



KOMMENTAR

zum EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCH

Begründet von

Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Horst Böhme †, Universität Marburg

Fortgeführt von

Prof. Dr. Klaus Hartke †, Universität Marburg

Dr. Helga Hartke, Marburg

Prof. Dr. Gerhard Rücker †, Universität Bonn

Prof. Dr. Max Wichtl †, Universität Marburg

Herausgegeben von

Prof. Dr. Franz Bracher, Universität München

Prof. Dr. Peter Heisig, Universität Hamburg

Prof. Dr. Peter Langguth, Universität Mainz

Prof. Dr. Dr. Drs. h. c. Ernst Mutschler, Universität Frankfurt a.M.

Prof. Dr. Tanja Schirmeister, Universität Mainz

Prof. Dr. Gerhard Scriba, Universität Jena

Prof. Dr. Elisabeth Stahl-Biskup, Universität Hamburg

Prof. Dr. Reinhard Troschütz, Universität Erlangen

Gesamtwerk mit 70. Aktualisierungslieferung 2022

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
Govi – ein Imprint der Avoxa Mediengruppe

Pflanzliche Drogen zur Teebereitung

Plantae ad ptisanam

Definition

Die „Teedroge“ ist eine Drogenzubereitung mit dem Bestimmungszweck der Bereitung eines Tees. Sie unterscheidet sich von der unbearbeiteten pflanzlichen Droge (Rohdroge, Ganzdroge) durch die Tatsache, dass sie zerkleinert – meist geschnitten (Schnittdroge) – als homogenes Produkt vorliegt. Schnittdrogen werden als Bulk in den Verkehr gebracht, werden meist dann – in Tüten oder anderen größeren Behältnissen abgepackt – an den Verbraucher weitergegeben. Zur Herstellung von Teebeuteln werden manche Drogen auch grob pulverisiert. In beiden Fällen kann es sich entweder um eine Einzeldroge oder um eine Drogenmischung handeln. Zur Definition der Rohdroge siehe den Kommentar zu **Pflanzliche Drogen**, zur Definition der Drogenzubereitung siehe den Kommentar zu **Zubereitungen aus pflanzlichen Drogen** (beide Ph. Eur., unter „Monographiegruppen, Allgemeine Monographien“).

Die Teebereitung kann auf dreierlei Weise erfolgen¹⁾. Meist wird ein heißer Teeaufguss bereitet, indem die Teedroge mit siedendem Wasser versetzt wird, der Ansatz dann eine bestimmte Zeit (wenige Minuten) stehen gelassen und dann abgeseiht wird. In manchen Fällen ist diese Zubereitungsart nicht angemessen und längeres Kochen (Abkochung) oder eine Kaltmazeration über mehrere Stunden ist angebracht. Eine Abkochung ist dann sinnvoll, wenn die Teedroge aus noch relativ dicken Drogenstücken besteht, die schlecht vom Wasser durchtränkt werden, was meist auf Wurzel- und Rhizomdrogen zutrifft. Eine Kaltmazeration ist z.B. bei Schleimdrogen angebracht, damit sich während der Mazerationszeit der Schleim bereits ausbilden kann. Auch wenn verhindert werden soll, dass bestimmte Inhaltsstoffe in Lösung gehen, wird eine Kaltmazeration durchgeführt; so z.B. bei **Bärentraubenblätter** (Ph. Eur.) mit ihren schlecht verträglichen Gerbstoffen, die möglichst nicht oder zumindest nur eingeschränkt in den Tee

gelangen sollen. Wie der Tee dann im Einzelnen zubereitet wird, ist der Packungsaufschrift oder -beilage zu entnehmen.

Die Ausgangsdroge(n) zur Herstellung der Teedroge/Teemischung müssen den jeweiligen Drogenmonographien entsprechen. Da durch das Schneiden die charakteristischen makroskopischen Merkmale zerstört werden, muss die Teedroge die makroskopische Identitätsprüfung (A) nicht mehr durchlaufen, alle anderen Qualitätsanforderungen muss sie aber erfüllen. Dies geht zwar aus der hier vorliegenden Monographie nicht hervor, ergibt sich aber aus der Allgemeinen Monographie **Pflanzliche Drogen** (Ph. Eur.).

Bei einigen Drogenmonographien von Ätherisch-Öl-Drogen wird auch der Tatsache Rechnung getragen, dass nach dem Schneiden das ätherische Öl leichter verdunsten kann. Dann wird bei der Schnittdroge ein etwas niedrigerer Ölgehalt als bei der Rohdroge gefordert (z.B. **Eucalyptusblätter**, Ph. Eur.). In Einzelfällen gibt es auch eine separate Monographie für die geschnittene Teedroge (z.B. **Geschnittene Baldrianwurzel**, Ph. Eur.).

Prüfung auf Identität

Zur Sicherstellung der Identität werden in Bezug auf die Identität nur die botanischen Untersuchungen vorgeschrieben (makroskopisch und mikroskopisch), die Inhaltsstoffe bleiben unberücksichtigt. Soweit es sich um eine Einzeldroge handelt und für diese eine spezifische Monographie vorliegt, ist das gesamte Programm der Identitätsprüfung abzuarbeiten, also auch die Inhaltsstoff-bezogenen Prüfungen wie z.B. die Dünnschichtchromatographie. Bei Teemischungen ist dies in der Regel nicht möglich, sodass man sich auf die botanischen Prüfungen verlassen muss.

Prüfung auf Reinheit

In Bezug auf die Prüfung „Mikrobielle Verunreinigung“ wird auf den Abschnitt „Pflanzliche Arzneimittel“ in **5.1.8** (Ph. Eur.) verwiesen. Darin werden Grenzwerte für die mikrobielle Belastung vorgegeben. Bei Teedrogen, die vor der Anwendung mit siedendem Wasser versetzt werden, sind die mikrobiellen Akzeptanzkriterien höher als bei Teedrogen, die ohne Kontakt mit siedendem Wasser zur Anwendung kommen. Dabei geht man davon aus, dass das siedende Wasser die Keimzahl reduziert; siehe dazu den Kommentar zu **5.1.8 Mikrobiologische Qualität von pflanzlichen Arzneimitteln zum Einnehmen und von Extrakten zu deren Herstellung** (Ph. Eur.).

Bei Teedrogen gelten die Qualitätsvorgaben in den jeweiligen Monographien oder zumindest die An-

forderungen der Allgemeinen Monographie **Pflanzliche Drogen** (Ph. Eur.). Im Falle von Drogenmischungen müssen die einzelnen Bestandteile makroskopisch voneinander getrennt werden, die einzelnen Bestandteile können dann ausgewogen werden. Bei Teebeuteln ist ein Verfahren aufgezeigt, mit dem statistisch korrekt die Gewichtsgleichmäßigkeit der Beutelinhalte überprüft werden muss. Abweichungen sind nur bis zu einem bestimmten Prozentsatz zugelassen.

Details zum Thema „Tee als phytotherapeutische Darreichungsform“ (Wertigkeit, therapeutische Gesichtspunkte, Übergangsquoten der Drogeninhaltsstoffe, Dosierung u. a.) siehe Lit.¹⁾.

E. Stahl-Biskup

Literatur

- 1) B. Frank, Z. Phytother. 40, 244-253 (2019).

[¹⁸F]PSMA-1007-Injektionslösung

PSMA-1007[¹⁸F] solutio injectabilis

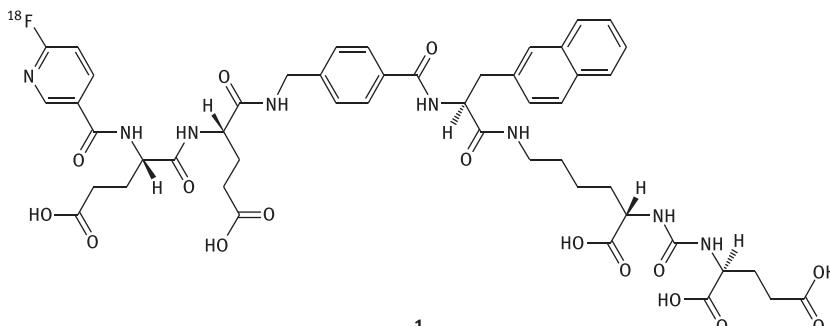
Allgemeine Angaben

[¹⁸F]PSMA-1007 (1) gehört zu einer Gruppe niedermolekularer Inhibitoren des Prostataspezifischen Membranantigens (PSMA), die für nuklearmedizinische Anwendungen entwickelt wurden. Anwendung in der PET, SPECT und Endoradiotherapie finden neben dem PSMA-1007 u.a. auch die Verbindungen PSMA-11, PSMA-617, PSMA I&T, PSMA I&S, DCFBC und DCFPyL nach Markierung mit geeigneten Radionukliden. Eine Übersicht über die einzelnen Radiopharmaka, deren Struktur und Anwendungsgebiet ist der Fachliteratur zu entnehmen¹⁾.

Den oben genannten peptidomimetischen Inhibitoren ist gemein, dass sie PSMA – eine membrangebundene, Zink-abhängige Carboxypeptidase, die vorzugsweise Peptide mit einem C-terminalen Glutamat spaltet – adressieren. Beim gesunden Patienten wird PSMA in einer Reihe von Geweben wie Gehirn, Niere, Speicheldrüsen oder Dünndarm exprimiert. Erste Versuche, geeignete Inhibitoren des PSMA zu entwickeln, hatten zum Ziel, die Aufgaben des PSMA im ZNS und des durch das PSMA freigesetzten Glutamats besser zu verste-

hen. Dabei wurde *N*-Acetyl-Aspartyl-Glutaminsäure als Leitstruktur verwendet und optimiert. Da nachgewiesen werden konnte, dass PSMA in Prostatakarzinomen eine 1000fach höhere Expression im Vergleich zum physiologischen Niveau aufweist, erfolgte eine Neuausrichtung der PSMA-Forschung auf diesen onkologischen Bereich. Nach Entwicklung und Optimierung der Leitstrukturen zeigte sich, dass für hochaffine Inhibitoren zwei Strukturelemente von entscheidender Bedeutung sind: zum einen eine Harnstoffstruktur, vorzugsweise Glu-urea-Lys (KuE) oder Glu-urea-Glu (EuE), und zum anderen eine lipophile Region, die eine entsprechende Bindungstasche im PSMA adressiert. Das letztgenannte Strukturelement kann hierbei sowohl durch geeignete Strukturen im Linker, z.B. Aromaten, als auch durch einen geeigneten Chelator, z.B. HBED-CC, bedient werden¹⁾.

Nach ihrer Etablierung in der klinischen Routine verdrängten die PSMA-Inhibitoren, insbesondere [⁶⁸Ga]Gallium-PSMA-11 (siehe [⁶⁸Ga]Gallium-PSMA-11-Injektionslösung, Ph. Eur.), die bis dato genutzten radioaktiv markierten Cholin-Derivate [¹⁸F]Fluorcholin und [¹¹C]Cholin (siehe [¹⁸F]Fluorcholin-Injektionslösung und



([¹¹C]Methyl)Cholin-Injektionslösung, beide Ph. Eur., und die zugehörigen Kommentare) zunehmend. Ursachen hierfür sind u.a. die generell höhere diagnostische Aussagekraft der PSMA-Derivate. Das in der vorliegenden Monographie beschriebene [¹⁸F]PSMA-1007 besitzt zudem mit seiner primär hepatobiliären Ausscheidung ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal gegenüber anderen PSMA- und Cholinderivaten, welche renal ausgeschieden werden, was eine Anwendung für die lokale Diagnostik im Bereich der Blase signifikant erleichtert.

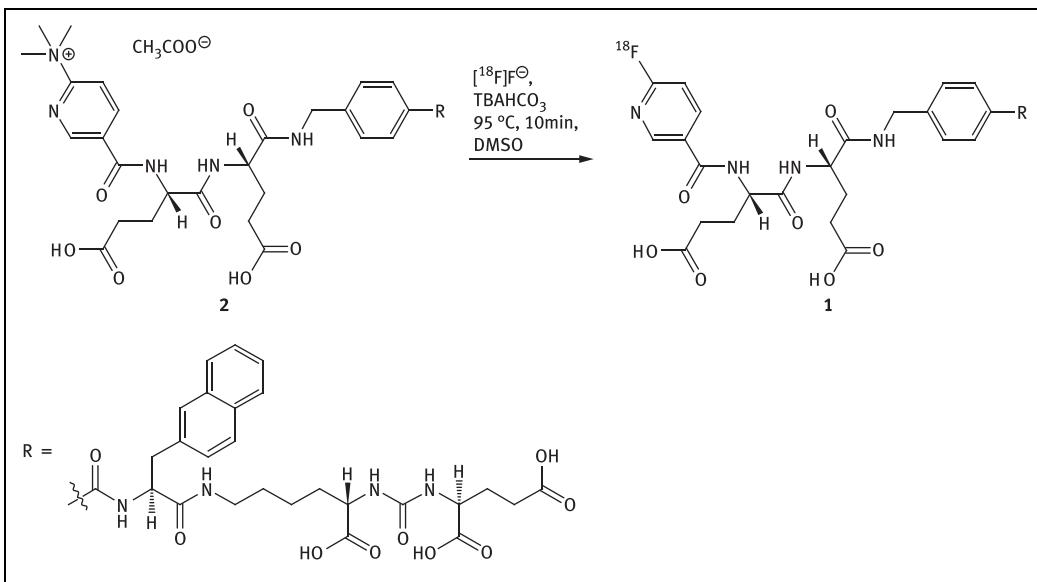
In der Monographie wird eine sterile Lösung von [¹⁸F]PSMA-1007 beschrieben. Enthalten sein dürfen außerdem geeignete Puffersysteme und Stabilisatoren. Die Monographie wurde neu in die Ph. Eur. 10.5 aufgenommen. Wie auch andere kürzlich veröffentlichte Monographien ist auch diese im Kontext einer Harmonisierung des Europäischen Arzneibuchs und insbesondere von radioaktiven Arzneimitteln zu betrachten. Während dies weitgehend umgesetzt wurde, sind jedoch einzelne Aspekte noch nicht komplett adressiert worden. Im Falle dieser Monographie betrifft dies die Testung auf Phasentransferkatalysatoren, deren wichtigste Vertreter Aminopolyether (insbesondere das 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosan, Kryptofix® 222) und quarternäre Tetraalkylammoniumsalze (z.B. Tetrabutylammonium) sind. Während bis dato eine Testung auf diese Phasentransferkatalysatoren in der jeweiligen Einzelmonographie des radioaktiven Arzneimittels beschrieben wurde, wurde in der Ph. Eur. 10.5 eine allgemeine Grenzprüfung für Tetrabutylammonium veröffentlicht (siehe 2.4.33 Tetrabutylammonium in radioaktiven Arzneimitteln und den zugehörigen Kommentar). Daher erfolgt nun in dieser Monographie eine Reinheitsprüfung auf Tetrabutylammonium (Verunreinigung A) gemäß dieser allgemeinen Methode, während für Aminopolyether (Verunreinigung E) ein separates Verfahren beschrieben wird. Da Aminopolyether in der Praxis die deutlich relevanteren und wichtigeren Phasentransferkatalysatoren darstellen, wäre es sinnvoll und nur konsequent, auch für diese eine allgemeine Grenzprüfung zu veröffentlichen.

CAS-Nr.: 2093321-19-6

PubChem-Nr.: 145996605

Darstellung: Die Monographie beschreibt die Synthese des [¹⁸F]PSMA-1007 (**1**) in einer einstufigen Reaktion, durch Umsetzung der chemischen Vorstufe (5-((S)-4-Carboxy-1-((S)-4-carboxy-1-(4-((S)-1-((S)-5-carboxy-5-(3-((S)-1,3-dicarboxypropyl)ureido)pentylamino)-3-(naphthalen-2-yl)-1-oxopropan-2-ylcarbamoyl)benzylamino)-1-oxobutan-2-ylcarbamoyl)-N,N,N-trimethylpyridin-2-aminiumacetat) (**2**) mit [¹⁸F]Fluorid. Die erste Syntheseroute dieses Radiofarmakons basierte auf einer zweistufigen Synthese unter Verwendung von 6-[¹⁸F]Fluoronicotinsäure-2,3,5,6-tetrafluorphenylester als prosthetischer Gruppe, da die üblicherweise bevorzugte ¹⁸F-Direktmarkierung, aufgrund der ungeschützten Carbonsäuren im Molekül, keine oder nur extrem niedrige radiochemische Ausbeuten erwarten ließ²⁾. Allerdings konnten über diese Route, mit einer Synthesezeit von ca. 45 min, nur unkorrigierte radiochemische Ausbeuten von ca. 5% erzielt werden. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass trotz der ungeschützten Carbonsäuren eine [¹⁸F]-Direktmarkierung mit hohen radiochemischen Ausbeuten realisierbar war, weswegen dieses Verfahren nun die in der Praxis etablierte Methode darstellt.

Das für die Synthese benötigte [¹⁸F]Fluorid wird an geeigneten Zyklotronen produziert. Das wichtigste Herstellungsverfahren besteht in der Bestrahlung von ¹⁸O-angereichertem Wasser (mehr als 90%) mit Protonen über die ¹⁸O(p, n) ¹⁸F-Kernreaktion. Dabei wird das Radionuklid als [¹⁸F]Fluorid-Anion in wässriger Lösung erhalten. Anschließend wird das [¹⁸F]Fluorid auf einer Anionenaustauschersäule adsorbiert, das ¹⁸O-anreicherte Wasser dadurch abgetrennt und zurückgewonnen und das Nuklid mittels eines Phasentransferkatalysators (PTK) vom Anionenaustauscher eluiert. Im Falle des [¹⁸F]PSMA-1007 kommt hierbei meist eine wässrige Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat-Lösung zum Einsatz, alternativ können aber auch Aminopolyether in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch verwendet werden. Durch mehrmaliges azeotropes Trocknen des Eluats unter Verwendung von wasserfreiem Acetonitril werden sämtliche Wasserspuren entfernt, wodurch eine möglichst hohe Nukleophilie des [¹⁸F]Fluorids und somit hohe radiochemische Ausbeuten für die nachfolgende Markierungsreaktion sichergestellt wurden.



Radioaktive Arzneimittel

In der nachfolgenden Markierungsreaktion wird das getrocknete $[^{18}\text{F}]$ Fluorid mit der chemischen Vorstufe umgesetzt. Die chemische Vorstufe (Defluorotrimethyl-PSMA-1007) kann sowohl in Form des Acetats als auch des Trifluoressigsäuresalzes verwendet werden, wobei erste Ergebnisse dem Acetatsalz eine bessere Eignung bescheinigen⁵. Als Lösungsmittel kommen hierbei DMSO oder alternativ Acetonitril/tert-Butanol-Gemische zum Einsatz. Die Reaktion wird bei ca. 95 °C für 10 min durchgeführt. Nach Abschluss der $[^{18}\text{F}]$ -Markierung erfolgt die Aufreinigung des Reaktionsgemisches mittels HPLC oder Festphasenkartuschen. Insbesondere letzteres Verfahren ist bei der Synthese des $[^{18}\text{F}]$ PSMA-1007 sehr weit verbreitet, da es kürzere Synthesezeiten ermöglicht und auch eine leichtere Implementierung auf automatisierten Synthesemodulen erlaubt. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass entsprechende Waschschritte der Festphasenkartuschen nötig sind und optimiert werden müssen, um eine Abtrennung der chemischen Verunreinigungen (insbesondere die Verunreinigungen C und D) sicherzustellen.

Da für die klinische Routine in der Regel sehr hohe Aktivitätsmengen eingesetzt werden, werden die Markierungsreaktionen üblicherweise in entsprechend abgeschirmten Bleizellen („heißer Zelle“, hotcell) unter Verwendung automatisierter Synthesemodule durchgeführt. Letztere erlauben

nach entsprechender Programmierung der Syntheseparameter eine nahezu vollautomatisierte Synthese des Radiopharmakons, bei der der Nutzer nur gelegentlich, meist bei der Aufreinigung, eingreifen muss. Dementsprechend wurde für das $[^{18}\text{F}]$ PSMA-1007 die Synthese auf einer Reihe gängiger Synthesemodule etabliert³⁻⁵.

Stabilität/Lagerung: Die In-vitro-Stabilität des [¹⁸F]PSMA-1007 (1) wurde in einigen Studien untersucht, wobei hohe Stabilitäten über den Zeitraum von 6 bis 8 h nachgewiesen werden konnten³⁻⁵⁾. Bei höheren Volumenaktivitäten (> 1 GBq/ml) ist jedoch die Verwendung von Stabilisatoren (Natriumascorbat) angezeigt, da ansonsten eine erhöhte Radiolyse und damit ein verkürzter Verwendbarkeitszeitraum festzustellen ist³⁾. Für den genauen Verwendbarkeitszeitraum sind die Angaben des Herstellers bzw. des jeweiligen Markierungsbestecks zu beachten. Für diesen Zeitraum muss die Qualität gesichert sein, d.h. trotz evtl. sich bildender Neben- bzw. Zersetzungprodukte müssen die Grenzwerte eingehalten werden.

Da es sich bei $[^{18}\text{F}]$ PSMA-1007 um ein radioaktives Arzneimittel handelt, muss bei der Lagerung die Einhaltung geltender Strahlenschutzvorschriften sichergestellt werden, wie z. B. die Aufbewahrung bzw. Handhabung nur in dafür bestimmten

Bereichen oder das Treffen geeigneter Vorkehrungen zum Schutz vor ionisierender Strahlung.

Verwendung: Die [¹⁸F]PSMA-1007-Diagnostik dient – wie [⁶⁸Ga]Gallium-PSMA-11 (siehe den Kommentar zu [⁶⁸Ga]Gallium-PSMA-11-Injektionslösung, Ph. Eur.) – sowohl der Lokalisation von Prostatakarzinomen als auch entsprechender Metastasen. Aufgrund des bis dato kurzen Verwendungszeitraumes dieses Tracers existieren nur erste vergleichende Studien mit dem etablierten [⁶⁸Ga]Gallium-PSMA-11. Diese bescheinigen [¹⁸F]PSMA-1007 dem [⁶⁸Ga]Gallium-PSMA-11 ähnliche, zum Teil jedoch auch überlegene Eigenschaften bei der Diagnostik^{6, 7)}. Für weitere Informationen in diesem Zusammenhang sei auf die Handlungsempfehlung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN) verwiesen⁸⁾.

Dosierung: Trotz der insgesamt stark angestiegenen Nutzung des [¹⁸F]PSMA-1007 (1) ist die optimale Injektionsdosis aufgrund des kurzen Nutzungszeitraums noch nicht festgelegt und wird noch diskutiert. Die aktuelle Handlungsempfehlung der DGN verweist hierbei auf die aktuelle Studienlage bei der eine Patientendosis von 250 bis 350 MBq appliziert wurde⁸⁾.

Intravenös injiziertes [¹⁸F]PSMA-1007 wird schnell aus dem Blut ausgeschieden und reichert sich bevorzugt in den Nieren, der Leber, der Milz, der Bauchspeicheldrüse und den Speicheldrüsen und Tränendrüsen an^{7, 9)}. Im Vergleich zu anderen PSMA-gerichteten Radiopharmaka weist [¹⁸F]PSMA-1007 eine ähnliche Biodistribution auf, unterscheidet sich jedoch durch eine reduzierte Urinausscheidung (was die Diagnostik der Prostata und Blasenregion erleichtert) und eine erhöhte hepatobiliäre Ausscheidung. Bei Prostatakarzinom und Metastasen wurde eine deutlich erhöhte Aufnahme (SUV) und ein besserer Kontrast festgestellt, wobei günstige Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse 2 bis 3 h nach der Applikation beobachtet wurden⁷⁾.

Strahlenbelastung: Die durchschnittliche Strahlenbelastung für Organe und Gewebe wurde im Rahmen einer Studie mit gesunden Probanden ($n = 3$) und Patienten ($n = 10$) mit einem neu dia-

gnostiziertem Hochrisiko-Prostatakarzinom ermittelt⁹⁾. Für die gesunden Probanden wurde hierbei eine effektive Dosis von 0,022 mSv/MBq berechnet, was bei einer applizierten Aktivität von 200–250 MBq einer Gesamtdosis von 4,4 bis 5,5 mSv entspricht. Betrachtet man die Werte der absorbier-ten Organdosen für die Probanden, so wurden die höchsten Dosiswerte für die Nieren (0,17mGy/ MBq), die Leber (0,06mGy/MBq) und die Milz (0,074mGy/MBq) ermittelt. Bei den Patienten konnte in den Tumoren 1 bis 3 h nach Applikation des [¹⁸F]PSMA-1007 eine 5- bis 10fach höhere Aufnahme in Relation zum intravesikalen Harn beobachtet werden.

Tab. 1: Strahlenexposition durch eine [¹⁸F]PSMA-1007-PET-Untersuchung in gesunden Probanden⁹⁾

Organ	Organdosis [mGy/MBq]
	Mittelwert
Nebennieren	$1,94 \cdot 10^{-2}$
Gehirn	$7,20 \cdot 10^{-3}$
Brust	$8,06 \cdot 10^{-3}$
Gallenblasen	$2,22 \cdot 10^{-2}$
Unterer Dickdarm	$4,83 \cdot 10^{-2}$
Dünndarm	$1,56 \cdot 10^{-2}$
Magen	$1,42 \cdot 10^{-2}$
Oberer Darm	$4,08 \cdot 10^{-2}$
Herzwand	$2,51 \cdot 10^{-2}$
Nieren	$1,70 \cdot 10^{-1}$
Leber	$6,02 \cdot 10^{-2}$
Lunge	$1,11 \cdot 10^{-2}$
Muskeln	$1,00 \cdot 10^{-2}$
Pankreas	$1,92 \cdot 10^{-2}$
Rotes Knochenmark	$1,33 \cdot 10^{-2}$
Osteogene Zellen	$1,55 \cdot 10^{-2}$
Haut	$7,30 \cdot 10^{-3}$
Milz	$7,39 \cdot 10^{-2}$
Hoden	$8,37 \cdot 10^{-3}$
Thymus	$9,90 \cdot 10^{-3}$
Schilddrüse	$8,50 \cdot 10^{-3}$
Blasenwand	$1,87 \cdot 10^{-2}$
Effektive Dosis (mSv/MBq)	$2,2 \cdot 10^{-2}$

Synonyme: Fluor-18-PSMA-1007, PSMA-1007 F-18

Eigenschaften

Fluor-18 hat eine Halbwertszeit von ca. 110 min (siehe hierzu auch die Tabelle in **5.7**, Ph. Eur.) und emittiert in 97 % aller Zerfälle Positronen mit einer Maximalenergie von 0,635 MeV. Nach Verlust seiner kinetischen Energie bildet das Positron mit einem Elektron ein Positronium, das in Form von zwei Gammaquanten in einem Winkel von 180° zueinander mit je 511 keV zerstrahlt. Die Erfassung des Gammaquantenpaares ist Grundlage des PET-Messprinzips.

Prüfung auf Identität

- Gammaspektrometrie:** Die Prüfung der Identität des Radionuklids erfolgt zusammen mit der Prüfung der Radionuklid-Reinheit durch Auswertung des Gammastrahlenspektrums anhand des Photopeaks bei 511 keV. In Abhängigkeit von der Detektorgeometrie und der gemessenen Radioaktivität kann es dabei auch zum Auftreten eines Summenpeaks kommen (siehe hierzu auch **2.2.66**, Ph. Eur.), der jedoch eine deutlich niedrigere Intensität als der Photopeak aufweist.
- Halbwertszeitbestimmung:** Da Positronenemitter anhand der Gammaspektrometrie nicht von einander zu unterscheiden sind, ist zusätzlich die Bestimmung der Halbwertszeit zur Identifikation notwendig. Die Prüfung sollte einen Wert zwischen 105 und 115 min ergeben und wird wie üblich bei Radiopharmaka durch Ermittlung der abgeschätzten Halbwertszeit (Messdauer ein Viertel der Halbwertszeit des Radionuklids, in diesem Fall ca. 30 min) bestimmt.
- HPLC-Chromatographie:** Die Prüfung auf [¹⁸F]PSMA-1007 erfolgt durch Vergleich der Prüflösung mit der chemischen Referenzsubstanz PSMA-1007 gemäß dem bei der Reinheitsprüfung „PSMA-1007 und verwandte Substanzen“ beschriebenen HPLC-Verfahren. Die Prüfsubstanz muss hierbei zum Referenzstandard (Referenzlösung A) vergleichbare Retentionszeiten aufweisen. Da bei der Radio-HPLC UV- und Radiodetektor in Reihe geschaltet sind, lässt sich zwischen den beiden Chromatogrammen (UV und Radioaktivität) stets ein Unterschied in der Retentionszeit feststellen, der durch die Wegstrecke zwischen beiden Detektoren bedingt ist. Eine genaue Kenntnis dieses Retentionszeitunterschiedes ist für eine genaue Identifikation einer Substanz wichtig und bei Verunreinigungen mit ähnlicher Retentionszeit sogar zwingend erforderlich.

Prüfung auf Reinheit

Verunreinigung A: Für die Erzielung hoher radiochemischer Ausbeuten bei [¹⁸F]-Markierungsreaktionen ist die Verwendung von Phasentransferkatalysatoren (PTK) unabdingbar. Im Allgemeinen finden hierbei bevorzugt Aminopolyether Anwendung, da sie gegenüber der Alternative, dem Tetrabutylammonium (TBA, Verunreinigung A), zu meist höhere radiochemische Ausbeuten erbringen. In diesem Fall stellt jedoch das TBA den üblicherweise genutzten PTK dar. Da das TBA eine gewisse Toxizität aufweist, wurde in der Ph. Eur. 10.5 eine allgemeine Grenzprüfung für das TBA (siehe **2.4.33** und den zugehörigen Kommentar) veröffentlicht. Zum Bestehen dieser Grenzprüfung darf der erlaubte Maximalgehalt von 2,6 mg TBA pro Patienten nicht überschritten werden, wobei sich der Gehalt auf das eigentliche Tetrabutylammonium bezieht (ein Gegenion wird bei diesem Grenzwert nicht berücksichtigt).

Verunreinigung E: Als Alternative zum TBA können auch Aminopolyether (insbesondere Kryptofix® 222) als PTK eingesetzt werden. Wie TBA besitzen aber auch Aminopolyether eine gewisse, wenn auch geringe Toxizität¹⁰⁾, weshalb auch für diese eine Gehaltsbestimmung in der Produktlösung durchgeführt werden muss. Da sich andere chromatographische Verfahren als unzuverlässig herausgestellt haben, wird zu dessen Prüfung die in dieser Monographie beschriebene „Tüpfel-Test“ eingesetzt (siehe Abb. 1). Diese basiert auf Verwendung einer mit Iodplatin-Reagenz behandelten DC-Platte (siehe 1172700 DC-Platte mit Kieselgel zur Aminopolyetherprüfung R). Da die Matrix der Untersuchungslösung gegebenenfalls auch zu einer Maskierung des Flecks führen kann, wird neben der Untersuchungs- und den Referenzlösungen auch eine Mischung aus Untersuchungs- und Referenzlösung b aufgetragen (Abb. 1, Fleck 2). Zum Bestehen dieser Grenzprüfung darf der zentrale Fleck der Untersuchungslösung nicht intensiver sein als der der Referenzlösung b, wodurch ein

maximaler Gehalt von 2,2 mg pro Patienten sichergestellt wird.



Abb. 1: Prüfung auf Aminopolyether; 1 Referenzlösung b; 2 Untersuchungslösung/Referenzlösung b 1/1 (V/V); 3 Untersuchungslösung; 4 Referenzlösung a

Da für die Synthese entweder Aminopolyether oder TBA als PTK eingesetzt werden, muss auch nur auf eine der beiden Verunreinigungen A oder E getestet werden.

PSMA-1007 und verwandte Substanzen: Die chemische Reinheit wird mit Hilfe einer Gradienten-HPLC bestimmt. Zum Lösen der Referenzsubstanzen kommt das beschriebene Lösungssystem A zum Einsatz. Alternativ wurde auch ein Wasser/Ethanol-System untersucht; dieses machte das Lösen der Referenzsubstanzen jedoch aufwändiger und resultierte zudem auch in kleineren Peaks. Als Referenzlösungen werden PSMA-1007 (a), Defluorhydroxy-PSMA-1007 (b), welches durch Hydrolyse der chemischen Vorstufe während der Synthese entstehen kann, sowie Defluortrimethyl-PSMA-1007 (chemische Vorstufe, c) für die Prüfung genutzt. Unter den beschriebenen Bedingungen ergeben sich die nachfolgenden Retentionszeiten für die Referenzlösungen: (c) (Verunreinigung D, chemische Vorstufe) 5,6 min; (b) (Verunreinigung C, Nebenprodukt) 6,7 min und (a) (PSMA-1007) 11 min. Als Grenzwerte für nicht-radioaktives PSMA-1007 und verwandte Substanzen wurde jeweils ein Maximum von 0,1 mg pro Patienten festgelegt, wobei die Gesamtmenge 0,5 mg nicht überschreiten darf.

Lösungsmittel-Rückstände: Als potentielle Lösungsmittel-Rückstände für die Testung sind insbesondere das für die azeotrope Trocknung eingesetzte Acetonitril und das für die ¹⁸F-Direktmarkierung verwendete Lösungsmittel(-system), also zumeist DMSO oder *tert*-Butanol/Acetonitril, zu berücksichtigen. Die Überprüfung auf Lösungsmittel-Rückstände sollte vorzugsweise mittels GC durchgeführt werden.

Ethanol: Da Ethanol bei einigen Herstellungsverfahren – insbesondere bei Abtrennungen mittels Festphasenkartuschen – als Lösungsmittel eingesetzt wird, wurde ein Grenzwert von 10 % V/V und maximal 2,5 g (\approx 3,16 ml) pro Anwendung festgelegt.

Sterilität: Siehe auch die Allgemeine Monographie **Radioaktive Arzneimittel** (Ph. Eur.) und den zugehörigen Kommentar. Da eine Prüfung auf Sterilität, unter Berücksichtigung der Halbwertszeit des Fluor-18, nicht innerhalb des Verwendbarkeitszeitraums von [¹⁸F]-markierten Radiopharmaka möglich ist, ist auch hier eine Freigabe der Arzneimittelcharge vor Beendigung des Tests gestattet.

Bakterien-Endotoxine: Siehe **2.6.14** (Ph. Eur.) und den zugehörigen Kommentar. Eine Freigabe der Arzneimittelcharge vor Beendigung des Tests ist gestattet.

Radionuklid-Reinheit

Fluor-18: Der Gehalt an Fluor-18 muss mindestens 99,9 % der Gesamtradioaktivität betragen.

A. Gammaspektrometrie: Die Überprüfung auf kurzlebige Verunreinigungen, deren Gehalt \leq 0,1 % sein muss, erfolgt durch Gammaspektrometrie. Dazu müssen alle als 0,511 MeV (Photopeak) und 1,022 MeV (Summenpeak) emittierten Gammalinen mittels eines Gammaspektrometers erfasst werden (siehe hierzu auch **2.2.66**, Ph. Eur.). Dabei ist zu beachten, dass alle anderen PET-Radionuklide das gleiche Gammaspektrum zeigen und somit mit dieser Messmethode nicht erfassbar sind. Die einzige nuklearchemische Methode, [¹⁸F] von anderen PET-Nukliden zu unterscheiden, besteht in einer Bestimmung der Halbwertszeit des [¹⁸F] ($t_{1/2} \approx 110$ min), da derartige Verunreinigungen zu einer Änderung der gemessenen Halbwertszeit führen würden. Die häufigste potentiell auftretende Radionuklidverunreinigung ist [¹³N] ($t_{1/2}$: 10 min), welches durch die ¹⁶O(p;α)₁₃N-Kernreaktion während der Bestrahlung gebildet wird. Der Anteil des [¹³N] hängt somit von der Qualität des [¹⁸O]-Wassers und den Bestrahlungsbedingungen ab und beeinflusst im Allgemeinen – unter Be-

rücksichtigung der Synthesedauer – die Qualität des Endproduktes nicht.

B. Gammaspektrometrie: Da Verunreinigungen mit langlebigen Radionukliden ($t_{1/2} > 2$ h) anfänglich, aufgrund des hohen Hintergrunds durch die 511 keV Photonen des Fluor-18, nicht oder nur sehr schwer messbar sind, muss die Probe mindestens 24 h abklingen, um eine ausreichende Sensitivität für deren Messung zu besitzen. Der Gehalt an derartigen langlebigen Radionukliden muss ebenfalls kleiner als $\leq 0,1\%$ sein.

Da eine Prüfung auf langlebige Verunreinigungen nicht innerhalb des Verwendbarkeitszeitraums von [¹⁸F]-Radioparmaka möglich ist, ist auch hier eine Freigabe der Arzneimittelcharge vor Beendigung des Tests gestattet.

und anderer radiochemischer Verunreinigungen unter Verwendung der dort dargelegten Formel.

Verunreinigung B: Die Prüfung auf [¹⁸F]Fluorid erfolgt mittels eines radiodünnschichtchromatographischen Verfahrens, wobei der Gehalt an [¹⁸F]F[⊖] $\leq 5\%$ sein muss.

Andere radiochemische Verunreinigungen: Die Prüfung auf weitere radiochemische Verunreinigungen erfolgt mit dem bei der Reinheitsprüfung „PSMA-1007 und verwandte Substanzen“ beschriebenen HPLC-Verfahren. In Abhängigkeit des Gehalts an Verunreinigung B sind somit für andere radiochemische Verunreinigungen maximale Gehalte von 4 bis 9 % gestattet.

Beschriftung

Die Beschriftung muss den prozentualen Anteil an Ethanol angeben. Da für Ethanol Grenzwerte (sowohl hinsichtlich Volumenprozenten als auch maximaler Dosis) festgelegt wurden, stellt diese Angabe sicher, dass diese auch durch den Anwender eingehalten werden können.

Piel, Rösch/Schi

Radiochemische Reinheit

[¹⁸F]PSMA-1007: Für das [¹⁸F]PSMA-1007 wird ein Mindestgehalt von $\geq 91\%$ gefordert, was somit in einem Widerspruch zu dem bis dato für [¹⁸F]-markierte Radiopharmaka stets geforderten Mindestgehalt von $\geq 95\%$ steht. Die Berechnung des Gesamtgehalts an [¹⁸F]PSMA-1007 erfolgt mit Hilfe der Testergebnisse von Verunreinigung B

Literatur

- 1) K. Kopka et al., J. Nucl. Med. 58, 17S–26S (2017).
- 2) J. Cardinale et al., J. Nucl. Med. 58, 425–431 (2017).
- 3) J. Cardinale et al. Pharmaceuticals 10, 77 (2017).
- 4) O. Shamni, et al., J. Lab. Compds. Radiopharm. 62, 252–258 (2019).
- 5) S. Naka, et al., EJNMMI Radiopharm. Chem. 5, 18, (2020).
- 6) J. Kuten et al., J. Nucl. Med. 61, 527–532 (2020).

- 7) S. Awenat, et al., Diagnostics 11, 552 (2021).
- 8) https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/031-055_L_S1_PSMA-Liganden-PET-CT-Diagnostik-Prostatakarzinoms_2020-05.pdf
- 9) F. L. Giesel, et al., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 44, 678–688 (2017).
- 10) P. Baudot P, et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 113–118 (1977).

Konzentrierte Erythropoetin-Lösung

Erythropoetini solutio concentrata

Allgemeine Angaben

Erythropoetin (Epoetin, EPO) ist ein hauptsächlich in der Niere gebildetes Glycoprotein-Hormon, das die Erythropoese (Bildung und Differenzierung der Erythrozyten im Knochenmark) stimuliert. Therapeutisch wird EPO zur Behandlung der Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz oder aufgrund einer Chemotherapie eingesetzt. Missbräuchlich wird EPO zum Doping besonders in Ausdauersportarten verwendet.

Die Isolierung von EPO gelang 1977 aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie¹⁾. Die Klönnierung und Expression des humanen EPO-Gens gelang 1985²⁾. Rekombinant hergestelltes EPO wurde 1989 von Amgen unter dem Handelsnamen Epogen® und von Johnson & Johnson unter dem Handelsnamen Procrit® in die Therapie eingeführt. 2007 folgten mit Binocris®, Epoetin alfa Hexal® und Absamed® die ersten Biosimilars von EPO³⁾. Produziert wird rekombinantes EPO heute u.a. in Russland, Thailand, China, Indien, Korea sowie südamerikanischen Staaten, sodass man die Zahl der weltweit gehandelten EPO-Biosimilars auf etwa 80 Präparate schätzt^{4, 5)}.

Die Substanz ist auch in der USP beschrieben, die JAP beschreibt Epoetin alfa und Epoetin beta. Während sich die Monographien der JAP ebenfalls auf EPO-Lösungen beziehen, beschreibt die Monographie der USP Reinsubstanz.

In der Ph. Eur. 10.5 wurde der Abschnitt „Herstellung“ um die Glycan-Analyse erweitert, um die Gleichmäßigkeit des Glycosylierungsmusters der produzierten Chargen sicherzustellen. Außerdem wurde die Identitätsprüfung der N-terminalen Sequenzanalyse gestrichen, da diese Prüfung für die Freigabeanalytik nicht relevant ist.

Die Referenzsubstanzen der Ph. Eur. sind eine Mischung aus gleichen Teilen von Epoetin alfa und Epoetin beta.

Nomenklatur: Nach der INN Nomenklatur wurde der Wortstamm „poetin“ für Hämatopoese-Faktoren vom Erythropoetin-Typ festgelegt⁶⁾. Proteine mit der gleichen Aminosäuresequenz wie das humane Hormon werden „Epoetin“ genannt, ein zusätzlicher griechischer Buchstabe weist auf unterschiedliche Glycan-Muster hin. Die WHO listet derzeit Epoetin alfa, beta, gamma, delta, epsilon, zeta, theta, kappa und omega; wirtschaftliche Bedeutung haben vor allem Epoetin alfa, beta, delta, theta und zeta. Derivate mit einer von natürlichem Epoetin abweichenden Aminosäuresequenz werden mit dem Suffix „poetin“ und einem frei gewählten Präfix benannt. Ein Beispiel ist Darbepoetin alfa, bei dem fünf Aminosäuren ausgetauscht sind (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn und Pro90Asn) und das zwei zusätzliche N-Glycane an den neu eingeführten Asn30 und Asn88 aufweist. Darbepoetin alfa wird auch als NESP (novel erythropoiesis stimulating protein) bezeichnet.

CAS-Nr.:	11096-26-7 113427-24-0 (Epoetin alfa) 122312-54-3 (Epoetin beta) 2611356-80-3 (Epoetin delta) 154725-65-2 (Epoetin epsilon) 604802-70-2 (Epoetin zeta) 762263-145-9 (Epoetin theta) 879555-13-2 (Epoetin kappa) 148363-16-0 (Epoetin omega) 209810-58-2 (Darbepoetin alfa)
-----------------	---

PubChem-Nr.:	SID 135362249 SID 103771193 (Epoetin alfa) SID 134221730 (Epoetin beta) SID 47205997 (Epoetin delta) SID 135305722 (Epoetin epsilon) SID 135290569 (Epoetin zeta) SID 135315770 (Epoetin theta) SID 124490477 (Epoetin kappa) SID 135297905 (Epoetin omega) SID 103771325 (Darbepoetin alfa)
---------------------	---

DrugBank-Nr.: DB00016 (Epoetin alfa)
DB08923 (Epoetin zeta)
DB00012 (Darbepoetin alfa)

Struktur: EPO gehört zur Klasse-1-Zytokin-Familie, die eine kompakte, globuläre Struktur mit vier α -Helices aufweisen. EPO ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 30 400 Da⁷⁾, wobei ca. 18200 Da auf den Proteinanteil entfallen. Das Protein besteht aus 165 Aminosäuren (Abb. 1). Zwischen den Cysteinresten Cys7 und Cys161 sowie zwischen Cys29 und Cys33 sind Disulfidbrücken ausgebildet. Im Vergleich zur aus cDNA abgeleiteten Aminosäurenssequenz fehlt EPO die C-terminale Aminosäure Arginin⁸⁾, die vor dem Ausschleusen aus der Zelle durch eine Carboxypeptidase abgespalten wird. EPO entsteht aus einem PräPro-EPO-Protein, das 193 Aminosäuren umfasst und neben dem C-terminalen Arginin am N-Terminus ein zusätzliches, 27 Aminosäuren umfassendes Signalpeptid aufweist. Dieses wird ebenso wie das C-terminale Arginin abgespalten.

EPO enthält vier Polysaccharidketten, drei an Asn24, Asn38 und Asn43 gebundene *N*-Glycane sowie ein an Ser126 gebundenes *O*-Glycan (Abb. 2). Insgesamt beträgt der Kohlenhydratanteil etwa 40% des Molekulargewichts. Die Glycane bestehen aus Mannose, Galactose, *N*-Acetylglucosamin, Fucose und endständiger *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure). Die *N*-Glycane gehören zum komplexen Typ und sind in der Mehrzahl tetraantennär⁹⁾; zu einem geringen Prozentsatz existieren auch bi- und triantennäre Strukturen. Die Glycane sind hinsichtlich der Struktur sehr variabel (Verzweigung der Antennen, Anzahl der *N*-Acetyllactosamin-Einheiten (LacNAc-Repeats), Anzahl und Verknüpfung der Sialinsäuren etc.), woraus eine Vielzahl von Molekülen mit geringfügig variierender Glycan-Struktur resultiert. Dies wird auch als Mikroheterogenität eines Glycoproteins bezeichnet. Die Glycosylierungsvarianten sind u.a. vom Zelltyp, dem Vektorexpressionssystem der Wirtszelle und den Kulturbedingungen abhängig. Die Struktur des an Ser126 gebundenen *O*-Glycans ist wesentlich kleiner und auch weniger heterogen; sie besteht aus dem Disaccharid Galactose-*N*-Acetylgalactosamin, an das 1 bis 2 Sialinsäuren gebunden sind⁹⁾. Zu Details der Analyse der Glycan-Strukturen siehe auch z.B. Lit.⁹⁻¹³⁾. Für

allgemeine Angaben zu Glycanen und ihrer Struktur siehe auch den Kommentar zu **2.2.59 Glycan-Analyse von Glycoproteinen** (Ph. Eur.).

Aus dem Urin isoliertes natürliches EPO und in CHO- oder BHK-Zellen rekombinant hergestelltes EPO unterscheiden sich durch einen geringen Anteil (1 bis 3% der Gesamtsialinsäuren) der Immunreaktionen auslösenden *N*-Glycolylneuraminsäure, der Verknüpfung der Sialinsäuren (nur α 2 \rightarrow 3-Verknüpfung der Sialinsäuren) und der Anzahl der LacNAc-Repeats (bis zu drei in einigen Glycanen)¹⁴⁾. Für ein in einer humanen Zelllinie exprimiertes EPO konnte die immunogene *N*-Glycolylneuraminsäure nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus wies dieses Produkt eine höhere Zahl an tetraantennären Glycanen und eine geringere Zahl an LacNAc-Repeats auf als in CHO-Zellen exprimiertes EPO¹⁵⁾.

Die Glycane, insbesondere die *N*-Glycane, sind für die In-vitro-Stabilität sowie die In-vivo-Aktivität verantwortlich. Deglycosyliertes EPO denaturiert in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur leichter als glycosyliertes EPO¹⁶⁾. Für die biologische Aktivität tragen besonders die terminalen Sialinsäurereste bei.

Die Röntgenkristallstruktur des EPO im Komplex mit dem Erythropoetin-bindenden Protein ist beschrieben¹⁷⁾. Die Struktur des Hormons in Lösung wurde mittels NMR-Spektroskopie ermittelt¹⁸⁾.

Definition

Die Ph. Eur. fordert für „Konzentrierte Erythropoetin-Lösung“ eine Konzentration von 0,5 bis 10 mg/ml bei einer Aktivität von mindestens 100 000 I.E./mg Protein. Die JAP gibt für Epoetin alfa einen Proteingehalt von 1,1 bis 1,5 mg/ml bei einer Mindestaktivität von 150 000 I.E./mg Protein an, Epoetin beta muss einen Proteingehalt von 0,5 bis 1,5 mg/ml bei einer Mindestaktivität von 150 000 I.E./mg Protein enthalten. Die USP fordert eine Aktivität von 140 000 bis 200 000 I.E. pro Einheit der Absorption bei 280 nm.

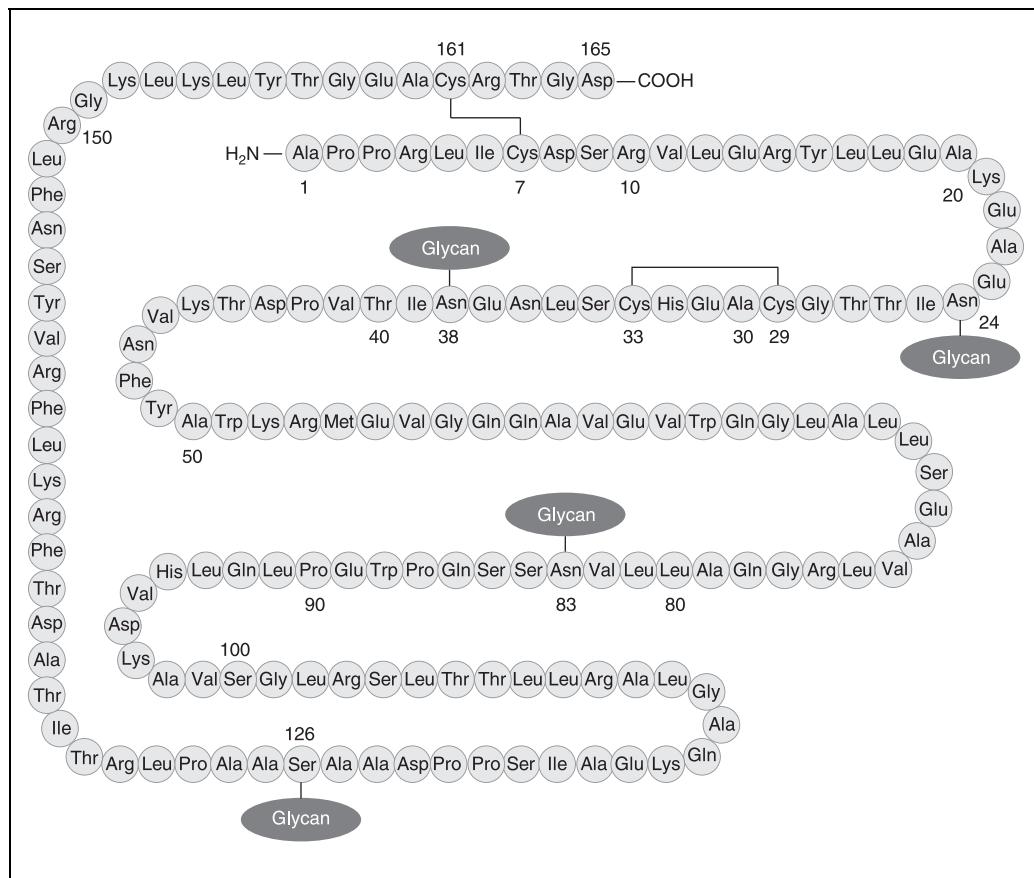


Abb. 1: Aminosäuresequenz von Erythropoetin

Herstellung

EPO wird biotechnologisch durch Fermentation transzierter Zellen gewonnen. Hierzu wurden aufbauend auf der Aminosäuresequenz des EPO Gensonden synthetisiert, mit deren Hilfe sich das EPO-Gen in menschlichen Zellbanken lokalisieren und isolieren lässt. Im Falle von Epoetin alfa wurde somatische DNA verwendet, im Falle von Epoetin beta die komplementäre DNA-Kopie von mRNA. Das Gen wurde dann in einen Vektor eingebaut, der weitere Gene enthält, die für die Erkennung und Selektion erfolgreich transzierter Zellen und die Expression in der Wirtszelle notwendig sind. Die Aufreinigung des Produkts aus dem Fermentationsmedium erfolgt mittels Diafiltration und umfasst in der Regel mehrere chromatographische Schritte.

Am weitesten verbreitet ist – unter Verwendung von Dihydrofolatreduktase (DHFR) – die Produktion defizienter Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen)¹⁹⁾. Von den derzeit kommerziell erhältlichen Präparaten werden Epoetin alfa (Handelspräparate Eprex®, Erypo®, Epoetin alfa Hexal®, Binocrit® und Absamed®), Epoetin beta (NeoRecormon®), Epoetin theta (Biopin® und Eporatio®) und Epoetin zeta (Silapo® und Retacrit®) in CHO-Zellen exprimiert. Epoetin delta (Dynepo®) wird aus einer transzistorisierten humanen Fibrosarcoma-Zelllinie gewonnen. Zur Produktion von Darbepoetin alfa (Aranesp®) dient ebenfalls eine CHO-Zelllinie. Methoxy-Polyethylenglycol-Epoetin beta (CERA, continuous erythropoietin receptor activator; Mircera®) ist aus CHO-Zellen gewonnenes Epoetin beta, das über die Amino-

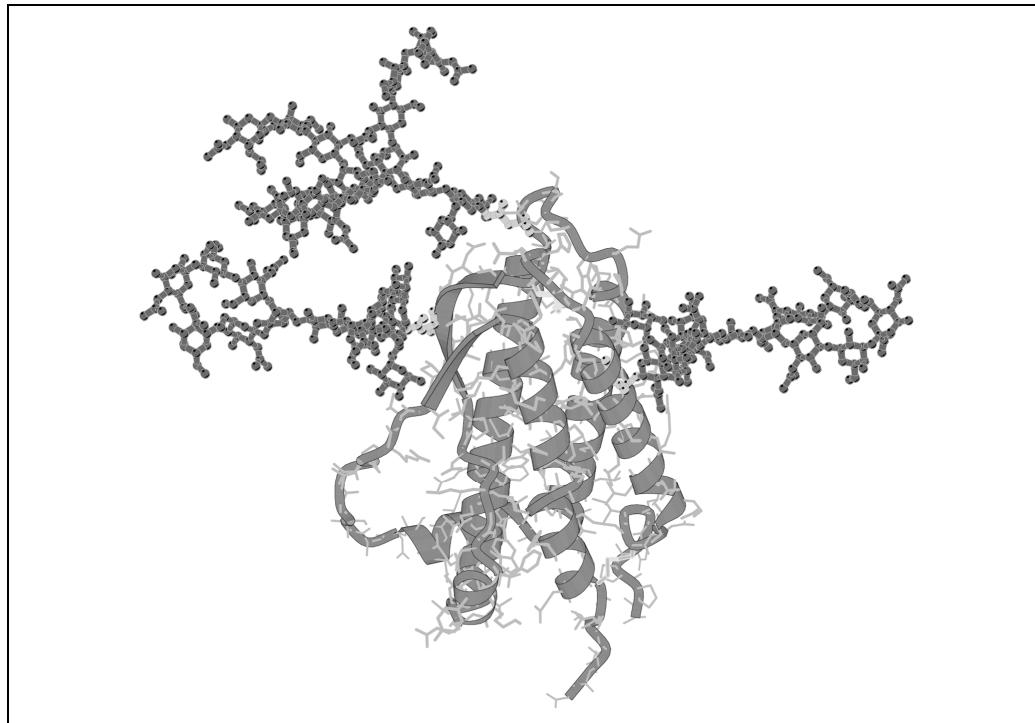


Abb. 2: Molecular-Modeling-Struktur des Erythropoetin mit N-Glycanen an Asn24, Asn38 und Asn83; das O-Glycan an Ser126 ist nicht gezeigt. Die Protein-Glycan-Bindungen sind vermutlich sehr flexibel, sodass das Modell nur eine mögliche Konformation zeigt (reproduziert mit Erlaubnis aus C. Sheridan, Nat. Biotechnol. 25, 145-146 [2007], © Nature Publ. Group. Die Abbildung wurde von M. R. Wormald, R. A Dwek und P.M. Rudd erstellt).

gruppen von Lys52 oder Lys45 pegyliert ist¹⁹⁾. Epoetin omega und Epoetin epsilon (keine zugelassenen Präparate in Europa) werden mit Kulturen einer Zelllinie aus der Niere eines Jungtiers des Syrischen Goldhamsters (BHK-Zellen) hergestellt und Epoetin gamma (kein zugelassenes Präparat in Europa) in einer murinen Fibroblastenzelllinie. Publiziert ist auch die Expression von EPO in weiteren murinen und caninen Zelllinien oder Affennierenzellen (COS-Zellen)²⁰⁾. Die chemische Totalsynthese einer Glycoform des EPO ist beschrieben²¹⁻²³⁾, wobei diese keine wirtschaftliche Bedeutung besitzt. Hierzu wurden zunächst die Glycane synthetisiert und an kleine Peptide gekoppelt. Die resultierenden Glycopeptide wurden anschließend mit den entsprechenden EPO-Polypeptidfragmenten verknüpft.

Konzentrierte Erythropoetin-Lösung muss der Monographie **DNA-rekombinationstechnisch herge-**

stellte Produkte (Ph. Eur.) entsprechen (unter „Monographiegruppen, Allgemeine Monographien“). Daraus ergeben sich Anforderungen für das Validieren der Abreicherung von Wirtszellproteinen, Vektor-DNA, Viren und Mycoplasmen sowie methodische Anforderungen für die Prüfung auf Wirtszellproteine und Vektor-DNA. Die Monographie selbst legt keine Grenzwerte für Wirtszellprotein und Vektor-DNA fest, sondern verweist auf entsprechende Anforderungen der Zulassungsbehörden. Die USP verfährt analog.

Glycan-Analyse: Die Ph. Eur. fordert die Überprüfung des Glycan-Musters, in der Regel der N-Glycane, im Rahmen des Herstellungsverfahrens. Es wird hierfür kein spezielles Verfahren vorgeschrieben, sodass die Hersteller größtmögliche Wahlfreiheit haben. Die Ph. Eur. fordert lediglich, dass die Glycane in geeigneter Weise abgespalten

und analysiert werden, entweder nativ oder nach einer Derivatisierung. Der Anteil der einzelnen Glycane wird nicht festgelegt, sondern auf die Zulassung durch die zuständige Behörde verwiesen.

Beispielhaft gibt die Ph. Eur. ein Verfahren an, mit dem die Bestimmung durchgeführt werden kann. Dabei werden die *N*-Glycane nach Entsalzung der Probe mit dem Enzym Peptid-*N*-Glycosidase F (PNGase F) abgespalten. Die nativen Glycane werden anschließend mit einem HPLC-Verfahren unter Verwendung eines stark basischen Ionenaustauschers und gepulster amperometrischer Detektion (high-performance anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD) analysiert, wobei ein ternärer Gradient eingesetzt wird. Zur Etablierung und Validierung des Verfahrens siehe Lit.²⁴⁾.

Die USP lässt das Glycan-Profil in einer Reinheitsprüfung bestimmen. Hierzu werden die Glycane ebenfalls mit PNGase F abgespalten und nach reduktiver Aminierung mit 2-Aminobenzamid und Natriumcyanoborhydrid mit einem analogen HPLC-Verfahren mit ternärem Gradienten analysiert. Die Detektion erfolgt fluorimetrisch ($\lambda_{\text{ex}} 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 420 \text{ nm}$). Der Anteil der Glycane mit zwei Sialinsäureresten muss zwischen 4,5 und 6,0 % liegen, der mit drei Sialinsäureresten zwischen 18 und 25 % und der mit vier Sialinsäureresten zwischen 69 und 77 %.

Das Profil der heterogenen Glycoformen kann mittels HPLC-MS auch in Kombination mit enzymatischer Hydrolyse der Glycane erfolgen²⁵⁻²⁷⁾. Mit der Kombination von CE mit TOF-MS kann die Bestimmung der Isoformen mit gleicher Anzahl von Sialinsäuren, aber unterschiedlichem Substitutionsmuster am intakten Glycoprotein analysiert werden²⁸⁾. Da die Mikroheterogenität der Glycane in Abhängigkeit vom Produktionsstamm und der Kulturbedingungen variiert, können EPO-Präparate unterschiedlicher Hersteller anhand des Glycan-Musters differenziert werden^{14, 25, 26, 29)}. Zur Bestimmung des Glycan-Profiles von EPO siehe auch Lit.^{25, 26, 29-32)}. Die Kombination von Anionenaustausch- und hydrophiler Interaktionschromatographie – jeweils gekoppelt mit Massenspektrometrie – erlaubt die umfangreiche Charakterisierung der Glycane³³⁾. Eine Übersicht zu Verfahren zur Charakterisierung des Glycan-Musters in biotechnologisch hergestelltem Erythropoetin gibt Lit.³⁴⁾. Siehe auch den Kommentar zu

2.2.59 Glycan-Analyse von Glycoproteinen (Ph. Eur.)

Synonyme: Erythropoietin (EP), Hämatopoietin, erythropoiesis stimulating factor (ESF), r-HuEPO, rEPO, EPO

Arzneibuchnamen: Epoetin (USP), Epoetin Alfa (JAP), Epoetin Beta (JAP)

Eigenschaften

Konzentrierte Erythropoetin-Lösung ist eine klare, farblose Flüssigkeit. In wässriger Lösung zeigt EPO die beste Stabilität bei pH 7 bis 8. Der pI-Wert des desialisierten EPO beträgt etwa 8,2⁸⁾.

Prüfung auf Identität

Mit tausenden Publikation zu analytischen Aspekten gehört EPO zu den am besten untersuchten Glycoproteinen. Die in Rahmen der Prüfungen zitierte Literatur stellt daher nur eine kleine Auswahl der verfügbaren Publikationen dar.

- A. Die Substanz muss die Erythropoese im Tierversuch stimulieren. Das Arzneibuch lässt dies mit Hilfe der Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit prüfen. Die USP schreibt ebenfalls die Bestimmung der Wirkaktivität vor.
- B. Das Arzneibuch lässt die makroskopischen Isoformen, die auf der Anzahl der Sialinsäurereste der Glycane beruhen, mittels CE in einer nativen Quarzglaskapillare unter Verwendung eines schwach sauren Hintergrundelektrolyten bestimmen. Unter den Bedingungen werden 8 Isoformen aufgetrennt, die nach Lit.³⁵⁻³⁷⁾ 8 (Isoform 1) bis 15 (Isoform 8) Sialinsäurereste aufweisen. Das Arzneibuch lässt gegen das mit dem Referenzstandard erhaltene Muster vergleichen und gibt Bereiche für die prozentuale Verteilung der Isoformen an. Im Referenzstandard Erythropoetin für physikalisch-chemische Prüfungen CRS (1:1-Mischung von Epoetin alfa und Epoetin beta) überwiegen die Isoformen 5 und 6 mit 12 bzw. 13 Sialinsäureresten. Zur Analytik des Ph.-Eur.-Standards siehe auch Lit.³⁸⁾. Die USP führt die Prüfung der Isoformenverteilung unter den „spezifischen Tests“ auf und fordert ein bestimmtes Verhältnis der als 10 bis 13 bezeichneten Isoformen.

E

- Die JAP lässt Epoetin beta ebenfalls mittels CE identifizieren, fordert aber nur die Detektion von mindestens 4 Peaks ohne die Angabe einer prozentualen Verteilung der Isoformen.
- In der Literatur sind zahlreiche Varianten der CE-Methode zur Bestimmung der Isoformen beschrieben^{5, 39-42)}, so z.B. auch die CE-MS unter Verwendung von Oberflächen-beschichteten Kapillaren^{35-37, 43, 44)}. Zur Analytik des Glycan-Musters des Ph.-Eur.-Standards siehe auch Lit.^{36, 38, 43)}. Die Isoformenverteilung kann auch mittels kapillarisoelektrischer Fokussierung (CIEF)^{45, 46)} oder klassischer IEF analog zur Dopinganalytik^{47, 48)} ermittelt werden. Mittels Anionenaustauschchromatographie-Massen-spektrometrie können in einem Experiment zum einen die Ladungsheterogenität, der Anteil an Sialinsäuren und Anzahl der LacNAc-Einheiten bestimmt werden, als auch Information über weitere Modifizierungen wie O-Acetylierung oder Deamidierung erhalten werden²⁷⁾.
- C. Das Arzneibuch schreibt eine SDS-PAGE mit Immun-Blotting zur Detektion vor. Referenzlösung und Probe werden mehrfach appliziert. Nach der elektrophoretischen Trennung wird das Gel geteilt und die Proteinbanden in einem Teil mittels Coomassie-Blau-Färbung detektiert. Vom zweiten Teil des Gels werden die Proteinbanden auf eine geeignete Membran geblottet und mit einem mono- oder polyclonalen Antikörper inkubiert, der anschließend mit einem zweiten Antikörper mittels RIA oder ELISA detektiert wird.
- In der SDS-PAGE migriert rekombinantes EPO in Abhängigkeit der Analysenbedingungen mit einer scheinbaren Molekülmasse von 34 bis 38 kDa, obwohl die Molekülmasse etwa 30,4 kDa beträgt. Daher lässt das Arzneibuch gegen Referenzsubstanz vergleichen. Natives EPO migriert bei etwas geringerer scheinbarer Molekülmasse (ca. 34 kDa) als die meisten rekombinanten Hormone (ca. 36 bis 38 kDa), während Darbepoetin alfa bei deutlich höherer Molekülmasse (ca. 44 bis 45 kDa) migriert^{47, 49)}. Die JAP fordert für Epoetin alfa die mittels SDS-PAGE bestimmte Molekülmasse von 37 bis 42 kDa.
- Die SDS-PAGE ist prinzipiell auch zur Reinheitsprüfung geeignet, da Molekülfragmente oder Aggregate (Dimere und Oligomere) erkannt werden können⁴⁰⁾. Die JAP schreibt für Epoetin alfa einen analogen Identifizierungstest vor. Für einen Vergleich von SDS-PAGE und der SDS-CE siehe Lit.⁵⁰⁾. Zum Nachweis von EPO stehen z.B. auch kommerzielle ELISA-Kits zur Verfügung.
- D. Die Ph. Eur. schreibt die Peptidmustercharakterisierung nach enzymatischer Spaltung durch Trypsin und flüssigchromatographischer Auf-trennung der resultierenden Peptide vor. Zum Vergleich dient die CRS „Erythropoetin zur physikalisch-chemischen Prüfung“.
- Als Alternative zur Trypsinspaltung kann die Spaltung mit Endo-Proteinase-Lys-C erfolgen. Diese Methode liefert Chromatogramme mit einer geringeren Anzahl von Peaks, die aber besser getrennt werden. Im Gegensatz zur Methode der Ph. Eur. erfordert sie eine Vorbehandlung der Proben durch Reduktion und S-Pyridylethylierung. Die JAP schreibt für Epoetin alfa die Trypsinspaltung und für Epoetin beta die Spaltung mit Endo-Proteinase-Lys-C nach Pyridinethylierung vor. Die chromatographischen Trennbedingungen der USP- und JAP-Mono-graphien unterscheiden sich von denen der Ph. Eur. Alle Texte lassen gegen das Peptidmuster vor Referenzsubstanz nach entsprechender enzymatischer Hydrolyse bestimmen. Die Struk-turaufklärung der Glycopeptide der Peptidmu-stercharakterisierung kann mittels HPLC-MS^{30, 51)} oder CE-MS^{31, 32)} erfolgen. Bei erhöhter Analysetemperatur gelingt auch die HPLC-Trennung von Isomeren von O- und N-sialisierten Glycopeptiden⁵²⁾. Siehe auch den Kommen-tar zu **2.2.55 Peptidmustercharakterisierung** (Ph. Eur.).
- Andere Identitätsprüfungen:** Die JAP schreibt für Epoetin alfa und beta die Bestimmung des Glycan-Profil und des Sialinsäuregehalts vor, der für Epoetin alfa zwischen 10 und 12 und für Epoetin beta zwischen 10 und 13 liegen muss. Eine Zusammenfassung hoch auflösender Analy-senmethoden für EPO findet sich in Lit.⁵⁾. Die Charakterisierung von rekombinantem EPO Präpa-raten unterschiedlicher Hersteller anhand der Be-stimmung des Sialinsäuregehalts, der Verteilung der Isoformen mit CE sowie der Bestimmung des Profils der O- und N-Glycane mit Anionenaus-tausch und hydrophiler Interaktionschromatogra-phy mit massenspektrometrischer Detektion findet sich in Lit.⁵³⁾. Zu vergleichenden Untersuchungen

von rekombinanten EPO-Präparaten siehe z.B. Lit.^{40, 42, 54, 55)}.

In älteren Ausgaben der Ph. Eur. wurden die ersten 15 N-terminalen Aminosäuren mittels Edman-Abbau in einem automatischen Festphasensequenzator bestimmt. Dabei reagiert Phenylisothiocyanat mit der N-terminalen Aminosäure zum Phenylthiocarbamyl-Peptid. Behandlung mit Säure in wasserfreien Lösungsmitteln führt zur Abspaltung der terminalen Aminosäure unter Bildung einer Anilinthiazolinon-Aminosäure. Dieses instabile Derivat lagert sich in wässriger Säure bei erhöhten Temperaturen in eine relativ stabile Phenylthiohydantoin-Aminosäure (PTH-Aminosäure) um. Die PTH-Aminosäuren werden mittels HPLC anhand der Retentionszeit von PTH-Aminosäurestandards identifiziert. Die um eine Aminosäure verkürzte Peptidkette wird anschließend einem erneuten Aabauzyklus unterworfen. Durch sukzessive Zyklen können so ca. 30 bis 40 Aminosäuren eines Proteins identifiziert werden. Da EPO in Position 7 ein Cystein aufweist, das mit Cystein-161 eine Disulfidbrücke ausbildet, und EPO ohne Reduktion oder Alkylierung umgesetzt wird, ist als siebte Aminosäure kein Phentylthiohydantoin-Derivat chromatographisch nachweisbar. Zum Edman-Abbau sowie weiteren Verfahren zur Proteinsequenzanalyse siehe z. B. Lit.⁵⁶⁾.

Der Nachweis von EPO besitzt besondere Bedeutung in der Dopinganalytik. Die World Anti-Doping Agency (WADA) hat zwei Methoden zur direkten Detektion von rekombinantem EPO im Urin zugelassen, die IEF mit doppeltem Western-Blot und immunchemischer Detektion sowie den Nachweis mittels SDS-PAGE oder SAR-PAGE⁵⁷⁾. Bei der SAR-PAGE wird statt SDS das Detergens *N*-Lauroylsarcosin in Gel und Laufpuffer eingesetzt⁵⁸⁾. Je nach EPO-Variante werden die unterschiedlichen Verfahren zum initialen Nachweis oder als Bestätigungstest eingesetzt. Bei dem IEF-Verfahren wird EPO durch unspezifische Verfahren wie Ultrafiltration und Proteinfällung oder durch Immunoaffinitätschromatographie aufkonzentriert und auf einem Gel mit einem pH-Gradienten von 2 bis 6 in Gegenwart von 7 M-Harnstoff aufgetrennt. Nach der IEF werden die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran geblottet und mit einem monoklonalen Anti-EPO-Antikörper (Klon AE7A5) inkubiert, der an die EPO-Isoformen bindet. Im zweiten Blot wird die

EPO-Antikörperbindung durch Ansäuern auf pH < 3 dissoziiert und die Antikörper-Banden auf eine andere PVDF-Membran übertragen. An diese wird ein biotinylierter Anti-Maus-IgG-Antikörper gebunden. Die Chemolumineszenzdetektion erfolgt durch Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex und einem Luminolsubstrat^{59, 60)}. Humanes EPO zeigt 5 bis 7 Banden im pI-Bereich von 4,4 bis 5,1, während rekombinante EPO-Biosimilars 5 bis 6 Banden im schwächer sauren pI-Bereich aufweisen. Darbepoetin alfa (NESP) zeigt 4 Banden im stärker sauren pI-Bereich⁵⁷⁾. Bei der SDS-PAGE-/SAR-PAGE-Methode wird die Probe nach Immunoaffinitätsaufreinigung elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet⁴⁸⁾. Die Detektion der Banden erfolgt mittels einfachem oder doppeltem Immunoblot analog zur Detektion bei der IEF, wobei der doppelte Immunoblot bei Verwendung der PAGE-Verfahren als Bestätigungstest immer anzuwenden ist⁵⁷⁾.

Zur Überwachung von Blut- und EPO-Doping dient heute auch der 2008 in einigen Sportarten eingeführte biologische Pass („Blutpass“), in dem hämatologische Parameter der Athleten festgehalten sind. Abweichung von den individuellen Werten kann zu einer Sperre führen. Zum Nachweis von EPO- und Blutdoping siehe auch z.B. Lit.^{49, 61, 62)}.

E

Prüfung auf Reinheit

Gesamtprotein: Der Proteingehalt wird mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Hierzu wird zunächst ein UV-Spektrum aufgenommen und das Maximum im Bereich von 276 bis 280 nm bestimmt. Zur Quantifizierung dient der spezifische Absorptionskoeffizient von 7,43 für das Glycoprotein. Die gemessene Absorption wird dabei vom Proteinanteil des EPO bestimmt, dessen spezifischer Absorptionskoeffizient sich nach Lit.⁶³⁾ mit 12,5 berechnen lässt. Aus den beiden Absorptionskoeffizienten und dem Molekulargewicht des Proteinanteils (18200 Da) lässt sich das mittlere (hypothetische) Molekulargewicht des Glycoproteins berechnen. Es beträgt $18200 \text{ Da} \times 12,5/7,43 = 30600 \text{ Da}$. Die Ph. Eur. fordert einen Proteingehalt von 80 bis 120% der angegebenen Konzentration. Die JAP fordert für Epoetin alfa (280 nm) und beta die Bestimmung des Proteingehalts als Gehaltsbestim-

mung. Die USP schreibt keinen Puffer zur Lösung von Epoetin vor und lässt die Absorption bei 280 nm messen. Zur Bestimmung des Proteingehalts siehe auch den Kommentar zu **2.5.33 Gesamtprotein** (Ph. Eur.).

Dimere und verwandte Substanzen mit einer größeren Molekülmasse als der von Erythropoetin: EPO ist ein relativ stabiles monomeres Molekül. Allerdings können beispielsweise bei höheren Lagertemperaturen Dimere und höhere Aggregate gebildet werden^{64, 65)}. Proteinaggregate sind häufig Ursache für die Immunogenität rekombinanter Wirkstoffe. Daher prüft die Ph. Eur. auf Dimere und Oligomere mittels Größenausschlusschromatographie. Die Methode erfasst auch Fremdprotein, sofern sich dieses in der Molekülmasse von EPO unterscheidet und im Trennbereich der versendeten chromatographischen Säule liegt. Die Systemeignung wird mit Hilfe von Referenzsubstanz anhand der Peakfläche des Hauptpeaks (Erythropoetin) sowie der Auflösung zwischen dem Erythropoetin-Monomer und -Dimer überprüft. Das Arzneibuch lässt maximal 2,0% Dimere und Oligomere zu. Peaks mit einer längeren Retentionszeit als Erythropoetin werden nicht berücksichtigt, da es sich hierbei um Hilfsstoffe aus der Referenzsubstanz handelt.

Die USP begrenzt Proteinaggregate und Dimere auf 0,1 %. Die JAP limitiert für Epoetin alfa Oligomere ebenfalls auf 2 %, für Epoetin beta verwandte Substanzen auf 1,0 %. Für weitere Größenausschlusschromatographieverfahren zur Bestimmung von Dimeren und Oligomeren in EPO siehe Lit.^{5, 40, 64–66)}. Oligomere können auch mittels RP-HPLC analysiert werden⁵⁾.

Sialinsäuren: Sialinsäure ist ein Sammelbegriff für N- und O-Derivate der Neuraminsäure. Beim Menschen ist das häufigste Derivat die *N*-Acetylneuraminsäure. Sialinsäuren bilden den „Abschluss“ der Antennen der Glycane. Sialinsäuren ergeben beim Erhitzen mit Resorcin in Gegenwart von Kupfer(II)-Ionen einen blauvioletten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 580 nm⁶⁷⁾, der in *n*-Butanol ausgeschüttelt und gegen eine mit *N*-Acetylneuraminsäure erstellte Kalibrierkurve vermessen wird. Der Sialinsäuregehalt muss mindestens 10 Mol Sialinsäure pro Mol EPO betragen. Die USP bestimmt den Sialinsäuregehalt nicht, sondern prüft das Glycan-Profil. Die JAP prüft den

Sialinsäuregehalt mittels chromatographischer Verfahren als Identitätsreaktion und fordert für Epoetin alfa 10 bis 12 Mol Sialinsäuren pro Mol EPO und für Epoetin beta 10 bis 13 Mol Sialinsäuren pro Mol EPO. Siehe auch die Kommentare zu **2.2.59 Glycan-Analyse von Glycoproteinen** und **2.5.23 Sialinsäure in Polysaccharid-Impfstoffen** (beide Ph. Eur.). Zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung von Biopharmazeutika siehe z. B. Lit.⁶⁸⁾.

Ein häufig zur Charakterisierung von Glycoproteinen eingesetzter Parameter ist die Z-Zahl als mathematischer Ausdruck der Zusammensetzung negativ geladener *N*-Glycane. Dabei werden die *N*-Glycane nach enzymatischer Abspaltung chromatographisch analysiert und die Z-Zahl aus den prozentualen Anteilen der *N*-Glycane mit 0, 1, 2, 3, 4 und möglicherweise 5 negativen Ladungen (aus der Anzahl der gebundenen Sialinsäuren) multipliziert mit der jeweiligen negativen Ladung berechnet (siehe den Kommentar zu **2.2.59**, Ph. Eur.). Zur Bestimmung der Z-Zahl bei EPO-Produkten siehe Lit.⁶⁹⁾. Die Analytik der Glycoformen kann mittels HPLC-MS^{25, 26, 30)} oder CE-MS^{29, 31, 32)} erfolgen. Siehe auch den Abschnitt „Glycan-Analyse“ unter Herstellung.

Bakterien-Endotoxine: Endotoxine werden mittels Limulus-Amoebozytenlysat (siehe den Kommentar zu **2.6.14**, Ph. Eur.) bestimmt. Bei dem gegebenen Grenzwert von 20 I.E. Endotoxin pro 100 000 I.E. EPO treten mit den handelsüblichen Lysaten keine Störungen des Testsystems auf. Die USP begrenzt auf 2,5 USP Endotoxin-Einheiten pro ml.

Andere Reinheitsprüfungen: Die JAP fordert einen pH-Wert der wässrigen Lösung von Epoetin alfa von 5,7 bis 6,5 an und einen pH-Wert von 7,0 bis 8,0 für Epoetin beta. Zu vergleichenden Untersuchungen von EPO-Präparaten siehe z. B. Lit.^{40, 42, 54, 55)}.

Wertbestimmung

Das Arzneibuch schreibt zwei alternative In-vivo-Methoden an Mäusen vor, welche die Erythropoese nach Gabe von EPO messen. Bei beiden Methoden erfolgt die statistische Auswertung nach dem Modell der parallelen Geraden, wobei die Ak-

tivitäten von Prüf- mit Referenzsubstanz verglichen werden. Die Aktivität wird in I.E. angegeben, die aus dem Vergleich mit dem aktuellen Referenzstandard „Erythropoetin BRS“ resultieren. Der Vorteil der In-vivo-Verfahren besteht darin, dass sie die „echte“ physiologische Aktivität der Produkte widerspiegeln einschließlich der Zirkulation in der Blutbahn, der Internalisierung in die Zielzellen, der glomerulären Filtration und des Metabolismus in Organen.

A. In polyzythämischen Mäusen

Die dosisabhängige Bildung von Erythrozyten durch Einbau von gleichzeitig verabreichtem radioaktivem ^{59}Fe Eisen(III) wird in polyzythämischen Mäusen bestimmt. Die Versuchstiere werden bei schrittweise reduziertem Luftdruck und damit unter hypoxischen Bedingungen gehalten. Dies induziert Polyzythämie (gesteigerte Erythropoese). Bei nachfolgender Haltung unter Normalatmosphärendruck kommt die endogene Erythropoese völlig zum Erliegen, sodass neue Erythrozyten nur unter dem Einfluss von exogenem EPO gebildet werden.

B. In normozythämischen Mäusen

Bei diesem in der Durchführung einfacheren Test verwendet man gesunde, nicht vorbehandelte Mäuse und misst mittels Durchfluszytometrie die Anzahl der Retikulozyten im Blut, der nach Injektion von EPO zunimmt. Als unreife Vorstufen der Erythrozyten ist die Retikulozytenzahl ein direktes Maß für die Erythropoese im Knochenmark. Der Monographieentwurf des USP Medicines Compendium gibt eine analoge Bestimmung an. Die JAP bestimmt die Aktivität von Epoetin alfa und beta ebenfalls in normozythämischen Mäusen, wobei unterschiedliche Mäusestämme angegeben werden. Die Auswertung erfolgt über die Anzahl der hämolyseresistenten Zellen. Die USP führt nur diesen Assay zur Bestimmung der Wirksamkeit von Epoetin auf.

Andere Wertbestimmungsmethoden: Die JAP lässt bei Epoetin alfa und Epoetin beta neben der Bestimmung der In-vivo-Wirksamkeit den Proteingehalt photometrisch bei 280 nm und chromatographisch mit UV-Detektion bei 214 nm bestimmen. Zur chromatographischen Bestimmung von EPO in Fertigarzneimitteln siehe auch Lit.^{40, 70},

zur Bestimmung mittels CE Lit.⁴². Außerdem ist die Quantifizierung von EPO über die Aminosäurenanalyse mittels HPLC-MS beschrieben⁷¹. Der Monographieentwurf des USP Medicines Compendium führt als physikalisch-chemische quantitative Verfahren die Bestimmung der Isoformenverteilung mittels CE sowie des Sialinsäuregehalts auf. Der Wirkwert soll in Analogie zur Ph. Eur. in vivo unter Verwendung poly- oder normozythämischer Mäuse oder in vitro unter Verwendung EPO-sensitiver Zelllinien ermittelt werden, wobei deren Wachstum in Abhängigkeit von der eingesetzten EPO-Konzentration gemessen wird^{72, 73}. Der Einfluss der Glycosylierung auf die Wirkung wird hier aber nicht erfasst, sodass für unvollständig glycosyliertes EPO keine Korrelation zwischen In-vitro- und In-vivo-Aktivität besteht⁷⁴. Dieser Nachteil könnte durch die Kombination der In-vitro-Aktivitätsbestimmung mit einem physikalisch-chemischen Verfahren beispielsweise der Analyse der Isoformenverteilung überwunden werden⁷². Für vergleichende analytische Untersuchungen von EPO-Präparaten siehe z. B. Lit.^{42, 54}.

E

Lagerung

Die Lagerung sollte in gefrorenem Zustand, am besten bei unter -70°C erfolgen. Das Arzneibuch schreibt die Lagerung unterhalb von -20°C vor. Obwohl wiederholtes Einfrieren und Auftauen das Molekül nicht beeinträchtigen, empfiehlt die Ph. Eur. dies zu vermeiden. In aufgetautem Zustand, insbesondere bei stärkerer Verdünnung, kann Epoetin oxidieren, aggregieren und an Oberflächen absorbieren, was den Zusatz von stabilisierenden Agentien wie Albumin oder Aminosäuren und von Netzmitteln wie z. B. Polysorbaten erforderlich machen kann.

Metabolisierung

Die Metabolisierung von EPO ist noch nicht vollständig verstanden. In geringem Ausmaß wird das Hormon hepatisch und renal eliminiert. Der größte Teil des im Blut zirkulierenden EPO wird durch Aufnahme in Zellen, die EPO-Rezeptoren exprimieren, entfernt. Die Bestimmung von EPO in Plasma erfolgt in der Regel mit kommerziellen ELISA-Kits.

G. Scriba

Pharmakologische Eigenschaften

Pharmakodynamik⁷⁵⁻⁸¹: Erythropoetin (EPO) ist ein Glycoprotein-Hormon, das in der Niere und in geringer Menge auch in der Leber gebildet wird. Es wird bei Sauerstoffmangel im Gewebe (Hypoxie) vermehrt in den Nieren synthetisiert und ins Blut abgegeben. Ein Hypoxie-induzierter Faktor (HIF-1) reguliert die Genexpression von EPO. Dieses stimuliert seinerseits über die Bindung an einen Rezeptor aus der Familie der Zytokinrezeptoren auf der Oberfläche von Erythrozytenvorläuferzellen die Bildung von Erythrozyten. Pro Tag werden etwa 200 Milliarden der roten Blutkörperchen gebildet. Die Aufgabe von EPO im Organismus ist allerdings nicht allein auf die Bildung von Erythrozyten beschränkt. EPO-Interaktionen mit seinem Rezeptor werden in den verschiedensten nicht blutbildenden Geweben in Zusammenhang mit Zellteilungsvorgängen, Chemotaxis, Angiogenese, Aktivierung intrazellulären Calciums und Apoptosehemmung nachgewiesen. Der zugehörige Rezeptor findet sich in somatischen Zellen wie Neuronen, Astrozyten, Mikroglia – und Herzmuskelzellen. Bei Patienten, die z. B. wegen einer Nierenerkrankung EPO nicht mehr oder nicht in ausreichender Menge bilden können, wird eine Anämie durch die Applikation des rekombinanten Hormons verhindert oder abgemildert.

Für die klinische Anwendung wird EPO gentechnisch hergestellt. Das rekombinante humane EPO wird aus Säugetier-Zelllinien in zwei verschiedenen Formen – Epoetin alfa und Epoetin beta – gewonnen. Beide besitzen den gleichen Proteinanteil wie das menschliche Hormon; sie unterscheiden sich aber im Glykosylierungsmuster (siehe unter „Struktur“).

Pharmakokinetik^{75, 76, 78}: Nach intravenöser Applikation wird EPO schnell verteilt, das Verteilungsvolumen entspricht mit 21 bis 63 ml/kg Körperegewicht etwa dem Plasmavolumen. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 4 bis 12 h, sie kann bei wiederholter Gabe abnehmen. Die Eliminationsgeschwindigkeit gleicht einer Kinetik 1. Ordnung. Die renale Clearance liegt bei 0,032 bis 0,055 ml/min/kg Körperegewicht. Bei intravenöser Gabe kann EPO noch nach 24 h im Plasma nachgewiesen werden.

Nach subkutaner Injektion werden innerhalb von 10 bis 14 h maximale Plasmaspiegel erreicht. Die Bioverfügbarkeit beträgt etwa 31 %. Das Ausmaß der Resorption ist nach Injektion in den Bauch etwas höher als an anderen Stellen. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei 22 bis 41 h; nach subkutaner Gabe kann EPO noch bis zu 4 Tage im Plasma nachgewiesen werden. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die eine Hämodialyse erhalten, beträgt die Eliminationshalbwertszeit nach einmaliger Gabe 6 h, im Steady State 4 h.

Die Wirkung setzt bei drei EPO-Injektionen pro Woche nach ca. 7 bis 10 Tagen mit der Erhöhung der Retikulozytenzahl im Blut ein; eine Steigerung des Hämoglobinspiegels, der Erythrozytenzahl und des Hämatokritwerts (HKT) sind innerhalb von 2 bis 6 Wochen nach Therapiebeginn feststellbar.

Indikationen^{76, 77, 79}: Behandlung von Anämie infolge einer chronischen Nierenerkrankung (renalen Anämie) bei dialysepflichtigen und noch nicht dialysierten Patienten; insbesondere bei diesen Patienten lassen sich ansonsten notwendige Bluttransfusionen möglicherweise umgehen. Symptomatische Anämien bei erwachsenen Krebspatienten mit nicht-myeloischen malignen Erkrankungen, die eine Chemotherapie erhalten sowie bei primären Niedigrisiko-Myelodysplastischen Syndromen (MDS) und niedrigen Erythropoetin-Serumspiegeln. Weiterhin sekundäre Anämien, z. B. bei AIDS (insbesondere bei Behandlung mit Zidovudin), Fehlfunktionen des Knochenmarks, chronische Entzündungen; Vorbeugung einer Anämie bei Frühgeborenen; Steigerung der Menge an Eigenblut bei Patienten in einem Eigenblutspendeprogramm [autologe Blutgewinnung; nur bei mittelschwerer Anämie (Hämatokrit 33 bis 39 %) und wenn kein Eisenmangel vorliegt].

Die Gabe von EPO stellt eine alternative Behandlungsmethode für Patienten dar, die aus religiösen Gründen nicht mit Bluttransfusionen behandelt werden können⁸⁰.

Dosierung^{75, 76, 79, 81}: Die EPO-Lösung wird subkutan oder langsam intravenös (über 1 bis 2 min) injiziert. Bei Dialysepatienten kann die intravenöse Gabe über die arteriovenöse Fistel erfolgen, bei nicht hämodialysierten Patienten sollte subkutan appliziert werden, um die peripheren Venen zu schonen.

Behandlungsziel ist ein Hämoglobinwert von 10 bis 12 g/100 ml bzw. ein Hämatokritwert von 30 bis 35 %. Dabei sollte die Steigerung des Hämatokrits wöchentlich mindestens 0,5 % betragen.

– Korrekturphase:

Intravenös: 40 bis 50 I.E./kg Körpergewicht 3-mal wöchentlich; falls erforderlich, kann die Dosis alle 4 Wochen um 25 I.E./kg 3-mal wöchentlich erhöht werden.

Subkutan: 20 I.E./kg Körpergewicht 3-mal wöchentlich; die Dosis kann alle 4 Wochen um 20 I.E./kg 3-mal wöchentlich erhöht werden.

In der Korrekturphase sollte die maximale Dosis von 720 I.E./kg/Woche nicht überschritten werden.

– Erhaltungsphase: 30 bis 100 I.E./kg Körpergewicht 3-mal wöchentlich; die Dosis muss individuell eingestellt werden.

Bei noch nicht dialysepflichtigen Patienten („Prädiyalese-Patienten“) liegt die Erhaltungsdosis bei 50 bis 100 I.E./kg wöchentlich, verteilt auf 3 Dosen.

– Krebspatienten: Empfohlene Anfangsdosis unabhängig vom Körpergewicht 20000 I.E. 1-mal wöchentlich. Falls nach 4-wöchiger Therapie der Hämoglobin-Wert um mindestens 1 g/dl angestiegen ist, sollte die Dosis beibehalten werden. Falls nicht, kann eine Verdoppelung der wöchentlichen Dosis erwogen werden. Höchstdosis pro Woche: 60000 I.E. Die Behandlung sollte für bis zu 4 Wochen nach Beendigung der Chemotherapie fortgesetzt werden.

– Frühgeborene: 250 I.E./kg Körpergewicht 3-mal wöchentlich; die Therapie sollte in den ersten 3 Lebenstagen begonnen und über 6 Wochen durchgeführt werden.

Cave: Präparate zur Mehrfachentnahme können Benzylalkohol enthalten, was bei Frühgeborenen u.a. neurologische Komplikationen verursachen kann!

Bei Hypertonie, bestehenden kardiovaskulären, zerebrovaskulären oder peripheren vaskulären Erkrankungen sollten die Anstiegs geschwindigkeit und der Zielwert des Hämatokrits individuell bestimmt werden.

Eine engmaschige Überwachung der Patienten hinsichtlich Veränderungen des Blutdrucks und der Serum-Elektrolytwerte ist angeraten.

Vor der Behandlung mit EPO sollten Vitamin-B₁₂- oder Folsäuremangel als Ursache der Anämie aus-

geschlossen werden. Eventuell muss während der Therapie eine Eisensubstitution erfolgen.

Bei geringem oder fehlendem Ansprechen auf EPO können u.a. folgende Ursachen vorliegen: Eisen-, Folsäure- oder Vitamin-B₁₂-Mangel, Aluminiumvergiftung, Infektionen, Entzündungen oder Verletzungen, okkuler Blutverlust, Hämolyse oder Knochenmarksfibrosen.

Intoxikation^{75, 77)}: Auch bei sehr hohen EPO-Serumspiegeln werden nur selten Vergiftungsscheinungen beobachtet. Prinzipiell muss mit dem Auftreten von Polyzythämie, Angina pectoris, einer Verschlechterung einer Hypertonie und einer Exazerbation chronischer Lungenerkrankungen wie z.B. Asthma bronchiale gerechnet werden.

Therapie: Die EPO-Gabe sollte ausgesetzt werden, bis der Hämatokritwert in den Zielbereich abgesunken ist. Eventuell kann ein Aderlass (Phlebotomie) durchgeführt werden. Ein Bluthochdruck sollte bevorzugt mit einem peripheren Vasodilatator behandelt werden.

E

Nebenwirkungen^{75, 76, 79, 81)}: Entstehung und Verstärkung eines Bluthochdrucks, besonders bei schnellem Anstieg des Hämatokritwerts; zentralnervöse Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Verwirrtheit und Krampfanfälle; vereinzelt sind bei Patienten mit normalem oder niedrigem Blutdruck Blutdruckentgleisungen mit Enzephalopathie-ähnlichen Symptomen (Kopfschmerzen, Verwirrtheitszuständen, Sprach- und Gangstörungen etc. bis zu generalisierten tonisch-klonischen Krämpfen) aufgetreten.

Es kann zum Anstieg der Thrombozytenzahl kommen, selten entwickelt sich eine Thrombozytose. Durch den gesteigerten Hämatokritwert benötigen Dialysepatienten u.U. eine höhere Heparindosis, um ein Verstopfen des Dialysesystems zu verhindern. Es können Thrombosen im arteriovenösen Shunt entstehen. Andere thrombotische Ereignisse wie Herzinfarkt, Krampfanfälle und vorübergehende Ischämien sind aufgetreten. Parallel zum Anstieg des Hämatokritwerts entwickeln viele Patienten einen funktionalen Eisenmangel, daher wird die zusätzliche Gabe eines Eisenpräparates (oral oder i.v.) empfohlen. In Einzelfällen wurde eine vorübergehende Erhöhung des Kalium- und Phosphat-Blutspiegels beobachtet.

Ferner können gastrointestinale Nebenwirkungen (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall) und grippeähnliche Symptome auftreten.

Kontraindikationen^{75, 76, 79}: Unkontrollierter Bluthochdruck, Überempfindlichkeit gegen EPO, Albumin oder Fragmente der Zellen, aus denen das rekombinante EPO gewonnen wurde; Erythroblastopenie nach vorangegangener Erythropoetin-Therapie; Patienten vor einem elektiven orthopädischen Eingriff, die nicht an einem autologen Blutspenderprogramm teilnehmen können, im Zusammenhang mit schwerer Herzkrankheit, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, vaskulärer Erkrankung der Karotiden oder zerebrovaskulärer Erkrankung sowie Patienten mit vor kurzem eingetretenen Herzinfarkt oder zerebrovaskulärem Ereignis; chirurgische Patienten bei denen keine adäquate Thromboseprophylaxe durchgeführt werden kann.

Bei Bluthochdruck, Epilepsie, Thrombozytose und chronischer Leberinsuffizienz sollte EPO mit Vorsicht angewendet werden. Ein Folsäure- oder Vitamin-B₁₂-Mangel ist vor der Behandlung auszuschließen. Bei ischämischen Gefäßerkrankungen darf EPO wegen der Änderung der Fließeigenschaften des Blutes bei Anstieg des Hämatokritwerts ebenfalls nur mit Vorsicht angewendet werden.

Interaktionen^{76, 79}: Bei gleichzeitiger Gabe von Ciclosporin sollten dessen Plasmaspiegel kontrolliert werden, da die Substanz an Erythrozyten gebunden wird. Die Ciclosporindosis muss dem steigenden Hämatokritwert angepasst werden.

Wegen der Erhöhung des Hämatokritwerts kann es außerdem erforderlich sein, die Heparindosis zu erhöhen.

Schwangerschaft und Stillzeit^{76, 79}: Da keine ausreichenden Erfahrungen vorhanden sind, sollte EPO während Schwangerschaft und Stillzeit nicht oder nur nach strenger Nutzen-Risiko-Abschätzung eingesetzt werden.

Besondere Hinweise^{76, 81}: Die missbräuchliche Verwendung durch Gesunde, z.B. durch Leistungssportler als Alternative zum Bludoping, kann zu einer übermäßigen Steigerung des Hämatokritwerts führen. In diesem Zusammenhang wurde über lebensbedrohliche Komplikationen des Herz-Kreislauf-Systems berichtet.

Bewertung: Rekombinantes EPO kann bei Patienten mit renaler Anämie, unter Chemotherapie oder während der Vorbereitung einer Eigenblutspende zur Vermeidung einer Anämie appliziert werden. Es handelt sich um die erste unmittelbar kausale Behandlungsmöglichkeit und stellt für die betroffenen Patienten meist eine mittelfristig lebensrettende Maßnahme dar. Weiterentwicklungen wie Darbopoetin alfa oder Methoxy-Polyethylenglycol-Epoetin beta unterscheiden sich von EPO durch eine längere Halbwertszeit. Sie müssen nur einmal pro Woche bzw. Monat appliziert werden. Der Hypoxie-induzierbarer-Faktor-Prolylhydroxylase-Inhibitor Roxadustat hat sich in klinischen Studien gegenüber Erythropoese-stimulierenden Substanzen wie EPO lediglich als ebenbürtig, nicht jedoch als überlegen gezeigt. Auch die Tendenz zur Auslösung von potenziell tödlich verlaufenden kardiovaskulären oder thromboembolischen Ereignissen ist bei beiden Wirkstoffgruppen ähnlich stark ausgeprägt. EPO wird noch immer missbräuchlich zum Doping von Leistungssportlern verwendet.

M. Neubeck/Mu

Literatur

- 1) T. Miyake, C. K.-H. Kung, E. Goldwasser, *J. Biol. Chem.* **252**, 5558–5564 (1977).
- 2) F.-K. Lin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7580–7584 (1985).
- 3) H. Schellekens, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 174–178 (2008).
- 4) I. Macdougall, M. Ashenden, *Adv. Chronic Kidney Dis.* **16**, 117–130 (2009).
- 5) M. Girard et al., *Anal. Chim. Acta* **713**, 7–22 (2012).
- 6) International Nonproprietary Names (INN) for Biological and Biotechnical Substances, INN Working Document 05.179 (update 2013).
- 7) J.M. Davis et al., *Biochemistry* **26**,

- 2633–2638 (1987).
- 8) N. Imai et al., *J. Biochem.* **107**, 352–359 (1990).
- 9) P.H. Jensen et al., *Nature Protocols* **7**, 1299–1310 (2012).
- 10) H. Sasaki et al., *J. Biol. Chem.* **262**, 12059–12076 (1987).
- 11) C. H. Hokke et al., *J. Biochem.* **228**, 981–1008 (1995).
- 12) R.S. Rush et al., *Anal. Chem.* **67**, 1442–1452 (1995).
- 13) N. Kawasaki et al., *Anal. Biochem.* **285**, 82–91 (2000).
- 14) D. Cointe et al., *Glycobiology* **10**, 511–519 (2000).
- 15) N. Shahrokh et al., *Mol. Pharm.* **8**, 286–296 (2011).
- 16) L.O. Narhi et al., *J. Biol. Chem.* **266**, 23022–23026 (1991).
- 17) R.S. Syed et al., *Nature* **395**, 511–516 (1998).
- 18) J.C. Cheetham et al., *Nature*

- Struct. Biol. Mol. Biol. 5, 861–866 (1998).
- 19)** T. Dingermann, T. Winckler, I. Zürndorf, *Gentechnik, Biotechnik*, 3. Aufl., S. 329–334, Wiss. Verlagsges., Stuttgart 2019.
- 20)** W. Jelkmann, Int. Med. 43, 649–659 (2004).
- 21)** P. Wang et al., Science 342, 1357–1360 (2013).
- 22)** P. Wang et al., Angew. Chem. Int. Ed. 51, 11576–11584 (2012).
- 23)** R. M. Wilson et al., Angew. Chem. Int. Ed. 52, 7646–7665.
- 24)** B. Cowper et al., Pharmeur. Sci. Notes 266, 34–53 (2019).
- 25)** A. Harazono et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 83, 65–74 (2013).
- 26)** N. Hashii et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 28, 921–932 (2014).
- 27)** G. van Schaick et al., Anal. Chim. Acta 1143, 166–172 (2021).
- 28)** A. Taichrib et al., J. Proteomics 74, 958–966 (2011).
- 29)** A. Taichrib, M. Pioch, C. Neusüß, Anal. Bioanal. Chem. 403, 797–805 (2012).
- 30)** J. Jiang et al., Anal. Bioanal. Chem. 406, 6265–6274 (2014).
- 31)** E. Gimenez et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 25, 2307–2316 (2011).
- 32)** E. Gimenez et al., Anal. Chim. Acta 709, 81–90 (2012).
- 33)** Z. Szabo et al., J. Proteome Res. 17, 1559–1574 (2018).
- 34)** S. Hua et al., Trends Anal. Chem. 68, 18–27 (2015).
- 35)** C. Neusüß, U. Demelbauer, M. Pelzing, Electrophoresis 26, 1442–1450 (2005).
- 36)** E. Balaguer et al., Electrophoresis 27, 2638–2650 (2006).
- 37)** E. Balaguer, C. Neusüß, Anal. Chem. 78, 5384–5393 (2006).
- 38)** J. Bones et al., Anal. Chem. 83, 4154–4162 (2011).
- 39)** F. Benavente et al., Electrophoresis 27, 4008–4015 (2006).
- 40)** V. Brinks et al., Pharm. Res. 28, 386–393 (2011).
- 41)** J. Zhang et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 50, 538–543 (2009).
- 42)** S. Boucher, A. Kane, M. Girard, J. Pharm. Biomed. Anal. 71, 207–213 (2012).
- 43)** E. Balaguer, C. Neusüß, Chromatographia 64, 351–357 (2006).
- 44)** A. Taichrib, M. Pioch, C. Neusüß, Electrophoresis 33, 1356–1366 (2012).
- 45)** P. Dou et al., J. Chromatogr. A 1190, 372–376 (2008).
- 46)** X. Li et al., Anal. Methods 12, 3836–3843 (2020).
- 47)** M.-J. Kang et al., Bull. Korean Chem. Soc. 31, 2493–2496 (2010).
- 48)** C. Reichel et al., Drug Test. Anal. 1, 43–50 (2009).
- 49)** C. Reichel, Anal. Bioanal. Chem. 401, 463–481 (2011).
- 50)** A. L. Wang et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 180, 113006 (2020).
- 51)** Y. Takegawa et al., J. Sep. Sci. 31, 1585–1593 (2008).
- 52)** E. S. Ji et al., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 1110–1111, 131–137 (2019).
- 53)** B. Cowper et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 153, 214–220 (2018).
- 54)** S. Park et al., J. Pharm. Sci. 98, 1688–1699 (2009).
- 55)** L. A. Halim et al., J. Pharm. Sci. 105, 542–550 (2016).
- 56)** F. Lottspeich, J. W. Engel, *Bioanalytik*, 3. Aufl., S. 349–366, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 2012.
- 57)** WADA Technical Document TD2014EPO.
- 58)** C. Reichel, F. Abzehier, T. Geisendorfer, Drug Test. Anal. 1, 494–504 (2009).
- 59)** F. Lasne et al., Anal. Biochem. 311, 119–126 (2002).
- 60)** F. Lasne, J. Immunol. Methods 276, 223–226 (2003).
- 61)** Y. O. Schumacher et al., Drug Test. Anal. 4, 846–853 (2012).
- 62)** T. Pottgiesser, Y. O. Schumacher, Anal. Bioanal. Chem. 405, 9625–9639 (2013).
- 63)** H. Mach et al., Anal. Biochem. 200, 74–80 (1992).
- 64)** A. M. DePaolis, J. V. Andvani, B. Sharma, J. Pharm. Sci. 84, 1280–1284 (1995).
- 65)** Y. Endo et al., J. Biochem. 112, 700–706 (1992).
- 66)** S. R. Gunturi, U. Ghobrial, B. Sharma, J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 213–221 (2007).
- 67)** L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta 24, 604–611 (1957).
- 68)** A. Harazono et al., Biologicals 39, 171–180 (2011).
- 69)** C.-T. Yuen et al., Biologicals 39, 396–403 (2011).
- 70)** S. S. Rane et al., J. Pharm. Anal. 2, 160–165 (2012).
- 71)** J. H. Yim et al., Anal. Bioanal. Chem. 406, 4401–4409 (2014).
- 72)** U. Hammerling et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 14, 1455–1469 (1996).
- 73)** S. Nicolis et al., Exp. Hematol. 21, 665–670 (1993).
- 74)** J. Caro, A. J. Erslev, Contrib. Nephrol. 66, 54–62 (1988).
- 75)** Martindale.
- 76)** Drugdex®.
- 77)** B. G. Katzung, *Basic & Clinical Pharmacology*, 6. Aufl., Appleton & Lange, Norwalk 1995.
- 78)** I. C. MacDougall, Lancet 1, 425–427 (1989).
- 79)** Fachinformation Erygo®/Erypo® FS, Janssen-Cliag, Stand 09/2000.
- 80)** O. J. Nielson, J. N. Thaysen, Dan. Med. Bull. 36, 590–592 (1989).
- 81)** Fachinformation Epoetin alfa HEXAL®, Hexal, Stand 8/2011.