). Die SD stellt sich als schonendes, schnelles und solides Trocknungsverfahren dar, denn sie ermöglicht die Kontrolle der Partikeleigenschaften, wie Morphologie, Partikelgröße, Restwassergehalt etc.. Die Vorteile bestehen darin, dass die SD im Vergleich zur GT eine deutlich verkürzte Prozesszykluszeit hat und bei atmosphärischem Druck gearbeitet wird. Nachteilig ist, dass die SD auch eine Denaturierung von Proteinen induzieren kann (94). Ebenso ist die Materialrückgewinnung schwierig (i.e., das Ernten des Pulvers), was durch ein geeignetes Prozessdesign und Anpassung der Formulierung umgangen werden kann (87,104). Alternativ können Hochleistungszyklone oder elektrostatische Abscheider, die einen Verlust von kleinen Partikeln durch Adsorption am Behältnis verhindern genutzt werden (105).

Zusammengefasst ist es für die Empfindlichkeit der Proteine wichtig, die Belastung während des SD-Prozesses maximal zu verringern. Dafür werden Hilfsstoffe wie Zucker, Aminosäuren, Polysorbate und verschiedene Puffer verwendet. Ein Wirkstoff, der mittels SD getrocknet wurde, ist Caplacizumab, ein mAb der für die Therapie der erworbenen thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (aTTP) eingesetzt wird. Diese Formulierung ist jedoch nicht zugelassen und vermarktet. (3,94,96,106).

Neben schonenden Trocknungsmethoden stellen auch die Hilfsstoffe, die für eine Formulierung der Darreichungsform verwendet werden, eine wichtige Rolle und werden im Folgenden genauer besprochen.

3.5.2 Saccharide

Zur Stabilisierung können Saccharide beitragen, da Zucker vor allem mit Proteinen in Wechselwirkung treten und somit für die Stabilisierung von Proteinlösungen sowohl in flüssigen als auch in trockenen Formulierungen wichtig sind. Den Wechselwirkungen liegen drei Phänomene zu Grunde:

- 1) Ausschluss oder Entropieverlust aufgrund von Zucker-Protein-Wechselwirkungen.
- 2) Wasserersatz einschließlich der thermodynamischen Stabilisierung durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hydroxylgruppen von Zucker und Proteinen.
- 3) Vitrifikation als Teil der Anhydrobiose (vollständige Austrocknung), sog. „Zuckerglas“ entsteht dabei.

Als Vitrifikation wird eine physikalisch direkte Umwandlung einer Flüssigkeit in ein nicht kristallines, amorphes Material durch Erhöhung der Viskosität verstanden. Hierbei wird die

Viskosität durch Zugabe von Zuckern und einem ultra-schnellen Abkühlungsprozess erhöht (107–110). Vereinfacht gesagt führen die Verbindungen zwischen Wasser und Zucker zu einer Stabilisierung des Proteins. Wasser wird hierbei innerhalb der Protein-Struktur des Antikörpers eingeschlossen, was zu einer schnellen Rekonstitution getrockneter mAb-Formulierungen führt (111). In einer aktuellen Studie wurden verschiedene SD-mAb-Formulierungen nach der Rekonstitution untersucht. Es wurde festgestellt, dass Saccharide, vor allem Saccharose und Trehalose im Vergleich zu Aminosäuren mit der Ausnahme von Arginin die Stabilität und Rekonstitutionszeit massiv erhöhen (112). Die sogenannte Glasübergangstemperatur (T_g) ist ein wichtiger Indikator für die Stabilität des späteren anzuwendenden Arzneimittels, zusammen mit der molekularen Relaxationszeit und der molekularen Mobilität. Man kann sagen, dass eine höhere T_g in Verbindung mit einer niedrigen molekularen Mobilität und hohen Relaxationszeit auf ein stabiles System hinweist. Zu den am häufigsten verwendeten Zuckerstabilisatoren zählt Saccharose. Sie wird in allen Trockenpulverformulierungen von mAbs auf dem Markt verwendet. Dazu zählen (Caplacizumab, Secukinumab, Canakinumab und Omalizumab). Jedoch weisen Produkte mit Saccharose eine niedrige T_g auf, was, wie oben erwähnt, nicht stabilitätsfördernd ist (113,114). Als weiterer vielversprechender Zucker zur Proteinstabilisierung zeigt sich Trehalose, ein sogenanntes nicht reduzierendes Zuckermolekül (115–118). Die Trehalose stabilisiert Proteinstrukturen, indem sie die molekulare Mobilität und strukturelle Relaxation während des Trocknens abschwächt(119). Ebenso wird Mannitol verwendet. Die Wirkung von Mannitol in Bezug auf die Tonizität muss jedoch beachtet werden, da sie die mAb-Aufnahme beeinflussen kann. Wichtig hierbei zu verstehen ist, dass eine erhöhte Tonizität die lymphatische Aufnahme durch Erhöhung des osmotischen Drucks und das Ankurbeln der Lymphe beschleunigt.

Trehalose, Saccharose und Mannitol wurden bereits erfolgreich in mAb-Formulierungen verwendet. Zum Beispiel wurde Canakinumab, verwendet in der Therapie der juvenilen idiopathischen Arthritis, als Lösung aber auch als Pulver formuliert. (120–122)

3.5.3 Puffer-Systeme

Biologische Systeme besitzen ein Puffersystem, um das Säure-Base-Gleichgewicht bzw. einen bestimmten pH-Wert aufrecht zu erhalten. Puffer bestehen aus einer schwachen oder starken Säure/Base und deren korrespondierenden Salzen, wodurch eine Pufferlösung pH-Wert Änderungen ausgleicht (123).

Der Typ und die Ladung eines mAbs werden vom pH-Wert bestimmt. Ein leicht saurer pH-Wert von 5.5-6.5 mit niedrigem Ionengehalt bildet dabei die idealen Bedingungen in Bezug auf den iP des mAb (124,125). Aminosäureketten sind bei einem niedrigen pH-Wert positiv geladen, somit könnte eine Erhöhung des pH-Werts zu einer stabileren Proteinlösung führen. Dieser pH-Wert würde sich höchstwahrscheinlich im Rahmen von 5.0-7.4 bewegen (5).

Die Oberflächenladung des Proteins kann unter der Verwendung falscher Hilfsstoffe oder Pufferkonzentrationen (zu sauer oder zu basisch), verändert werden. Auch die Viskosität kann dadurch aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen erhöht werden, was zu Desamidierung und Aggregation führen kann. Somit schützen leicht saure Puffersysteme wie Histidin- oder Phosphatpuffer (pH-Wert um die 5.5) die Proteine vor diesen Instabilitäten. Histidin dient zur Pufferung von flüssigen und getrockneten mAb-Formulierungen. Sie wird beispielsweise bei Omalizumab und Canakinumab als Hilfsstoff eingesetzt. Histidin als basische Aminosäure zeigt eine hervorragende Pufferkapazität unter sauren Bedingungen. Unter der Verwendung von Histidin als Puffer wird die Viskosität der flüssigen Formulierung verringert (126). Des Weiteren zeigt Histidin im Vergleich zu anderen Puffersystemen, wie Zitratpuffer, eine bessere stabilisierende Wirkung, was besonders bei mAb-Formulierungen, die bei erhöhten Temperaturen getrocknet werden, wichtig ist (127). Zitratpuffer mit dem pH-Wert zwischen 5.0-7.5 werden verwendet, um mAb-Lösungen für die Gefriertrocknung zu formulieren. Diese werden beispielsweise auch bei Capalcizumab und Secukinumab eingesetzt. Es zeigte sich, dass bei einem pH-Wert von 6.5 die Zitratpuffer am stabilsten sind (97). Der richtig eingestellte pH-Wert und die daraus resultierende Pufferkapazität haben auch einen signifikanten Einfluss auf die Interaktion mit dem Gewebe nach der Verabreichung. Durch pH-Anpassung an den pH-Wert des Gewebes wird die Sicherheit des Arzneimittels nach subkutaner Verabreichung sichergestellt. Des Weiteren können hydrophobe Wechselwirkungen zwischen hydrophoben mAbs und dem lipophilen Gewebe der Subkutis durch Kombination weiterer Hilfsstoffe reduziert werden (31).

3.5.4 Enzyme

Enzyme sind weitere vielversprechende Hilfsstoff in der Formulierung einer subkutanen Darreichungsform. Hyaluronidase spielt hier eine wichtige Rolle. Das Zielkompartiment bei einer s.c. Injektionen ist die Hypodermis, in der sich neben den Fettbestandteilen auch Fibroblasten befinden. Wie bereits erwähnt bilden diese mit Glykosaminoglykanen und anderen Molekülen die EZM. Die Hyaluronsäure bildet dabei einen zentralen und strukturellen Bestandteil in der EZM. So beeinflusst sie nicht nur die Festigkeit und Plastizität des Gewebes, sondern auch den Stofftransport. Des Weiteren ist die Hyaluronsäure auch verantwortlich für das begrenzte Injektionsvolumen, das schmerzfrei möglich ist, von 1-2 ml (29,128,129). Durch die Zugabe von Hyaluronidase wird die Pharmakokinetik verbessert, indem die Absorptionsrate und die Bioverfügbarkeit eines mAbs erhöht wird (130). Das Enzym spaltet die Hyaluronsäure., genauer gesagt trennt sie die beta-glykosidischen Bindung zwischen N-Acetyl-D Glucosamin und D-Glucuronsäure (82,131,132).

Drei Hyaluronidase-hältige Medikamente für s.c. Injektionen sind die Amphadase, Hyelenex und Vitrase. Diese werden zur s.c. Flüssigkeitsverabreichung bei Symptomen der Austrocknung verwendet. Infolge der Injektion wird die Durchlässigkeit des Bindegewebes erhöht, wodurch injizierte Medikamente oder lokalisierte Exsudate und Transsudate leichter absorbiert werden können. Jedoch sind bei allen drei Medikamenten die Hyaluronidasen von verschiedener Herkunft. Hyelenex verwendet eine rekombinante humane Hyaluronidase, Vitrase eine aus Schafshoden verwendete und die Amphadase eine aus dem Rinderhoden hergestellte Hyaluronidase (133).

Derzeit befinden sich zwei s.c. mAb-Formulierungen mit humaner Hyaluronidase als Hilfsstoff auf dem Markt. Diese beiden sind Trastuzumab, das für die Behandlung von Brustkrebs und Rituximab, das zur Behandlung von Non-Hodgkin Lymphom eingesetzt wird. Handelsnamen der beiden Vertreter sind Herceptin - Hylecta™ und Rituximab - MabThera® (134,135).

3.5.5 Tenside/Surfactants

Tenside konzentrieren sich an der Luft-Flüssigkeits-, oder hydrophoben und hydrophilen Grenzfläche an. Vertreter daraus sind Polysorbat-20 und Polysorbat-80. Diese amphiphilen Polysorbate sind nicht ionische Tenside. Sie verringern nicht nur die Oberflächenspannung in der flüssigen Formulierung und während des Trocknungsprozesses, sondern auch an der

Verabreichungsstelle wodurch es zur geringeren Gefahr der Aggregation des Proteins kommt. Diese Polysorbate sind Mischung aus verschiedensten Fettsäureestern und können Schäden an Proteinen induzieren, weshalb sie nur in geringen Mengen zugesetzt werden dürfen. Der Abbau und die Beschädigung der Proteine sind abhängig vom pH-Wert der Lösung, der Anwesenheit von Sauerstoff, Bildung von Peroxiden, Wärme, Metallionen speziell Kupfer und UV-Licht. Studien zeigen, dass eine Lagerung der Polysorbatlösungen, lichtgeschützt, in Gegenwart von Stickstoff und bei niedrigen Temperaturen einen Abbau des Proteins verhindern kann (37,97,136). Insbesondere bei Trocknungsprozessen muss auf die geringe Stabilität der Tenside gegenüber chemischer und thermischer Photostabilität hingewiesen und geachtet werden (37,137). Tenside fungieren als chemische Begleiter, die eine Proteinaggregation während der Rückfaltung verhindern. Somit schützen sie die Proteinkonformationen vor thermischen, mechanischen und chemisch induzierten Beanspruchungen, wie sie beispielsweise bei SD und GT entstehen. Polysorbat-20 und Polysorbat-80 sind in bereits vermarkteten Trockenpulverformulierungen, die für subkutane Injektionen zugelassen sind enthalten (12,138).

Ein wichtiger Vertreter der Polysorbat-80 enthält ist Ronapreve. Es besteht aus Casivirimab und Imedinimab und kann intravenös und subkutan verabreicht werden. Dieses Medikament wurde zur Prophylaxe und zur Therapie von COVID-19 am Menschen getestet (139).

4 Diskussion

Die derzeit zugelassenen mABs werden vorwiegend i.v. appliziert. Diese invasive Form der Applikation führt jedoch zu längeren Krankenhausaufenthalten, da nur geschultes Personal die Verabreichung vornehmen kann. Im Vergleich dazu besteht bei s.c. Formulierungen die Möglichkeit der selbstständigen Verabreichung durch den/die Patienten/in, wodurch Krankenhausaufenthalte verkürzt oder sogar verhindert werden können. Dies führt zu einer Entlastung des Gesundheitswesens, aber auch zu einem verbesserten Ressourcenmanagement. Außerdem ist die s.c. Verabreichung weniger invasiv, wodurch die PatientInnencompliance gesteigert werden kann. Dementsprechend stellt die s.c. Applikation von mAbs eine vielversprechende Alternative zur i.v. Applikation dar. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit an den Beispielen Trastuzumab und Daratumumab demonstriert.

Studien zeigen, dass die s.c. Applikationsform von Trastuzumab von PatientInnen generell bevorzugt wird. Eine der größten Herausforderung ist die Formulierung einer s.c. Darreichungsform, da das Zielkompartiment bei einer s.c. Injektionen die Hypodermis ist, sie neben Fettbestandteilen Fibroblasten und die EZM enthält. Die Hyaluronsäure bildet dabei einen zentralen und strukturellen Bestandteil in der EZM und beeinflusst nicht nur die Festigkeit des Gewebes, sondern auch den Stofftransport. Dementsprechend wird durch die Verwendung des Enzyms Hyaluronidase in beispielsweise der Trastuzumab Formulierung das Hyaluronan abgebaut, so die s.c. Barriere „durchbrochen“ und der Stofftransport des aktiven Wirkstoffkandidaten ermöglicht. Neben der Formulierung ist auch die Dosierungsfindung wichtig. In der HannaH-Studie beschäftigte man sich in einer randomisierten offenen Phase 3 Studie mit dem neoadjuvanten Setting der Trastuzumab Therapie. Einschlusskriterien sind im Kapitel 3.4 nachzulesen. Dabei wurde eine entsprechende Dosierung für die s.c. Applikation ermittelt, die bei kürzerer Applikationszeit den gleichen therapeutischen Effekt wie nach i.v. Applikation erzielte. Neben Trastuzumab wurde Daratumumab als weiterer mAb für die s.c. Applikation zur Behandlung des Multiplen Myeloms 2020 in der EU zugelassen. In der COLUMBA-Studie wurden Vergleichsuntersuchungen der s.c. und i.v. Applikation von Daratumumab durchgeführt. Es handelte sich hierbei um eine multizentrische, offene, randomisierte Phase 3 Studie. Man testete die Wirksamkeit und die Nebenwirkungen der s.c. Applikation versus der i.v. Applikation. Da es hierbei zu keinerlei Nachteilen in der s.c. PatientInnengruppe kam -

weder hinsichtlich der Nebenwirkungen noch der Wirksamkeit, diene diese Studie zur Zulassung der s.c. Applikationsmöglichkeit von Daratumumab (140).

Die Einführung neuer mAbs Formulierungen auf den Markt stellt jedoch auch Herausforderungen hinsichtlich Herstellung und Stabilität dar. Für eine Marktzulassung müssen sowohl die Formulierung, die Sicherheit und die skalierbare Produktion als auch die Produktlagerung bzw. die Stabilität definiert und gegeben sein. Vor allem Stabilitätsschwierigkeiten der fragilen Biologika während der Herstellung aber auch während der späteren Lagerung sind herausfordernd. Diese können chemischer und physikalischer Natur sein, wie beispielsweise Oxidation oder Protein-Aggregation. Aber auch Herstellungs- und Lagertemperaturen können die Produktstabilität beeinflussen. In der Regel müssen mAB Formulierungen unter milden Temperaturbedingungen hergestellt und bei 2-8 Grad Celsius gelagert werden. Um diese Limitierungen hinsichtlich Produkt- und Lagerstabilität zu verbessern, werden, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, unterschiedliche Strategien verfolgt. Diese beinhalten die Zugabe von diversen Hilfsstoffen (z.B. Tenside, Saccharide und Puffer-Systeme) und auch die Überführung der liquiden Formulierung in ein stabiles Pulver. Dies kann durch schonende Trocknungsverfahren erfolgen. Die GT hat sich als geeignete Trocknungsstrategie erwiesen. Durch eine Überführung der flüssigen mAB Formulierung in ein gefriergetrocknetes Pulver können Instabilitäten, ausgelöst durch beispielsweise Hydrolyse, verhindert werden. Obwohl die technologische Umsetzung zeitintensiv (i.e., über 50 Stunden), aufwendig und teils fehleranfällig ist, kann ein Arzneimittel so für mehr als vier Jahre haltbar gemacht werden. Außerdem kann dadurch oft eine Lagerung bei Raumtemperatur erfolgen, wodurch die Transport- und Lagerlogistik der finalen Formulierung enorm vereinfacht werden kann. Mittlerweile werden auch andere alternative Trocknungsmethoden, wie die ST, Sprühgefriertrocknung, Mikrowellentrocknung und/oder Schaumtrocknung herangezogen. Die ST hat den großen Vorteil, dass sie im Vergleich zur GT schonender ist. Daneben können in kürzerer Zeit, größere Mengen an hochwertigen Partikeln mit gezielten Eigenschaften hergestellt werden. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die Überführung von flüssigen Zubereitungen in lagerstabile Pulver eine vielversprechende Strategie darstellen. Neben der Produktstabilität müssen jedoch auch noch wirtschaftliche Faktoren (Kosten/Nutzen) berücksichtigt werden.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit Frage der Möglichkeit einer s.c. Injektion der beiden Checkpoint-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab. Dies wäre

grundsätzlich möglich, allerdings müsste eine sorgfältige Formulierungsentwicklung durchgeführt werden. Genauer gesagt, müssten Hilfsstoffe, entsprechende Eigenschaften sowie möglich Interaktionen mit dem jeweiligen Protein evaluiert werden, um eine sichere Anwendung in der richtigen Dosis zu gewährleisten. Zu diesen Hilfsstoffen zählen Puffer-Systeme, Saccharide, Tenside und Enzyme. Puffer werden beispielsweise verwendet, um mAbs vor pH-Wert-Schwankungen zu schützen und Zucker, wie Saccharose, schützen mAbs vor prozessinduzierten, strukturellen Modifikationen, stabilisieren die Osmolalität und erleichtern die Arzneimittelabsorption. Zusätzlich kann mit Tensiden die Oberflächenaktivität moduliert werden, um hydrophobe Wechselwirkungen zu reduzieren und die systemische Aufnahme zu erleichtern.

Obwohl aus formulierungstechnischer Sicht gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche s.c. Applikation von Pembrolizumab und/oder Nivolumab gegeben wären, müssen weitere Studien durchgeführt werden. Zum einen müssen mögliche Nebenwirkungen durch notwendige höhere Dosierungen ausgeschlossen werden. Zum anderen muss die Wirksamkeit und vergleichbare Pharmakokinetik nach s.c. Applikation im Vergleich zur i.v. Applikation belegt werden.

Derzeit wird Pembrolizumab-Pulver nach Auflösen als Infusionslösung i.v. verabreicht. Um das vorliegende Präparat s.c. applizieren zu können, könnte demnach während des Resuspendierens wie bei Trastuzumab eine Hyaluronidase hinzugefügt werden. Dies könnte den Stofftransport des mAB ermöglichen, was in Studien mit klaren Ein- und Ausschlusskriterien evaluiert werden müsste. Als mögliche Dosierungsstrategien würden sich eine Depotform oder regelmäßige Injektionen etwa alle 2-3 Wochen ergeben. Gleiches gilt auch für den mAb Nivolumab.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine s.c. Injektion aus chemischer, physikalischer und pharmazeutischer Sicht möglich wäre. Studien wie die HannaH- und COLUMBA-Studie könnten als Vorlage für eine Zulassung der s.c. Applikationsmöglichkeit von Pembrolizumab und Nivolumab dienen. Die Berücksichtigung von Tierstudien scheint nicht als sinnvoll, da man aufgrund der unterschiedlichen Physiologie der Individuen nur schwierig Rückschlüsse auf die Therapie am Menschen ziehen kann. Klar ist jedoch, dass für die s.c. Applikation Änderungen in der Formulierung vorgenommen werden müssen, die mit Kosten und zeitlichen Aufwand verbunden sind. Die

adaptierten Formulierungen zeigten sich vor allem in ihrer Lagerung kompliziert und durch den Ressourcen- und Zeitaufwand sehr kostenintensiv.

4.1 Konklusion

Laut aktuellen Studien befinden sich mehr als 570 mAbs in klinischen Untersuchungen zur Marktzulassung. Derzeit sind in der europäischen Union 82 mAbs zugelassen. Von diesen 82 entfallen 30 auf die Krebsbehandlung. Der Marktwert der Biologika betrug 2018 115,2 Milliarden US-Dollar und wird bis 2025 auf bis zu 300 Milliarden US-Dollar geschätzt (7,8). Die am Markt befindlichen mAbs sind zum größten Teil für die i.v. Applikation vorgesehen. Da jedoch die s.c. Applikation Vorteile in der PatientInnencompliance, im Ressourcenmanagement (e.g., Abfallmanagement) und der Entlastung des Gesundheitssystems aufweist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit zur s.c. Applikation untersucht. Allgemein gilt, dass die fragilen Biologika individuelle Eigenschaften aufweisen, die im Besonderen während der Herstellung und Lagerungen berücksichtigt werden müssen. Es müssen geeignete Herstellungstechnologien und Prozessbedingungen gewählt werden, die die Pharmakokinetik der mAbs nicht negativ beeinflussen. Zusätzlich können diverse Hilfsstoffe und Trocknungsverfahren die Produkt- und Lagerstabilität steigern. Für eine erfolgreiche s.c. Applikation müssen vor allem Anpassungen der Formulierung und Dosierung vorgenommen werden. Dies zeigten Studien, in denen die s.c. Applikation von Trastuzumab und Daratumumab untersucht wurden. Diese zwei mAbs sind bereits am europäischen Markt zur s.c. Applikation zugelassen. Deren Formulierungsstrategie kann als wichtige Vorlage für weitere mAbs zur erfolgreichen s.c. Applikation gesehen werden. Die Vor- und Nachteile der s.c. bzw. i.v. Applikation sind nochmals in Tabelle 2 übersichtlich zusammengefasst.

Tabelle 2 Darstellung der Vor- und Nachteile der s.c. bzw. i.v. Applikation (81)

	Vorteile	Schwierigkeiten/Nachteile
s.c. Applikation	Kürzere klinische Aufenthalte	Schmerzfremie Applizierung höherer Volumina
	Optimaler Nutzen der Ressourcen	Ausreichende Absorption und Bioverfügbarkeit
	Selbstapplikation ist möglich	Richtige Dosierungsfindung

	Weniger invasiv als i.v. Applikation	Irritationen an der Einstichstelle
i.v. Applikation	Vorteile	Schwierigkeiten/Nachteile
	Geeignet für Stoffe, die starke Irritationen hervorrufen können	Spezielle Infusionssettings und eingeschultes Personal ist nötig
	Geeignet für Arzneimittel, die in größeren Volumina verabreicht werden müssen	Zur Infusionsapplikation benötigte invasive Katheter (Porth-a-cath, PICC...)
		Längerer klinischer Aufenthalt
		Höheres Risiko einer systemischen Infektion

5 Literaturverzeichnis

1. Medicines Agency E. Biosimilars in the EU - Information guide for healthcare professionals.
2. Mullard A. 2021 FDA approvals. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Feb 1;21(2):83–8.
3. Langford A, Bhatnagar B, Walters R, Tchessalov S, Ohtake S. Drying of Biopharmaceuticals: Recent Developments, New Technologies and Future Direction. *Japan Journal of Food Engineering*. 2018 Mar 15;19(1):15–24.
4. Brams J. Evaluate Pharma. *Pharma Asia* . 2018.
5. Cui Y, Cui P, Chen B, Li S, Guan H. Monoclonal antibodies: formulations of marketed products and recent advances in novel delivery system. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2017 Apr 3 [cited 2022 Apr 13];43(4):519–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28049357/>
6. Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US - The Antibody Society [Internet]. [cited 2022 Apr 13]. Available from: <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>
7. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science* 2020 27:1 [Internet]. 2020 Jan 2 [cited 2022 Apr 13];27(1):1–30. Available from: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-019-0592-z>
8. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1703531> [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Apr 13];12(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19420862.2019.1703531>
9. Grilo AL, Mantalaris A. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Apr 13];37(1):9–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29945725/>
10. Caffarel-Salvador E, Abramson A, Langer R, Traverso G. Oral delivery of biologics using drug-device combinations. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Apr 21];36:8. Available from: [/pmc/articles/PMC5732838/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)

11. Bannas P, Well L, Lenz A, Rissiek B, Haag F, Schmid J, et al. In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies. *Contrast Media Mol Imaging* [Internet]. 2014 Mar [cited 2022 Apr 21];9(2):135–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24523058/>
12. Reilly RM, Domingo R, Sandhu J. Oral delivery of antibodies. Future pharmacokinetic trends. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1997 [cited 2022 Apr 21];32(4):313–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9113439/>
13. Marquette S, Peerboom C, Yates A, Denis L, Langer I, Amighi K, et al. Stability study of full-length antibody (anti-TNF alpha) loaded PLGA microspheres. *Int J Pharm* [Internet]. 2014 Aug 15 [cited 2022 Apr 21];470(1–2):41–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24792974/>
14. Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein and Cell*. 2018 Jan 1;9(1):63–73.
15. Wang Q, Chen Y, Pelletier M, Cvitkovic R, Bonnell J, Chang CY, et al. Enhancement of antibody functions through Fc multiplications. *MAbs* [Internet]. 2017 Apr 3 [cited 2022 Apr 21];9(3):393. Available from: </pmc/articles/PMC5384704/>
16. Lázár-Molnár E, Delgado JC. Implications of Monoclonal Antibody Therapeutics Use for Clinical Laboratory Testing. *Clin Chem* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Apr 21];65(3):393–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30377156/>
17. Robertson JS, Chui WK, Genazzani AA, Malan SF, López de la Rica Manjavacas A, Mignot G, et al. The INN global nomenclature of biological medicines: A continuous challenge. *Biologicals* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Apr 21];60:15–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31130314/>
18. Hindryckx P, Novak G, vande Casteele N, Khanna R, Laukens D, Vipul J, et al. Incidence, Prevention and Management of Anti-Drug Antibodies Against Therapeutic Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: A Practical Overview. *Drugs*. 2017 Mar 1;77(4):363–77.
19. Jin R, Gu HY, Li LL, Sun LL. Current status of Chinese herbal preparations included in LiverTox database. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2016 Nov 20;24(11):817–23.

20. Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani BM, Rose RH, Chetty M. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2013 Feb [cited 2022 Apr 21];52(2):83–124. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23299465/>
21. Nilvebrant J, Rockberg J. An Introduction to Epitope Mapping. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Apr 21];1785:1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29714008/>
22. Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. 4th ed. Thieme; 2016.
23. Sarmay G, Lund J, Rozsnyay Z, Gergely J, Jefferis R. Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc gamma receptor. *Mol Immunol* [Internet]. 1992 [cited 2022 Apr 21];29(5):633–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1533898/>
24. Bumbaca D, Boswell CA, Fielder PJ, Khawli LA. Physiochemical and biochemical factors influencing the pharmacokinetics of antibody therapeutics. *AAPS J* [Internet]. 2012 Sep [cited 2022 Apr 21];14(3):554–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610647/>
25. Ovacik M, Lin K. Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development. *Clin Transl Sci* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Apr 21];11(6):540–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29877608/>
26. Sequeira JAD, Santos AC, Serra J, Estevens C, Seiça R, Veiga F, et al. Subcutaneous delivery of biotherapeutics: challenges at the injection site. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Apr 21];16(2):143–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30632401/>
27. Bittner B, Richter W, Schmidt J. Subcutaneous Administration of Biotherapeutics: An Overview of Current Challenges and Opportunities. *BioDrugs* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Apr 21];32(5):425–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30043229/>
28. Viola M, Sequeira J, Seiça R, Veiga F, Serra J, Santos AC, et al. Subcutaneous delivery of monoclonal antibodies: How do we get there? *J Control Release* [Internet].

- 2018 Sep 28 [cited 2022 Apr 21];286:301–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30077735/>
29. Kinnunen HM, Mrsny RJ. Improving the outcomes of biopharmaceutical delivery via the subcutaneous route by understanding the chemical, physical and physiological properties of the subcutaneous injection site. *J Control Release* [Internet]. 2014 May 28 [cited 2022 Apr 21];182(1):22–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24631859/>
 30. Zheng Y, Tesar DB, Benincosa L, Birnböck H, Boswell CA, Bumbaca D, et al. Minipig as a potential translatable model for monoclonal antibody pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration. *MAbs* [Internet]. 2012 [cited 2022 Apr 21];4(2):243–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22453096/>
 31. Datta-Mannan A, Estwick S, Zhou C, Choi H, Douglass NE, Witcher DR, et al. Influence of physiochemical properties on the subcutaneous absorption and bioavailability of monoclonal antibodies. *MAbs* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Apr 21];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32486889/>
 32. Tabor Aaron, Blair RM. *Nutritional cosmetics : beauty from within*. 2009;545.
 33. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Apr 21];6(9):576–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28653357/>
 34. Haraya K, Tachibana T, Igawa T. Improvement of pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies by antibody engineering. *Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Apr 21];34(1):25–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30472066/>
 35. Wohlrab J. Pharmakokinetische Besonderheiten von therapeutischen Antikörpern. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Apr 21];13(6):530–4. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ddg.12648_suppl
 36. Balcão VM, Vila MMDC. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015 Oct 1;93:25–41.

37. le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Apr 21];109(1):169–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31465737/>
38. Glassman PM, Balthasar JP. Physiologically-based modeling of monoclonal antibody pharmacokinetics in drug discovery and development. *Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Apr 21];34(1):3–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30522890/>
39. Kok-Yong S, Lawrence L. Drug Distribution and Drug Elimination. *Basic Pharmacokinetic Concepts and Some Clinical Applications* [Internet]. 2015 Nov 18 [cited 2022 Apr 21]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/48275>
40. Loftsson T. Essential Pharmacokinetics: A Primer for Pharmaceutical Scientists. *Essential Pharmacokinetics: A Primer for Pharmaceutical Scientists*. 2015 Apr 1;1–170.
41. Matucci A, Vultaggio A, Danesi R. The use of intravenous versus subcutaneous monoclonal antibodies in the treatment of severe asthma: a review. *Respir Res* [Internet]. 2018 Aug 16 [cited 2022 Apr 21];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30115042/>
42. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Apr 21];9(1):15–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28421387/>
43. Agadjanyan MG, Zagorski K, Petrushina I, Davtyan H, Kazarian K, Antonenko M, et al. Humanized monoclonal antibody armanezumab specific to N-terminus of pathological tau: characterization and therapeutic potency. *Molecular Neurodegeneration* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2022 Apr 21];12(1):33–33. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC5418694>
44. Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function - PubMed [Internet]. [cited 2022 Apr 21]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16375256/>
45. Ouellette D, Alessandri L, Chin A, Grinnell C, Tarcsa E, Radziejewski C, et al. Studies in serum support rapid formation of disulfide bond between unpaired cysteine

- residues in the VH domain of an immunoglobulin G1 molecule. *Analytical Biochemistry*. 2010 Feb 1;397(1):37–47.
46. McNicholas N, Hutchinson M, McGuigan C, Chataway J. 2017 McDonald diagnostic criteria: A review of the evidence. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2018 Aug 1;24:48–54.
 47. Bown HK, Bonn C, Yohe S, Yadav DB, Patapoff TW, Daugherty A, et al. In vitro model for predicting bioavailability of subcutaneously injected monoclonal antibodies. *Journal of Controlled Release*. 2018 Mar 10;273:13–20.
 48. Bown HK, Bonn C, Yohe S, Yadav DB, Patapoff TW, Daugherty A, et al. In vitro model for predicting bioavailability of subcutaneously injected monoclonal antibodies. *J Control Release [Internet]*. 2018 Mar 10 [cited 2022 Apr 21];273:13–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29355621/>
 49. Piñero J, Furlong LI, Sanz F. In silico models in drug development: where we are. *Curr Opin Pharmacol [Internet]*. 2018 Oct 1 [cited 2022 Apr 21];42:111–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30205360/>
 50. Sánchez-Félix M, Burke M, Chen HH, Patterson C, Mittal S. Predicting bioavailability of monoclonal antibodies after subcutaneous administration: Open innovation challenge. *Adv Drug Deliv Rev [Internet]*. 2020 Dec 1 [cited 2022 Apr 21];167:66–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32473188/>
 51. Collins DS, Sánchez-Félix M, Badkar A v., Mrsny R. Accelerating the development of novel technologies and tools for the subcutaneous delivery of biotherapeutics. *J Control Release [Internet]*. 2020 May 10 [cited 2022 Apr 21];321:475–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32105759/>
 52. Wada R, Matsui M, Kawasaki N. Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. *MAbs [Internet]*. 2019 Feb 17 [cited 2022 Apr 21];11(2):350. Available from: [/pmc/articles/PMC6380427/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32105759/)
 53. Millward TA, Heitzmann M, Bill K, Längle U, Schumacher P, Forrer K. Effect of constant and variable domain glycosylation on pharmacokinetics of therapeutic antibodies in mice. *Biologicals [Internet]*. 2008 Jan [cited 2022 Apr 21];36(1):41–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17890101/>

54. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy [Internet]. 2017 Dec 5 [cited 2022 Apr 21];3–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29461782/>
55. Onkologie L. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms.
56. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2022 Apr 21];129(7):1666–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131946/>
57. Cancer Statistics Review, 1975-2013 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review [Internet]. [cited 2022 Apr 21]. Available from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/
58. Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2010 Nov [cited 2022 Apr 21];10(11):1811–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21080806/>
59. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2022 Apr 21];50(4):215–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10986965/>
60. Kosary CL, Altekruse SF, Ruhl J, Lee R, Dickie L. Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: collaborative stage data collection system, version 1 and version 2. *Cancer* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2022 Apr 21];120 Suppl 23(S23):3807–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25412392/>
61. Ekwueme DU, Guy GP, Li C, Rim SH, Parelkar P, Chen SC. The health burden and economic costs of cutaneous melanoma mortality by race/ethnicity-United States, 2000 to 2006. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2011 Nov [cited 2022 Apr 21];65(5 Suppl 1):S133-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018062>
62. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Apr 21];136(5):E359–86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.29210>

63. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Apr 21];27(1):3–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19095149/>
64. Kampagne „Bedeutung der adjuvanten Melanom Behandlung“ [Internet]. [cited 2022 Apr 21]. Available from: <https://www.adjuvant.at/>
65. Heckman CJ, Darlow SD, Ritterband LM, Handorf EA, Manne SL. Efficacy of an Intervention to Alter Skin Cancer Risk Behaviors in Young Adults. *Am J Prev Med* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 Apr 21];51(1):1. Available from: </pmc/articles/PMC4914462/>
66. Herold G. Herold G: Innere Medizin. Gerd Herold Verlag, Köln 2018. 2018. 401–406 p.
67. Kraywinkel K, Schönfeld I. Epidemiology of non-small cell lung cancer in Germany. *Onkologe*. 2018 Dec 1;24(12):946–51.
68. Kwok G, Yau TCC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Apr 22];12(11):2777–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27398650/>
69. Caldwell C, Johnson CE, Balaji VN, Balaji GA, Hammer RD, Kannan R. Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for Determination of PDL1 Expression in Tumors. *Scientific Reports* 2017 7:1 [Internet]. 2017 Oct 20 [cited 2022 Apr 22];7(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-10946-2>
70. Almutairi AR, Erstad BL, McBride A, Slack M, Abraham I. Immune checkpoint inhibitors-associated risk of immune-related hypothyroidism in older patients with advanced melanoma: a real-world analysis of US SEER-Medicare data. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2021;20(4):489–97.
71. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The next immune-checkpoint inhibitors: Pd-1/pd-11 blockade in melanoma. *Clinical Therapeutics*. 2015 Apr 1;37(4):764–82.
72. Rendon A, Rayi A. Nivolumab. *StatPearls* [Internet]. 2021 Dec 12 [cited 2022 Apr 22]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567801/>

73. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2016 Nov 10 [cited 2022 Apr 22];375(19):1823–33. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1606774>
74. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, de Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 May 31;378(22):2078–92.
75. Ismael G, Hegg R, Muehlbauer S, Heinzmann D, Lum B, Kim SB, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of (neo)adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive, clinical stage I–III breast cancer (HannaH study): a phase 3, open-label, multicentre, randomised trial. *The Lancet Oncology* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2022 Apr 25];13(9):869–78. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204512703297/fulltext>
76. Stefanou D, Kokkali S, Tripodaki ES, Drizou M, Magou E, Zylis D, et al. Subcutaneous Trastuzumab Combined with Pertuzumab and Docetaxel as First-line Treatment of Advanced HER2-positive Breast Cancer. *Anticancer Res* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Apr 25];38(11):6565–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30396987/>
77. Jackisch C, Stroyakovskiy D, Pivot X, Ahn JS, Melichar B, Chen SC, et al. Subcutaneous vs Intravenous Trastuzumab for Patients with ERBB2-Positive Early Breast Cancer: Final Analysis of the HannaH Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*. 2019 May 1;5(5).
78. Ismael G, Hegg R, Muehlbauer S, Heinzmann D, Lum B, Kim SB, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of (neo)adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive, clinical stage I–III breast cancer (HannaH study): a phase 3, open-label, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2022 Apr 25];13(9):869–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22884505/>
79. X P, J G, V M, G C, A K, S V, et al. Patients’ preferences for subcutaneous trastuzumab versus conventional intravenous infusion for the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer: final analysis of 488 patients in the international,

- randomized, two-cohort PrefHer study. *Ann Oncol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2022 Apr 25];25(10):1979–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25070545/>
80. Jackisch C, Müller V, Dall P, Neumeister R, Park-Simon TW, Ruf-Dördelmann A, et al. Subcutaneous Trastuzumab for HER2-positive Breast Cancer - Evidence and Practical Experience in 7 German Centers. *Geburtshilfe Frauenheilkd* [Internet]. 2015 Jun 10 [cited 2022 Apr 28];75(6):566–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26166837/>
 81. Jackisch C, Müller V, Maintz C, Hell S, Ataseven B. Subcutaneous Administration of Monoclonal Antibodies in Oncology. *Geburtshilfe Frauenheilkd* [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 25];74(4):343–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25076790/>
 82. Converting Intravenous Dosing to Subcutaneous Dosing With Recombinant Human Hyaluronidase [Internet]. [cited 2022 Apr 25]. Available from: <https://www.pharmtech.com/view/converting-intravenous-dosing-subcutaneous-dosing-recombinant-human-hyaluronidase>
 83. CHMP. ANHANG I ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS [Internet]. [cited 2022 Apr 26]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_de.pdf
 84. Antibody Services from GenScript Academic Services. [cited 2022 Apr 26]; Available from: www.GenScript.com
 85. Daugherty AL, Mersny RJ. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006 Aug 7;58(5–6):686–706.
 86. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2022 Apr 28];96(1):1–26. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354916321633/fulltext>
 87. Gikanga B, Turok R, Hui A, Bowen M, Stauch OB, Maa YF. Manufacturing of High-Concentration Monoclonal Antibody Formulations via Spray Drying-the Road to

- Manufacturing Scale. PDA J Pharm Sci Technol [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Apr 27];69(1):59–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25691715/>
88. Chari R, Jerath K, Badkar A v., Kalonia DS. Long- and short-range electrostatic interactions affect the rheology of highly concentrated antibody solutions. Pharm Res [Internet]. 2009 Dec [cited 2022 Apr 29];26(12):2607–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19795191/>
89. Jezek J, Darton NJ, Derham BK, Royle N, Simpson I. Biopharmaceutical formulations for pre-filled delivery devices. <http://dx.doi.org/10.1517/174252472013780023> [Internet]. 2013 Jun [cited 2022 Apr 29];10(6):811–28. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.2013.780023>
90. Hawe A, Wiggenhorn M, van de Weert M, Garbe JHO, Mahler HC, Jiskoot W. Forced degradation of therapeutic proteins. J Pharm Sci [Internet]. 2012 [cited 2022 Apr 29];101(3):895–913. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22083792/>
91. ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and drug products | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2022 Apr 29]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products#current-effective-version-section>
92. ICH Q5C Stability testing of biotechnological/biological products | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2022 Apr 29]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q5c-stability-testing-biotechnologicalbiological-products>
93. Lee SH, Heng D, Ng WK, Chan HK, Tan RBH. Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. Int J Pharm [Internet]. 2011 Jan 17 [cited 2022 Apr 26];403(1–2):192–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20951781/>
94. Emami F, Vatanara A, Park EJ, Na DH. Drying Technologies for the Stability and Bioavailability of Biopharmaceuticals. Pharmaceutics [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Apr 26];10(3). Available from: </pmc/articles/PMC6161129/>

95. Cicerone MT, Pikal MJ, Qian KK. Stabilization of Proteins in Solid Form. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Apr 26];93:14. Available from: [/pmc/articles/PMC4623959/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499299/)
96. Walters RH, Bhatnagar B, Tchessalov S, Izutsu KI, Tsumoto K, Ohtake S. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(9):2673–95.
97. Batens M, Massant J, Teodorescu B, van den Mooter G. Formulating monoclonal antibodies as powders for reconstitution at high concentration using spray drying: Models and pitfalls. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Apr 26];127:407–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499299/>
98. Lyophilization and freeze drying of biopharmaceuticals | HALIX [Internet]. [cited 2022 Apr 27]. Available from: https://www.halix.nl/lyophilization/?gclid=CjwKCAjwsJ6TBhAIEiwAfl4TW11Cl2KlrmVjF6eGtNSt8rLUajaUKRA4QxYj281grO67ffNz-WIYiBoCVkcQAvD_BwE
99. Liu B, Zhou X. Freeze-Drying of Proteins. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 27];2180:683–702. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0783-1_37
100. Maltesen MJ, van de Weert M. Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2008 Sep 1;5(2–3):e81–8.
101. Pinto JT, Faulhammer E, Dieplinger J, Dekner M, Makert C, Nieder M, et al. Progress in spray-drying of protein pharmaceuticals: Literature analysis of trends in formulation and process attributes. <https://doi.org/10.1080/0737393720211903032> [Internet]. 2021 [cited 2022 May 12];39(11):1415–46. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373937.2021.1903032>
102. Bolje A, Gobec S. Analytical Techniques for Structural Characterization of Proteins in Solid Pharmaceutical Forms: An Overview. *Pharmaceutics* 2021, Vol 13, Page 534 [Internet]. 2021 Apr 11 [cited 2022 Apr 27];13(4):534. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/4/534/htm>

103. Angkawinitwong U, Sharma G, Khaw PT, Brocchini S, Williams GR. Solid-state protein formulations. *Ther Deliv* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Apr 27];6(1):59–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25565441/>
104. Bowen M, Turok R, Maa YF. Spray Drying of Monoclonal Antibodies: Investigating Powder-Based Biologic Drug Substance Bulk Storage. <https://doi.org/10.1080/073739372013796968> [Internet]. 2013 Oct [cited 2022 Apr 27];31(13–14):1441–50. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373937.2013.796968>
105. Masters K. *Spray Drying*. London: Hill Books; 1972.
106. ENABLING SUBCUTANEOUS DELIVERY OF BIOLOGICS - ONdrugDelivery [Internet]. [cited 2022 Apr 27]. Available from: <https://ondrugdelivery.com/enabling-subcutaneous-delivery-of-biologics/>
107. Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2011 Oct [cited 2022 Apr 27];63(13):1053–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21756953/>
108. Carpenter JF, Prestrelski SJ, Arakawa T. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1993 [cited 2022 Apr 27];303(2):456–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8512328/>
109. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2022 Apr 27];60:73–103. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>
110. Vitrifikation - DocCheck Flexikon [Internet]. [cited 2022 Apr 27]. Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Vitrifikation>
111. Chang L, Shepherd D, Sun J, Ouellette D, Grant KL, Tang X, et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *J Pharm Sci* [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 27];94(7):1427–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15920775/>

112. Massant J, Fleurime S, Batens M, Vanhaerents H, van den Mooter G. Formulating monoclonal antibodies as powders for reconstitution at high concentration using spray-drying: Trehalose/amino acid combinations as reconstitution time reducing and stability improving formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Apr 27];156:131–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32882422/>
113. Haeuser C, Goldbach P, Huwyler J, Friess W, Allmendinger A. Impact of dextran on thermal properties, product quality attributes, and monoclonal antibody stability in freeze-dried formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020 Feb 1;147:45–56.
114. Schersch K, Betz O, Garidel P, Muehlau S, Bassarab S, Winter G. Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins III: Collapse during storage at elevated temperatures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013 Oct 1;85(2):240–52.
115. Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Apr 27];18(1):24. Available from: </pmc/articles/PMC2708026/>
116. Moorthy BS, Zarraga IE, Kumar L, Walters BT, Goldbach P, Topp EM, et al. Solid-State Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry: Correlation of Deuterium Uptake and Long-Term Stability of Lyophilized Monoclonal Antibody Formulations. *Mol Pharm* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2022 Apr 27];15(1):1–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29182876/>
117. Shire SJ. Formulation and manufacturability of biologics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009 Dec 1;20(6):708–14.
118. Jovanović N, Bouchard A, Hofland GW, Witkamp GJ, Crommelin DJA, Jiskoot W. Distinct effects of sucrose and trehalose on protein stability during supercritical fluid drying and freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006 Mar 1;27(4):336–45.
119. Rajagopal K, Wood J, Tran B, Patapoff TW, Nivaggioli T. Trehalose limits BSA aggregation in spray-dried formulations at high temperatures: Implications in

- preparing polymer implants for long-term protein delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2022 Apr 27];102(8):2655–66. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354915309886/fulltext>
120. CHMP. ANHANG I ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS [Internet]. [cited 2022 Apr 27]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ilaris-epar-product-information_de.pdf
 121. Basson C, Thuren T, Foo SY, Fishman MC. USE OF IL - 1 BETA BINDING ANTIBODIES FOR TREATING PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE . Switzerland; US 2018 0258166 A1, 2018.
 122. Jameel F, Skoug JW, Nebitt RR. Development of Biopharmaceutical Drug-Device Products. 2020.
 123. Proksch E. Buffering Capacity. *Current Problems in Dermatology* (Switzerland) [Internet]. 2018 [cited 2022 Apr 27];54:11–8. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/489513>
 124. Awotwe-Otoo D, Agarabi C, Khan MA. An Integrated Process Analytical Technology (PAT) Approach to Monitoring the Effect of Supercooling on Lyophilization Product and Process Parameters of Model Monoclonal Antibody Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Apr 27];103(7):2042–52. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354915305153/fulltext>
 125. Luo S, McSweeney KM, Wang T, Bacot SM, Feldman GM, Zhang B. Defining the right diluent for intravenous infusion of therapeutic antibodies. *MAbs* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Apr 27];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31774346/>
 126. Baek Y, Singh N, Arunkumar A, Zydney AL. Effects of Histidine and Sucrose on the Biophysical Properties of a Monoclonal Antibody. *Pharmaceutical Research* 2016 34:3 [Internet]. 2016 Dec 29 [cited 2022 Apr 27];34(3):629–39. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-016-2092-0>
 127. Jiskoot W, Randolph TW, Volkin DB, Middaugh CR, Schöneich C, Winter G, et al. Protein Instability and Immunogenicity: Roadblocks to Clinical Application of

- Injectable Protein Delivery Systems for Sustained Release. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2022 Apr 27];101(3):946–54. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354915316981/fulltext>
128. Kinnunen HM, Sharma V, Contreras-Rojas LR, Yu Y, Alleman C, Sreedhara A, et al. A novel in vitro method to model the fate of subcutaneously administered biopharmaceuticals and associated formulation components. *Journal of Controlled Release*. 2015 Sep 28;214:94–102.
 129. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Apr 27];25(2):92–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/exd.12832>
 130. Wohlrab J, Wohlrab D, Wohlrab L, Wohlrab C, Wohlrab A. Use of Hyaluronidase for Pharmacokinetic Increase in Bioavailability of Intracutaneously Applied Substances. *Skin Pharmacology and Physiology* [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 28];27(5):276–82. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/360545>
 131. Locke KW, Maneval DC, LaBarre MJ. ENHANZE® drug delivery technology: a novel approach to subcutaneous administration using recombinant human hyaluronidase PH20. <https://doi.org/10.1080/1071754420181551442> [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Apr 28];26(1):98–106. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10717544.2018.1551442>
 132. Frost GI. Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. <http://dx.doi.org/10.1517/1742524744427> [Internet]. 2007 Jul [cited 2022 Apr 28];4(4):427–40. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.4.4.427>
 133. Kaul A, Short WD, Wang X, Keswani SG. Hyaluronidases in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021 Mar 2 [cited 2022 Apr 28];22(6):1–11. Available from: [/pmc/articles/PMC8004219/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348004219/)
 134. Dent S, Ammendolea C, Christofides A, Edwards S, Incekol D, Pourmirza B, et al. A multidisciplinary perspective on the subcutaneous administration of trastuzumab in

- HER2-positive breast cancer. *Current Oncology* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Apr 28];26(1):e70. Available from: [/pmc/articles/PMC6380645/](#)
135. Shpilberg O, Jackisch C. Subcutaneous administration of rituximab (MabThera) and trastuzumab (Herceptin) using hyaluronidase. *British Journal of Cancer* [Internet]. 2013 Sep 17 [cited 2022 Apr 28];109(6):1556. Available from: [/pmc/articles/PMC3776971/](#)
 136. Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2022 Apr 28];97(8):2924–35. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354916326570/fulltext>
 137. Chiu J, Valente KN, Levy NE, Min L, Lenhoff AM, Lee KH. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Apr 28];114(5):1006. Available from: [/pmc/articles/PMC5360534/](#)
 138. Randolph WT, Jones LTS. *Rational Design of Stable Protein Formulations* . Vol. 13. 2002.
 139. Sidebottom DB, Gill D. Ronapreve for prophylaxis and treatment of covid-19. *BMJ* [Internet]. 2021 Sep 2 [cited 2022 Apr 28];374. Available from: <https://www.bmj.com/content/374/bmj.n2136>
 140. Mateos MV, Nahi H, Legiec W, Grosicki S, Vorobyev V, Spicka I, et al. Subcutaneous versus intravenous daratumumab in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (COLUMBA): a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Haematology* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 May 10];7(5):e370–80. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2352302620300703/fulltext>

