

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe: Untersuchungen zu Physikochemie, In-vitro-Verhalten und Austauschbarkeit von Eisen „non-biological complex drugs“

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Julia Schnorr

geb. in Dernbach, Westerwald

Mainz, 2018

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2018

D77

**„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt“**

Marie Curie (1867 – 1934)

Danksagung

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. L. für die Überlassung dieses interessanten Forschungsgebietes und der Möglichkeit mich in die Qualitätssicherung des Klinikmusterbetriebes einzubringen. Durch meine Promotion konnte ich in den letzten drei Jahren fachlich und persönlich wachsen. Ebenso danke ich meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis. T. N. und K. Z. danke ich für die fachlichen Diskussionen und die daraus hervorgegangenen Denkanstöße. U. H. und M. S. T. danke ich für die Unterstützung bei der Organisation meiner Versuche. Besonders danken möchte ich A.-M. C., M. H., M. F., Y. G., O. K. und M. A. N. für ihre Freundschaft und Unterstützung. Ihr habt meine Zeit in Mainz zu einer ganz besonderen gemacht. Herrn S., Herrn E. und Frau C. vom [REDACTED] gilt ein ausgesprochener Dank für die Einarbeitung in das *In-ovo*-Modell und die großartige Unterstützung beim Methodentransfer. Ich danke Michael K. für die Assistenz bei den *In-ovo*-Versuchen. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. K. für die Möglichkeit der Nutzung und Einarbeitung in das Gebiet der Transelektronenmikroskopie. Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle auch an M. G. und B. B. aussprechen, die viele Stunden darauf verbracht haben mich mit der TEM-Technik vertraut zu machen und mir unzählige Fragen beantwortet haben. Bei Herrn Prof. H. und seinem Mitarbeiter Herrn M. bedanke ich mich für die Aufnahme der Röntgendiffraktogramme und die Diskussion der Ergebnisse. Ebenso gilt mein Dank Herrn K. und S. S. für die Anfertigung der Mößbauer-Spektren die in dieser Arbeit verwendet wurden. Mein herzlichster Dank gilt meinem Freund T. S. für seine Liebe, Unterstützung und sein Verständnis, wenn es im Labor mal wieder nicht klappen wollte. Ich bedanke mich auch bei meinen Großeltern und J. R., die den Abschluss meiner Promotion leider nicht mehr erleben können. Ihr habt stets an mich geglaubt und mir beigebracht, dass man mit genug Motivation alle seine Ziele erreichen kann.

Liste der Veröffentlichungen und Vorträge

Vorträge:

Prüfpräparate- Produktion in der Praxis- Beispiel der Universität Mainz. Lehrgang Entwicklung „GMP-/FDA-konforme Prüfpräparate (IMPs)“, Concept Heidelberg, 21.-22. Februar 2018, Heidelberg

Prüfpräparate- Produktion in der Praxis- Beispiel der Universität Mainz. Lehrgang Entwicklung „GMP-/FDA-konforme Prüfpräparate (IMPs)“, Concept Heidelberg, 14.-15. Februar 2017, Mannheim

Veröffentlichungen:

Schnorr J, Fütterer S, Spicher K, Catarinolo M, Schlösser C, Enzmann H, Langguth P: Bioequivalence decision for nanoparticulate iron complex drugs for parenteral administration based on their disposition. Regul Toxicol Pharmacol 2018. Zur Veröffentlichung angenommen

Schnorr J, Langguth P: Characterisation of non-biological complex drugs. Hosp Pharm Europe 2016; Educational Handbook on Non-biological Complex Drugs, 10-13

Schnorr J, Spahn-Langguth H, Langguth P: GMP-konforme Arzneimittelherstellung an der Universität Mainz. Pharm Ind 78 2016; Nr.2, 279-283 .
Artikel ebenfalls publiziert in Russland in: DPI 2016, Nr.1, 26-31

Posterpräsentationen:

Schnorr J, Fütterer S, Langguth P: Similarity question of nanomedicines: Physicochemical comparison of parenteral iron generic products with their innovators. DPhG Annual Meeting 2016, München, 4.-7. Oktober 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Liste der Veröffentlichungen und Vorträge	III
Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung.....	6
1.1. Das Element Eisen	6
1.2. Physiologie des Eisenstoffwechsels.....	6
1.2.1. Intestinale Eisenresorption.....	8
1.2.2. Endokrine Regulation des Plasma-Eisenspiegels	11
1.3. Anämie und deren Behandlung.....	13
1.3.1. Orale Eisentherapie	15
1.3.2. Parenterale Eisensupplementierung.....	16
1.3.3. Risiken der parenteralen Eisentherapie	20
1.4. Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe	23
1.4.1. Geschichte parenteraler Eisenkomplexe	23
1.4.2. Non-biological complex drugs und die Herausforderungen bei der Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe	25
1.4.3. Charakterisierungsstrategien.....	27
1.4.3.1. Physikochemische Charakterisierung	28
1.4.3.2. In-vitro-Charakterisierung / nicht klinische Studien	32
1.4.3.3. In-vivo-Charakterisierung.....	33
1.5. Ziele dieser Arbeit.....	33
2. Materialien und Methoden.....	35
2.1. Physikochemische Charakterisierung	36
2.1.1. Methodische Hintergründe	36
2.1.1.1. Struktureller Aufbau von Festkörpern.....	36

Inhaltsverzeichnis

2.1.1.2.	Spektroskopische Methoden	38
2.1.1.3.	Größenbestimmung von Nanopartikeln	49
2.1.1.4.	Elektrostatische Erscheinungen von Partikeln im wässrigen Medium ...	53
2.1.2.	Methoden.....	56
2.1.2.1.	Zeta-Potential	56
2.1.2.2.	Größenbestimmung	57
2.1.2.2.1.	Dynamische Lichtstreuung.....	57
2.1.2.2.2.	Transelectronenmikroskopie.....	58
2.1.2.3.	Untersuchungen zur Zusammensetzung und Polymorphie des Eisenkerns	59
2.1.2.3.1.	Mößbauer-Spektroskopie	59
2.1.2.3.2.	Pulverröntgendiffraktometrie.....	60
2.1.2.3.3.	IR-Spektroskopie	61
2.2.	Stabilitätsuntersuchungen	62
2.2.1.	Saure Hydrolyse.....	62
2.2.2.	Ferrozin-Methode zur Bestimmung von labilem Eisen.....	64
2.3.	In-ovo-Biodistribution	67
2.3.1.	Das Chorion-Allantois-Membran-Modell.....	67
2.3.2.	Studiendesign	68
2.3.3.	Praktisches Vorgehen	70
2.3.4.	Statistische Auswertung.....	73
3.	Ergebnisse	74
3.1.	Größenbestimmung und Zeta-Potential	74
3.1.1.	Dynamische Lichtstreuung.....	74
3.1.2.	Transelectronenmikroskopie.....	75
3.1.3.	Zeta-Potential	83
3.1.4.	Diskussion Größe und Zeta-Potential	85

Inhaltsverzeichnis

3.2. Strukturanalyse	86
3.2.1. Morphologie des Eisenkerns	86
3.2.1.1. Pulverröntgendiffraktometrie	89
3.2.1.2. Struktur des Eisenkernes Diskussion	93
3.2.2. IR-Spektroskopie.....	94
3.3. Stabilitätsuntersuchungen	98
3.3.1. Saure Hydrolyse.....	98
3.3.2. Ferrozintest.....	99
3.4. CAM Hühnermodell.....	101
3.4.1. Überlebensrate.....	101
3.4.2. Gewicht.....	101
3.4.3. Eisenverteilung im Gewebe.....	103
3.4.4. Auswertung CAM Versuche.....	107
4. Diskussion	109
4.1. Zusammenhang thermodynamische Stabilität, Gewebeverteilung und zulässige Gesamtdosis	109
4.2. Austauschbarkeit von parenteralen Eisenprodukten.....	112
4.3. Vergleich Nachfolgeprodukt zu Originator	113
4.4. Schlussbetrachtung und Fazit	115
5. Literaturverzeichnis	116
Lebenslauf.....	128

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

AFM	Atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskop
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, die französische Arzneimittelbehörde
API	Active pharmaceutical ingredient, Wirkstoff eines Arzneimittels
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CAM	Chorion-Allantois-Membran
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use, Ausschuss für Humanarzneimittel
CKD	Chronical kidney disease, chronische Nierenerkrankung
d	Durchmesser
d _f	Ferret'scher Durchmesser
d _g	Geometrischer Durchmesser
d _h	Hydrodynamischer Durchmesser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
d _m	Marrit'scher Durchmesser
DMT1	Divalenten Metalltransport 1
EMA	European Medicines Agency
Fe	Eisen
FeCM	Eisencarboxymaltose, Ferinject®
FeD_EU	Niedermolekulares Eisendextran, europäischer Markt, Cosmofer®
FeD_USA	Niedermolekulares Eisendextran, US-amerikanischer Markt, IN-FeD®
FeG	Eisengluconat, Ferrlecit®
FeG_G	Eisengluconat, generisch
FeIM	Eisenisomaltosid, Monofer®
FeNP	Eisenoxidhydroxid-Nanopartikel
FeOx	Eisenoxytol, Rienso®
FeS	Eisensucrose
FeS_G	Eisensucrose, generisch

Abkürzungsverzeichnis

FeX	Eisenoxid unbekannter Zusammensetzung, Entwicklungsprodukt
Fz	Ferrozin®
GI	gastrointestinal
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide
IBD	Inflammatory bowel disease, chronisch entzündliche Darmerkrankung
ICDD	International Centre for Diffraction Data
LOMO	Highest occupied molecular orbital
LS	Light scattering, Lichtstreuung
LUMO	Lowest occupied molecular orbital
NBCD	Non-biological complex drug
NIBS	Non-inversive back scattering, Nicht-inversive Rückwärtsstreuung
NTBI	Non-transferrin bound iron, Nicht Transferrin gebundenes Eisen
SEM	scanning electron microscope, Rasterelektronenmikroskop
STABW	Standardabweichung
TEM	Transelectronenmikroskopie
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1. Das Element Eisen

Eisen (Fe) ist ein Element der Platin-Eisengruppe und trägt die Ordnungszahl 26. Es kann Oxidationsstufen von -2 bis +6 einnehmen, wobei Fe^{3+} die am häufigsten vertretene Oxidationsstufe darstellt. Gewichtsmäßig ist es das zweithäufigste Element der Erde, zählt man die Atmosphäre nicht mit, sogar das Häufigste. In der Erdkruste kommt Eisen auf Grund seiner Reaktionsfreudigkeit mit Sauerstoff und Wasser nur selten in elementarer Form vor, sondern hauptsächlich als Erz. Von industrieller Bedeutung sind vor allem die Erze Magnetit (Fe_3O_4), Hämatit (Fe_2O_3), Pyrrhotin (FeS) und Siderit (FeCO_3)(1). In Biologie und Technik ist Eisen ubiquitär vertreten. Es ist gewichtsmäßig das industriell am häufigsten verwendete Metall und kommt vor allem als Hauptbestandteil von Stahl und Gusseisen zum Einsatz. Für die meisten Lebewesen ist Eisen überlebensnotwendig. Durch sein Redoxpotential von 1000 bis -500 mV ist es in der Lage, sowohl als Elektronenakzeptor als auch -donator zu fungieren. Daher ist Eisen Bestandteil vieler biochemischer Prozesse in denen es zu einer Elektronenübertragung kommt. Eisenenthaltende Proteine sind unter anderem an der Photosynthese, der Atmungskette, dem Sauerstofftransport im Blut, aber auch an Abwehrreaktionen des Körpers beteiligt.

1.2. Physiologie des Eisenstoffwechsels

Der menschliche Körper enthält durchschnittlich 3-4 g Eisen. Ein Großteil dieser Menge ist in ständiger Nutzung (ca. 2-3 g) und entfällt auf den roten Blutfarbstoff Hämoglobin in Erythrozyten. Mit insgesamt 0,6-0,8 g des Gesamteisenbestandes bilden Leber und Milz den Eisenspeicher des Körpers. Das Eisen befindet sich dabei entweder in Makrophagen (Milz und Leber) oder liegt in Form von Ferritin oder Hämoseridin gebunden in den Hepatozyten der Leber vor. Der restliche Anteil entfällt auf Myoglobin im Muskelgewebe und geringe Eisenmengen in Enzymen. Die Eisenversorgung des Körpers wird über das Blutplasma sichergestellt. Der Transport erfolgt über das Transportprotein *Transferrin(Tf)*, welches mit 3-4 mg Fe^{3+} beladen ist. Die Bindestellen des Transferrins könnten theoretisch bis zu 12 mg Eisen binden. Unter physiologischen Bindungen sind aber nur ca. 30% der Bindestellen gesättigt (2). Transferrin gehört zur Familie der eisenbindenden Glykoproteine und ist ein starker Eisenchelator, der Eisen mit einer hohen Affinität bindet ($K_D = 10^{-23} \text{ M}$) (2, 3). Beim pH-Wert des Blutes (7,4) ist die Affinität am höchsten und

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

lässt bei niedrigeren pH-Werten nach. Dies ermöglicht eine Freisetzung des Eisens im sauren Milieu der intrazellulären Endosome. Die Aufnahme von Transferrin in die Zelle erfolgt über eine rezeptorvermittelte Internalisierung. Alle Körperzellen exprimieren in unterschiedlicher Ausprägung Transferrinrezeptoren (TfR). Die höchste Rezeptordichte findet sich auf den Erythroblasten des Knochenmarkes. Die Rezeptoren sitzen in Zellmembraneinstülpungen, die auf der cytosolischen Seite mit Clathrin überzogen sind, den sogenannten *coated pits* (Stachelsaumgruben). Nach Binden des Transferrins an den TfR (Abbildung 1) und lokale Assoziation umschließen die Vertiefungen den TfR-Komplex und bilden Clathrin-überzogene Vesikel, die endocytotiert werden. Im Zellinneren wird der Clathrinmantel der Vesikel abgestreift und die Vesikel fusionieren mit den Endosomen. Durch das saure Milieu dissoziiert der Transferrinrezeptorkomplex und Eisen wird aus Transferrin freigesetzt. Das Eisen wird nun über einen protonengekoppelten Rezeptor (DMT1, siehe Abschnitt DMT1) in das Zellinnere transportiert und steht zur Speicherung oder direkten Nutzung bereit. Der TfR wird recycelt und durch Vesikel zurück an die Oberfläche der Zellmembran transportiert. Insgesamt werden 20-25 mg Eisen pro Tag über das Transferrinsystem in das Zielgewebe transportiert, dies entspricht einem sechs- bis achtfachen Austausch des Transferrineisens. Dem gegenüber steht

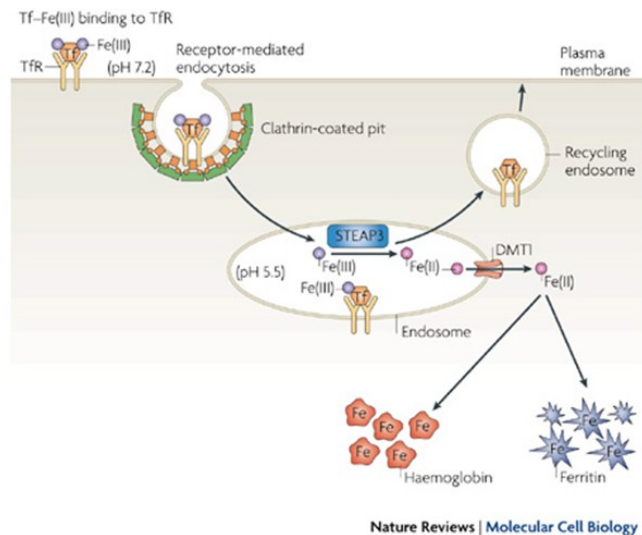


Abbildung 1: Zyklus des Transferrinrezeptorkomplexes. Erläuterungen siehe Text. Übernommen aus (4).

eine tägliche Eisenaufnahme von nur 2 mg und ein Verlust von ebenfalls 2 mg Eisen bei Frauen und 1 mg bei Männern. Die Eisenverluste resultieren hauptsächlich aus einer Abschuppung von Epithelzellen und der weiblichen Menstruationsblutung. Eine Gegenüberstellung von täglicher Eisenzufuhr, Umsetzung und dem Verlust verdeutlicht, dass die täglich zugeführte Eisenmenge lediglich sicherstellt, dass die Verluste ausgeglichen werden. Hauptquelle des täglichen Eisenbedarfs sind Makrophagen, welche abgestorbene Erythrozyten phagozytieren und das enthaltende Eisen anschließend über Milz und Leber zur Wiederverwendung zur Verfügung stellen. Es gibt keinen bekannten aktiven Transportmechanismus für die Eisenausscheidung (5). Die Eisenhomöostase des Körpers wird da-

her ausschließlich über die intestinale Eisenresorption und die Wiederverwertung makrozytären Eisens gesteuert. Die entscheidenden Schritte der Eisenhomöostase werden im Folgenden zusammengefasst.

1.2.1. Intestinale Eisenresorption

Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung liegt der durchschnittliche tägliche Eisenbedarf eines Erwachsenen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht bei 10-30 mg (6). Auf Grund von Eisenverlusten in Schwangerschaft und Menstruationsblutungen haben Frauen im gebärfähigen Alter einen höheren Bedarf als Männer. Für Frauen im Alter zwischen dem 19 - 51. Lebensjahr wird eine tägliche Zufuhr von 15 mg empfohlen (Schwangerschaft 30 mg, Stillzeit 20 mg), während für gleichaltrige Männer nur 10 mg Eisen empfohlen werden. Ab dem 51. Lebensjahr sind die Empfehlungen mit 10 mg pro Tag für beide Geschlechter wieder gleich hoch. Die Resorption des Eisens erfolgt im Duodenum und oberen Jejunum. Sie wird dabei durch zahlreiche Faktoren negativ beeinflusst, so dass nur 10% des Nahrungseisens resorbiert werden. Nahrungsbestandteile wie etwa Oxalsäure (Gemüse), Gerbstoffe (Tee und Kaffee) oder auch Phytate (Hülsenfrüchte, Nüsse, Getreide) bilden mit Eisen schwerlösliche Komplexe, die nicht mehr für die Resorption zur Verfügung stehen. Aber auch das basische Milieu im Duodenum kann sich unvorteilhaft auf die Aufnahme auswirken, da Eisenionen in Anwesenheit von Hydroxidionen als schwerlösliche Hydroxide ausfallen können. Die Resorption erfolgt in Abhängigkeit der konsumierten Eisenquelle. Tierische Eisenquellen können dabei besser verwertet werden als pflanzliche. In der Ernährung kommen hauptsächlich drei Arten von Eisen vor:

- Dreiwertiges Eisen, konjugiert mit Nahrungsproteinen,
- Hämeisen, welches in Fleisch und Fisch vorkommt und
- Ferritin, aus Hülsenfrüchten.

Den größten Anteil macht dabei Fe^{3+} aus. Untersuchungen haben gezeigt, dass für die drei oben genannten Eisenverbindungen voneinander unabhängig Transportmechanismen existieren (7, 8). Intrazellulär scheinen die Transportmechanismen des Eisens bei allen Resorptionswegen jedoch weitestgehend identisch zu verlaufen. Nach jetzigem Erkenntnisstand wird davon ausgegangen, dass Eisen intrazellulär aus Hämeisen und Nahrungs-

ferritin freigesetzt und dann wie resorbiertes Fe^{2+} entweder als Ferritin zwischengespeichert oder zur basolateralen Seite der Enterozyten transportiert wird (7, 9). Bei der intrazellulären Eisensfreisetzung aus Häm wird die Beteiligung einer Oxidase vermutet (10). Bisher ist es nur gelungen, den Transportmechanismus von Fe^{2+} umfassend zu charakterisieren (siehe Abschnitt DMT1). Für Hämeisen und Ferritin sind die genauen Abläufe unbekannt. Der in der Literatur beschriebene Hämtransporter HCP1 wurde von Laftah et al. zunächst als Protonen-gekoppelter Transporter für Häm und Folate beschrieben (11). Spätere Forschungsergebnisse zeigten jedoch, dass dieser Transporter primär nur für die Folsäureresorption verantwortlich ist und der beschriebene Hämtransport aus einer Mutation des Rezeptors bei Patienten mit Folsäuremangel resultierte (12, 13).

DMT1

Der divalente Metallionentransporter 1 (DMT1) ist ein Protonen-gekoppelter Kationentransporter, der hauptsächlich auf der apikalen Seite von Enterozyten im Duodenum exponiert ist. DMT1 ist nicht auf zweiwertiges Eisen spezialisiert, sondern kann auch weitere zweiwertige Kationen wie etwa Mg^{2+} , Ca^{2+} oder Cd^{2+} transportieren (14). Durch die gleichzeitige Zufuhr anderer zweiwertiger Mineralstoffe kann es zu einer Konkurrenzsituation am Transporter mit herabgesetzter Eisenresorption kommen. Anorganisches Eisen kann nur in zweiwertiger, nicht aber dreiwertiger, gelöster Form vom DMT1 transportiert werden. Die Aktivität des Kationentransporters ist dabei abhängig von der Konzentration von Fe^{2+} und einem ausreichenden Protonenangebot durch ein saures Mikromilieu im Bürstensaum (8). Durch die auf der apikalen Seite vorkommende Eisenreduktase *Dudinales Cytochrom B* (Dcytb) kann jedoch auch Fe^{3+} anteilig nach voriger Reduktion zu Fe^{2+} von DMT1 erfasst werden. Die Aktivität von Dcytb kann durch Ascorbinsäure erhöht werden. Vitamin C ist schon länger dafür bekannt die Resorption von Eisen positiv zu beeinflussen. Versuche mit Dcytb in Insektenzellen zeigten, dass es sich bei Dcytb um ein Di-Häm-Protein handelt, dessen Hämanteil durch Ascorbat reduzierbar ist. Es ist daher anzunehmen, dass Ascorbinsäure der intrazelluläre Elektronendonator des Enzyms ist (15).

Einleitung

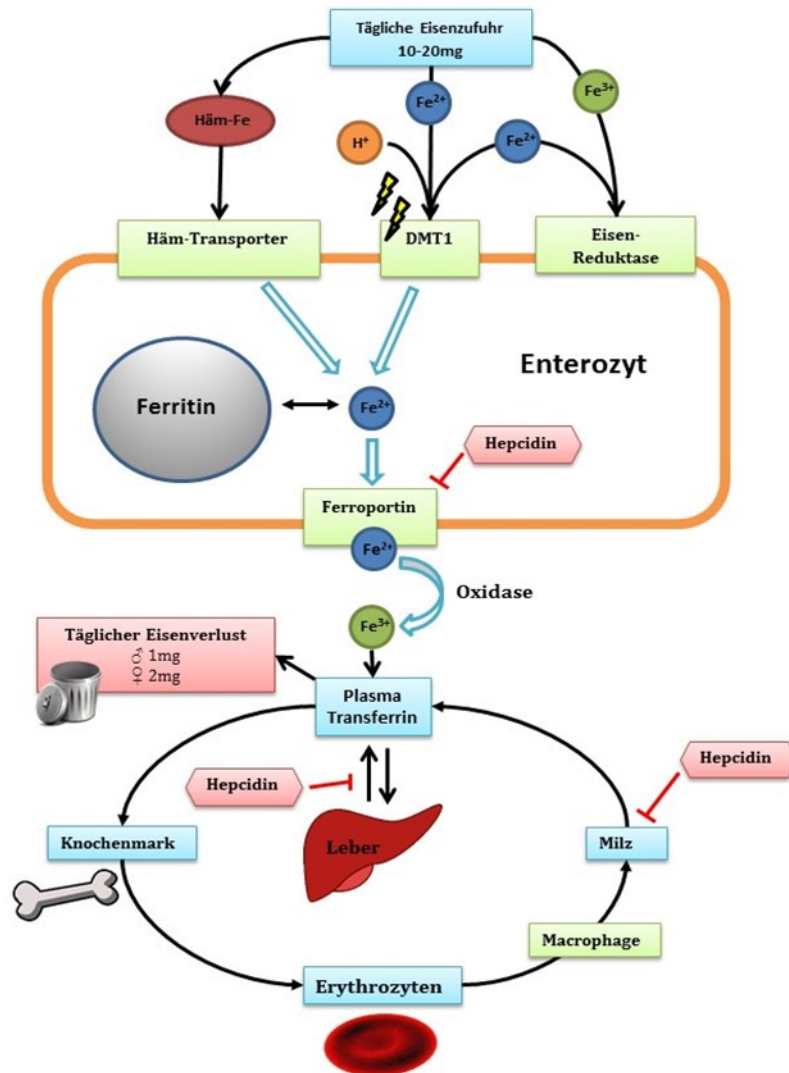


Abbildung 2: Schematische Darstellung des menschlichen Eisenstoffwechsels. Die Resorption von Hämeisen und Eisenionen erfolgt über unterschiedliche Transporter. Hepcidin und sein Rezeptor Ferroportin sind die Hauptakteure in der Eisenhomöostase und steuern den Eisenexport aus den Enterozyten. Zur Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase ist eine effektive orale Resorption von 1-2 mg Eisen pro Tag notwendig.

1.2.2. Endokrine Regulation des Plasma-Eisenspiegels

Zum Erhalt eines konstanten Eisenplasmaspiegels ist eine kontinuierliche Bereitstellung von Eisen aus den Speicherkompartimenten des Körpers notwendig. Die Eisenfreisetzung aus den Zellen in das Plasma wird dabei hauptsächlich von dem Rezeptor Ferroportin und seinem Liganden, dem Peptidhormon Hecpudin gesteuert (siehe Abbildung 2)(17). Ferroportin ist der bisher einzig bekannte Eisenexporter, der Eisen in die Blutbahn abgeben kann und ist damit maßgeblich an der Aufrechterhaltung konstanter Eisenplasmaspiegel beteiligt (18). Ferroportin wird auf der Oberfläche von Enterozyten, Hepatozyten und Makrophagen der Milz und Leber exprimiert. Hecpudin ist ein niedermolekulares Peptid aus 25 Aminosäuren, welches die Eisenausschüttung von Enterozyten, Hepatozyten und Makrophagen hemmt (siehe Abbildung 2)(17, 19). Die Hemmung kommt durch eine Bindung an den Ferroportin-Rezeptor und dessen durch Hecpudin initiierten Abbau zu Stande. Der Name Hecpudin leitet sich aus dem Hauptbildungsort (Leber) und den vermuteten bakteriziden Eigenschaften des Hormons ab. Bisher konnte Hecpudin nur in Wirbeltieren nachgewiesen werden (20). Hecpudin wird von dem Gen Hecpudin Antimicrobial Peptide (HAMP) codiert. Zahlreiche Faktoren nehmen Einfluss auf die Genexpression (siehe Abbildung 3):

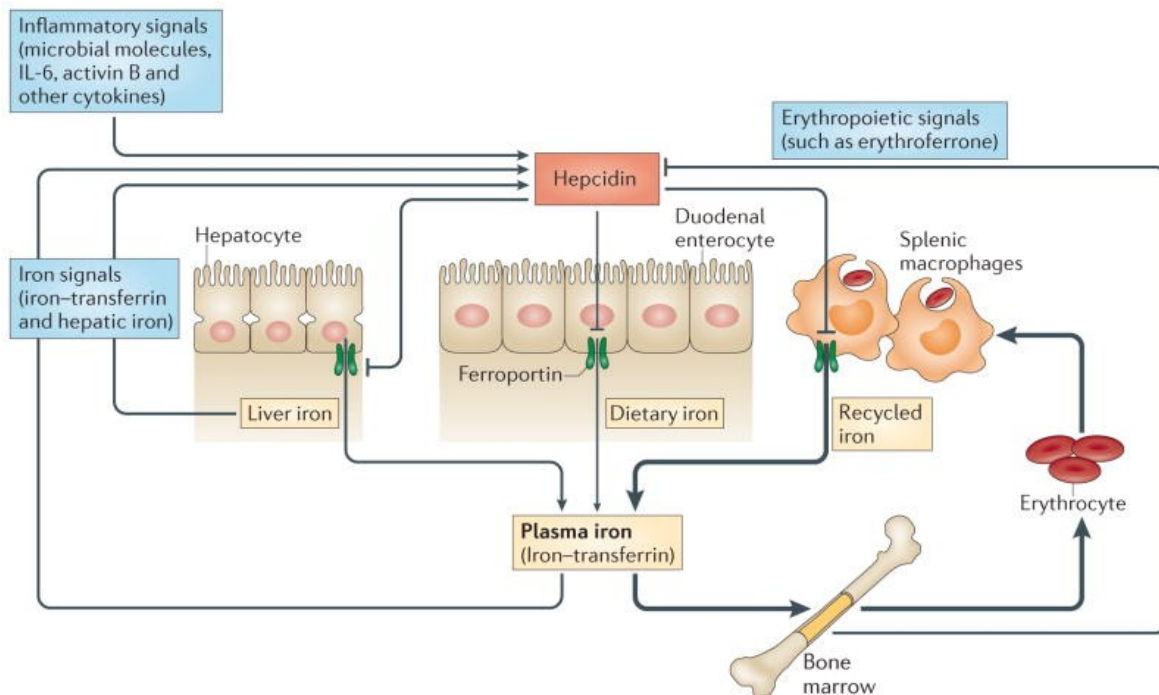


Abbildung 3: Übersicht über die Regulation der Hecpudinexpression. Erläuterungen siehe Text. Entnommen aus (16).

Einleitung

- Hohe Plasmaeisenpiegel induzieren durch negative Rückkopplung eine erhöhte Bildung von Heparin und folglich eine verminderte Eisenfreisetzung.
- Eine gesteigerte Erythropoese hemmt hingegen die Expression von Heparin und erhöht somit die Eisenfreisetzung.
- Entzündungssignale wie bakterielle Moleküle oder anderweitige Zytokine erhöhen die Genexpression.

Letzterem Punkt wird ein Abwehrmechanismus gegen Bakterien zugeschrieben (Nahrungsgebung). Ebenso wie Zellen von Wirbeltieren sind Bakterienzellen auf Eisen angewiesen. Daher herrschte lange die These, eine herabgesetzte Verfügbarkeit von Eisen im Blutplasma hemme die Bakterienteilung und sei somit ein unspezifischer Schutzmechanismus gegen Mikroorganismen. Diese Vermutung konnte bisher nicht belegt werden. Ganz und Nemeth postulierten daher die These, dass eine Senkung des Blutplasmaspiegels vielmehr der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einer Eisenüberladung der Zellen entgegen wirkt (16). Zytokine sind Initiatoren der Akute-Phase-Reaktionen, bei welchen es neben einer Abwehr gegen Bakterien auch zu einer Schädigung von Zellen und Erythrozyten kommt. Bei hohen Blutplasmaspiegeln und damit hoher Sättigungsrate von Transferrin, könne es somit bei schnellem Freisetzen des Eisens aus den geschädigten Zellen zur Bildung von nicht Transferrin-gebundenem Eisen (NTBI = non transferrin bound iron) kommen. NTBI ist mit der Bildung von ROS und damit einhergehenden toxischen Effekten assoziiert (21, 22). Eine durch Entzündung oder Genmutation gesteigerte Expression von Heparin hat eine verminderte Eisenresorption im Darm und eine verminderte zelluläre Eisenfreisetzung zur Konsequenz. Die Enterozyten können zwar weiterhin Eisen aufnehmen, durch eine Blockade von Ferroportin kann dieses jedoch nicht systemisch genutzt werden. Dadurch geht das in den Enterozyten gespeicherte Eisen bei der Desquamation verloren. Dies führt langfristig zur Manifestation einer Eisenmangelanämie (23). Besonders Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD = inflammatory bowel disease) oder chronischen Nierenerkrankungen (CKD = chronic kidney disease) sind hiervon betroffen. Zunehmend wird jedoch auch ein Eisenmangel in adipösen Patienten beobachtet, der vermutlich von Entzündungssignalen des vermehrten Fettgewebes begünstigt wird (24).

1.3. Anämie und deren Behandlung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Anämie als einen Zustand in dem die Anzahl roter Blutkörperchen oder deren Kapazität Sauerstoff zu transportieren nicht mehr ausreicht, um den physiologischen Bedarf zu entsprechen (25). Eisenmangel, welche die weltweit am meisten verbreitete Form der Mangelernährung darstellt, wird von der WHO als Hauptverursacher der Anämie angesehen. Schätzungsweise 33% der Weltbevölkerung sind anämisch (26). Besonders Kinder und Frauen in Entwicklungsländern sind betroffen. Die WHO betitelt die Eisenmangelanämie als weltweit teuerste Erkrankung, da durch hohe Betroffenenzahl und die damit eingehend herab gesetzte Produktivität, die Weltwirtschaft maßgeblich leidet (27). Symptome der Anämie äußern sich in allgemeiner, körperlicher Abgeschlagenheit mit Kopfschmerz, Tachykardie und Belastungsdyspnoe, sowie am Erscheinungsbild von Haut, Schleimhäuten und Haaren. Die Veränderung von Haut und Hautanhangsgebilden treten in Form von trockener, juckender Haut, Mundwinkelrhagaden, Aphthen und brüchigen Nägel mit Neigung zur Rillenbildung in Erscheinung. Ebenso wird Haarausfall beobachtet (28). Bei einigen Patienten wird im Zusammenhang mit der Diagnose Anämie vom Pica-Syndrom berichtet, welches sich im Konsum von nicht zum Verzehr vorgesehener Substanzen wie etwa Erde, Steinen oder Papier äußert (29). Während in Entwicklungsländern vor allem eine Mangelernährung für die Entstehung von Anämien verantwortlich ist, sind in westlichen Ländern Blutungen und Schwangerschaft die Hauptauslöser von Eisenmangelanämien (30). Gemäß der Definition der WHO kommen als Auslöser einer Anämie nicht nur Eisenmangelzustände in Frage, sondern auch andere Faktoren, die sich negativ auf die Bildung roter Blutkörperchen oder den Sauerstofftransport auswirken. Als Beispiele seien hier die perniziöse und die funktionelle Anämie genannt. Bei der perniziösen Anämie liegt ein Mangel an Vitamin B 12 vor, der sich in einer gestörten Zellteilung der Vorläuferzellen der Erythrozyten äußert. Dies resultiert in einer verminderten Anzahl Erythrozyten, ungewöhnlicher Größe und Hämoglobingehaltes, den Megalozyten und dem Vorhandensein von Megaloblasten im Blutbild. Die perniziöse Anämie zählt zu den megaloblastären Anämien, die durch eine Entwicklungs- und Reifestörung der roten Blutkörperchen gekennzeichnet sind. Eine funktionelle Anämie hingegen liegt dann vor, wenn der Körper über genügend Eisenspeicher verfügt, diese jedoch nicht im benötigten Maße mobilisieren kann (31). Bei einer renalen Anämie, die bei nahezu allen Patienten mit akuten oder chronischen Nierenerkrankungen (CKD) zu beobachten ist, kommt es zu einer verminderten Bildung von

Einleitung

Erythropoetin und damit herabgesetzter Erythropoese (32). Als Therapie erhalten die Patienten unter anderem Erythropoetin, was durch den gesteigerten Bedarf an Eisen zu einer funktionellen Anämie führt. Anhand verschiedener Laborparameter können die Ursachen der Anämien festgestellt werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Parameter, die zur Anämiediagnostik herangezogen werden. Je nach Differenzialdiagnose variiert die Behandlung der Anämie und es wird der Einsatz von Eisen, Folsäure, Vitamin B 12 oder auch der Einsatz einer Blutinfusion notwendig. Diese Arbeit behandelt ausschließlich die Therapie mit (parenteralem) Eisen.

Tabelle 1: Übersicht wichtiger Parameter zur Anämiediagnostik

Laborparameter	Aussagekraft	Normbereich	Bemerkung
Serumferritin	Serumkonzentration des Eisentransporters	♂170-330 mg/dL ♀160-350 mg/dL	Erhöht: Mangel an Speichereisen Erniedrigt: Infektion, Eisenüberladung
Transferrinsättigung	Sättigungsgrad des Transporters	18-45%	Erhöht: aplastischer Anämie Erniedrigt: Eisenmangelanämie
Hämoglobin	Gehalt des roten Blutfarbstoffes	12-15 g/dL	Gibt Auskunft über den Eisengehalt
Erythrozyten	Anzahl der roten Blutkörperchen	♂ 4,5-5,9 106/μL ♀ 4,1-5,1 106/μL	Erniedrigt bei Eisenmangel
mittlerer korpuskularer Hämoglobingehalt (MCH)	Beurteilung des Hämoglobingehaltes	28-33 pg	hypochrom: MCH ↓ normochrom: MCH normal hyperchrom: MCH ↑
mittleres korpuskuläres Volumen (MCV)	Beurteilung Erythrozytengröße und Teilungsfähigkeit	83-97 fL	mikrozytär: MCV ↓ normozytär: MCV normal makrozytär: MCV ↑

1.3.1. Orale Eisentherapie

Grundlage der Behandlung von alimentären (durch Nahrung bedingten) Eisenmangelanämien bildet eine Ernährungsberatung in Kombination mit einer oralen Eisensupplementierung. Ziel ist die Normalisierung des Hb-, MCV-, sowie Serumferritinwerts (siehe Normwerte Tabelle 1). Für einen Zeitraum von mindestens drei Monaten werden 2-6 mg Eisen pro kg Körpergewicht empfohlen. Als Mittel der Wahl gilt Eisen(II)-sulfat (33). Neben Eisensulfat sind noch weitere zweiwertige Eisensalze für den therapeutischen Einsatz erhältlich (siehe Tabelle 2). Idealerweise erfolgt die Einnahme des Eisenpräparates auf nüchternen Magen, um den Anteil des resorbierten Eisens zu erhöhen (siehe Abschnitt 1.2.1). Obwohl die orale Eisensubstitution eine einfache und kostengünstige Methode zur Behandlung der Eisenmangelanämie darstellt, wird die Therapieeffektivität durch eine mangelnde Compliance und Einnahmefehler des Patienten negativ beeinflusst (34–36). Orale Eisenpräparate stehen im Zusammenhang mit unerwünschten gastrointestinalen (GI) Arzneimittelwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Obstipation und Diarrhöe, welche die Hauptgründe der mangelnden Therapietreue darstellen. Als Ursache der GI-Beschwerden werden die Bildung freier Sauerstoffradikale und damit einhergehende Entzündungsreaktionen, sowie eine Beeinflussung der Darmflora, vermutet (37–42). Besonders bei Schwangeren scheint eine bestehende Obstipation zusätzlich verschlimmert zu werden (37, 43). Um eine bessere GI-Verträglichkeit zu erreichen, haben einige Hersteller verzögert freisetzende Formulierungen entwickelt. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2015 mit insgesamt 43 ausgewerteten Studien und 6831 erwachsenen Patienten konnte jedoch keine Reduktion der Nebenwirkungen bei verzögert freisetzenden Eisenpräparaten nachweisen (37).

Tabelle 2: Überblick über die in Deutschland zugelassenen Eisensalze zur oralen Eisensupplementierung mit Beispielen und Normdosen (44)

	Präparat	Dosis in mg	Pharmazeutischer Unternehmer
Eisen(II)-sulfat	Dreisafer® Filmtabletten	100	TEVA GmbH, Ulm
	Tardyferon® Depot-Eisen(II)-sulfat	80	PIERRE FABRE PHARMA GmbH, Freiburg
	Eisensulfat Lomapharm	50 oder 100	LOMAPHARM, Rudolf Lohmann GmbH KG, Emmerthal
Eisen(II)-fumarat	Ferrum Hausmann® Retardkapseln	100	Vifor Pharma Deutschland GmbH, München
	Rulofer® N	50	LOMAPHARM, Rudolf Lohmann GmbH KG, Emmerthal
Eisen(II)-gluconat	Eisen Verla® überzogene Tabletten	35	Verla-Pharm Arzneimittel GmbH & Co. KG, Tutzing
	ferro sanol® Soft Sirup	5/mL	Sanol GmbH, Monheim
Eisen(II)-succinat	Ferrlecit® 2 überzogene Tabletten	95,2	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
Eisen(II)-glycin-sulfat-Komplex	ferro sanol® duodenal (mite) Hartkapseln	50 oder 100	Sanol GmbH, Monheim
	ferro sanol® 30 mg/mL Tropfen zum Einnehmen, Lösung	30	Sanol GmbH, Monheim

1.3.2. Parenterale Eisensupplementierung

Obwohl die orale Eisentherapie eine effektive Methode zur Behandlung der Eisenmangelanämie darstellt, ist deren Einsatzgebiet auf Grund mangelhafter Resorption, Verträglichkeit und/oder eines fortgeschrittenen Krankheitsverlaufes oftmals limitiert. In diesen Fällen kann die Gabe parenteraler Eisenpräparate notwendig werden. Indikationen für die parenterale Applikation sind:

- Unverträglichkeit, fehlende Compliance oder fehlendes Ansprechen auf die Therapie mit oralen Eisenpräparaten (45, 46)
- Fortgeschrittene Anämie mit raschem Handlungsbedarf bei chronischen Blutungen oder im Rahmen der Schwangerschaft (43, 47, 48)
- Einsatz von Erythropoetin bei CKD-Patienten oder Chemotherapie (funktionelle Anämien) (49–54)

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

- Gestörte Eisenresorption durch GI-Erkrankungen (IBD) oder Operationen (Roux-en-Y-Magenbypass) (55–57)
- Ersatz von Blutinfusionen bei Patienten, die aus religiösen Gründen Blutprodukte ablehnen (Zeugen Jehovas) (58)
- Anämie bei vorliegenden Herzfehlern (59)
- Kombinationen der oben genannten Punkte.

Die größte Bedeutung kommt dem Einsatz bei CKD-Patienten zu. Diese Patienten entwickeln einerseits eine renale Anämie auf Grund der verminderten Erythropoetinsynthese in der Niere, andererseits wird diese Anämie noch zusätzlich durch die bei fortschreitendem Krankheitsverlauf notwendige Hämodialyse und die damit einhergehenden Blutverluste verschlimmert. Generell ist es notwendig, dass Patienten, die auf eine parenterale Eisengabe angewiesen sind, in kurzer Zeit größere Mengen Eisen erhalten, um ihre Speicher wieder füllen zu können. Eine direkte Injektion größerer Mengen (>12 mg) von löslichen Eisensalzen ist jedoch nicht möglich, da diese zu einer schnellen Sättigung von Transferrin führen und somit für den Körper hochgradig toxisch sind (60). Die heutigen auf dem Markt befindlichen Präparate sind daher technologisch so gestaltet, dass sie im Idealfall kein Eisen direkt an das Plasma abgeben, sondern erst nach Opsonisierung durch Makrophagen Eisen freisetzen. Sie bedienen sich demnach des drug targeting Ansatzes.

Struktur und Metabolismus

Bei den heutigen parenteralen Eisenpräparaten handelt es sich um polynukleäre, kolloidale Systeme aus Eisen(III)-kernen, deren direkte Eisenfreisetzung in der Blutbahn durch eine stabilisierende Kohlenhydrathülle eingedämmt wird (62–65). Bei den Eisenkernen kann es sich sowohl um Eisenoxidhydroxide mit unterschiedlichen Modifikationen des Eisens als auch um Eisenoxide handeln. Die Präparate folgen dabei der allgemeinen Formel: $[yFeOOH]_nL_x$ oder $[Fe_nO_n]_nL_x$

wobei (y) für die Modifikation des Eisenoxidhydroxid-Kerns und (L) für die variable Kohlenhydratkomponente steht. Durch diesen Aufbau werden sie oftmals auch als Eisenkomplexe bezeichnet. Die Komplexstabilität ist dabei anhängig von der Kohlenhydratkomponente und der thermodynamischen Stabilität des Eisenoxidhydroxid-Kerns. Derzeit sind sechs Präparate auf dem deutschen Markt zugelassen (siehe Tabelle 3). Nach intravenöser Gabe werden die Eisen-Nanopartikel (FeNP) von Makrophagen opsonisiert und intrazellulär von den makrozytären Endosomen lysiert (siehe Abbildung 4) (61). Im Falle von Eisendextranen wird zusätzlich eine

Rezeptor-vermittelte Aufnahme vermutet (66). Anschließend wird das freigesetzte Eisen analog der in 1.2.2 beschriebenen Mechanismen in den Makrozyten gespeichert oder über Ferriportin abgegeben. In Abhängigkeit der Präparatestabilität wird jedoch im Blutplasma schon anteilig Eisen aus den Nanopartikeln liberiert oder Teile des Kohlenhydratgerüsts durch α -Amylasen zerstört. Dieses „labil“ gebundene Eisen wird mit vielen unerwünschten Arzneimittelwirkungen parenteraler Eisenformulierungen in Verbindung gebracht (21, 67, 68).

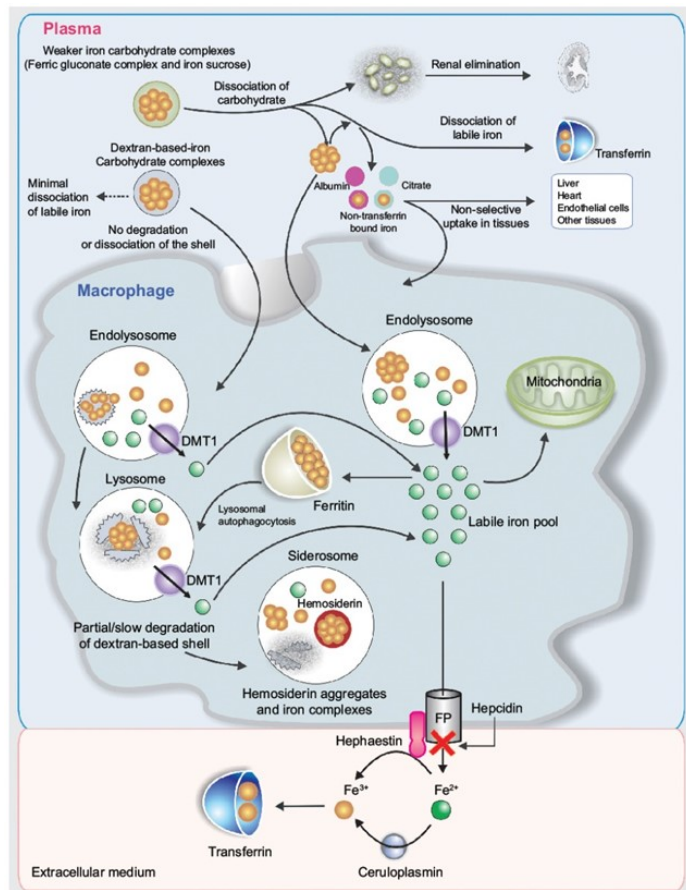


Abbildung 4: Eisenmetabolismus der Makrophagen. Je nach Präparatestabilität werden intakte Komplexe oder Fragmente opsonisiert. Bereits im Plasma dissoziierte Kohlenhydrate werden renal eliminiert. Labil gebundenes Eisen kann bis zu einem gewissen Grad von Transferrin gebunden werden. Entnommen aus (61).

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Tabelle 3: Überblick der derzeit in Deutschland zur parenteralen Therapie von Eisenmangelzuständen zugelassenen Arzneimittel, Stand 03/2017 (44)

Bezeichnung des Eisenkomplexes	Abkürzung	Präparate	Sonstige Bestandteile	Pharmazeutischer Unternehmer
Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex	FeD_EU	CosmoFer® 50 mg/ml Injektionslösung und Infusionslösung	Natriumhydroxid, Salzsäure, konzentriert, Wasser, für Injektionszwecke	MEDICE Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG, Iserlohn
Eisencarboxymaltose	FeCM	FERINJECT® 50 mg Eisen/ml Injektions- und Infusionslösung	Wasser, für Injektionszwecke, Natriumhydroxid, Salzsäure	Vifor Pharma Deutschland GmbH, München
Eisen(III)-hydroxid-Sucrose-Komplex	FeS	Venofer® Injektionslösung 100 mg Fe	Wasser f. Injektionszwecke, Natriumhydroxid	Vifor Pharma Deutschland GmbH, München
	FeS_G	FerMed® 20 mg/ml Injektionslösung/Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung	Natriumhydroxid, Wasser, für Injektionszwecke	MEDICE Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG, Iserlohn
Eisen(III)-natrium-gluconat-Komplex	FeG	Ferrlecit® 40 mg/- 62,5 mg Injektionslösung bzw. Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung	Benzylalkohol 28,8 mg/45 mg Natriumcarbonat, Sucrose, Wasser, für Injektionszwecke, Stickstoff	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
Eisen(III)-Deriso-maltose	FeIM	MonoFer® 100 mg/ml Lösung zur Injektion und Infusion	Wasser, für Injektionszwecke, Natriumhydroxid Salzsäure	MEDICE Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG, Iserlohn

1.3.3. Risiken der parenteralen Eisentherapie

Obwohl die Therapie mit parenteralen Eisenkomplexen als sicher angesehen werden kann, bergen die Präparate einige Risiken in Bezug auf akute und chronische Nebenwirkungen. Chronische Nebenwirkungen sind besonders bei Patienten mit langfristiger Gabe, wie etwa im Falle von CKD und IBD, von Bedeutung und sollten bei der Auswahl der Medikation berücksichtigt werden. Zu den akuten Nebenwirkungen zählen Symptome wie GI-Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, abdominale Schmerzen, Diarrhö), Rötungen (Flush) und Hitzegefühl (69–73). Diese Symptome gleichen den körperlichen Reaktionen einer Eisenvergiftung (74).

Anaphylaxie

Wie bei jeder parenteralen Medikamentengabe, kann es auch bei allen parenteralen Eisenkomplexen zu Überempfindlichkeitsreaktionen kommen. Insbesondere das Auftreten eines anaphylaktischen Schocks ist ein oft befürchtetes Szenario, welches sich in einem restriktiven Einsatz parenteraler Sublimierung äußert. Nicht alle Eisenpräparate werden mit dem gleichen allergischen Potential assoziiert. Besonders Eisendextranen wird ein höheres Risiko für Anaphylaxie zugeschrieben. Dies ist besonders auf die ersten auf dem Markt befindlichen hochmolekularen Eisendextrane zurückzuführen, die mittlerweile nicht mehr verkehrsfähig sind und vom Weltmarkt verschwanden (62). Wang et al. untersuchten in einer retrospektiven Kohortenstudie im Zeitraum von Januar 2003 bis Dezember 2013 das Auftreten eines anaphylaktischen Schocks bei Erstgabe parenteraler Eisenkomplexe bei nichtdialysepflichtigen Patienten. Untersucht wurden Eisengluconat, hoch- und niedermolekulares Eisendextran, Eisensucrose und ab 2010 auch Eisen-Polyglucose-Sorbitol-Carboxymethylether. Die Daten von insgesamt 688.183 Patienten des amerikanischen „US fee-for-service Medicare“ Programms wurden ausgewertet. In 274 Fällen kam es zu einer Überempfindlichkeitsreaktion. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass das Risiko einer anaphylaktischen Reaktion bei Erstkontakt für Eisendextrane bei 68 pro 100.000 Patienten liegt (95% CI, 57.8-78.7 pro 100.000). Das Anaphylaxie-Risiko aller anderen Präparate lag bei 24 pro 100.000 Patienten (95% CI, 20.0-29.5 pro 100.000) (75). Das Studiendesign weist jedoch einige Mängel auf. So konnte beispielsweise nicht zwischen hoch- und niedermolekularem Eisendextran differenziert werden und durch den Ausschluss von Dialysepatienten wurde das größte Patientenkollektiv von Eisensucrose nicht berücksichtigt (62). Hochmolekulare Dextrane zeigen in anderen Studien jedoch ein

höheres Risiko für immunologische Reaktionen (76–78). Die Studie von Wang et al. ist daher nur bedingt geeignet das Risiko von niedermolekularem Eisendextran zu beurteilen.

Eisenüberladung und das Risiko zur Entstehung von ROS

Die parenterale Gabe von Eisen ist eine potentielle Quelle für oxidativen Stress (68, 80–82). Eine frühzeitige Freisetzung von Eisen aus den Komplexen kann zu einer Übersättigung des Tf-Transporters und der Bildung von NTBI führen(83). NTBI wiederum steht im Zusammenhang mit der Bildung von ROS, da freies Eisen über die Fenton-Reaktion zur Ausbildung von Hydroxyl-Radikalen führt. Die Reaktivität von Hydroxyl-Radikalen ist enorm hoch. Ihre Halbwertszeit bei Körpertemperatur beträgt gerade einmal 10^{-9} Sekunden (84). ROS schädigen Zellen und erhöhen möglicherweise das Risiko von Arteriosklerose (85). Untersuchungen von Zager et al. sehen zudem einen Zusammenhang zwischen oxidativen Stress und der Schädigung von tubulären Gewebe (81). Pai et al. untersuchten in einer prospektiven, cross-over Studie die Auswirkungen der Gabe von Eisendextran, -saccharat und -gluconat auf die Transferrinsättigung, den Gehalt von NTBI und die Kon-

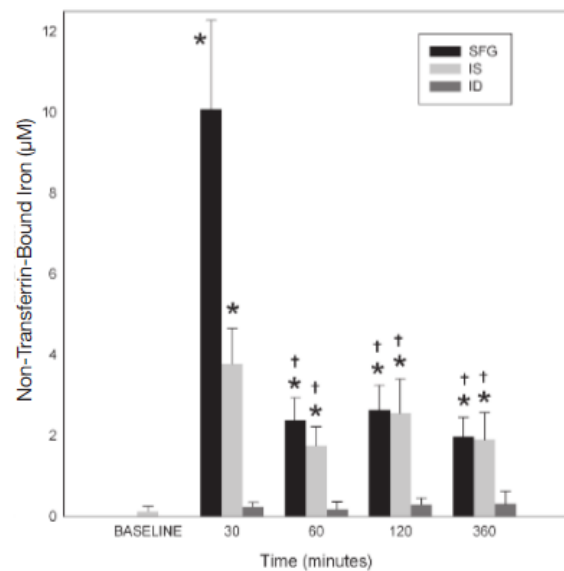


Abbildung 5: Zeitabhängige Konzentrationen von NTBI nach Verabreichung von parenteralen Eisenpräparaten. Eisengluconat führt nach 30 Minuten zu stark erhöhten NTBI-Konzentrationen. Entnommen aus (79).

zentration von Biomakern für oxidativen Stress. 14 ambulante, dialysepflichtige Patienten erhielten mit zweiwöchiger Auswaschphase zwischen den Behandlungen jeweils 100 mg der oben genannten Präparate. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, das Eisengluconat und -saccharat zu einer höheren Konzentration von NTBI im Blut führen als Eisendextran. Jedoch konnte nur bei Eisengluconat eine direkte negative Auswirkung auf den Körper in Form einer erhöhten Lipidoxidation nachgewiesen werden (79). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Eisengluconat 30 Minuten nach Applikation die mit Abstand höchsten NTBI-Konzentrationen verursachte (10mal höher als Eisendextran)

Einleitung

(siehe Abbildung 5). Diese Studie zeigte jedoch, dass alle getesteten Produkte in unterschiedlicher Ausprägung zu oxidativen Stress führen. Die Langzeitfolgen der Gabe können anhand dieser Studie nicht abgeschätzt werden.

Hypophosphatämie

Das Phänomen der Hypophosphatämie wurde gehäuft bei der Therapie mit Eisencarboxymaltose (FeCM), in selteneren Fällen aber auch bei Eisensucrose beobachtet (86–88). In einer prospektiven Studie von Prats et al. wurden insgesamt 47 nicht-Dialysepflichtige CKD Patienten mit einer Einmaldosis von 1000 mg Eisencarboxymaltose behandelt und deren Mineralhaushalt nach drei und zwölf Wochen mit dem Zustand vor Behandlungsbeginn verglichen. Nach drei Wochen wurde bei 35 Patienten eine Hypophosphatämie nachgewiesen, die auch nach zwölf Wochen fortbestand. Bei allen Patienten wurde eine Reduktion von *Fibroblast Growth Factor 23*, einem Hormon, welches die renale Phosphatreabsorption hemmt, festgestellt (89).

1.4. Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Teile dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht:

- Schnorr J., Langguth P. Characterisation of non-biological complex drugs. Hosp Pharm Europe 2016; Educational Handbook on Non-biological Complex Drugs: 10-13.

Auf den folgenden Seiten werden, mit freundlicher Erlaubnis des Cogora Verlages, Teile des Artikels wieder aufgefasst und weiter vertieft. Abbildungen und Tabellen aus dem Artikel wurden in das Deutsche übersetzt und erweitert.

1.4.1. Geschichte parenteraler Eisenkomplexe

Parenterale Eisenkomplexe kommen bereits seit den 1930er Jahren zum klinischen Einsatz (90). Zu Beginn handelte es sich dabei noch um einfache Eisensalze, deren Dosis durch die Toxizität von löslichem

Tabelle 4: Toxizität von parenteralem Eisen nach Geisser et al. (60)

	Eisenverbindung	LD ₅₀ bei weißen Mäusen, i.v.-Gabe [mg Fe / kg]
Salz	Eisensulfat	11
	Eisenchlorid	18,5
Mono- und Oligokomplexe	Eisen-EDTA	40-50
	Amoniumeisencitrat	16,5
	Eisendextran	>2500
	Eisengluconat	>200

Eisen stark eingeschränkt war (vgl. Tabelle 4). Anwenderberichte aus dieser Zeit berichten vom Einsatz von Ammoniumeisen(III)-citrat zur subkutanen oder intramuskulären Injektion und Dosen von 8-32 mg (91). Bei diesen niedrigen Dosen kam es bereits zu Nebenwirkung wie Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen an der Einstichstelle und einem Wärmegefühl im ganzen Körper. Im Laufe der Zeit entwickelten sich die Komplexe immer weiter und erlaubten höhere Injektionsmengen bei weniger Nebenwirkungen. Zunächst wurden Eisenhydroxide in der Therapie eingeführt und bereits ab Ende der 1940er Jahre kam das Konzept auf, Eisenhydroxide mit Saccharose zu Polykomplexen zu komplexieren (92, 93). Dieses Konzept der Polykomplexe ist noch immer die Grundlage moderner Eisentherapie. Ein Blick auf die LD₅₀-Werte unterschiedlicher Eisensalze bei weißen Mäusen verdeutlicht dabei, wie effektiv sich die Toxizität durch Komplexierung senken lässt (60). Bei dem anfänglich in der Eisentherapie eingesetztem Ammoniumeisen(III)-citrat liegt der LD₅₀-Wert bei gerade einmal 16,5 mg Fe/kg während Eisendextran mit einem LD₅₀-Wert von

Einleitung

über 2500 mg Fe/kg eine 150fach geringere Letalität aufweist. In der heutigen Form bestehen alle parenteralen Eisenkomplexe aus nanopartikulärem Eisenoxidhydroxid (FeOOH) und einer variablen Kohlenhydratkomponente wie etwa Glucose, Saccharose oder Dextran. Ein Ansatz die heutigen Präparate zu klassifizieren richtet sich nach deren erstmaligen Einführungsdatum (94). Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Einführung parenteraler Eisenformulierungen auf dem amerikanischen und europäischen Markt. Eisendextrane werden demnach der 1. Generation zugerechnet, Eisengluconat und Eisensucrose der 2. Generation und alle Komplexe anderer Kohlenhydratkomponente mit Markteinführung ab 2007 der 3. Generation.

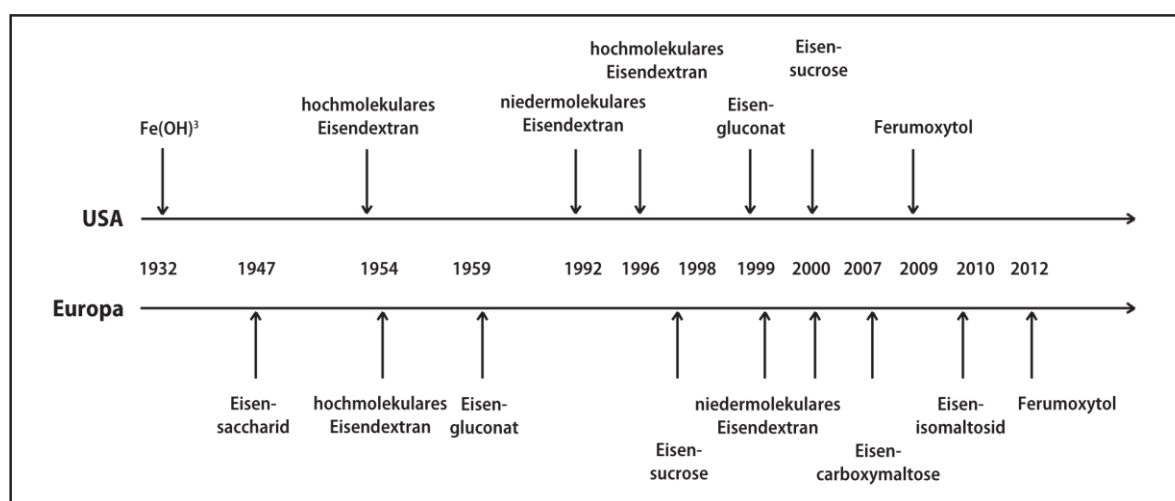


Abbildung 6: Überblick über die Einführung der therapeutisch genutzten parenteralen Eisenformulierungen auf dem europäischen und amerikanischen Markt. Die Therapieeinführung der Eisendextrane stellt den Beginn der modernen Eisentherapie dar. In den 1990ern kam mit Eisengluconat und Eisensucrose eine neue Generation von Eisenkomplexen hinzu. Die Markteinführung von Eisencarboxymaltose markiert den Beginn der 3. Generation der bisherigen Therapieoptionen. Abbildung entnommen aus (94)

Obwohl alle kommerziell erhältlichen parenteralen Eisenpräparate auf den ersten Blick eine sehr ähnliche Struktur aufweisen, zeigen sie klare Unterschiede in klinischen (50, 95) und nicht-klinischen Untersuchungen (96–99). Trotz kontinuierlicher Verbesserungen haben auch die heutigen Präparate nach wie vor Nebenwirkungen (siehe Kapitel 1.3.3). Durch Initiative der französischen Arzneimittelagentur ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) wurde auf Grundlage der EU-Richtlinie 2001/83/EC vom Ausschuss für Humanarzneimittel CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) eine Neubewertung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses von parenteralen Eisenpräparaten durchgeführt (100). Untersucht wurden sämtliche in der gesamten EU zugelassenen Eisenkomplexe (FeD_EU, FeCM, FeS, FeS_G, FeG und FeIM). Die Neubewertung wurde am 27.06.2013 abgeschlossen. Die Untersuchungen kamen zu dem

Ergebnis, dass **alle** Präparate ein geringes Risiko für Überempfindlichkeitsreaktionen mit potentiell tödlichem Ausgang bergen. Als Konsequenz wurden vom CHMP neue Vorsichtsmaßnahmen bei der Applikation, wie etwa ein 30-minütiges Überwachen des Patienten nach Injektion und eine engere Indikationsstellung, festgelegt. Schwangerschaft und ein bekanntes Allergierisiko seien relative Kontraindikationen, die einer sorgsamem Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnis bedürfen. Als absolute Kontraindikation werden bereits aufgetretene Überempfindlichkeitsreaktionen bei der Gabe von anderen parenteralen Eisenprodukten genannt. Generell wird das Nutzen-Risiko-Verhältnis aber weiterhin als positiv bewertet. Seit Januar 2014 stehen sämtliche parenteralen Eisenkomplexe auf der Liste für Arzneimittel mit zusätzlicher Überwachung (101). Diese nachträgliche Überwachung nach Zulassung soll gemäß der Definition des Artikels 1 (15) der EU-Richtlinie 2001/83/EC dafür sorgen, Risiken eines Arzneimittels zu identifizieren, charakterisieren oder quantifizieren, das Sicherheitsprofil des Arzneimittels zu bestätigen oder die Effektivität eines Risikomanagements zu überprüfen (102). Dieser Schritt verdeutlicht, dass trotz jahrelanger Erfahrung in der parenteralen Eisensupplementierung immer noch viele Fragen offen sind.

1.4.2. Non-biological complex drugs und die Herausforderungen bei der Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Durch ihren komplexen Aufbau ist es bisher nicht möglich, parenterale Eisenkomplexe vollständig physikochemisch zu charakterisieren (103). Damit unterscheiden sie sich von den meisten chemischen Arzneistoffen (small molecular drugs), deren Struktur gut erforscht ist. Parenterale Eisenkomplexe zeigen gewisse strukturelle Analogien zu *Biologics*, was dazu geführt hat, dass einige Autoren sie den non-biological drugs (NBCDs) zuordnen (104). Unter dem noch jungen Begriff NBCD versteht man eine Gruppe von synthetischen Arzneistoffen, mit ähnlichem strukturellen Aufbau und Herstellprozess. Zu ihren Vertretern gehören unter anderem wirkstoffbeladene Liposomen, parenterale Eisenkomplexe und Polypeptide wie der Arzneistoff Glatiramacetat (Copaxone®). Diese Beispiele zeigen, dass sich diese Gruppensystematik nicht auf ähnliche pharmakologische Eigenschaften, sondern allein auf strukturelle Gemeinsamkeiten stützt. NBCDs werden nach Crommelin et al. über vier Hauptcharakteristika definiert (105):

1. Sie bestehen aus einer Vielzahl engverbundener Strukturen.
2. Der gesamte Komplex ist für die pharmakologische Wirkung verantwortlich.

3. Ihre pharmakologische Aktivität kann nicht allein durch physikochemische Untersuchungen bestimmt werden.
4. Ein engmaschig kontrollierter Herstellungsprozess ist entscheidend für ein reproduzierbares Produkt.

Durch diese Charakteristika stehen NBCDs, und somit auch parenterale Eisenkomplexe, systematisch zwischen den Biologicals und klassischen, synthetischen Arzneistoffen, deren Strukturaufklärung vollständig möglich ist. Einerseits werden sie im Gegensatz zu Biologicals auf rein synthetischem Wege und nicht etwa durch Hefen oder Bakterien synthetisiert. Andererseits ist der Herstellungsprozess bei NBCDs ähnlich komplex wie der von Biologicals und kleine Abweichungen im Herstellungsprozess können zu einem völlig veränderten Produkt führen. Ebenso können NBCDs wie Biologicals nicht vollständig physikochemisch charakterisiert werden. Für ihre Charakterisierung bedarf es einer Vielzahl von Untersuchungsmethoden. Neben physikochemischen Untersuchungen sind zusätzliche *In-vitro*- und *In-vivo*-Charakterisierungen, insbesondere im Hinblick auf die Gewebeverteilung, notwendig (105). Die Wichtigkeit von letzterem Punkt spiegelt sich in einer Erfahrung mit generischen Eisenprodukten aus Deutschland wieder: Im Jahr 2009 wurde vom Bundesinstitut für Medizinprodukte und Arzneimittel (BfArM) Fermed® (Eisensaccharat) als Generikum zu Venofer® ohne weitere Gewebeverteilungsstudien zugelassen (106). Im selben Jahr tauchten jedoch bereits Berichte auf, die die therapeutische Äquivalenz beider Produkte in Frage stellten (107, 108). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Notwendigkeit umfassender *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen um ein besseres Verständnis über die komplexe Struktur von parenteralen Eisenkomplexen zu erlangen. Auch seitens der Behörde wurde kurze später Zeit erkannt, dass zusätzliche Tests für die Zulassung von Nachfolgeprodukten notwendig sind. 2011 veröffentlichte die Europäische Zulassungsbehörde (EMA) ein erstes *reflection paper* mit Anforderungen für den Vergleich von generischen Eisennanopartikeln mit dem Referenzpräparat. In diesem Dokument wurde erstmals nach Gewebeverteilungsstudien verlangt (109). 2015 folgte ein zweites, deutlich erweitertes Dokument, das nun eine Kombination aus physikochemischen, *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien zum Vergleich parenteraler Eisenkomplexe fordert (65). Es ist zu erwarten, dass zur Zulassung von NBCD-Nachfolgeprodukten zukünftig ähnliche Richtlinien wie bei der Zulassung von Biosimilars gelten werden.

1.4.3. Charakterisierungsstrategien

Für NBCDs steht keine universell einsetzbare Charakterisierungsstrategie zur Verfügung, sondern für jedes Produkt müssen geeignete Methoden gewählt werden, die Aussagen über die Verträglichkeit und Wirkung erlauben. Zum Vergleich und zur Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe bietet das EMA reflection paper eine breite Übersicht über qualitätsrelevante Parameter, sowie notwendige *In-vivo*- und *In-vitro*-Untersuchungen (65). Die EMA nennt hier jedoch oftmals nur notwendige Parameter, ohne vorgeschriebene Analysemethoden. Es liegt also im Ermessen des Experimentators geeignete Methoden auszuwählen und zu kombinieren. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über bereits in der Literatur beschriebene Charakterisierungsansätze gegeben. Das Augenmerk liegt hierbei auf den Vorgaben der EMA und physikochemischen Untersuchungsmethoden. Einige dieser Verfahren (mit * gekennzeichnet) werden im Methodenteil dieser Arbeit ausführlicher behandelt.

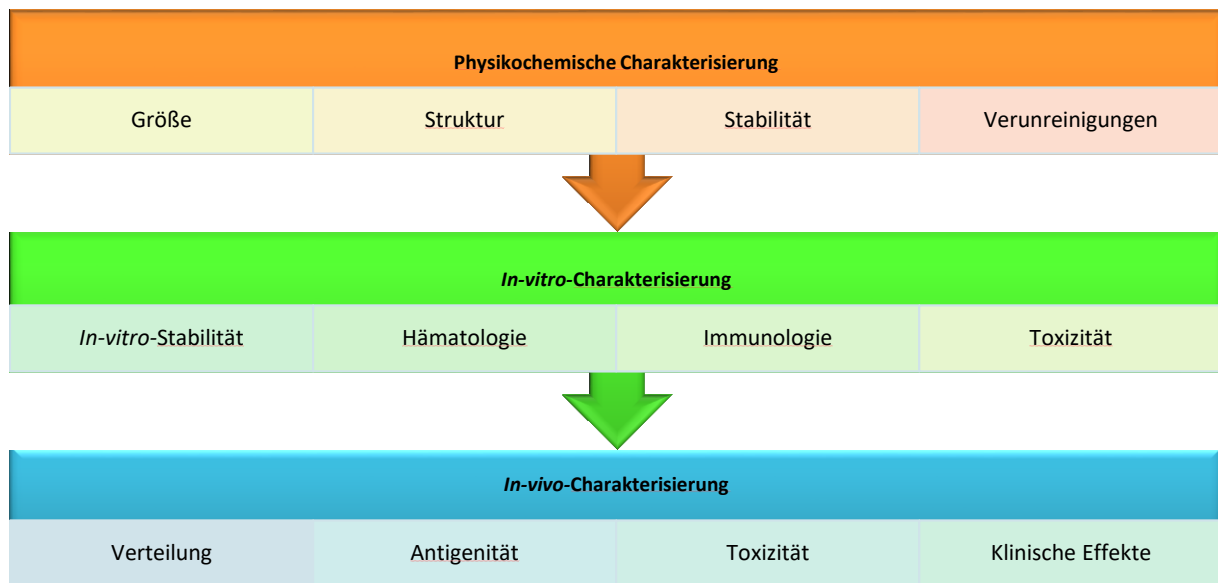


Abbildung 7: Notwendige Charakterisierungsschritte bei der Untersuchung von non-biological complex drugs

1.4.3.1. Physikochemische Charakterisierung

Obwohl es nicht möglich ist Fe-NBCDs vollständig durch physikochemische Untersuchungen zu charakterisieren, liefern diese Methoden wertvolle Aussagen über die Qualität der Produkte und erlauben teilweise Vorhersagen über das *In-vivo*-Verhalten. Physikochemische Methoden liefern Informationen über Größe, Reinheit, Molekulargewicht und Zusammensetzung der Komplexe. Sie sind damit essentiell für die Qualitätskontrolle und Reproduzierbarkeit einzelner Chargen. Oftmals müssen jedoch mehrere Methoden kombiniert werden um verlässliche Ergebnisse zu erhalten.

Tabelle 5: Auswahl eingesetzter physikochemischer Methoden zur Strukturanalyse parenteraler Eisenkomplexe und deren Literaturfundstelle

	Parameter	Analysemethode	Referenzen
Größe und Gewicht	Partikel	DLS	(97)
		AFM	(64, 110)
	Eisenkern	(kryo-)TEM	(64, 98)
		XRPD	(98, 111)
		Mößbauer-Spektroskopie	(99, 111)
Molekulargewicht	GPC	(97, 112, 113)	
Struktur	Morphologie des Kerns	TEM	(98)
	Polymorphie des Eisenkerns	Mößbauer-Spektroskopie	(111)
		XRPD	(98, 99, 111, 113, 114)
	Ladung	Zeta Potential	(97, 115)
	Struktur und Zusammensetzung der Kohlenhydratmatrix	IR	(113, 116)
UV-VIS		(113, 114)	
Reinheit & Stabilität	Abbau-Kinetik	Saure Hydrolyse von Fe (III)	(97)
	Labiles Eisen	Ferrozin® assay	(98)
	Verunreinigungen mit Fe(II)	Mößbauer-Spektroskopie	(97)
		Polarographie	(99, 117)
		Komplexierung mit Ferrozin	(118)

Größe, Morphologie und Molekulargewicht

In Hinblick auf den Administrationsweg parenteraler Eisenpräparate ist die Größe der Komplexe eine wichtige Kenngröße, da sie einen direkten Einfluss auf Gewebeverteilung und Ausscheidung hat (119–121). Ferner ist die Partikelgröße durch ein potentielles Embolie-Risiko limitiert. Folglich werden für parenterale Zubereitung Partikelgrößen von $<1\mu\text{m}$ angestrebt. Gebräuchliche Methoden zur Größenbestimmung sind die *dynamische Lichtstreuung** (DLS) oder mikroskopische Methoden wie die (*kryo-Transelectronenmikroskopie** (TEM), die *Rasterelektronenmikroskopie* (SEM) oder die *Rasterkraftmikroskopie* (AFM). Diese Methoden basieren auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien und unterscheiden sich daher in ihrem Informationsgehalt. Eine Kombination ist daher sinnvoll. Per DLS wird der hydrodynamische Durchmesser der Partikel aus der Diffusion in Lösung bestimmt, während mikroskopische Methoden es erlauben den geometrischen Durchmesser zu ermitteln und Feinstrukturen zu vermessen. Ein Vorteil mikroskopischer Methoden ist, dass diese im Gegensatz zur DLS Untersuchungen zur Form und Morphologie der Präparate ermöglichen. Mit der Transelectronenmikroskopie kann die Größe der Eisenkerne bestimmt werden (97). Zur reinen Größenbestimmung sind die Möglichkeiten mikroskopischer Methoden allein jedoch limitiert, da auf Grund der fehlenden Automatisierungsmöglichkeiten und dem damit verbundenen enormen Zeitaufwand nur stichprobenhaft Partikelgrößen ermittelt werden können. Die DLS ermöglicht jedoch die Größenbestimmung großer Partikelmengen und die Ermittlung dessen Polydispersitätsindex (PDI). Die *Röntgenpulverdiffraktometrie** (XRPD) und *Mößbauer-Spektroskopie** wurden von einigen Arbeitsgruppen ebenfalls zur Größenbestimmung von Eisenkernen genutzt (97, 99, 122). Neben der Partikelgröße ist auch das Molekulargewicht der Komplexe von Bedeutung für die Qualität. So lassen sich beispielsweise Fragmente von Abbauprodukten und Verunreinigungen detektieren. Die United States Pharmacopeia (USP) beschreibt in ihrer Monographie zu Eisensucrose eine Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes mit Hilfe der *Gel-Permeations-Chromatographie* (GPC)(123). Die GPC ist eine Standardmethode zur Ermittlung der Molmassenverteilung, die sich dem Größenausschluss-Prinzip bedient. In Abhängigkeit des hydrodynamischen Volumens verbleiben die Moleküle unterschiedlich lange in den porösen Polymeren der stationären Phase. Alternativ wäre auch ein Einsatz der Feld-Fluss-Fraktionierung denkbar, die zur Charakterisierung von Nanopartikeln genutzt wird (65, 124, 125).

Struktur und Stabilität des Komplexes

Eisenkomplexe bestehen nach bisherigen Vorstellungen aus einem Eisenkern und einer schützenden Kohlenhydrathülle. Die Kohlenhydrathülle kann dabei gemäß der Definition von NBCDs nicht als Trägersubstanz oder Hilfsstoff verstanden werden, sondern ist maßgeblich für die Verteilung der Komplexe, deren Abbau und letztlich auch das jeweilige Nebenwirkungsprofil mitverantwortlich (siehe auch 1.3.3). Die Stabilität der Hülle und des Kernes bestimmen zusammen das Freisetzungsprofil des Komplexes. Das reflection paper der EMA fordert daher eine Strukturuntersuchung beider Komponenten (65). Unterschiedliche spektroskopische Methoden wie beispielsweise *Kernspinresonanz (NMR)*, *Infrarotspektroskopie** (IR), *UV/Vis-Spektroskopie** (UV-Vis) und *Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma(ICP-MS)* sind dazu geeignet, die Zusammensetzung von Eisenkomplexen näher zu bestimmen. Die Eisenkerne des Komplexes können entweder

Tabelle 6: In der Natur vorkommende Eisenoxide- und oxidhydroxide

Mineral	Chemische Formel
Goethit	$\alpha\text{-Fe}^{3+}\text{O(OH)}$
Akaganeit	$\beta\text{-Fe}^{3+}\text{O(OH,Cl)}$
Lepidokrokit	$\gamma\text{-Fe}^{3+}\text{O(OH)}$
Magnetit	Fe_3O_4 , genauer $\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$
Maghemit	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Ferrihydrit	$\text{Fe}^{3+}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2$
Hämatit	Fe_2O_3

als Eisenoxidhydroxide in verschiedenen Modifikationen des Eisens wie Akaganeit, Lepidokrokit oder Ferrihydrit oder Oxide variabler Zusammensetzung vorliegen. Diese Eisenverbindungen, welche auch in der Natur als Minerale der Mineralklasse „Oxide und Hydroxide“ vorkommen, verfügen über unterschiedliche thermodynamische Stabilitäten (126). Eine Identifikation der vorliegenden Minerale ist daher zwingend erforderlich. Tabelle 6 fasst die in Frage kommenden Minerale zusammen. Die Zusammensetzung des Kerns kann mittels XRPD und Mößbauer-Spektroskopie ermittelt werden. Wenn möglich sollten beide Methoden kombiniert werden, da die Ergebnisse nicht immer kohärent sind. Besonders eine Identifizierung der vorliegenden Polymorphie bei Eisenoxidhydroxiden ist herausfordernd. Sollte diese Kombination immer noch keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern, so stellt die ergänzende Messung der elektrischen Suszeptibilität eine geeignete Möglichkeit dar, mittels der magnetischen Eigenschaften der Eisenkerne bei unterschiedlichen Temperaturen, die Modifikation zu identifizieren. Ebenso von Interesse ist der Grad der Kristallinität, da auch er Einfluss auf den Abbau nimmt. XRPD und die *Dynamische Differenzkalorimetrie* sind hierbei geeignete Methoden, um Aussagen über den Kristallisationsgrad zu treffen. Darüber hinaus fordert die EMA eine Untersuchung der

Abbaukinetik und verweist auf die Methode der *sauren Hydrolyse**. Parenterale Eisenkomplexe sind kolloidale Systeme, deren Stabilität unter anderem von der Partikelladung abhängt. Da sich das Nernst Potential parenteraler Eisenkomplexe nicht messen lässt, ist die Ermittlung des Zeta-Potentials eine wichtige, geforderte Kenngröße um die Stabilität des kolloidalen Systems beurteilen zu können (65).

Reinheit

Verunreinigungen können zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, die nicht direkt im Zusammenhang mit den pharmakologischen Eigenschaften der Komplexe stehen. Viele Verunreinigungen und Abbauprodukte lassen sich mit Standardverfahren wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), UV-VIS, IR oder ICP-MS ermitteln. Daneben existieren jedoch Verunreinigungen deren Nachweis eine analytische Herausforderung darstellt. Unter diese Kategorie fällt die Quantifizierung von Fe^{2+} . In parenteralen Eisenkomplexen ist Fe^{2+} eine unerwünschte Verunreinigung, da es in freier Form dazu in der Lage ist, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden (siehe 1.3.3). Die Quelle dieser bedenklichen Verunreinigung in parenteralen Eisenkomplexen findet sich vor allem in der Synthese des Eisenkernes. Die genaue Synthese der einzelnen Komplexe ist nicht bekannt und fällt unter das Firmengeheimnis der pharmazeutischen Unternehmer. Synthesewege aus der Literatur beschreiben jedoch sowohl Fe^{2+} als auch Fe^{3+} als Ausgangssubstanz für die Synthese der Eisen(III)-oxidhydroxide (116, 127–131). Es ist denkbar das Fe^{2+} -Verunreinigungen aus einer unvollständigen Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} oder als Verunreinigung der Synthese-Edukte in das Endprodukt gelangen. Die EMA fordert daher eine Bestimmung des Verhältnisses von Fe^{2+} zu Fe^{3+} (65). Wenige Methoden sind bisher verfügbar um den Fe^{2+} -Gehalt in Anwesenheit von Fe^{3+} zu bestimmen, weil es schwierig ist diese beiden Eisenformen analytisch zu unterscheiden. Erschwerend hinzukommt die leichte Oxidierbarkeit von Fe^{2+} zu Fe^{3+} . Eine Oxidation ist bereits unter Anwesenheit von Luftsauerstoff möglich. Die Mößbauer-Spektroskopie ist eine geeignete Methode zweiwertiges Eisen zu detektieren, wenn auch keine Spurenanalyse möglich ist. Für einige Eisenpräparate wurde zudem über eine polarographische und photometrische Bestimmung mit Ferrozin berichtet (99, 117, 118). Weitere potentielle Verunreinigungen stellen niedermolekulares und labil gebundenes Eisen dar. Beide Formen des Eisens bergen eine Gefahr für die Generierung von ROS, da sie weniger stabil im Komplex gebunden sind und die Komplexe somit bereits vor der Opsonisierung durch Makrophagen Eisen liberieren können. Unter

niedermolekularem oder auch dialysierbarem Eisen wird der Anteil des Eisens verstanden, welcher nicht oder nur lose an Plasmaproteine gebunden ist und sich mittels Dialyse von kolloidalem Eisen abtrennen lässt (132). Als Nachweis von niedermolekularem Eisen eignet sich die Dialyse der Eisenpräparate mit Dialyseschläuchen mit einem Cut-off von 12,000-14,000 Dalton oder ein polarographischer Nachweis nach USP-Monographie für Eisensucrose (97, 123). Labil gebundenes Eisen unterscheidet sich von niedermolekularem Eisen dahingehend, dass es sich nicht durch Dialyse vom Komplex abtrennen lässt, aber unter *In-vivo*-Bedingungen aus den Komplexen dissoziiert.

1.4.3.2. In-vitro-Charakterisierung / nicht klinische Studien

***In-vitro*-Stabilität**

Das EMA reflection paper fordert die Messung von labilem Eisen in einem *In-vitro*-Freisetzungsmo-
dell (65). Dazu soll die Übertragung von Eisen aus den Komplexen an Transferrin in humanem oder tierischem Serum gemessen werden. Für den Nachweis von labil gebundenem Eisen existieren mehrere Testmethoden. Gemeinsamkeit all dieser Methoden ist, dass sie neben labilem auch niedermolekulares Eisen erfassen. Die meisten in der Literatur beschriebenen Methoden weisen labiles Eisen über die Bildung eines Chelatkomplexes mit einem geeigneten Komplexbildner nach. Als Komplexbildner kommen Ferrozin*, Nitritotriessigsäure oder Polyphenole zum Einsatz (97, 99, 133). Ein anderer Ansatz ist der Nachweis von labilem Eisen mit Bleomycin (133). In diesem mehrschnittigen Test wird Eisen indirekt über das Ausmaß der DNA-Schädigung nachgewiesen, die Bleomycin in Anwesenheit von zweiwertigen Eisen verursacht.

Weitere *In-vitro*-Methoden

Parenterale Eisenkomplexe lassen sich auf vielfältige Weise durch *In-vitro*-Untersuchungen charakterisieren. Hierbei können sowohl toxikologische und immunologische Fragestellungen behandelt werden (siehe Abbildung 7). Da diese Fragestellungen nicht Teil dieser Doktorarbeit sind, soll an dieser Stelle nicht weiter auf diese Testmethoden eingegangen werden. Im späteren Teil dieser Arbeit werden jedoch einige Ergebnisse aus relevanten Testmethoden vorgestellt.

Tierstudien

Für die Untersuchung der Biodistribution von nanopartikulären Eisenpräparaten schlägt die EMA die Verwendung von Nagern vor (65). Hierbei soll vor allem die Eisenverteilung

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

in Blut und RES, sowie in pharmakologischen (Knochenmark), als auch toxikologischen Geweben (Herz, Niere, Lunge) erfolgen. Da eine Bestimmung der Eisenkonzentration allein noch keinen Rückschluss über die Partikeldegradation liefert, werden zeitabhängige Verteilungsmessungen empfohlen. Tierstudien unterstützen dabei die Ergebnisse aus klinischen Studien, da Humanplasmaspiegel allein keine Aussagen über die Gewebeverteilung zulassen. Für den Vergleich parenteraler Eisenkomplexe werden **keine Toxizitätsstudien** empfohlen.

1.4.3.3. In-vivo-Charakterisierung

Klinische Studien

Klinische Studien über parenterale Eisenkomplexe sollen vor allem Auskunft über die Pharmakokinetik, Effektivität und Sicherheit der Produkte liefern. Zum Vergleich zweier Produkte benennt die EMA bei Pharmakokinetikstudien AUC_t und C_{max} von Gesamt- und Tf-gebundenen-Eisen als ausschlaggebende Parameter (65). Klinische Vergleichsstudien sollten für einen Zeitraum von mindestens drei Monaten ausgelegt sein. Empfohlene Endpunkte sind:

- Ferritin- und Hämoglobingehalt
- Tf-Sättigung
- Gesamteisendosis
- Eingesetzte Erythropoetindosis

Für die Bewertung der Therapiesicherheit können folgende Parameter bestimmt werden:

- Rate an anaphylaktischen Reaktionen
- Sonstige unerwünschte Arzneimittelwirkungen (z.B. GI-Beschwerden oder Flush)
- Konzentration von NTBI
- Marker für oxidativen Stress

1.5. Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich sechs unterschiedlicher parenteraler Eisenkomplexe und eines Entwicklungsproduktes in Hinblick auf Struktur, Stabilität und Patientensicherheit. Die Präparate wurden durch ihre physikochemischen Eigenschaften, ihre thermody-

Einleitung

namische Stabilität und ihr Freisetzungverhalten charakterisiert. Bei einigen der Produkte wurden zusätzliche Biodistributionsstudien in einem *In-ovo*-Modell durchgeführt. Ein besonderes Augenmerk lag auf dem Vergleich der Komplexstabilität und deren Auswirkung auf Nebenwirkungsrate und Gewebeverteilung. Des Weiteren wurde ein direkter Vergleich von Eisengluconat zu seinem auf dem amerikanischen Markt befindlichem Nachfolgeprodukt durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

In dieser Arbeit wurden insgesamt sieben unterschiedliche Eisenpräparate charakterisiert. Rienso® wurde im Jahr 2014 charakterisiert, ein Jahr bevor es auf freiwilliger Basis vom europäischen und kanadischen Markt genommen wurde. Die Zulassung auf dem amerikanischen Markt blieb unter dem Namen Feraheme® erhalten



Abbildung 8: Untersuchte Eisenkomplexe.

(134). Tabelle 7 gibt einen kurzen Überblick über die Zusammensetzung dieser Produkte und die Methoden, die zur Charakterisierung der Komplexe gewählt wurden. Die Methoden und deren theoretischer Hintergrund werden im Folgenden vorgestellt.

Tabelle 7: Versuchsübersicht, Details zu Materialien siehe Kapitel 2.1.2

	INFeD®	Cosmofer®	Entwicklungsprodukt	Monofer®	Rienso®/ Feraheme®	Ferrlecit®	Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection
Kohlenhydrat	Dextran	Dextran	Unbekannt	Isomaltosid	Oxytol	Glukose	Glukose
Abkürzung	FeD_EU	FeD_USA	FeX	FeIM	FeOx	FeG	FeG_G
XRPD	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ferrozin	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2nd order UV/Vis	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TEM	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Mößbauer	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DLS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Zeta	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Saure Hydrolyse	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓
In-ovo-Bio-distribution	-	✓	-	✓	-	✓	✓

2.1. Physikochemische Charakterisierung

2.1.1. Methodische Hintergründe

2.1.1.1. Struktureller Aufbau von Festkörpern

Festkörper, die in der Natur vorkommen, werden entsprechend ihres inneren Aufbaus in Kristalle oder amorphe Festkörper eingeteilt. Kristalle sind anisotrope, homogene dreidimensionale Körper, die sich aus einer periodisch wiederkehrenden Anordnung von Bausteinen aus Atomen, Ionen oder Molekülen zusammensetzen (135). Bei idealen Kristallen handelt es sich um hochgeordnete Systeme, welche den kleinstmöglichen Energiegehalt fester Materie darstellen. Mit abnehmendem Ordnungsgrad nimmt feste Materie eine zunehmend amorphe Gestalt an. Amorphe Festkörper unterscheiden sich zu Kristallen dahingehend, dass sie keinen scharfen Schmelzpunkt besitzen, sondern einen Schmelzbereich (Glasübergangstemperatur T_g), in dem sie eine gummiartige, verformbare Konsistenz annehmen. Die Struktur von Kristallen

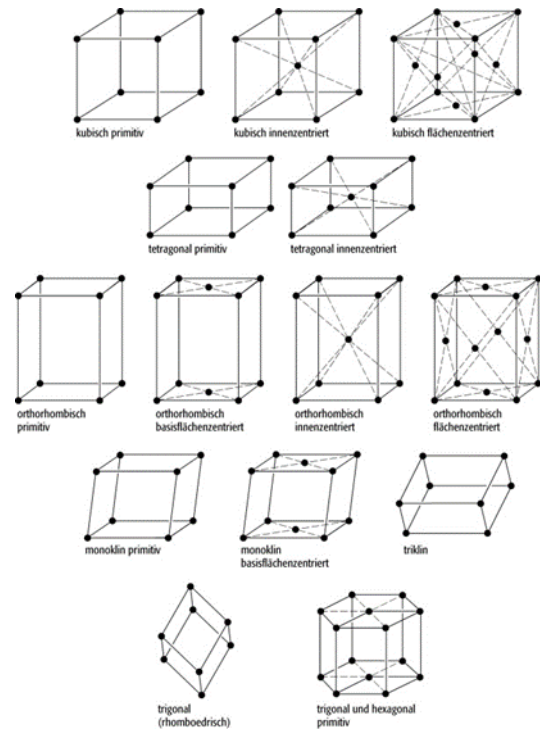


Abbildung 9: Bravais-Gitter. Die 14 möglichen kristallographischen Gittertypen. Entnommen aus: <http://www.spektrum.de/lexikon/physik/bravais-gitter/1948>.

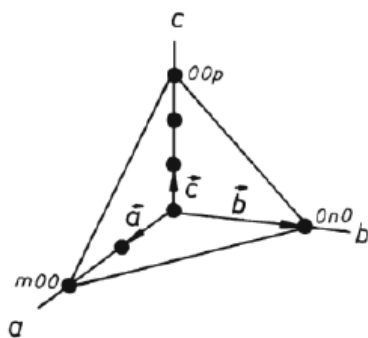


Abbildung 10: Beispiel einer Gitterebene mit den Millerschen Indizes von (362). Entnommen aus (135).

wird über Kristallgitter dargestellt. Die kleinste Ordnungseinheit des Kristallgitters sind die Elementarzellen (136). Sie beschreiben die räumliche Anordnung des vom Kristallgitter gebildeten Parallelepipeds (Nahordnung) und werden über drei Basisvektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} dargestellt. Durch Translation der Elementarzelle lässt sich das gesamte Raumgitter darstellen (Fernordnung) (136). Die Elementarzelle enthält folglich bereits die Gesamtinformation des Raumgitters (135). Es sind 14 verschiedene dreidimensionale Elementarzellen möglich, die über die sogenannten Bravais-Gitter abgebildet werden (siehe Abbildung 9). Amorphe

Substanzen besitzen ebenfalls eine Nahordnung, es existiert jedoch keine Fernordnung. Durch die Elementarzellen lassen sich gedanklich mehrere Ebenen spannen, welche die drei Basisvektoren schneiden. Um diese Netz- oder Gitterebene eindeutig beschreiben zu können, werden in der Mineralogie Ebenen in Form von Millerschen Indizes ausgedrückt.

Die drei Richtungsindizes (h, k, l) repräsentieren die Schnittpunkte der Ebene mit den drei Achsen. Aus den Schnittpunkten errechnen sich h, k und l: Gemeinsame Faktoren werden gekürzt, anschließend der Kehrwert gebildet und die erhaltenen Zahlen mit dem kleinsten gemeinsamen Vielfachen der ursprünglichen Zahlen multipliziert. Als Beispiel sei eine Ebene genannt, die in einem Koordinatensystem \vec{a}, \vec{b} und \vec{c} die Achsen bei $2a$, $1b$ und $3c$ schneidet (siehe Abbildung 10). Multipliziert man die Kehrwerte $(\frac{1}{2}, \frac{1}{1}, \frac{1}{3})$ mit dem kleinsten gemeinsamen Vielfachen von sechs so ergeben sich die Millerschen Indizes von (362).

Abbildung 11 gibt einen Überblick über mögliche Gitterebenen in einem kubischen Kristallsystem. Die Vektoren \vec{a}_1, \vec{a}_2 und \vec{a}_3 entsprechen den Basisvektoren \vec{a}, \vec{b} und \vec{c} . Der innere Aufbau von Festkörpern ist wichtig für deren physikalischen Eigenschaften. Trotz identischer stöchiometrischer Zusammensetzung können zwei Substanzen unterschiedliche Schmelzpunkte, Brechungsindizes oder Löslichkeiten besitzen, wenn sie unterschiedliche Erscheinungsformen (Modifikationen) haben. Ein Beispiel einer solchen Modifikation oder Polymorphie sind Diamant und

Grafit. Beide Kristalle bestehen aus purem Kohlenstoff, unterscheiden sich jedoch maßgeblich in Erscheinungsbild und Härte. Dies verdeutlicht, dass eine bekannte Zusammensetzung von Substanzen nicht ausreichend ist, um alle ihre Eigenschaften abzubilden.

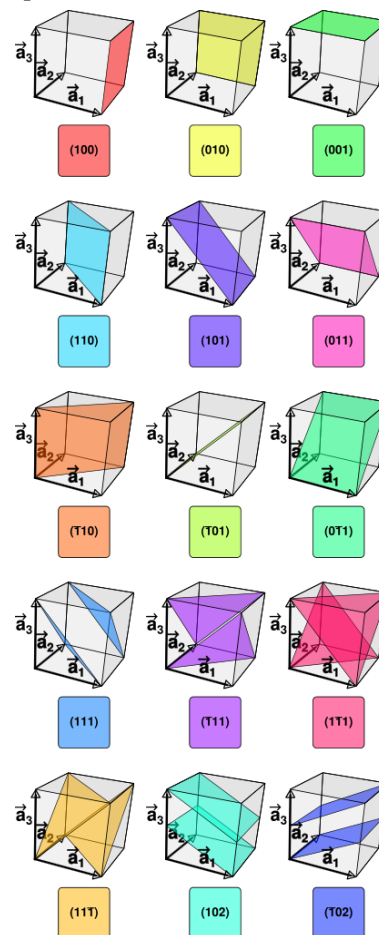


Abbildung 11: Millersche Indizes im kubischen Kristallsystem. Autor Felix King. Entnommen aus: (137).

2.1.1.2. Spektroskopische Methoden

Theoretische Grundlagen

Die Grundlage aller spektroskopischen Methoden bildet die Interaktion von elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Je nachdem ob einzelne Atome (Mößbauer- und Röntgenspektroskopie) oder Moleküle (UV/Vis und IR-Spektroskopie) mit der Strahlung wechselwirken spricht man von Atom- oder Molekülspektroskopie. Um die Wechselwirkung besser verstehen zu können, ist es notwendig sich mit der physikalischen Natur von Licht und anderer elektromagnetischer Wellen auseinander zu setzen. Aus Sicht der klassischen Elektrodynamik handelt es sich bei Licht um transversale elektromagnetische Wellen mit periodischer Änderung elektrischer und magnetischer Felder. Die Ausbreitung der Welle erfolgt senkrecht zur Amplitude des elektrischen und magnetischen Feldes (siehe Abbildung 12).

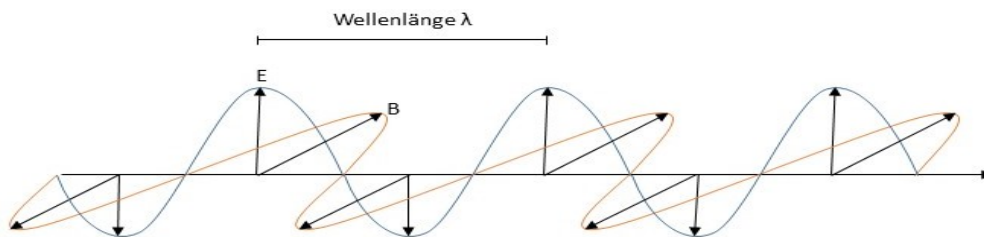


Abbildung 12: : Ausbreitung der elektromagnetischen Welle. E: elektrische Feldstärke. B: magnetische Induktion

Licht breitet sich mit hoher Geschwindigkeit aus. Im Vakuum erreicht sichtbares Licht eine Geschwindigkeit ($c = \text{Lichtgeschwindigkeit}$) von $299.792.458 \frac{m}{s}$. Je nach Wellenlänge besitzen die Quanten/ Photonen verschieden viel Energie. Die Beschreibung von Licht als Welle vermag es jedoch nicht hinreichend seinem energetischen Charakter gerecht zu werden. Quantenmechanisch wird Licht daher als Quantenobjekt aufgefasst. Es setzt sich aus diskreten Quanten, den sogenannten Photonen, zusammen. Die Energie des Photons bzw. des Lichts (E) ist abhängig von dessen Frequenz (ν) und der Planck'schen Konstante (h), mit $h = 6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$.

$$E = h \times \nu \quad \text{bzw.} \quad E = \frac{h \times c}{\lambda}$$

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Der Energiegehalt der Lichtquanten ist daher umgekehrt proportional zur Wellenlänge. Trifft elektromagnetische Strahlung auf Materie, so kann diese mit der Materie in Wechselwirkung treten und Energie abgeben. Im Bereich des sichtbaren Lichtes (380-780 nm) kommt es zu einer Anregung der äußeren Elektronen, während energiereichere Strahlen (Röntgen- oder γ -Strahlen) zur Ionisation oder Kernanregung führen können. Damit es zu einer Absorption kommt, muss die Photonenenergie exakt der Resonanzenergie entsprechen, also der Differenz zwischen angeregtem und nicht-angeregtem Zustand. Zur qualitativen und quantitativen Auswertung von spektroskopischen Methoden wird in der Regel die Differenz von eingestrahelter Strahlung und transmittierender Strahlung bei Passage durch eine Probe gemessen.

UV/Vis-Spektroskopie

Bei der UV/Vis-Spektroskopie ($\lambda = 300\text{-}900\text{ nm}$) tritt eine Wechselwirkung von Lichtphotonen mit Atom- oder Molekülorbitalen niedriger Energie ein. Während der Absorption wird die Energie des Photons vollständig darauf verwandt, ein Elektron aus seinem Grundzustand in ein Orbital höherer Energie anzuheben. Der Spin des Elektrons bleibt erhalten. Aus dem angeregtem Zustand heraus sind je nach molekularem Aufbau der absorbierenden Substanz, unterschiedliche Wege möglich, durch welche die aufgenommene Energie wieder abgegeben werden kann (Rückfall auf ursprüngliches Energieniveau des Elektrons). Gemäß dem Jablonski-Schema äußert sich diese Rückkehr in den Grundzustand (Relaxation) in Form von Wärme, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz (siehe Abbildung 13 a). In den häufigsten Fällen der Relaxation entsteht Wärme, die aus Schwingungs- und Rotationsanregung resultiert (vibronische Relaxation). Dies ist auch bei Farbstoffen wie etwa Ferrozin der Fall. Charakteristisch für eine vibronische Relaxation ist eine Verbreiterung der Absorptionsbanden ($\sim 100\text{ nm}$). Bei der Elektronenanregung im UV/Vis-Bereich wird ein n -, σ - oder π -Elektron aus dem höchsten besetzten Orbital (LOMO: highest occupied molecular orbital) in ein energetisch höheres, unbesetztes Orbital (LUMO: lowest unoccupied molecular orbital) anzuheben. Die möglichen Elektronenübergänge sind in Abbildung 13 b illustriert.

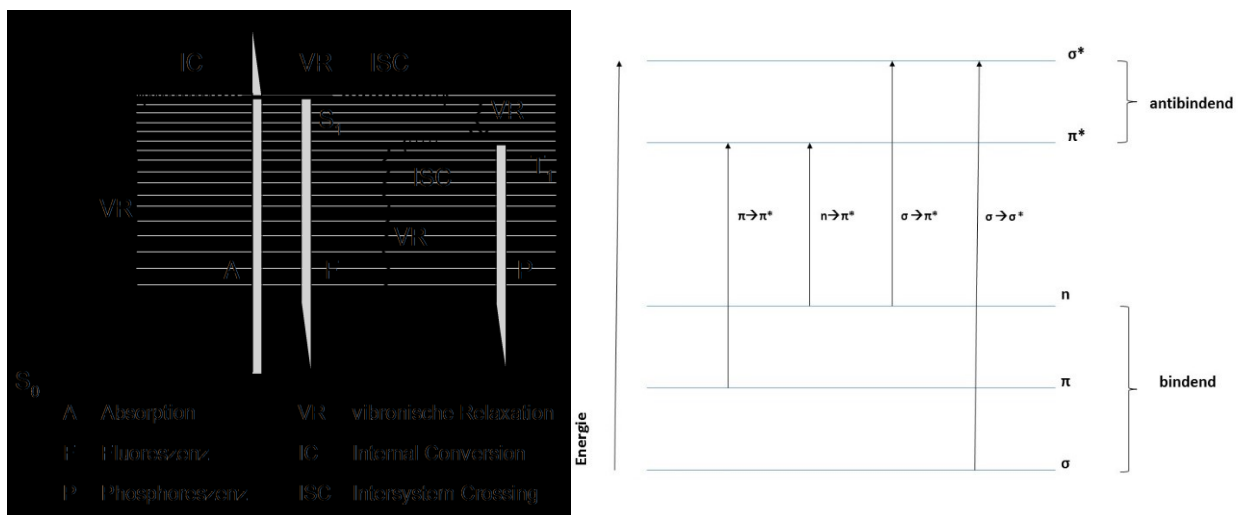


Abbildung 13: Energetische Vorgänge der UV/Vis-Absorption

a: Jablonski-Schema. Beim Rückfall angeregter Elektronen in den Grundzustand kann die Energie auf unterschiedliche Weise wieder abgegeben werden. Entnommen aus (181).

b: Mögliche Elektronenübergänge in Molekülorbitalen. Bei der Anregung werden Elektronen aus bindenden Orbitalen niedrigerer Energie in nicht-bindende, höherenergetische Orbitale angehoben

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

In welchem Wellenlängenbereich ein Molekül absorbiert, hängt von dessen Chromophor ab. Chromophore sind die lichtabsorbierenden Teile des Moleküls und verfügen über Elektronen in n- oder π -Orbitalen. Mindestens zwei konjugierte Doppelbindungen sind notwendig, damit ein Molekül im UV/Vis-Bereich absorbiert. Je mehr Doppelbindungen in einem Molekül vorhanden sind, desto weniger Energie wird benötigt um eine Elektronenanregung zu erreichen, da HOMO und LUMO sich zunehmend annähern. Funktionelle Gruppen des Moleküls, die selbst nicht absorbieren, nehmen ebenfalls Einfluss auf die Lage des Chromophors, da sie die Elektronendichte im Molekül beeinflussen. Sie werden als auxochrome Gruppen bezeichnet. Beispiele solcher Gruppen, die die Elektronendichte erhöhen (+M-Effekt), sind Elemente aus der Gruppe der Halogene, Hydroxid- oder auch Aminogruppen. Nicht nur funktionelle Gruppen des Moleküls, sondern auch Lösemittel, können das Absorptionsverhalten des Moleküls beeinflussen. Bei einem Wechsel von einem unpolarem zu einem polaren Lösemittel, verschiebt sich der Übergang von $n \rightarrow \pi^*$ zur niedrigeren Wellenlänge (Blauverschiebung/ Hypsochromie), während der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang weniger Energie benötigt und daher bei höherer Wellenlänge stattfindet (Rotverschiebung, Bathochromie). Dieses Verhalten lässt sich durch eine Stabilisierung des angeregten Zustandes erklären: Nach Anregung zeigt der π^* -Zustand den größten Dipolmoment, welcher von dem polarisierbaren Lösemittel begünstigt wird (\rightarrow dielektrische Konstante). Das Maß der aufzuwendenden Energie zum Erreichen des angeregten Zustandes wird herabgesetzt, da dieses nun energetisch günstiger ist. Neben dem induzierbaren Dipolmoment des Lösemittels verfügt dieses auch über einen permanenten Dipolcharakter. So bilden sich beispielweise in wässrigem Milieu Wasserstoffbrückenbindungen mit nichtbindenden Elektronen aus. Die Herabsenkung des n-Zustandes ist dabei stärker ausgeprägt als beim π^* -Zustand, sodass für den Übergang $n \rightarrow \pi^*$ insgesamt mehr Energie benötigt wird, als im unpolarem Lösemittel. Das Absorptionsspektrum eines Stoffes liefert Aussagen über die Struktur der Substanz. Ferner kann die Wellenlänge des Absorptionsmaximums zur quantitativen Analyse genutzt werden.

Quantitative Auswertung von UV-Spektren

Passiert Licht mit der anfänglichen Intensität I_0 eine absorbierende Flüssigkeit oder Substanz, der Schichtdicke d , so wird dessen Intensität (I) entlang der Wegstrecke exponentiell abgeschwächt. Dieses Phänomen wurde erstmals von Pierre Bouguer in seinem Buch „Essai d'optique sur la gradation de la lumière“ beschrieben (138). Zugeschrieben

wird es jedoch fälschlicher Weise Johann Heinrich Lambert, der Bouguer in einem seiner Werke zitierte. August Beer erweiterte 1852 die Beobachtungen von Bouguer und schuf damit die Grundlage der quantitativen, photometrischen Analytik (139). Die Gesetzmäßigkeiten der Strahlungsabschwächung (Extinktion) werden im Lambert-Beer-Gesetz wie folgt zusammengefasst:

$$E_{\lambda} = lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times c \times d \text{ oder } I = I_0 \times 10^{-\varepsilon \times c \times d} \text{ mit}$$

E_{λ} = Transmission/ Durchlässigkeit bei Wellenlänge λ

I_0 = Intensität des einfallenden Lichtes

I = Intensität des transmittierten Lichtes

c = Konzentration des absorbierenden Stoffes

ε = molarer Extinktionskoeffizient [$L^*cm^2mol^{-1}$]

d = Schichtdicke

Auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes ist es möglich die Konzentration von absorbierenden Substanzen zu ermitteln. Voraussetzung hierfür sind klare, verdünnte Lösungen, sowie der Einsatz von monochromatischem Licht.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektroskopie gehört zu den Standarduntersuchungsmethoden in der pharmazeutischen Strukturaufklärung und Qualitätskontrolle. Bei dieser Form der Molekularspektroskopie kommen energieärmere Strahlungen als bei der UV-Spektroskopie zum Einsatz. Mit Wellenlängen zwischen 780 nm und 1000 nm ist der Energiegehalt zu gering für eine Elektronenanregung. IR-Strahlen erzeugen dagegen eine Rotation oder Schwingung der Moleküle. Die Schwingungen können dabei sowohl innermolekular (entlang der Kernbindungsachsen) als auch intermolekular (Moleküle untereinander) stattfinden. Molekülschwingungen können anhand von Oszillatoren beschrieben werden. Stark vereinfacht kann ein Molekül, welches aus zwei kovalent gebundenen Atomen besteht, als zwei mit einer elastischen Feder verbundene Kugeln ($M_1 + M_2$) betrachtet werden (vgl. Abbildung 14). Die Kugeln stehen dabei für die jeweiligen Atome, die Feder repräsentiert die Bindung. Die Kugeln dieses Modelles werden einerseits durch Abstoßung der positiven Kerne und der negativen Elektronenwolken auf Distanz gehalten, andererseits übt der Kern eine Anziehung auf die jeweilige negativ geladene Elektronenwolke des Bindungspartners aus. Die Distanz der beiden Kugeln ist daher relativ konstant und wird als Gleichgewichtsabstand r_0 bezeichnet.

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

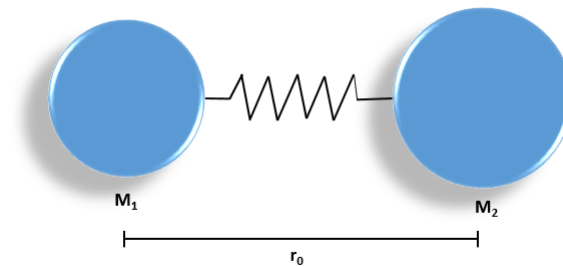


Abbildung 14: Model der kovalenten Bindung zweier Atome. Erläuterungen siehe Text.

Eine Stauchung (Kompression) oder Dehnung (Extension) der Feder erfordert Energie, da entweder gegen die Abstoßungskräfte oder gegen die Anziehungskraft gearbeitet werden muss. Durch die elastische Feder kehren die Kugeln nach der Auslenkung (r) wieder in den Ausgangsabstand zurück. Die benötigte Kraft (F) zur Bewegung der Kugeln lässt sich durch das Hook'sche Gesetz beschreiben:

$$F = -k \times (r - r_0) \text{ mit}$$

F = aufzuwendende Kraft
 k = Kraftkonstante
 r = Auslenkung
 r_0 = Gleichgewichtsabstand

Mit zunehmender Kraftkonstante erhöht sich die aufzuwendende Kraft. Kraftkonstanten chemischer Bindungen steigen mit zunehmender Bindungsordnung, zunehmenden s -Charakter der Hybridorbitale und der Kernladungszahl. Die Schwingung erfolgt bei dem Kugelmodell wie bei einem harmonischem Oszillator. Dieser schwingt mit der Frequenz(ν):

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \times \sqrt{\frac{k}{\mu}} \text{ mit}$$

ν = Schwingungsfrequenz
 μ = reduzierte Masse = $\frac{M_1 \times M_2}{M_1 + M_2}$

Die Frequenz ist demnach ausschließlich abhängig von der Kraftkonstanten und der schwingenden Masse. Sie wird nicht von dem Ausmaß der Auslenkung beeinträchtigt. Die

Schwingungsfrequenz lässt sich durch Division mit der Lichtgeschwindigkeit in die Wellenzahl ($\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]) umwandeln: $\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi \times c} \times \sqrt{\frac{k}{\mu}}$. Demnach ist $\tilde{\nu}$ proportional zu $\sqrt{\frac{k}{\mu}}$, da $\frac{1}{2\pi \times c}$ konstant ist. Im Gegensatz zur Wellenlänge ist die Wellenzahl direkt proportional zum Energiegehalt der elektromagnetischen Strahlung, da $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ gilt. Die oben beschriebenen Gesetze gelten jedoch nicht uneingeschränkt für die Oszillation von Molekülen. Chemische Bindungen sind nur begrenzt dehnbar und können reißen. Auch die Kompression über den Gleichgewichtsabstand hinaus ist nur bedingt möglich. Ferner spielt auch die Quantentheorie eine Rolle, da Moleküle nur in diskreten Quanten Energie absorbieren können. Obwohl demnach ein rein mechanisches Modell nicht in der Lage ist, die realen Bedingungen bei der Schwingung von Molekülen zu beschreiben, lassen sich aus diesem Modell wichtige Voraussagen treffen: Hohe Kraftkonstanten erhöhen den benötigten Energieaufwand, große reduzierte Massen verringern ihn. Diese aus der Mechanik abgeleiteten Tendenzen bestätigen sich in den IR-Aufnahmen organischer Moleküle. So findet sich die Valenzschwingung von C-C-Dreifachbindungen bei einer Wellenzahl von 2300-2100 cm^{-1} , die von einer C-C-Doppelbindung auf Grund der geringeren Kraftkonstante jedoch bei 1600-1500 cm^{-1} (140). Valenzschwingungen von O-H (3650-3000 cm^{-1}) benötigen auf Grund der höheren reduzierten Masse mehr Energie als eine N-H-Valenzschwingung (3500-3000 cm^{-1}) (140).

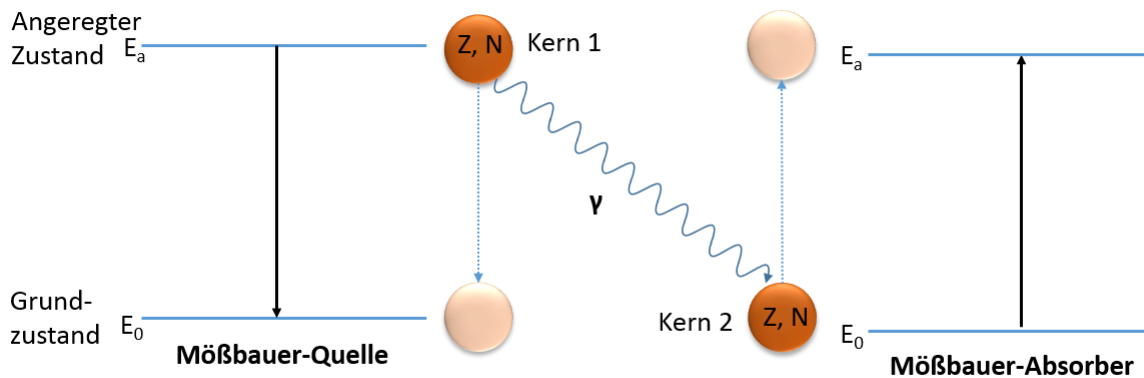
Voraussetzungen für IR-Aktivität

Damit ein Molekül eine Aktivität im IR-Spektrum zeigt müssen Voraussetzungen vorliegen. Einerseits muss die Energie bzw. die Frequenz der magnetischen Strahlung der benötigten Resonanzenergie entsprechen. Andererseits kommt es nur dann zu einer Absorption, wenn es durch die Schwingung zu einer Änderung des Dipolmoments im Molekül kommt. Bei Molekülen mit Symmetriezentrum (z.B. CO_2) kommt es daher nur dann zu einer IR-aktiven Schwingung, wenn diese asymmetrisch verläuft. Die Änderung des Dipolmoments beeinflusst auch die Intensität der Absorptionsbande im Spektrum. Die Intensität ist proportional zum Quadrat der Dipoländerung die das Molekül bei der Schwingung erfährt. Große Dipoländerungen zeigen infolgedessen stärkere Intensitäten als solche mit kleinen Änderungen. In der IR-Spektroskopie wird zwischen zwei Arten von Schwingungen unterschieden: Der Valenz- und der Deformationsschwingung. Valenz-

schwingungen sind Streckschwingungen bei der sich der Abstand zwischen Atomen ändert, während bei Deformationsschwingungen bei gleichbleibenden Abständen der Winkel eine Änderung in Form von Kipp- oder Pendelbewegungen erfährt. Die Summe aller IR-aktiven Schwingungen ergibt ein Spektrum welches für die jeweilige Substanz charakteristisch ist und Aussagen über deren molekularen Aufbau erlaubt.

Mößbauer-Spektroskopie

Die Mößbauer-Spektroskopie basiert auf einem Kernresonanz-Effekt (Mößbauer-Effekt), welcher erstmals von dem deutschen Physiker und späterem Nobelpreisträger Rudolf L. Mößbauer entdeckt wurde (141). Das heutige Hauptanwendungsgebiet ist die Unterscheidung zwischen zwei- und dreiwertigem Eisen. Diese spektroskopische Methode eignet sich jedoch auch zur Identifizierung unterschiedlicher Eisenmodifikationen. Der Mößbauer-Effekt kann als rückstoßfreie Kernresonanz von γ -Strahlen umschrieben werden (142). Ähnlich wie Elektronen bei der Phosphoreszenz können auch Atomkerne durch Absorption von Energie in einen angeregten Zustand übergehen. Emittiert der angeregte Atomkern die absorbierte Energie können weitere identische Atomkerne angeregt werden (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: Ablauf der Kernresonanz von Röntgenstrahlung. Emittiert ein angeregter Kern (Mößbauer-Quelle) beim Rückfall in den Grundzustand Röntgenstrahlung, so kann ein identischer Atomkern (Mößbauer-Quelle) in den angeregten Zustand übergehen. Voraussetzung hierfür ist, dass sowohl bei Absorption als auch Emission keine Energie verloren geht. Z = Protonenanzahl, N = Neutronenanzahl
In Anlehnung an (141).**

Freibewegliche Atome erfahren bei der Emission von γ -Strahlen im Zuge der Impulserhaltung einen Rückstoß, welche in einem Energieverlust des emittierten γ -Quantums resultieren. Folglich ist dessen Energiegehalt nicht mehr ausreichend um identische Atom-

kerne anzuregen, da er nicht mehr der notwendigen Übergangsenergie entspricht. Darüber hinaus benötigen freibewegliche Atome nicht nur die eigentliche Übergangsenergie um in den angeregten Zustand überzugehen, sondern zusätzlich noch den Energiebetrag, welcher bei ihrem Rückstoß verloren geht. Der Energiegehalt von Emissionsenergie und benötigter Absorptionsenergie freibeweglicher Atomkerne unterscheidet sich in Folge dessen um den zweifachen Betrag der Rückstoßenergie. Ein Resonanzzustand des Atomkernes ist nur möglich, wenn die Energie des γ -Quantens exakt der Übergangsenergie entspricht und es zu keinen Rückstoßeffekten kommt. Mößbauer stellte in seinen Experimenten einen Zusammenhang zwischen Bindefestigkeit und Temperatur für die Auftrittswahrscheinlichkeit der rückstoßfreien Emission fest (141, 143). Bei niedrigen Temperaturen nahm die Wahrscheinlichkeit für Resonanzeffekte rapide zu. Zurückzuführen ist dies auf eine zunehmende Starrheit des Kristallgitters und damit verbundene abnehmende Gitterschwingungen (141). Gemäß des Debye-Modells frieren unterhalb einer materialspezifischen Temperatur (Debye-Temperatur) die Freiheitsgrade der möglichen Schwingungen im Kristallgitter ein.

Ein möglicher Rückstoß des Atoms bei Energieabsorption wird unwahrscheinlicher, da die absorbierte Energie nicht in Schwin-

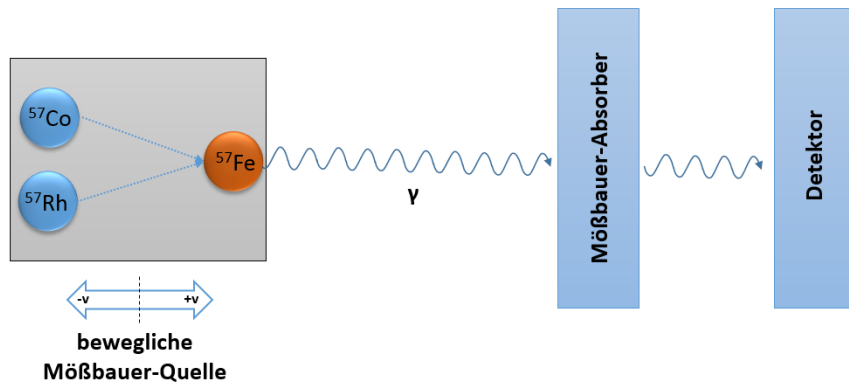


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines Mößbauer-Spektrometers mit $^{57}\text{Rh}/\text{Co}$ -Quelle. $^{57}\text{Rh}/\text{Co}$ zerfällt zu ^{57}Fe und dient als Röntgenquelle.

gungsenergie umgewandelt werden kann. Atomkerne kommen in der Regel als Teil von Atomen oder Molekülen vor. Ihre direkte Umgebung nimmt Einfluss auf die zur Anregung notwendige Übergangsenergie. Elektronen der Kernhülle, der Oxidationszustand und die Elektronegativität von Liganden nehmen Einfluss auf den Energiezustand des Kernes. Sie führen zu minimalen Verschiebungen im Mößbauer-Spektrum im Vergleich zum reinen Atomkern. Dieses Verhalten wird als Isomerie- oder chemische Verschiebung bezeichnet. Sie liefert Informationen über physikalische und chemische Eigenschaften der untersuchten Proben. Experimentell wird sie durch eine Bewegung der Mößbauer-Quelle nachge-

wiesen. Ferner sind magnetische Eigenschaften, die Molekülsymmetrie und die Bindungseigenschaften für das Aussehen der Spektren von Bedeutung. Sie führen zu einer Aufspaltung des Spektrums (Quadrupolaufspaltung und magnetische Aufspaltung). Magnetische Eigenschaften sind temperaturabhängig, Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen können sich folglich in ihrem Informationsgehalt unterscheiden.

Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Röntgendiffraktometrie ist eine Standardmethode in der Materialforschung, die sich Beugungsphänomene von Röntgenstrahlung an Kristallen zu nutzen macht. Sie liefert Informationen zur Bindung, Struktur und Kristallinität. Ferner eignet sie sich zur Untersuchung der quantitativen Zusammensetzung von Pulvergemischen und zur Ermittlung von Kristallgrößen. Röntgenstrahlen, die auf

Kristalle treffen erfahren eine elastische Streuung, welche nahezu ausschließlich an den Elektronen der Atome stattfindet (Thomson-Streuung). Gebeugte Strahlen, die aufeinander treffen, interferieren. Das bedeutet ihre Amplituden addieren sich und es kommt zu einer destruktiven (Auslöschung des Strahls) oder konstruktiven Interferenz (Verstärkung der Amplitude). Kristalle sind aus translativ-verschobenen Elementarzellen aufgebaut, somit tritt konstruktive Interferenz nur bei bestimmten Winkeln auf. Über die Bragg-Gleichung werden die Voraussetzungen hierfür an einem Kristallgitter beschrieben. Es gilt:

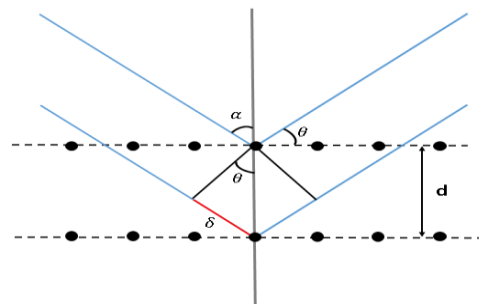


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Bragg-Reflektion: Anteile von Röntgenstrahlen werden am Kristallgitter elastisch gebeugt. Mehrere Gitterebenen sind notwendig um ein ausreichend starkes Messsignal zu erzeugen. δ = Gangunterschied Röntgenstrahlung zwischen zwei Gitterebenen. d = Abstand der Gitterebenen.

Über die Bragg-Gleichung werden die Voraussetzungen hierfür an einem Kristallgitter beschrieben. Es gilt:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin(\theta)_{hkl} \text{ mit}$$

λ = Wellenlänge

d_{hkl} = Abstand zweier Gitterebenen

θ_{hkl} = Glanz- oder Braggwinkel: Winkel zwischen einfallendem Strahl und der gebeugenden Gitterebene

Der Gangunterschied von reflektierten Strahlen am Kristallgitter beträgt $2d_{hkl} \sin(\theta)_{hkl}$.

Die Bedingungen für eine Bragg-Reflektion werden nur dann erfüllt, wenn $\lambda \leq 2d_{hkl}$.

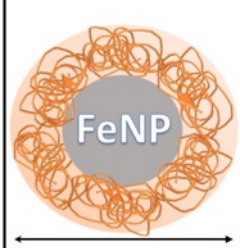
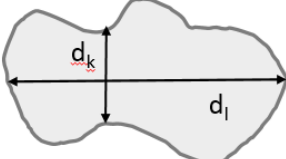
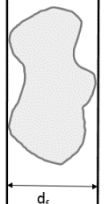
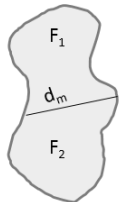
An einer Gitterebene werden nur zwischen 10^{-3} und 10^{-5} der Intensität eines Röntgenstrahles reflektiert. Zur Interferenz tragen bei Kristallen in Summe bis zu 10^5 Gitterebenen bei und erzeugen scharfe Reflexe (144). Kleine Kristalle (<100 nm) mit wenigen Gitterebenen erzeugen eine diffuse Beugung und führen zu einer Verbreiterung des Reflexes. Als Folge lassen sich aus der Breite eines Röntgenreflexes Aussagen über die Kristallgröße ableiten.

2.1.1.3. Größenbestimmung von Nanopartikeln

Durchmesser

Die Angabe der Partikelgröße durch den Durchmesser d ist nur bei kugelförmigen Partikeln exakt. Für die Größenbestimmung von Partikeln existieren daher unterschiedliche Größenannäherungen, die je nach Fragestellung und Form der Partikel von Interesse sind. Im Folgenden werden einige Durchmesser illustriert.

Tabelle 8: Pharmazeutisch relevante Durchmesser

Bezeichnung und Definition	Graphische Darstellung
<p>Hydrodynamischer Durchmesser d_h Durchmesser einer hypothetischen Kugel, die gleiches Diffusionsverhalten wie die Probe aufweist. Stokes Einstein $d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D}$</p>	
<p>Geometrischer Durchmesser d_g Der kürzeste (d_k) und der längste Durchmesser (d_l) fließen in den gemittelten, geometrischen Durchmesser mit ein</p> $d_g = \sqrt{\frac{(d_k^2 + d_l^2)}{2}}$	
<p>Ferret'scher Durchmesser d_f Abstand zweier Tangenten senkrecht zur Messrichtung</p>	
<p>Maritin'scher Durchmesser d_m Die Projektion welche die Fläche in zwei gleiche Teile teilt, $F_1 = F_2$</p>	

Transelektronenmikroskopie

Mikroskopische Methoden liefern wichtige Informationen über Form, Größe und Struktur von fester Materie. Ausschlaggebend für den erreichbaren Informationsgehalt der Aufnahmen ist deren Auflösung, also der notwendige Mindestabstand um zwei Objekte noch als getrennte Bildstrukturen wahrnehmen zu können. Das Auflösungsvermögen optischer Verfahren wird durch die Abbe'sche Auflösengrenze definiert:

$$\text{Auflösevermögen} = 0,61 * \frac{\lambda}{\sin \alpha} \text{ mit}$$

α = halber Öffnungswinkel der Linse

Bei optischen Mikroskopen ist die Auflösung durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts (untere Grenze $\lambda = 370 \text{ nm}$) limitiert. Bei ca. 400 nm Punktabstand stoßen sie durch Beu-

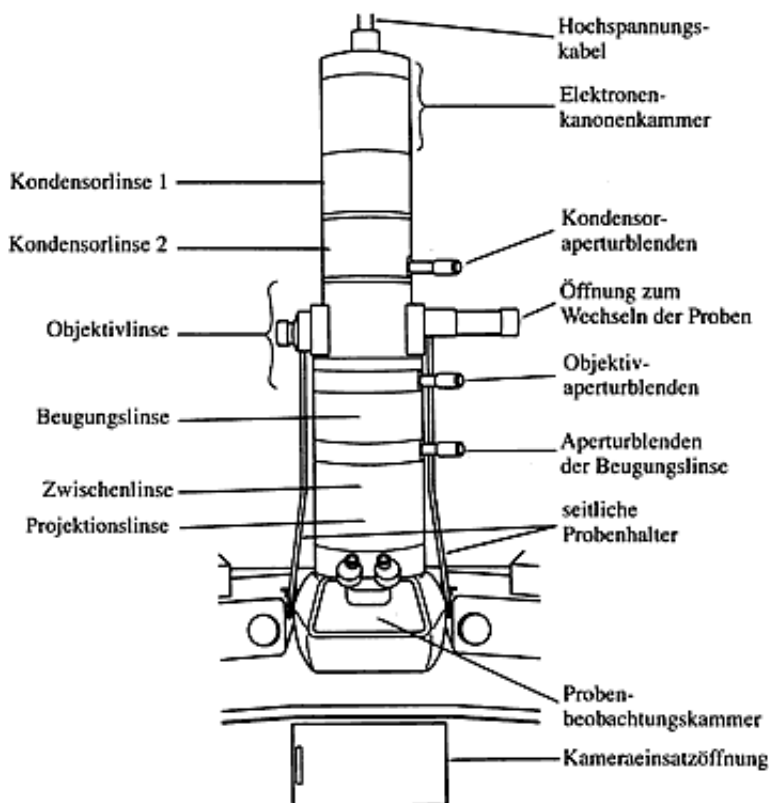


Abbildung 18: Aufbau eines Transelektronenmikroskops von oben nach unten: In einer Elektronenkanonenkammer werden Elektronen aus einer Kathode emittiert (z.B. durch Glühemission) und durch eine angelegte Beschleunigungsspannung zu einer Anode hin beschleunigt. Diese Elektronen werden nun durch einen Kondensorteil geleitet, der die gewünschten Strahlungsbedingungen schafft. In der Regel besteht dieser aus zwei Kondensatorlinsen (C_1 und C_2), Justierelementen und einem Stigmator. Die Probe befindet sich im Objektteil des Mikroskops (Vakuum). Unterhalb der Probe sitzt der Projektivteil. Er beinhaltet eine bis mehrere Projektive. Das erste Projektiv ist in der obigen Abbildung als Beugungslinse deklariert. Dieser Teil des Mikroskops erlaubt es störende Bildeigenschaften wie die Drehung zu minimieren. Der unterste Teil des Mikroskops (Kamerateil) dient der Sichtbarkeitsmachung des erzeugten Bildes. Er besteht aus einer Beobachtungskammer und einer an einen PC angeschlossenen Kamera. Abbildung entnommen aus: (145).

gungsringe an ihre Auflösungsgrenze. Um Aufnahmen mit größerer Auflösung anzufertigen, werden kleinere Wellenlängen benötigt. Ein solches mikroskopisches Verfahren stellt die Transelektronenmikroskopie dar. Anstelle von sichtbarem Licht, nutzt die Transelektronenmikroskopie Elektronenstrahlen mit Beschleunigungs-Spannungen von 80 kV bis 400 kV (Aufbau des Mikroskops siehe Abbildung 18). Diese Materiewellen haben eine geringe De-Broglie-Wellenlänge und ermöglichen damit Auflösungen von 0,2 bis 0,3 nm (146). Empfindliche Proben wie etwa Liposomen können durch den hohen Energiegehalt der Strahlung sowie die Untersuchung im Vakuum zerstört werden. Hier besteht die Möglichkeit mittels Kryotechnik Messungen bei Probentemperaturen unter -150°C vorzunehmen.

Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch Photonenkorrelationsspektroskopie genannt, ist eine Größenbestimmungsmethode für suspendierte Proben. Gemessen wird die Fluktuation des Lichtes bei der Passage einer kolloidalen Dispersion (vgl. Abbildung 19). In Abhängigkeit ihrer Größe bewegen sich Partikel in Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und erzeugen damit eine Änderung der detektierten Lichtintensität. Bei der DLS wird die Lichtstreuung in Zeitbereich von Nanosekunden bis Sekunden zeitaufgelöst ermittelt. Im Gegensatz zu anderen Streumethoden wie der statischen Kleinwinkelstreuung von Licht (LS), Röntgenstrahlung (SAXS) oder Neutronen (SANS) welche makroskopische Volumina von 0,1-1 mL betrachten, werden bei der DLS Mikrovolumina von typischerweise $2 \times 2 \times 50 \mu\text{m}^3$ mit lediglich 10 – 1000 Partikeln untersucht. Neben einer von der inneren Partikelstruktur abhängigen Kleinwinkelstreuung, kommt es zu Interferenzphänomenen der Streuung, welche die Kleinwinkelstreuung überlagert. Im Rahmen der Überlagerung bilden sich Interferenzmaxima (specles), welche sich bei Lösungen und Aerosolen im Takt der brownischen Molekularbewegung der Partikel verschieben. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zur Größe der Partikel. Kleine Partikel bewegen sich schneller (brownische Bewegung) als große Partikel und erzeugen damit eine hochfrequente Streulichtschwankung. Die Detektion erfolgt durch einen Spalt mit einer Öffnung in der Größenordnung der Specles von $\sim 10 \mu\text{m}$ (vgl. Abbildung 19). Je nach Probenzusammensetzung werden die Signale der Vor- und/ oder Rückwärtsstreuung betrachtet. Die Rückwärtsstreuung (*Non inverse back scattering*) kommt bei kon-

zentrierten und farbigen Proben zum Einsatz um einer Signalverfälschung durch Mehrfachstreuung oder Lichtabsorption entgegenzuwirken.

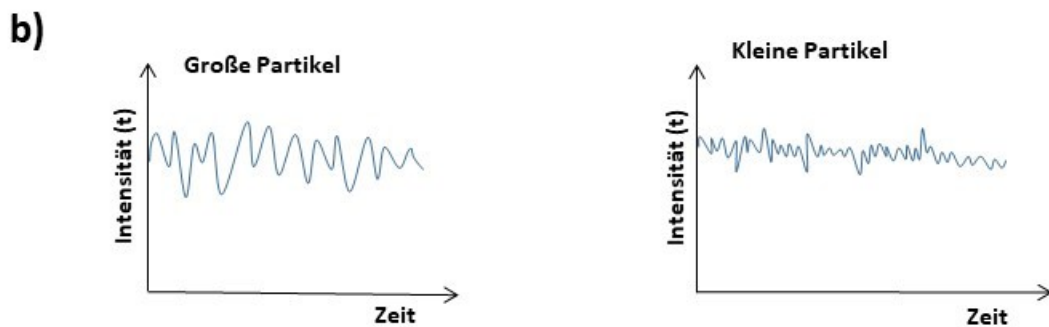
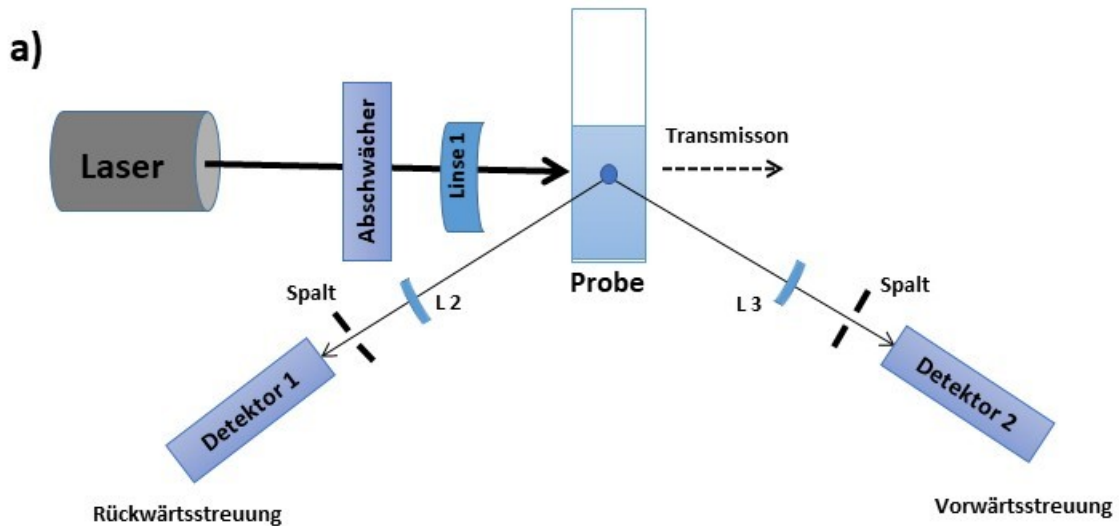


Abbildung 19: a) Schematischer Aufbau eines DLS-Gerätes, am Beispiel des *Zetasizers Nano ZS*: Ein abgeschwächtes Laserlicht wird auf eine verdünnte Probe gestrahlt. Das mit der Partikelbewegung fluktuierende Interferenzsignal wird in Vorwärts- und/ oder Rückwärtsrichtung in einem Winkel von 173° detektiert. Aus Zeit und Intensitätsänderung wird eine Korrelation erstellt, mit welcher der hydrodynamische Durchmesser errechnet wird. L = Linse

b) Schematische Darstellung von DLS-Signalen: Kleine Partikel erzeugen eine hochfrequente Änderung, große Partikel eine niederfrequente Änderung des Streulichtes.

Bei der Auswertung des DLS-Signals $I(t)$ ergibt sich durch Autokorrelationsanalyse zunächst ein Intensitätssignal $I(\zeta)$ mit der Korrelations- und Diffusionszeit ζ . Unter Miteinbeziehung der Viskosität der Lösung η und der Temperatur T im Diffusionsgesetz nach Stokes-Einstein ergibt sich die Zusammensetzung der Strukturintensität nach der Partikelgröße $c_i(d)$ (148, 184, 185).

$$D = \frac{k_B \times T}{3\pi\eta d} \text{ mit}$$

k_b = Boltmannkonstante = $1,3807 \times 10^{-23}$ J/K

Diese wird nach Nomenklatur der Firma Malvern als *Particle Size Distribution by Intensity* (DSD-I) benannt. Zur Umrechnung dieses DLS-Rohsignals in die Probenzusammensetzung sind Kenntnisse der Probenstrukturklasse notwendig, welche für viele pharmazeutische Proben nicht vorliegt. Bei häufig vorliegenden sphärischen Partikeln steigt deren Masse mit $\sim r^3$ und damit die Streuintensität als Quadrat der Amplitude und der Atomanzahl mit r^6 an. Für diesen Fall ergibt sich aus der Division der von $ci(d)$ durch r^3 die Partikelzusammensetzung nach Partikelvolumen $cm(d)$ (\approx Masse) und die numerische Partikelkonzentration $cn(d)$. Malvern bezeichnet $cm(d)$ als *Particle Size Distribution by Volume* (DSD-V) und $cn(d)$ als *Particle Size Distribution by Number* (DSD-N). Bei andersartigen Strukturen wie Plättchen (z.B. Liposomen) oder Stäbchen (z.B. RNA, DNA) gelten andere Gesetze, welche an dieser Stelle nicht weiter erörtert werden, da sie auf Eisenkomplexe nicht zutreffen. Bei pharmazeutischen Proben ist die genaue innere Partikelstruktur häufig unbekannt. Dies trifft auch für die im Rahmen der Arbeit charakterisierten Eisenkomplexe zu. Für solche Proben wurde eine DIN-Norm erarbeitet, welche ein Mittel aus den drei oben genannten Verteilungen (DSD-I/V/N) als z-average definiert. Die Umrechnung in den kumulativen, hydrodynamischen Durchmesser (z-average) ist über die ISO-Norm ISO22412:2017 geregelt (147). Der kumulative Durchmesser ist immer dann zur Größenbestimmung geeignet, wenn eine homogene Größenverteilung mit einem schmalen Polydispersionsindex (PDI) vorliegen. Vermisst man dieselbe Probe mit den oben genannten Gewichtungen ergibt sich meist der folgende absteigende Zusammenhang des Durchmessers: DSD-I > DSD-V > DSD-N (148). Bei einer Größenbestimmung mittels DLS ist es daher unerlässlich das gewählte Modell der Größenverteilung mit anzugeben. Ohne diese Angabe sind Messerergebnisse nur bedingt vergleichbar.

2.1.1.4. Elektrostatische Erscheinungen von Partikeln im wässrigen Medium

Für die Beurteilung der thermodynamischen Stabilität eines kolloidalen Systems ist die Ladung der dispergierten Teilchen ein wichtiger Parameter. Gemäß der nach ihren Erfindern benannten DLVO-Theorie (Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) ist die Stabili-

tät kolloidaler Systeme durch die Summe der Abstoßung elektrochemischer Doppelschichten (E_R) und der Van-der-Waals-Anziehung (E_A) zweier Teilchen bestimmt (149, 150):

$$E_{Gesamt} = E_R + E_A$$

Damit es zu einer Annäherung zweier Teilchen kommen kann muss die Energie E_{Gesamt} überwunden werden. Treffen zwei kolloidale Partikel durch die brownsche Molekularbewegung aufeinander, so kann es zu einer irreversiblen Koagulation kommen, wenn die kinetische Energie der Teilchen die elektrostatische Abstoßung übersteigt. Ist die elektrostatische Abstoßung jedoch groß genug, kommt es zu keiner Flokkulation und das kolloidale System ist stabil. Das Zusammenspiel von Anziehung und Abstoßung zweier kugelförmiger Partikel ist in Abbildung 20 näher beschrieben. Die elektrostatische Abstoßung kolloidaler Systeme wird über deren Zeta-Potential ausgedrückt.

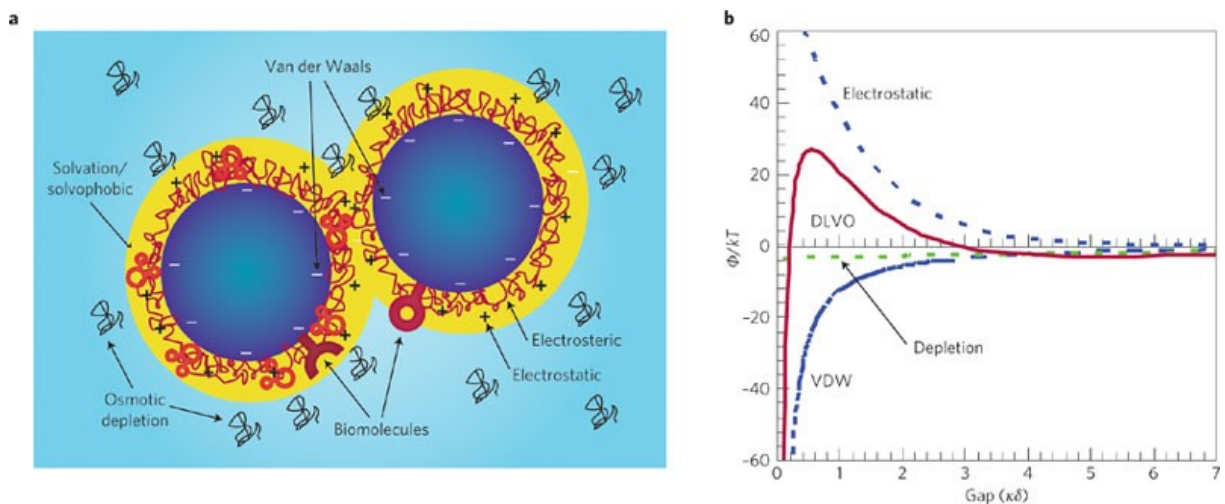


Abbildung 20 Energetische Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Potentialverlauf bei Annäherung
 Bild links: Abstoßende und anziehende Effekte zwischen zwei Nanopartikeln.
 Bild rechts: Potentialverlauf der elektrostatischen Stabilisierung. Blaue gestrichelte Linie: Elektrostatische Abstoßung. Rote Linie: E_{Gesamt} . Blaue Linie: Van-der-Waals-Kräfte. Entnommen aus: (151):

Entstehung des Zeta-Potentials

Dispergierte Partikel können eine Ladung (Nernst-Potential) besitzen, welche auf unbesättigte Valenzen, Dissoziation funktioneller Gruppen, Einbau von Fremdionen oder Adsorption von Ionen aus dem Dispergiermittel zurückzuführen sind. Befinden sich Partikel mit Oberflächenladung in einem wässrigen Milieu, so lagern sich an deren Oberfläche gegensätzlich geladene Ionen an.

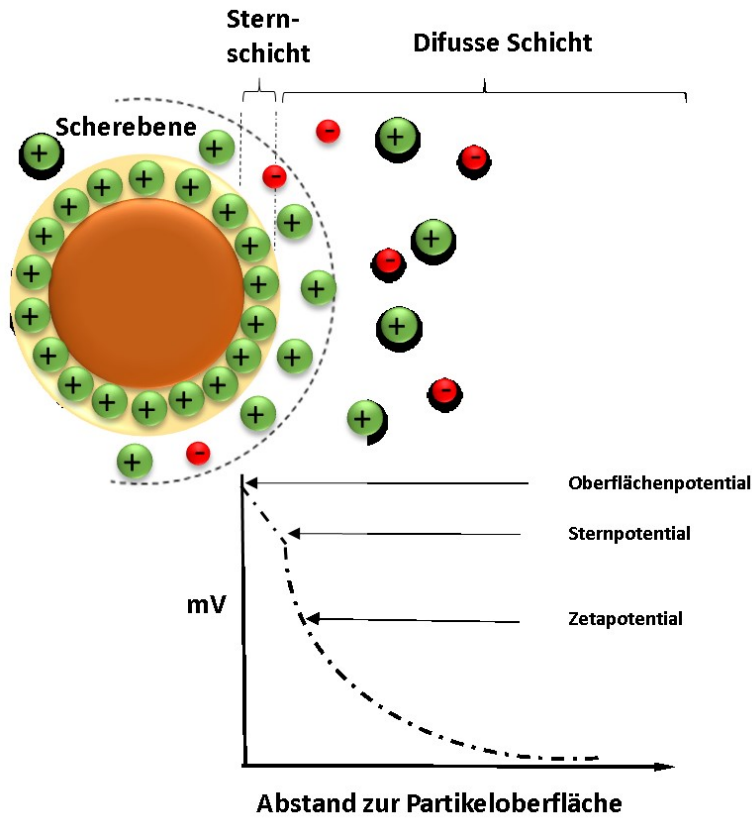


Abbildung 21: Oberflächen-nahe Schichten und Zetapotential eines negativ geladenen Nanopartikels in wässrigem Milieu. Erklärung siehe Text. In Anlehnung an (152).

Um die Sternschicht herum sammeln sich locker gebundene zur Kernoberfläche entgegengesetzt geladene Ionen an. Diese als *diffuse Schicht* bezeichnete Schicht weist auf Grund der brownischen Molekularbewegung jedoch auch gleichgeladene Partikel auf, deren Konzentration mit zunehmenden Abstand zur Partikeloberfläche zunimmt. In der Neutralzone liegen schließlich kationische und anionische Ionen in einer ladungsausgleichenden Konzentration vor. Je dicker die diffuse Schicht, umso stabiler ist das kolloidale System. Bewegen sich geladene Partikel im Dispergiermittel so reißen sie durch elektrostatische Anziehung die Solvathülle mit. Das Partikel verhält sich mechanisch wie ein größerer Festkörper. Der äußere Rand dieser mitwandernden Solvathülle wird als Scherebene bezeichnet. Das Zetapotential spiegelt die Potentialdifferenz zwischen Scherebene eines bewegten Partikels und der ruhenden äußeren Phase wieder.

Partikel mit Oberflächenladung in einem wässrigen Milieu, so lagern sich an deren Oberfläche gegensätzlich geladene Ionen an. Es bildet sich eine dichtgepackte Doppelschicht, die jedoch nicht ausreichend ist, um die Oberflächenladung auszugleichen. Diese angrenzende Schicht zur Oberflächenladung gegensätzlich geladener Ionen wird als *Sternschicht* bezeichnet. Es ist experimentell nicht möglich die Ladung der Oberfläche oder der Scherebene zu ermitteln. Mit zunehmendem Abstand zur

2.1.2. Methoden

2.1.2.1. Zeta-Potential

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Chargen LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Chargen 142239.1
- Entwicklungsprodukt, gepulvert, Eisengehalt im Komplex: 19,9%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 72627
- Monofer®, 100 mg/mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 153199
- Cosmofer®, 50 mg/2 mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 049935
- INFeD®, 100 mg/2 mL, Watson Pharma, Inc., Morristown, USA, Charge 13W14A
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Center (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Geräte und Arbeitsmaterialien

- Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Groß-Britannien
- Zetasizer Nano Series Kapillarküvetten, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Großbritannien, Charge 4202
- Steriler Spritzenfilter, Celluloseacetat: 0,2 µm, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Durchführung

Die Eisenpräparate wurden mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 0,4 mg/mL verdünnt. Das verwendete Wasser wurde in der Vorbereitung zweimal durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µL filtriert, um eventuelle Schwebstoffe, die die Messung beeinflussen könnten, zu entfernen. Der pH-Wert der Proben wurde nach der Verdünnung gemessen und protokolliert. Im Anschluss wurden die Proben in einer Kapillarküvette mit folgenden Geräteeinstellungen vermessen:

Geräteeinstellung:

- Dispergiermittel: Wasser
- Dispergiermittel RI: 1.330
- Viskosität (cP): 0.8872
- Dielektrische Konstante des Dispergiermittels: 78.5

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

- Messdauer: Automatisch (Minimum 50; Maximum 120 Sekunden)
- Messpunkt [mm]: 2.00
- Dämpfungsglied: Automatisch
- Temperatur: 25°C
- Spannung: Automatisch
- Gewähltes Größenauswertemodell: Huckelannäherung

2.1.2.2. Größenbestimmung

2.1.2.2.1. Dynamische Lichtstreuung

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Chargen LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Chargen 142239.1
- Entwicklungsprodukt®, gepulvert, Eisengehalt im Komplex: 19,9%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 72627
- Monofer®, 100 mg/mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 53199
- Cosmofer®, 50 mg/2 mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 049935
- INFeD®, 100 mg/2 mL, Watson Pharma, Inc., Morristown, USA, Charge 13W14A
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Center (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Geräte und Arbeitsmaterialien

- Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Großbritannien
- Einmalküvetten, 1,5mL, PMMA, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Durchführung

Für die Größenbestimmung mittels DLS kamen dieselben Verdünnungen wie beim Zeta-potential zum Einsatz. Die Probenvermessung erfolgte in einer Einmalküvette.

Geräteeinstellung:

- Winkel in dem abgestrahltes Streulicht gemessen wird: 173°
- Dispergiermittel: Wasser
- Temperatur: 25,0°C

2.1.2.2.2. Transelektronenmikroskopie

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Chargen LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Chargen 142239.1
- Entwicklungsprodukt, gepulvert, Eisengehalt im Komplex: 19,9%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 72627
- Monofer®, 100 mg/mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 153199
- Cosmofer®, 50 mg/2 mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 049935
- INFeD®, 100 mg/2 mL, Watson Pharma, Inc., Morristown, USA, Charge 13W14A
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Center (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Arbeitsmaterialien

- Kohlefilm auf 3.05 mm Cu-Netzchen 200 mesh, Plano GmbH, Wetzlar
- Röhrchen 20 mL, konischer Boden, PP, blau, steril, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Steriler Spritzenfilter, Celluloseacetat: 0,2µm, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Probenvorbereitung

Die Proben wurden mit bidestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. Bei FeIM wurde eine zusätzliche Verdünnung mit 0,5 mg/mL angefertigt. Anschließend wurde die Verdünnung auf ein mit Kohlefilm benetztes Kupfernetzchen getropft und in einem Exsikkator bei Raumtemperatur über Nacht trocknen gelassen.

Auswertung

Von mindestens 100 Partikeln wurde der geometrische Durchmesser bestimmt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass verschiedene Stellen des Kupfernetzchens betrachtet wurden. Bei starker Streuung der Partikelgröße wurde der Probenumfang auf bis zu 250 Partikel erhöht.

2.1.2.3. Untersuchungen zur Zusammensetzung und Polymorphie des Eisenkerns

2.1.2.3.1. Mößbauer-Spektroskopie

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Charge LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Charge 142239.1
- Entwicklungsprodukt, gepulvert, Eisengehalt im Komplex: 19,9%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 72627
- Wirkstoff für Monofer®, gepulvert, Eisengehalt 24,8%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 73842001
- Wirkstoff für Cosmofer®, gepulvert, Eisengehalt 16,1%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 3811001
- INFeD®, 100 mg/2 mL, Watson Pharma, Inc. , Morristown, USA, Charge 13W14A
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Center (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Durchführung

Von den getrockneten und gepulverten Proben wurden ^{57}Fe -Mößbauer-Spektren aufgenommen. Dazu wurde ein „Wissel“ Mößbauer-Spektrometer mit einer $^{57}\text{Co}/\text{Rh}$ -Quelle und einem Badkryostat mit möglichen Temperaturen von 5-300 K verwendet (Versuchsaufbau gemäß (153)). Alle Proben wurden bei 293 K vermessen. In einigen Fällen war es zusätzlich erforderlich, Messungen bei 70 K durchzuführen, um die Modifikation der Eisenoxidhydroxide bestimmen zu können. Die Spektren wurden mit Hilfe der „*Recoil Mössbauer Spectral Analysis*“ Software ausgewertet.

2.1.2.3.2. Pulverröntgendiffraktometrie

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Charge LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Charge 142239.1
- Entwicklungsprodukt, gepulvert, gepulvert, gepulvert, Eisengehalt im Komplex: 19,9%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 72627
- Wirkstoff für Monofer®, gepulvert, Eisengehalt 24,8%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 73842001
- Wirkstoff für Cosmofer®, gepulvert, Eisengehalt 16,1%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 3811001
- INFeD®, 100 mg/2 mL, Watson Pharma, Inc., Morristown, USA, Charge 13W14A
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Centre (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Geräte

- XRD 3000 TT (Seifert, Ahrensburg, Germany)

Durchführung

Flüssige Proben wurden vor der Messung für drei – fünf Tage in einem Trockenschrank bei 30°C getrocknet und anschließend mit einem Achatmörser pulverisiert. Bei Proben, die bereits als Pulver vorlagen, entfiel dieser Schritt. Bei den FeG-Proben wurden die Proben zusätzlich im nicht gepulverten Zustand vermessen, um die Signale der Eisenoxide zu verstärken. Des Weiteren wurde mit einer Trocknungszeit von drei und sieben Tagen (bei 30°C) gearbeitet. Folgende Geräteeinstellungen wurden genutzt:

- Wellenlänge der Kupfer-Kathode: $\lambda = 0.154178$ nm, 40 kV, 30 mA
- Bragg-Brentano-Anordnung (Breite der bestrahlten Probe: 10 mm; Messweite 5-65° 2 θ ; Drehrate 0,04° 2 θ , Messzeit 10 s/Schritt).

Auswertung

Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Abgleich mit Referenzspektren der ICDD (International Centre for Diffraction Data) Software Version 2.16 (ICDD, Newstown Square; PA; USA).

2.1.2.3.3. IR-Spektroskopie

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Charge LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Charge 142239.1
- Entwicklungsprodukt, gepulvert, Eisengehalt im Komplex: 19,9%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 72627
- Wirkstoff für Monofer®, gepulvert, Eisengehalt 24,8%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 73842001
- Wirkstoff für Cosmofer®, gepulvert, Eisengehalt 16,1%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 3811001
- INFeD®, 100 mg/2 mL, Watson Pharma, Inc., Morristown, USA, Charge 13W14A
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Centre (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Gerät

- FTIR-8400S, (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan)

Durchführung

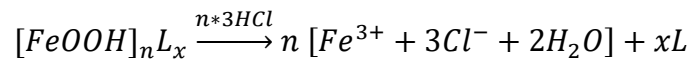
Flüssige Proben wurden für 3-5 Tage in einem Trockenschrank bei 37°C getrocknet, Anschließend wurden die Proben mit einem Achatmörser pulverisiert und mittels ATR-Headspace-Technik vermessen.

2.2. Stabilitätsuntersuchungen

2.2.1. Saure Hydrolyse

Grundlage

In Anwesenheit von sauren Lösungen sind Eisenkomplexe instabil und es kommt zu einer Hydrolyse des Eisenoxidhydroxid-Kernes. Die Dissoziation erfolgt dabei nach folgendem Schema (97):



Die Stabilität des Komplexes wird dabei vermutlich von der Art des Liganden und der vorliegenden Modifikation des Eisenoxidhydroxids beeinflusst. Im UV-Spektrum zeigen sich oktaedrisch koordinierte Bindungen von Fe^{3+} zu Sauerstoff bei Wellenlängen von 250-390 nm (64). Eine Abnahme der Absorption in diesem Bereich ist Folge der Zerstörung der Oxo-Bindung. Die gemessene Absorption ist demnach proportional zur Menge des im Komplex gebundenen Eisens und ermöglicht die Ermittlung der Halbwertszeit ($t_{0,5}$) im sauren Milieu. Diese wiederum erlaubt Rückschlüsse über die allgemeine Komplexstabilität.

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Chargen LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Chargen 142239.1
- Monofer®, 100 mg/mL, MEDICE Pharma GmbH & Co KG, Iserlohn, Charge 154340-5
- Cosmofer®, 50 mg/mL, MEDICE Pharma GmbH & Co KG, Iserlohn, Charge lot 41219A-4
- INFeD®, 100 mg/2 mL, Watson Pharma, Inc., Morristown, USA, Charge 13W14A
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Centre (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Geräte

- PERKIN ELMER Lambda 20 UV-VIS Spektrometer, Perkin Elmer Inc., Waltham, USA

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Reagenzien und Arbeitsmaterialien

- Einmalküvetten, 1,5 mL, PMMA, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Titrisol HCl 0,5 N, Merck KGaA ,Darmstadt, Charge HC441237
- NaCl

Durchführung

Um die Probenhandhabung zu standardisieren wurden von jeder Probe wässrige Stammlösungen mit einer Konzentration von 200 mg Fe/L hergestellt. Anschließend wurden jeweils 0,9 g NaCl in einen 100 mL Erlenmeyerkolben vorgelegt, 5 mL Stammlösung dazu gegeben und die Lösung bis zur 100 mL-Marke mit 0,25 N HCl (Titrisol 0,5N HCl ad 2L) aufgefüllt und gut geschüttelt. Die Proben wurden unverzüglich nach Zugabe der Säure (t_0) bei 287,3 nm photometrisch vermessen. Weitere Messungen erfolgten nach $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 6, 10, 12 und 24 h.

Auswertung

Die gemessene Absorption jeder Probe bei $t = 0$ wurde als 1 definiert ($\hat{=}$ 100% undissoziierter Komplex) und jeder weitere gemessene Wert entsprechend normalisiert. Die normalisierten Werte wurden als natürlicher Logarithmus dargestellt und graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Die erhaltenen Kurven wurden als Polynom zweiten Grades gefittet. Die Halbwertszeiten wurden anhand $f(t_{0,5}) = \ln(0,5)$ berechnet.

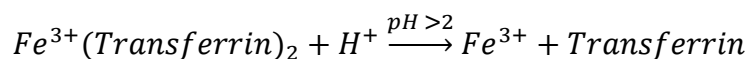
2.2.2. Ferrozin-Methode zur Bestimmung von labilem Eisen

Ferrozin® (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzoesulfonat, kurz: Fz) ist ein Komplexbildner, der mit zweiwertigem, nicht aber dreiwertigem, Eisen farbige Komplexe im Verhältnis 3 Fz : 1 Fe²⁺ bildet. Zweiwertiges Kupfer wird ebenfalls von Fz komplexiert. Der Fe(Fz)₃-Komplex zeichnet sich durch einen hohen Extinktionskoeffizienten ($\frac{27900}{\text{cm mol}}$), eine gute Wasserlöslichkeit, sowie über eine Stabilität bei pH-Werten von 4-9 aus. Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 562 nm (154). Fz wird dazu genutzt, Eisen in Serum photometrisch zu quantifizieren. Bereits 1971 wurde über diese Anwendung berichtet (155). Für die heutige Laboranalytik sind fertige Reaktionslösungen erhältlich, die sich je nach Hersteller in ihrer Zusammensetzung unterscheiden und automatisierte Gehaltsbestimmungen ermöglichen. Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Reaktionskits ist in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Bestandteile des Eisenkits von Roche (156)

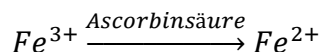
	Bestandteil	Konzentration	Funktion
Reagenz 1	Zitronensäure	200 mMol	pH-Einstellung
	Thioharnstoff	115 mMol	Maskierung von Kupfer zur Vermeidung falsch hoher Messergebnisse
Reagenz 2	Ferrozin	6 mMol	Komplexbildner, Chromophorbildung
	Natriumascorbat	150 mMol	Reduktionsmittel

Um bei der Gehaltsbestimmung mit Fz auch an Transferrin gebundenes Eisen erfassen zu können, muss dieses zunächst aus dem Transferrin-Eisen-Komplex gelöst werden. Dies geschieht im sauren Milieu. Andere Eisenkomplexe können ebenfalls auf diesem Wege aufgelöst werden.

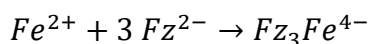


Das aus dem Komplex freigesetzte, dreiwertige Eisen kann jedoch noch nicht direkt mit Fz eine Farbreaktion eingehen. Es muss zunächst mit einem geeigneten Reduktionsmittel zu zweiwertigem Eisen reduziert werden. Hierzu eignet sich beispielsweise Ascorbinsäure.

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe



In einem weiteren Reaktionsschritt reagiert das zweiwertige Eisen nun mit Fz zu einem farbigen Komplex (siehe Abbildung 22). Die Reaktionszeit beträgt bei 10-45°C fünf Minuten (157).



Neben einer reinen Eisengehaltsbestimmung, kann diese Methode auch dazu verwendet werden, die Eisenfreisetzung aus parenteralen Eisenkomplexen näher zu charakterisieren um Rückschlüsse über den Gehalt von labil gebundenem Eisen zu ziehen.

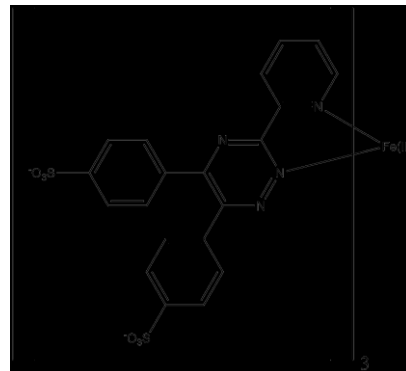


Abbildung 22 : Ferrozin-Eisen-Komplex. Entnommen aus (183).

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Chargen LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Chargen 142239.1
- Entwicklungsprodukt, gepulvert, Eisengehalt im Komplex: 19,9%, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 72627
- Monofer®, 100 mg/mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 153199
- Cosmofer®, 50 mg/2 mL, Pharmacosmos A/S, Holbaek Dänemark, Charge 049935
- Rienso®, 30 mg/mL, Takeda Global Research and Development Centre (Europe) Ltd., London, Großbritannien, Charge 32231

Geräte

- PERKIN ELMER Lambda 20 UV-VIS Spektrometer, Perkin Elmer Inc., Waltham, USA

Arbeitsmaterialien und Reagenzien

- Ferrozin® Reaktionskit, bestehend aus 6x64mL R1 und 6x16mL R2 (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 10), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Chargen 692336-01 und 148631.01
- Humanserum, gepoolt, bei 37°C im Wasserbad aufgetaut
- Einmalküvetten, 1,5 mL, PMMA, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

- Reaktionsgefäße 2 mL, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Leukosilk®, 2, 5 cm x 5 m, BSN medical GmbH, Hamburg
- Eisenstandard 1000 µg/mL in 2% HNO₃

Durchführung

Die Proben wurden mit Humanserum auf eine Konzentration von 66,67 µg/mL und 166,6 µg/mL verdünnt. Dies entspricht einer Injektion von 200 mg bzw. 500 mg Eisen bei einem 70 kg schweren Patienten, bei der Annahme, dass das Verteilungsvolumen 3 L beträgt (0,07 L Blut pro kg-Körpergewicht, Serumfraktion 60%)(112). 700 µL R1 wurden in 1,5 mL Einmalküvetten vorgelegt. Nach einer Serum-Inkubationszeit von 10 und 45 Minuten wurden 100 µL verdünnte Probe zu R1 pipettiert und gründlich gemischt. Anschließend wurden 350 µL R2 hinzugegeben um die Farbreaktion mit Fz zu starten. Die Absorption des gebildeten Komplexes wurde bei 562 nm über einen Zeitraum von 70 Minuten vermessen. Da eine Zunahme der Absorption während der ersten fünf Minuten lediglich auf die Farbreaktion, nicht aber auf eine weitere Eisenfreisetzung aus den applizierten Eisenkomplexen zurückzuführen ist, wurden nur die Werte von 5 -70 Minuten für die weitere Auswertung verwendet. Die gemessene Absorption wurde gegen die Zeit aufgetragen und die erhaltene Kurve einer polynomischen Regression zweiten Grades unterworfen. Anhand der ermittelten Regressionskurve wurde der Gehalt an Eisen zu Beginn der Farbreaktion ermittelt (t_0). In einem weiteren Auswerteschritt wurde t_0 der beiden Inkubationszeiten (10 und 45 Minuten) einer linearen Regression unterworfen, um die Eisenkonzentration zu Beginn der Inkubationszeit zu ermitteln. Diese initiale Eisenkonzentration entspricht dem labilen Eisenpool der Präparate. Für die Kalibrierung dieser Methode wurden mit dem verwendeten Humanserum und einem Eisenstandard Referenzlösungen mit Konzentrationen von 2,39-14,97 µg Fe/mL hergestellt. Jeweils 100 µL Referenz wurden analog den Proben behandelt und nach fünf Minuten nach Zugabe von R2 vermessen.

2.3. In-ovo-Biodistribution

2.3.1. Das Chorion-Allantois-Membran-Modell

Bei der Chorion-Allantois-Membran (CAM) handelt es sich um eine Membran die in einigen Eiern von Vögeln und Reptilien gebildet wird. Sie besteht aus der Allantois (griechisch, „die Wurstförmige“), der embryonalen Harnblase und dem Chorion (griechisch, „Zottenhaut“), der äußeren Schicht der embryonalen Fruchthülle. Die CAM entspricht somit der Placenta von Säugern und erfüllt eine wichtige Versorgungsfunktion. Zwischen der Chorionschicht und Allantoischicht befinden sich Kapillaren, die einen Gasaustausch mit den Poren der Schale ermöglichen (159). Bei Vögeln ist die CAM für einen Großteil des Gasaustausches von Embryo und Umgebung zuständig. Darüber hinaus ist sie in der späteren Entwicklung des Embryos essentiell für den Knochenaufbau, da sie für den Calciumtransport aus der Schale genutzt wird (160).

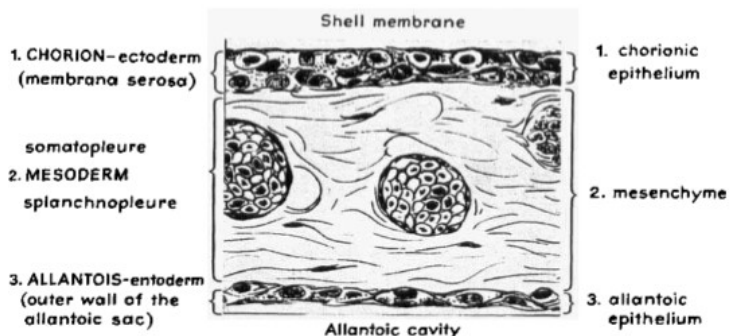


Abbildung 23: Querschnitt durch die CAM-Membran: Drei Schichten tragen zur Funktionalität bei. Entnommen aus (158).

Da die CAM über ein vollfunktionsfähiges lymphatisches System verfügt, welches zudem starke Ähnlichkeit zu dem von Säugern aufweist, ist die Hühner-CAM ein beliebtes Forschungsmodell. Die Anwendungsgebiete sind dabei breit gefächert und umfassen unter anderem onkologische und angiogenetische Fragenstellungen, sowie Untersuchungen der Biodistribution von Arzneistoffen (158). Bei Hühnern beträgt die Brutzeit bis zum Schlüpfen 21 Tage. Bereits ab Tag zehn erreicht die CAM ihre volle Größe und ist ab Tag 13 vollständig differenziert (161). Mit dem CAM-Modell kann sowohl *ex ovo* als auch *in ovo* gearbeitet werden. Im Vergleich zu klassischen Tiermodellen liefert es einige Vorteile, da es sowohl kostengünstig ist und in vielen Ländern vor dem Schlüpfen der Küken nicht als Tierversuch angesehen wird. Somit entfallen Tierversuchsanträge und lange Wartezeiten über die Versuchsgenehmigung.

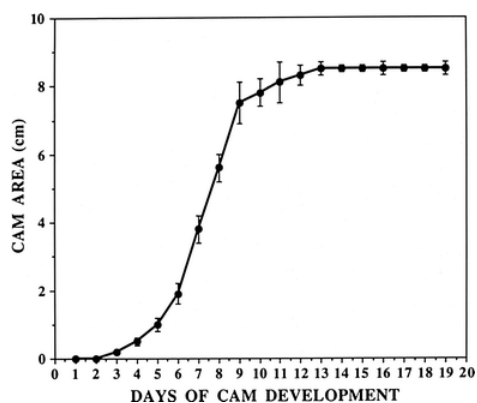


Abbildung 24: Entwicklung der Hühner-CAM. Nach 13 Tagen Entwicklung wird die vollständige Entwicklung erreicht (158).

Bei Hühnern beträgt die Brutzeit bis zum Schlüpfen 21 Tage. Bereits ab Tag zehn erreicht die CAM ihre volle Größe und ist ab Tag 13 vollständig differenziert (161). Mit dem CAM-Modell kann sowohl *ex ovo* als auch *in ovo* gearbeitet werden. Im Vergleich zu klassischen Tiermodellen liefert es einige Vorteile, da es sowohl kostengünstig ist und in vielen Ländern vor dem Schlüpfen der Küken nicht als Tierversuch angesehen wird. Somit entfallen Tierversuchsanträge und lange Wartezeiten über die Versuchsgenehmigung.

2.3.2. Studiendesign

Tabelle 10: Studiendesign *In-ovo*-Modell

Untersuchungsziel		Studienarm	Untersuchte Präparate	Dosis	V	Start	Ende
Komplexeinfluss	Vergleich von Generikum und Referenz	A_120 h	FeG, FeG_G	400 µg	40 µL	22.07.16	10.08.16
		A_24 h	FeG, FeG_G	400 µg	40 µL	25.07.16	09.08.16
	Vergleich der Biodistribution von FeD und FeIM	B_120 h	FeD_EU, FeIM	400 µg	40 µL	12.08.16	31.08.16
		B_24 h	FeD_EU, FeIM	400 µg	40 µL	15.08.16	30.08.16

In einem *In-ovo*-Hühner-CAM-Modell wurde die Gewebeverteilung von vier unterschiedlichen Eisenpräparaten getestet. Dafür wurde die Eisenkonzentration 24 h und 120 h nach Applikation bestimmt. Als pharmakologisch und toxikologisch relevante Zielorgane wurden dabei Herz und Leber gewählt. Bei allen Präparaten wurde eine Dosis von 400 µg Eisen in 0,9%iger NaCl-Lösung getestet. Zusätzlich wurden zwei Kontrollgruppen miteingeschlossen. Eine Blindgruppe, bei der das Ei gemäß Protokoll geöffnet und verschlossen wurde ohne das eine Injektion stattfand, und eine NaCl-Gruppe, bei der physiologische Kochsalzlösung statt Probe injiziert wurde. Ziel der NaCl-Gruppe war es eventuelle negative Einflüsse der Applikationsart und des Lösemittels auf die Überlebensrate aufzudecken. Pro Tag war die Behandlung von maximal 60 Eiern möglich, dies machte eine Aufteilung der Studie in vier Substudien notwendig (siehe Tabelle 10). Da Eierlieferungen nur donnerstags möglich waren, wurden in einem Vorversuch die Auswirkungen der Lagerdauer auf die Überlebensrate der Embryonen überprüft und der Anteil der zur Injektion geeigneten Eier bestimmt. Pro Substudie kamen schließlich 150 Eier zum Einsatz, um jeweils mindestens 15 erfolgreiche Injektionen in den Interventions- und Kontrollgruppen zu erlangen.

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Untersuchte Präparate

- Ferrlecit®, 62,5 mg/5 mL, sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, Charge LA5045
- Sodium Ferric Gluconate Complex in Sucrose Injection, 62,5 mg/5 mL, Watson Pharma Inc. Parsippany, USA, Charge 142239.1
- Monofer®, 100 mg/mL, MEDICE Pharma GmbH & Co KG, Iserlohn, Charge 154340-5
- Cosmofer®, 50 mg/mL, MEDICE Pharma GmbH & Co KG, Iserlohn, Charge 41219A-4



Abbildung 25: Im *In-ovo*-Modell getestete Eisenkomplexe.

Eingesetzte Geräte

- TissueRuptor® Disposable Probes, Qiagen, Hilden
- Tecan Reader, INFINITE 200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
- Brutschrank BSS 300/ BSS 160, ProCon automatic systems GmbH & Co. KG, Mücke
- Schierlampe, ProCon automatic systems GmbH & Co. KG, Mücke

Reagenzien und Arbeitsmaterialien

- CleanEggs, VALO Biomedica GmbH, Osterholz, Scharmbeck
- Ferrozin®, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Charge 140989
- Trichloressigsäure, AppliChem GmbH, Darmstadt, Charge 5D009702
- Natriumactetat, Carl Roth, Karlsruhe, Charge 126242001
- Eisenstandard in HCl, CPAchem Ltd., Stara Zagoro, Bulgarien, Charge D30392
- Thioglykolsäure 80% pure, AppliChem GmbH, Darmstadt, Charge 0000564477
- HCl, 1N, Carl Roth, Karlsruhe, Charge 02910416
- Microplate 96 Well, PS, crystal clear, Greiner bio-one, Frickenhausen, Charge E140113N
- Röhrchen, Rundboden 14 ml, PP, 17x100 mm, steril, Falcon®, Corning Science México S.A. de C.V, Tamaulipas, Mexico, Charge 08316018
- Sterican Kanülen 30G 0,30x12mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Charge 16C9G8812

- Quickpad®, HOLTSCHE Medizinprodukte GmbH, Taunusstein, Charge 020116
- Leukosilk®, 2, 5 cm x 5 m, BSN medical GmbH, Hamburg
- Sterican 19G, 1,10 x 50 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Charge 16B02G8841
- Omnifix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Injekt® Luer solo, 5 mL, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Uhrglasschalen aus AR-Glas, 4 cm Durchmesser

2.3.3. Praktisches Vorgehen

Vorbehandlung der Eier

Für die Versuche wurden vorbebrütete Hühnereier der Marke Clean Eggs verwendet. Nach Anlieferung wurden alle Eier nummeriert, gewogen und das Durchschnittsgewicht ermittelt. Eier mit Rissen und solche, deren Gewicht sich um mehr als 10% vom Durchschnittsgewicht unterschied, wurden aussortiert. Die restlichen Eier wurden für mindestens 24 h, aber maximal sieben Tage bei 4-6°C gelagert. In einem Vorversuch mit jeweils 100 Eiern konnte gezeigt werden, dass sich die Anwuchsrate der Eier um weniger als 3% unterschied, wenn sie für 24 h, vier Tage oder sieben Tage kühl gelagert wurden.



Abbildung 26: Nummerierte Eier im Wendekasten. Durch ein Bewegen des Rahmens werden die Eier dreimal täglich gewendet.

Tag 1: Einlagern der Eier

Die Eier der jeweiligen Subcharge wurden aus dem Kühlschrank genommen und für 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Jeweils 25 Eier wurden in Wenderahmen sortiert. Anschließend wurden die Eier in einen Brutschrank bei 37°C (Akzeptanzgrenze: 36-38,5°C) und einer Luftfeuchte von 65% (Akzeptanzgrenze: 65-80%) eingelagert. Die Wendeautomatik der Brutschränke wurde auf drei Umdrehungen pro Tag eingestellt.

Tag 8: Schieren

Nach sieben Tagen Inkubation wurden die Eier auf Wachstum untersucht. Nach Entnahme aus den Brutschränken, erfolgte eine visuelle Überprüfung unter Zuhilfenahme

einer Schierlampe (siehe Abbildung 27). Eier, bei denen ein Wachstums sichtbar war, wurden mit der Spitze nach oben in Eierkartons sortiert und zur Weiterbehandlung zur Seite gestellt. Anschließend erfolgte eine Desinfektion der spitzen Seite mit einem Alkoholtupfer (Quickpad®) und die Eierschale wurde vorsichtig mit einer Nagelschere x-förmig eingestochen. Das Loch wurde daraufhin mit einem Streifen Leukosilk® verschlossen

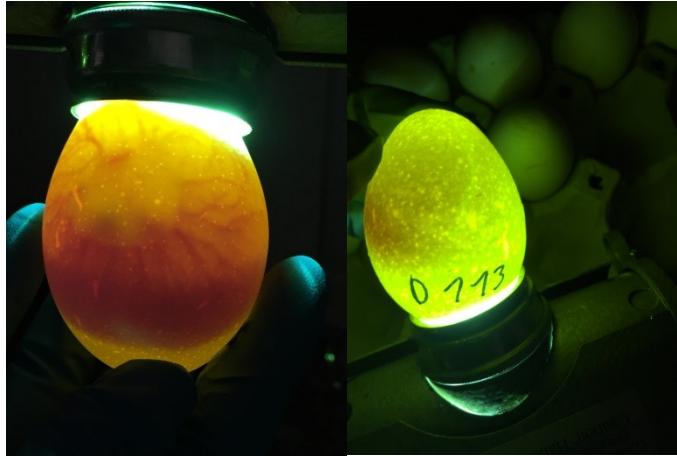


Abbildung 27: Schieren der Eier an Tag 8.
Linke Abbildung: Erfolgreicher Anwuchs des Embryos. Es ist ein deutliches Adergeflecht erkennbar.
Rechte Abbildung: Abgestorbener Embryo. Nach der Befruchtung wurde kein Adergeflecht ausgebildet.

und die Eier wurden in Eierkartons zurück in den Brutschrank gestellt. Die Eier wurden ab diesem Zeitpunkt nicht mehr gedreht.

Tag 14: Applikation

Nach zwei Wochen Bebrütung wurde die Öffnung der Eier mit einer Schere auf circa 3 cm Durchmesser erweitert. Die freigelegte CAM wurde auf geeignete Gefäße untersucht. Beim Vorhandensein genügend großer Gefäße, wurde mit einer 30G Kanüle 40 µL Probe

oder 0,9%ige NaCl-Lösung in die Ader injiziert. Kam es bei der Injektion zu starken Blutungen, wurden die Eier verworfen. Nach erfolgreicher Injektion, wurde die Schale mit einer autoklavierten Uhrglasschale verschlossen. Eier deren CAM kein ausgeprägtes Adergeflecht aufwiesen, wurden verschlossen und als Negativkontrolle verwendet. Anschließend wurde der Brutvorgang fortgesetzt.

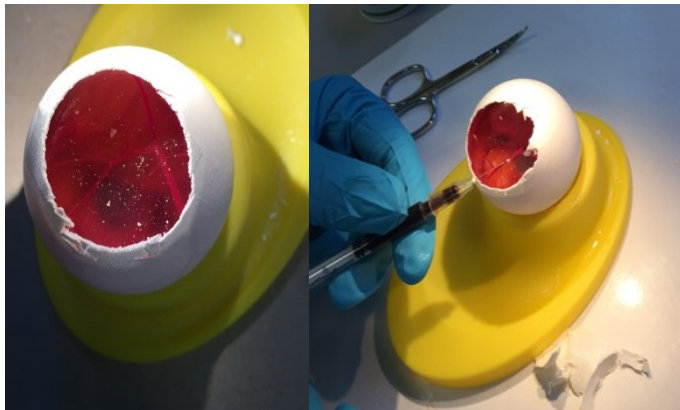


Abbildung 28: Applikation der Lösungen.
Linke Abbildung: Ei mit gut ausgebildeter CAM. Die Adern sind ausreichend dick und die Membran ist unbeschädigt.
Rechte Abbildung: Injektion in das Adergeflecht der CAM.

Tag 15/ Tag 20: Beenden der Inkubation

Nach Ende der vorgegebenen Inkubationszeit von 24 oder 120 h wurden die Eier geöffnet, die Föten herausgleiten gelassen und umgehend mit einer chirurgischen Schere dekapiert. Anschließend wurde das Gewicht von Torso und Kopf ermittelt. Der Torso wurde geöffnet, Herz und Leber entnommen und das Gewicht der Organe notiert. Die Organe wurden umgehend in Röhrchen gefüllt, mit Eis gekühlt und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

Eisenanalytik

Die Eisenanalytik erfolgte analog der Methode von Rebouche et al. (162). Die tiefgefrorenen Organe wurden dazu zunächst aufgetaut, mit destilliertem Wasser versetzt und mit Hilfe eines Zellmixers (TissueRuptor®) für 2-4 min homogenisiert. Die notwendige Verdünnung richtete sich dabei nach Inkubationszeit, Organ und injiziertem Präparat (genaue Verdünnung siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Verdünnungsverhältnis von Organ zu destilliertem Wasser [m/m]

	Blind		NaCl		FeG		FeG_G		FeD_EU		FeIM	
	24 h	120 h	24 h	120 h	24 h	120 h	24 h	120 h	24 h	120 h	24 h	120 h
Herz	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
Leber	1:15	1:15	1:15	1:15	1:15	1:30	1:15	1:30	1:15	1:30	1:15	1:30

Bei jeder Probe kam ein frischer Pürrier-Aufsatz zum Einsatz. Anschließend wurde das Homogenisat für mindestens 12 h bei -20°C tiefgefroren. Die Proben wurden wieder aufgetaut, gevortext und 600 µL Homogenisat in ein Röhrchen mit Schraubverschluss pipettiert. Der Aufschluss des Eisens erfolgte durch die Zugabe des gleichen Volumens Proteinpräzipitationslösung (10% [v/v] Trichloressigsäure in 1 N Salzsäure) und ein einstündiges Erhitzen auf 90°C. Die Proben wurden nun mit Eis auf Zimmertemperatur abgekühlt und anschließend bei 14.000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten zentrifugiert. Die Gehaltsbestimmung des Überstandes erfolgte UV-metrisch durch eine Farbreaktion mit Ferrozin®. Für die Kalibriergerade wurden Standardlösungen (Eisenstandard in 50% Proteinpräzipitationslsg. +50% H₂O) mit einer Eisenkonzentration von 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µg Eisen pro mL eingesetzt. Jeweils 100 µL Überstand und Standard wurden auf eine 96er Microplatte pipettiert und mit 100 µL Chromogenlösung (1,0 mM Ferrozin, 1,5M Natriumacetat, 0,3% Thioglykolsäure in H₂O) versetzt. Dies erfolgte mindestens als Doppelbestimmung (siehe Pipettierschema Tabelle 12). Zusätzlich wurden jeweils 100 µL

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Überstand / Standard mit 100 µL Blindlösung (1,5M Natriumacetat und 0,3% Thioglykolsäure in H₂O) versetzt um den Blindwert der Lösungen zu ermitteln. Nach 30 Minuten wurden die Platten auf einem Microplattenreader bei 570 nm vermessen. Anhand der Absorption und Verdünnungsfaktoren aus der Probenvorbereitung wurde die Eisenkonzentration errechnet.

Tabelle 12: Pipettierschema Eisenanalytik.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Behandlung der Reihe
A	Standardlösungen												+ 100 µl Chromogenlsg.
B	Standardlösungen												+ 100 µl Chromogenlsg.
C	Standardlösungen												+ 100 µL Blindlösung
D													
E	Überstand												+ 100 µl Chromogenlsg.
F	Überstand												+ 100 µl Chromogenlsg.
G	Überstand												+ 100 µL Blindlösung
H													

2.3.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte als Varianzanalyse (ANOVA). Als Auswertesoftware kam SPSS® der Version 23.0.0.0 (IBM®) zum Einsatz. $p \leq 0,05$ wurden dabei als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Größenbestimmung und Zeta-Potential

3.1.1. Dynamische Lichtstreuung

Tabelle 13: Detaillierergebnisse DLS

Produkt	T [°C]	Z [nm]	Größenverteilung gewichtet nach Partikelvolumen [nm]	Größenverteilung gewichtet nach Streu-Intensität [nm]	PDI
FeD_EU	25.0	14.81 ± 0,13	16.82 ± 5,97	12.15 ± 4,17	0.118
FeIM	25.0	12.16 ± 0,03	14.27 ± 5,85	9.224 ± 3,63	0.137
FeX	25.0	9.051 ± 0,04	10.32 ± 3,85	7.166 ± 2,60	0.113
FeD_USA	25.0	14.16 ± 0,08	16.21 ± 6,05	11.24 ± 4,09	0.118
FeOx	25.0	29.48 ± 0,09	36.71 ± 16,75	22.19 ± 9,47	0.190
FeG	25.0	16.29 ± 0,12	11.09 ± 5,22	20.12 ± 9,476	0.176
FeG_G	25.0	10.14 ± 0,09	11.88 ± 4,84	7.81 ± 3,00	0.142

Alle getesteten Produkte hatten einen PDI zwischen 0,1-0,2 (siehe Tabelle 13). Für den Durchmesservergleich von Partikeln mit einer engen (<0,15) bis weiten (0,15–0,25) Größenverteilung eignet sich die kumulative Größenverteilung (z-average). Ein Vergleich der Standardabweichungen der verschiedenen Größengewichtungen unterstreicht die gute Eignung des z-average. Sowohl bei der nach Volumen als auch bei der nach Intensität gewichteten Größenverteilung fiel die Standardabweichung deutlich höher als beim kumulativen Durchschnitt aus (siehe auch Abbildung 29). Es ergab sich folgende absteigende Größenverteilung:

FeOx >> FeG > FeD_EU ≥ FeD_USA > FeIM > FeG_G > FeX

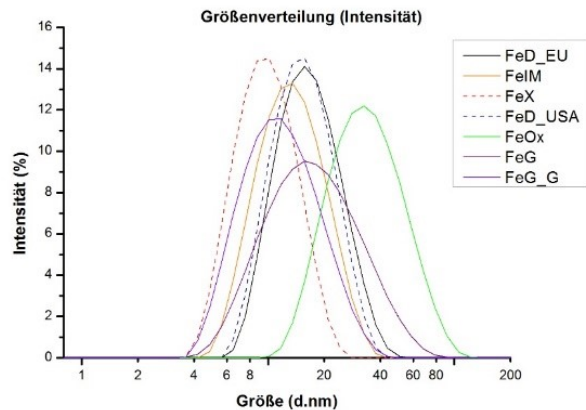


Abbildung 29: Überblick über die Größenverteilung (Gewichtung nach Intensität) der vermessenen Proben. Die Größenverteilung aller Präparate ist breiter als beim z-average.

3.1.2. Transelektronenmikroskopie

3.1.2.1. FeG

Die Partikel von FeG haben ein nadelförmiges bis ovales Erscheinungsbild. Der durchschnittliche geometrische Durchmesser liegt bei $3,93 \text{ nm} \pm 1,08$. FeG zeigt eine enge Größenverteilung mit Partikeln von 2-4 nm mit wenigen Ausreißern nach oben und unten. Partikel kommen selten vereinzelt vor, sondern finden sich in Clustern.

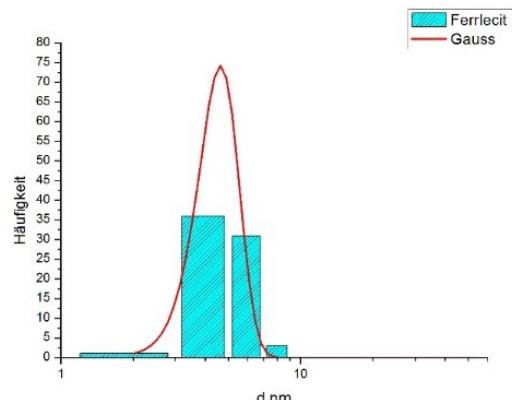


Abbildung 30: Größenverteilung FeG gemäß TEM. Gezeigt sind die absoluten Häufigkeiten der ausgezählten Partikel.

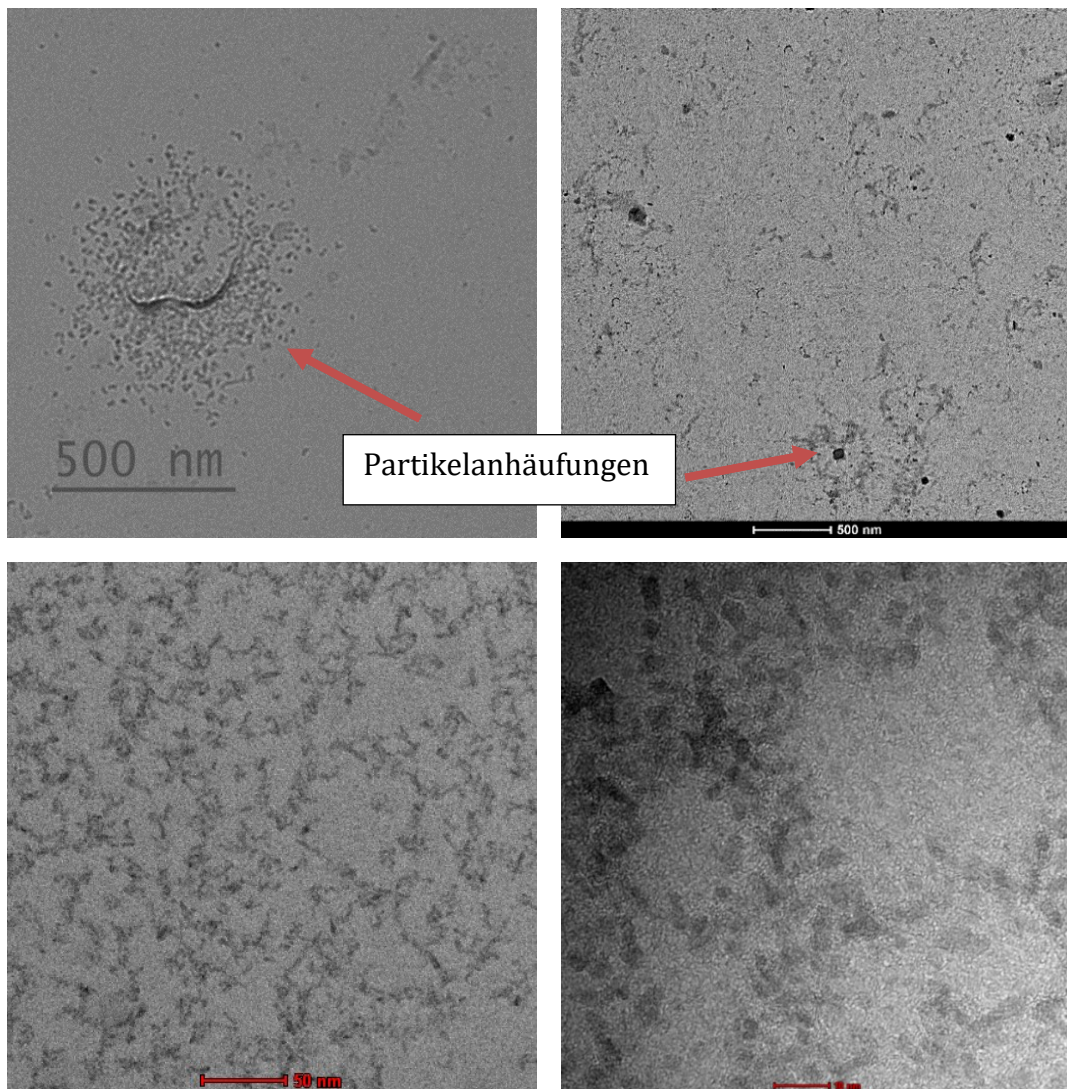


Abbildung 31: TEM-Aufnahmen FeG. Maßstab: oben 500 nm, links unten 50 nm, rechts unten 20 nm.

Ergebnisse

3.1.2.2. FeG_G

Auch bei FeG_G sammeln sich die Partikel in Clustern (vgl. 3.1.2.1). Die Partikelform ist nadelförmig bis oval. Der durchschnittliche Durchmesser beträgt $3,48 \text{ nm} \pm 0,93$. Die Größenverteilung ist eng und mit einer großen Fraktion von Partikeln mit einer Größe von 2-4 nm (siehe Abbildung 32). Es ist keine Tendenz zur Partikelaggregation erkennbar.

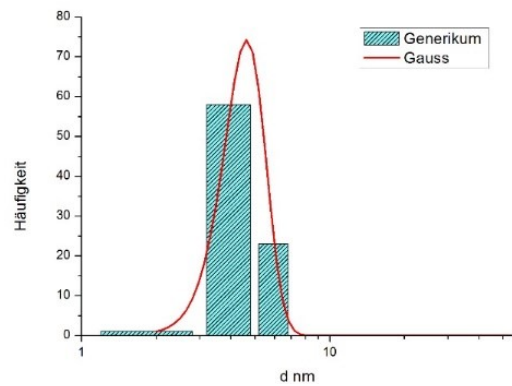


Abbildung 32: Größenverteilung FeG_G gemäß TEM. Gezeigt sind die absoluten Häufigkeiten der ausgezählten Partikel.

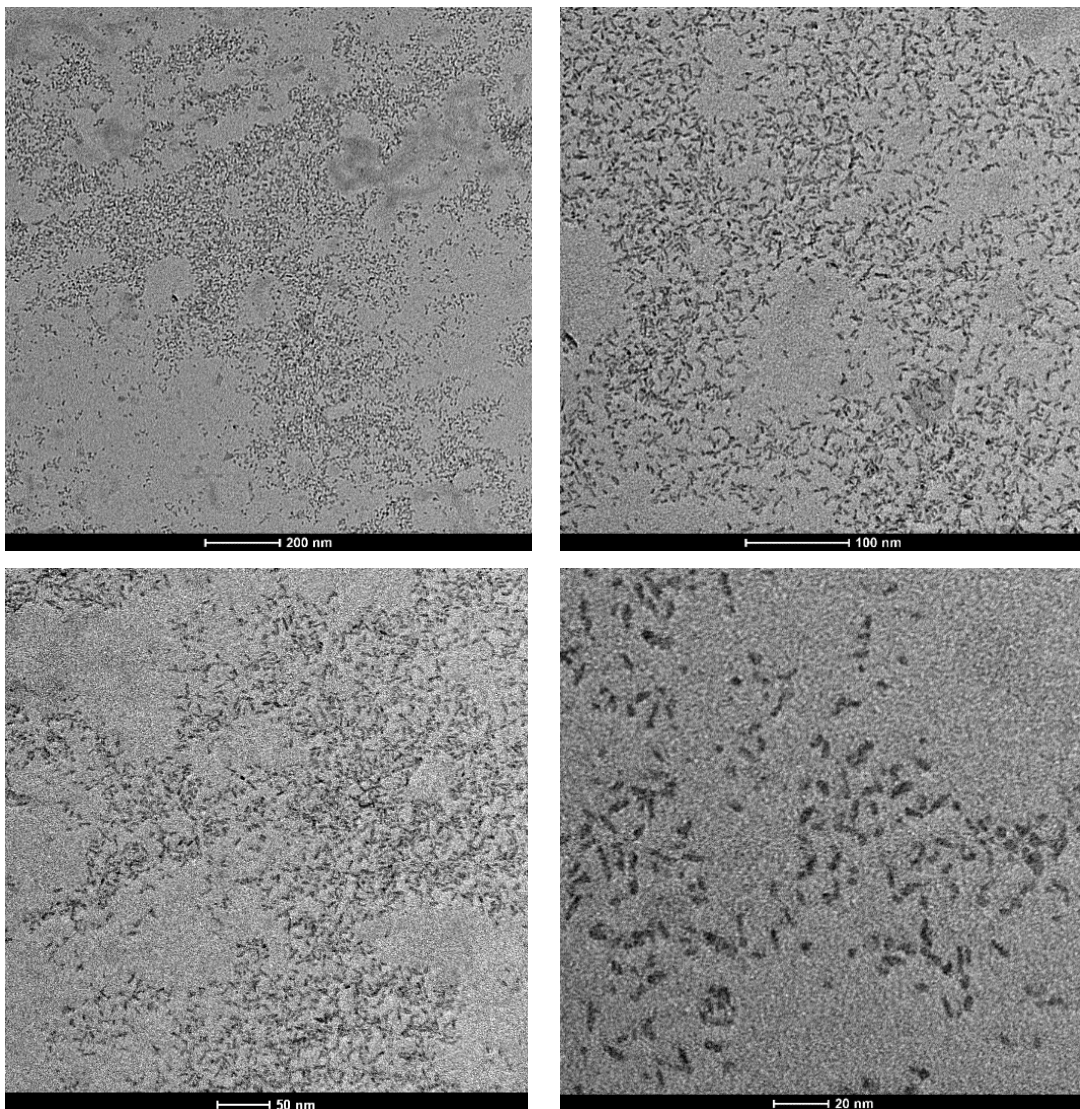


Abbildung 33: TEM-Aufnahmen FeG_G. Maßstab, von oben links nach unten rechts: 200 nm, 100 nm, 50 nm, 20 nm.

3.1.2.3. FeX

Die Partikel von FeX weisen eine runde bis ovale Form auf. Nadelförmige Partikel fehlen gänzlich. Die Abstände zwischen den einzelnen Partikeln sind gering, es zeigt sich aber keine Tendenz zur Agglomeration. Der durchschnittliche geometrische Durchmesser liegt bei $10.09 \text{ nm} \pm 3.86$. Das kleinste vermessene Partikel war 4.65 nm groß, das größte Partikel 21.12 nm .

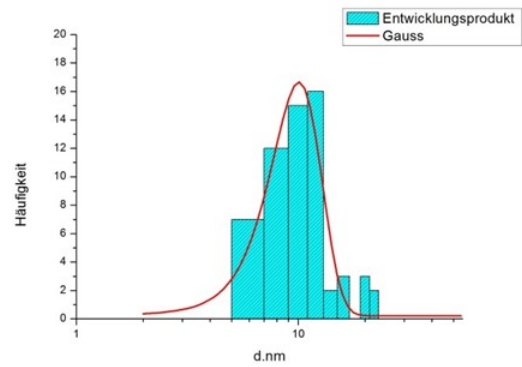


Abbildung 34: Größenverteilung FeX gemäß TEM. Gezeigt sind die absoluten Häufigkeiten der ausgezählten Partikel.

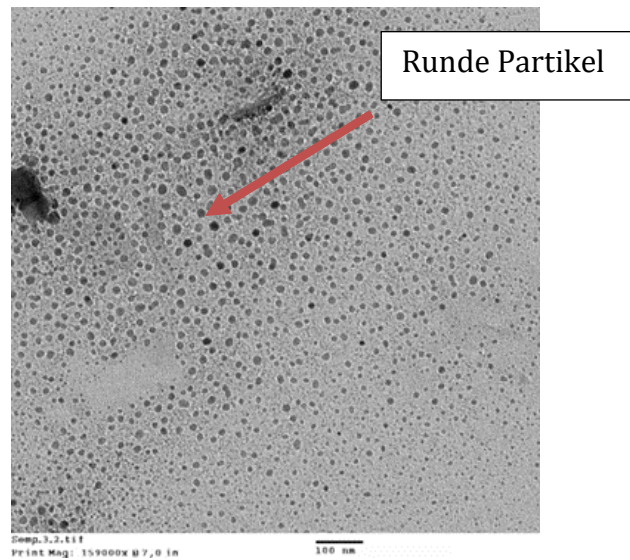
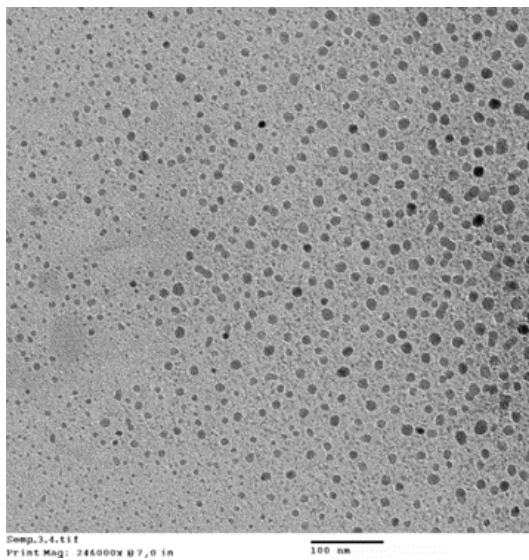


Abbildung 35: TEM-Aufnahmen FeX.
Maßstab: 100 nm.

3.1.2.4. FeIM

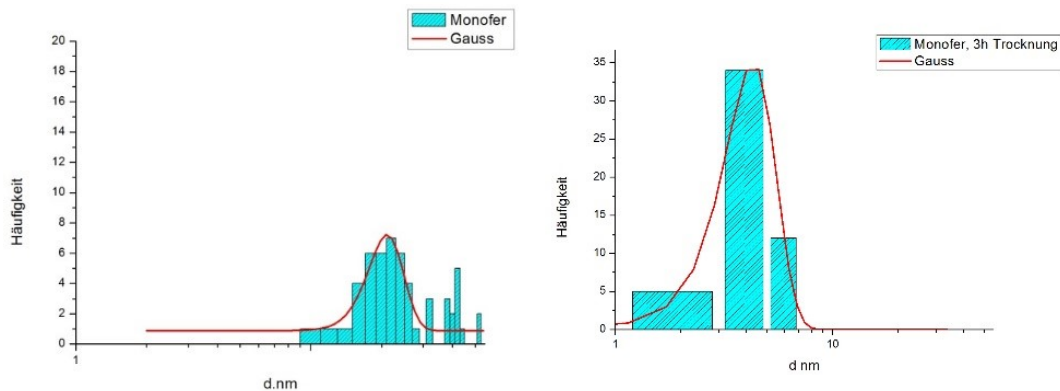


Abbildung 36: Größenverteilung von FeIM gemäß TEM. Gezeigt sind die absoluten Häufigkeiten der ausgezählten Partikel. Links: Trocknung über Nacht. Rechts: 3 h Trocknungszeit.

Der durchschnittliche geometrische Durchmesser von FeIM betrug $27,22 \text{ nm} \pm 13,71$. Das kleinste gemessene Partikel maß $8,04 \text{ nm}$, das Größte $75,03 \text{ nm}$. FeIM zeigte eine Tendenz zur Partikelagglomeration (siehe Abbildung 37). Die Größenverteilung war breit mit einigen Partikeln, die viel größer waren als der ermittelte Durchschnitt (vgl. Abbildung 36). Dies könnte auf eine Ostwald'sche Reifung während des Trocknungsprozesses zurückzuführen sein. Um dieses Verhalten näher zu untersuchen wurden weitere Messungen durchgeführt. Zum einen wurden die Proben nach einem kürzeren Trocknen von nur 3 h vermessen und zum anderen die Probenkonzentration bei gleichbleibender Trocknungszeit halbiert.

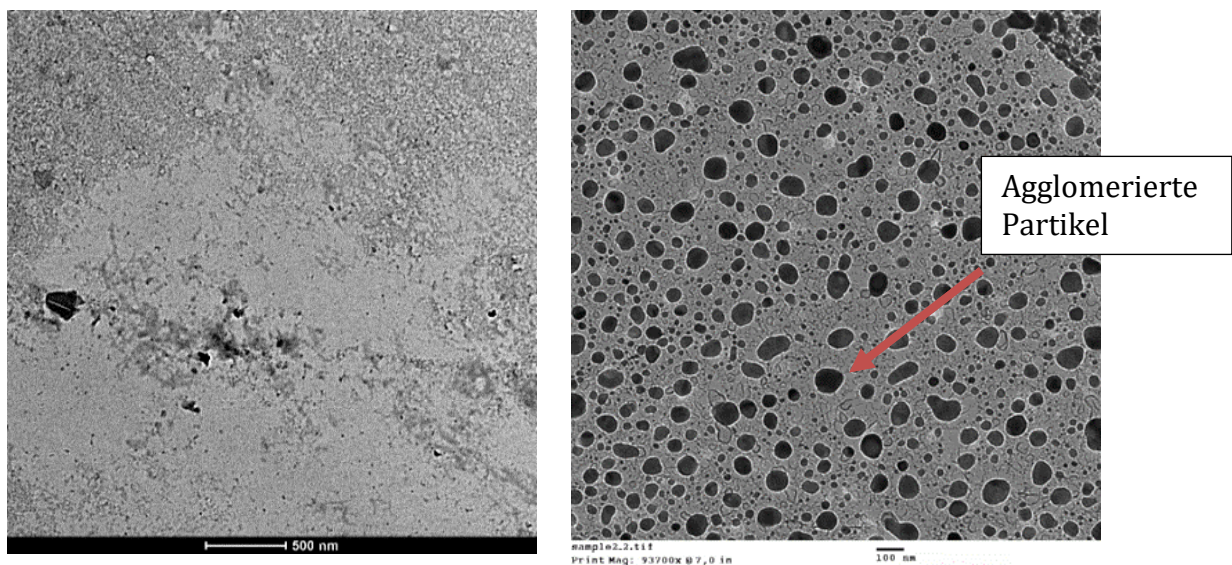


Abbildung 37: TEM Aufnahmen FeIM, Trocknung über Nacht. Maßstab: links 500 nm, rechts 100 nm. Die Aufnahme bei 500 nm zeigt eine punktuelle Partikelagglomeration. Die lange Trocknungszeit und die Menge aufgetragener Proben könnten hier entscheidende Faktoren sein.

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Bei einer reinen Reduktion der Probenkonzentration kam es ebenfalls zu Agglomerationserscheinungen. Es zeigte sich eine Anhäufung von Partikeln, welche jedoch im Gegensatz zu den agglomerierten Partikeln der höheren Konzentration noch nicht vollständig verschmolzen waren (siehe Abbildung 38). Bei der Wiederholungsmessung mit kürzerer Trocknungszeit wurde keine weitere Ostwald'sche Reifung beobachtet. Eine erneute Größenbestimmung ergab eine Durchschnittsgröße von $3,24 \text{ nm} \pm 0,96$. Diese Größe sollte der realen Partikelgröße näher kommen, da das Produkt selbst als thermodynamisch stabil angesehen werden kann (siehe auch Ergebnisse 3.1.3). Die Form nicht agglomerierter Partikel ist nadelförmig (siehe Abbildung 39). Vergrößerte Partikel wie in Abbildung 37 gezeigt, haben eine rundliche Form. Es ist davon auszugehen, dass dieser Formwechsel mit dem Kristallwachstum einhergeht.

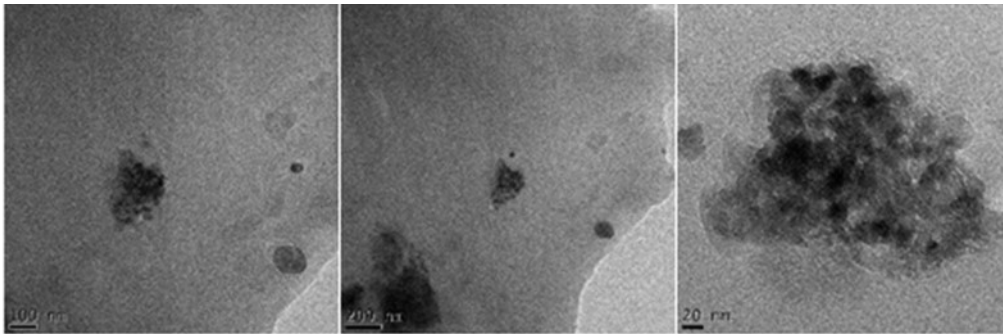


Abbildung 38: TEM-Aufnahmen FeIM. Trocknung über Nacht. Probenkonzentration 0,5 mg Fe/mL. Detailansicht Partikelanhäufung. Die angenäherten Partikel besitzen keine Nadelform mehr, sondern sind nun rundlich mit schwammiger Struktur. Ein Zusammenfließen ist erkennbar.

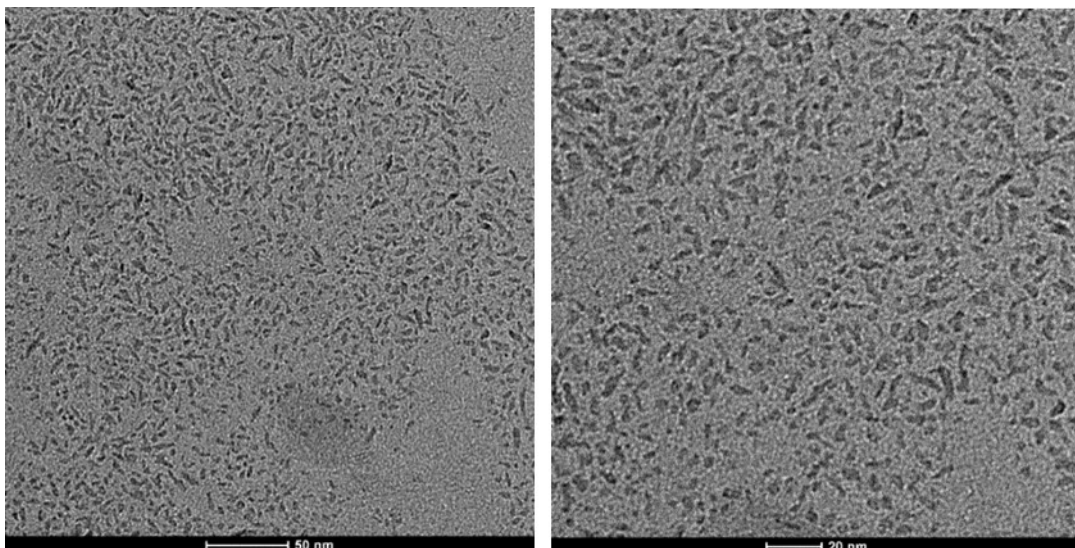


Abbildung 39: TEM-Aufnahmen FeIM nach drei-stündigem Trocknen. Keine erkennbaren Anzeichen von Ostwald-Reifung. Maßstab: links 50 nm, rechts 20 nm.

Ergebnisse

3.1.2.5. FeD_EU

FeD_EU zeigt eine breite Größenverteilung. Neben einer großen Fraktion von Partikeln mit einem Durchmesser von 7,61 nm bis 10 nm, sind mehrere Partikel mit einem Durchmesser von 10 bis 20 nm und vereinzelte Partikel über 20 nm sichtbar. Die durchschnittliche Partikelgröße beträgt 12,93 nm \pm 5,53. Das kleinste gemessene Partikel maß 7,61 nm, das größte 32,00 nm.

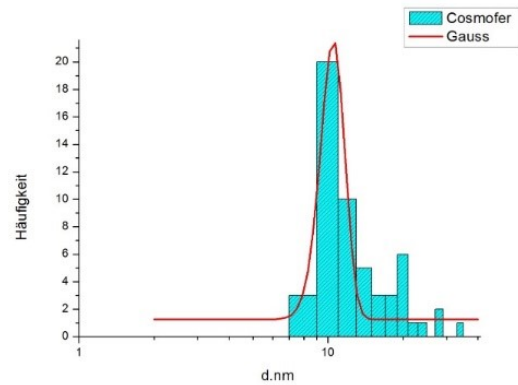


Abbildung 40: Größenverteilung von FeD_EU gemäß TEM. Gezeigt sind die absoluten Häufigkeiten der ausgezählten Partikel.

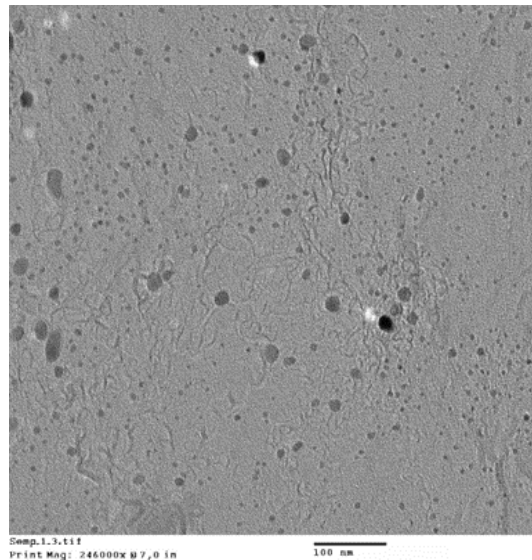
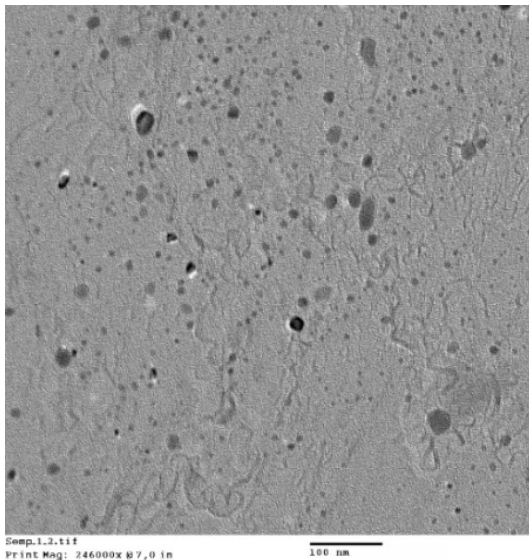


Abbildung 41: TEM-Aufnahmen FeD_EU. Die Partikel zeigen eine runde bis ovale Form. Maßstab: 100 nm.

3.1.2.6. FeD_USA

FeD_USA weist eine runde Form auf. Mit Ausnahme einiger größerer, überlappender Partikel, ist die Größenverteilung relativ homogen. Der durchschnittliche Durchmesser beträgt $8,92 \text{ nm} \pm 3,99$. Das kleinste Partikel hatte eine Größe von $4,25 \text{ nm}$, das Größte $17,86 \text{ nm}$ (überlappende Partikel wurden nicht berücksichtigt). Wie bei FeIM zeigte sich bei FeD_EU eine partielle Partikelagglomeration.

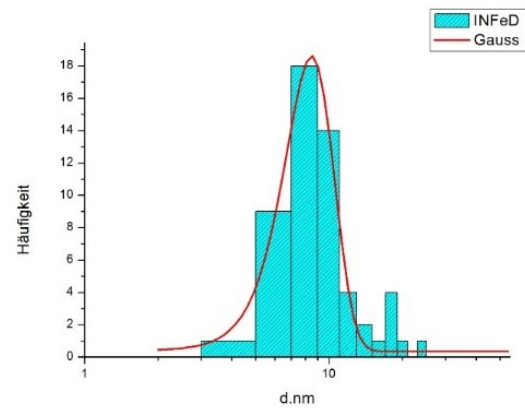


Abbildung 42: Größenverteilung FeD_USA gemäß TEM. Gezeigt sind die absoluten Häufigkeiten der ausgezählten Partikel.

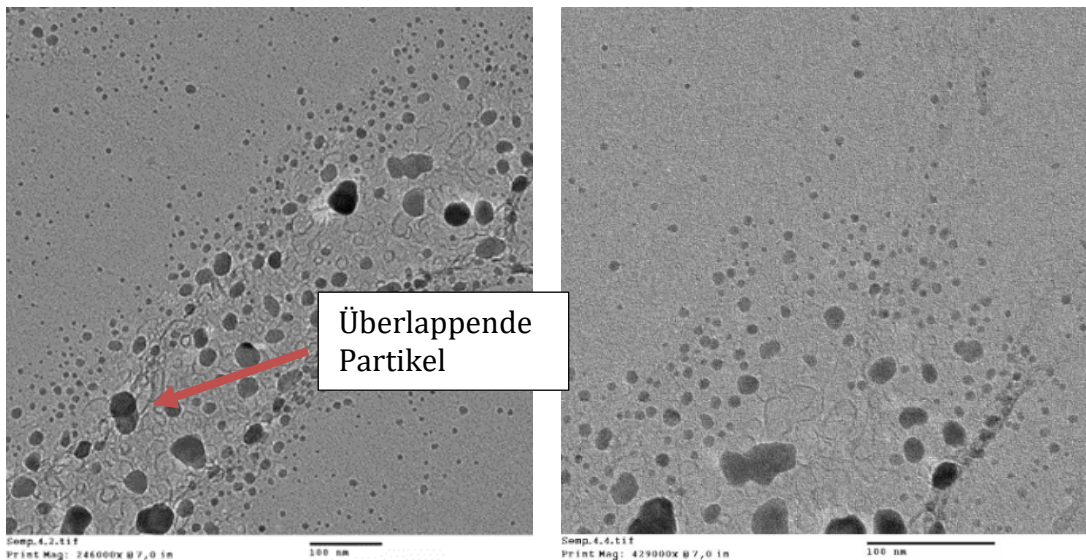


Abbildung 43: TEM-Aufnahmen FeD_USA. Maßstab: 100 nm. Stellenweise Plattenförmige Partikelagglomerationen.

Ergebnisse

3.1.2.7. FeOx

Die FeOx-Nanopartikel haben eine runde Form, es finden sich jedoch auch nadelförmige Partikel. Der ermittelte geometrische Durchmesser beträgt $8,75 \text{ nm} \pm 2,72$. Das kleinste gemessene Partikel maß $4,72 \text{ nm}$, das größte $14,26 \text{ nm}$.

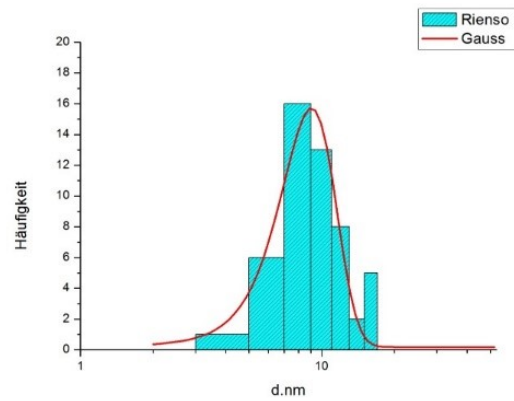


Abbildung 44: Größenverteilung FeOx gemäß TEM. Gezeigt sind die absoluten Häufigkeiten der ausgezählten Partikel.

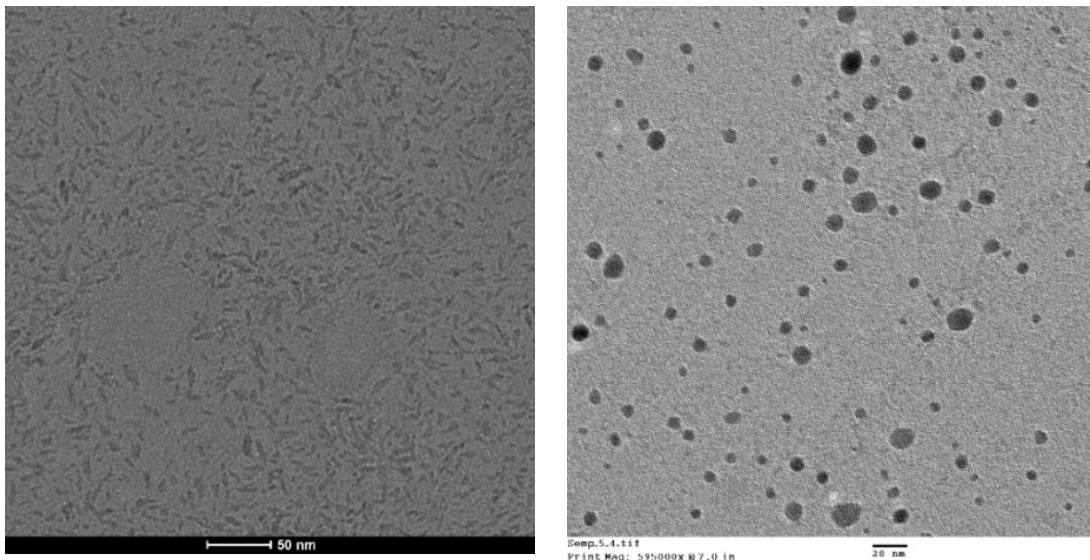


Abbildung 45: TEM-Aufnahmen FeOx Maßstab: links 50 nm, rechts 20 nm.

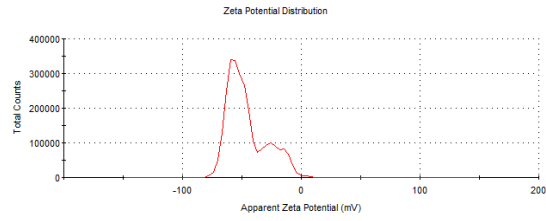
3.1.3. Zeta-Potential

Tabelle 14: Zeta-Potential der Eisenkomplexe ohne pH-Einstellung

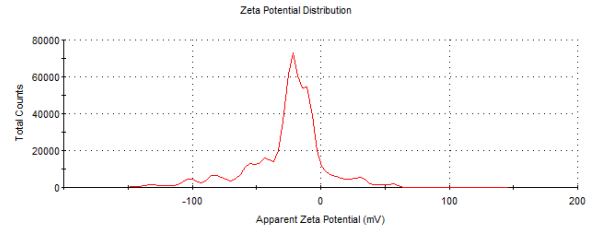
Produkt	pH	T [°C]	Zeta (ζ) [mV]	STABW
FeD_EU	5,63	25,0	-22,3	±1,02
FeIM	6,40	25,0	-26,2	±0,07
FeX	6,45	25,0	-25,1	±1,27
FeD_USA	6,33	25,0	-24,0	±3,25
FeOx	7,83	25,0	-57,6	±0,424
FeG	7,96	25,0	-39,9	±1,19
FeG_G	7,84	25,0	-39,4	±3,93

Alle untersuchten Präparate weisen ein negatives Zeta-Potential auf (siehe Tabelle 14). Die Qualität der ermittelten Ergebnisse schwankte stark zwischen den Präparaten, und nicht immer war es möglich eine unimodale Verteilung zu erlangen (siehe Abbildung 45). Besonders zeigte sich dies bei den Eisengluconaten. Mit -57,6 mV zeigt FeOx das größte und FeD_EU mit -22,3 mV das kleinste Zeta-Potential. Die abnehmende Reihenfolge des gemessenen Potentials ist FeOx >> FeG \approx FeG_G > FeIM \approx FeX > FeD_USA > FeD_EU. Der pH-Wert der Verdünnungen wurde nicht eingestellt, sondern der Wert beibehalten, der aus einer Verdünnung der Präparate mit Wasser resultiert. Die Formulierungen der Eisenpräparate enthalten teilweise Hilfsstoffe zur Einstellung des pH-Wertes (siehe Tabelle 45). Aus den Eisenkomplexen selbst und den formulierungsbedingten Zusätzen resultierten pH-Werte von 5,63 bis 7,96 (siehe Tabelle 14). Zeta-Potentiale sind abhängig vom pH-Wert der Lösung. Ergebnisse, welche bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelt wurden sind nicht direkt miteinander vergleichbar. Die oben genannte Reihenfolge ist jedoch repräsentativ für die Stabilität der Präparate zum Zeitpunkt der Injektion. Nanopartikel mit einem Zeta-Potential > + 25 mV oder > - 25 mV werden gemäß der DLVO-Theorie als thermodynamisch stabil erachtet. Mit Ausnahme der Eisendextrane trifft dies auf alle untersuchten Präparate zu. Dennoch können auch die Dextranskomplexe als stabil angesehen werden. Hier greift ein zusätzliches Prinzip der Kolloidstabilisierung, welches nicht von der DLVO-Theorie abgedeckt wird: Die *sterische Abstoßung*. Durch voluminöse Polymere, die auf der Oberfläche der Nanopartikel adsorbiert sind, wird das Zusammenstoßen von Partikeln erschwert und sie erfahren eine zusätzliche Stabilisierung. Dieses Phänomen trifft ebenfalls auf FeOx, FeX und FeIM zu.

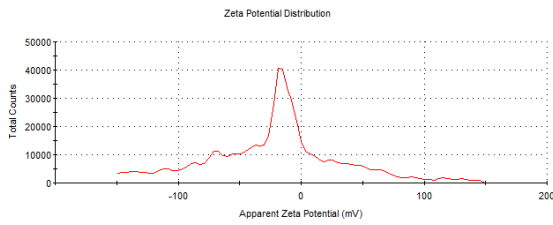
Ergebnisse



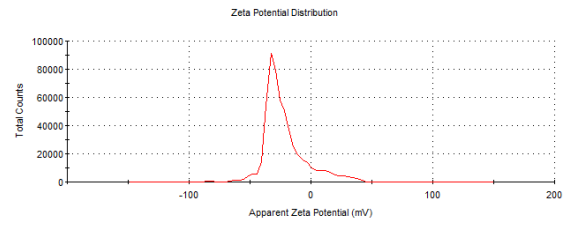
FeD_EU



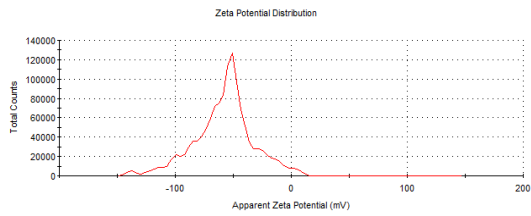
FeIM



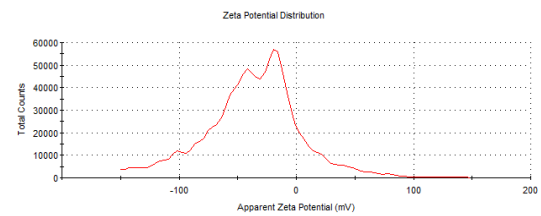
FeX



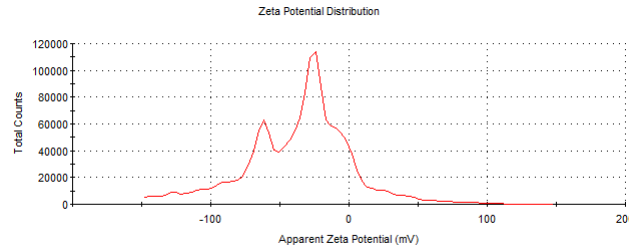
FeD_USA



FeOx



FeG



FeG_G

Abbildung 46: Verteilung des Zeta-Potentials. Die Peaks von FeG und FeG_G sind nicht unimodal. X-Achse: Zeta-Potential. Y-Achse: Anzahl gemessene Signale.

3.1.4. Diskussion Größe und Zeta-Potential

Tabelle 15: Vergleich Größenergebnisse DLS und TEM

Produkt	FeD_EU	FeIM	FeX	FeD_USA	FeOx	FeG	FeG_G
Größe TEM	12,93 nm ± 5,53	3,24 nm ± 0,96	10,09 nm ± 3,86	8,92 nm ± 3,99	8,75 nm ± 2,72	3,93 nm ± 1,08	3,48 nm ± 0,93
DLS (z-average)	14,81 nm ± 0,13	12,16 nm ± 0,03	9,051 nm ± 0,04	14,16 nm ± 0,08	29,48 nm ± 0,09	16,29 nm ± 0,12	10,14 nm ± 0,09

Mit Ausnahme von FeX war der hydrodynamische (DLS) Durchmesser aller Präparate größer als der geometrische (TEM). Dies ist darauf zurückzuführen, dass beim hydrodynamischen Durchmesser sowohl der Eisenkern als auch die Kohlenhydrathülle des Komplexes erfasst wird, während bei der Größenbestimmung mittels TEM nur der Eisenkern erfasst wird. Einige der Präparate zeigten eine Tendenz zur Partikelagglomeration während der Trocknungsphase (vgl. 3.1.2). Besonders ausgeprägt war dies bei FeIM, so dass hier mit kürzeren Trocknungszeiten gearbeitet werden musste (siehe 3.1.2.4). Bei FeD_EU, FeD_USA und FeX kamen ebenfalls gehäuft größere Partikel vor. Die kleinsten Partikel lagen bei diesen Präparaten bei 4 nm. Es ist wahrscheinlich, dass die eigentliche Kerngröße in dieser Größenordnung liegt. Ebenfalls ist davon auszugehen, dass sich die Form der Partikel während des Partikelwachstums ändert. So zeigten die Partikel von FeIM nach drei Stunden eine nadelförmige Struktur, während des Partikelwachstums gingen diese jedoch in eine immer kugelförmigere Gestalt über. Dies zeigte sich besonders gut bei den Aufnahmen die mit niedrigeren Konzentrationen von nur 0,5 mg Fe/mL aufgenommen wurden. Hier war das Partikelwachstum noch nicht vollständig abgeschlossen. Die Partikel hatten sich jedoch bereits sehr stark angenähert und ihre Form war deutlich verbreitert und von schwammiger Natur. Es ist annehmbar, dass die Partikel bei niedrigeren Konzentrationen zunächst mit größeren Abständen über das Probennetzchen verteilt vorlagen. Eine Partikelannäherung und ein anschließendes Kristallwachstum könnte daher verzögert stattgefunden haben. Eine Möglichkeit ein Partikelwachstum zu umgehen wäre das Arbeiten mit cyro-TEM oder sehr kurzen Trocknungszeiten von unter 3 h (siehe Ergebnisse 3.1.2.4). Niedrigere Proben-Konzentrationen verzögern nur das Wachstum und haben zusätzlich den Nachteil, dass nur wenige Partikel pro Aufnahme abgebildet werden können. Wu et. al untersuchten in einer vergleichenden Arbeit die Partikelgröße von parenteralen Eisenkomplexen mittels TEM bei Raumtemperatur und bei

Temperaturen von -175°C (163). Bei Raumtemperatur zeigten alle untersuchten Präparate (FeG, FeS, FeD_USA, FeIM) eine Tendenz zur Agglomeration. Bei den cryo-TEM-Aufnahmen war dies nicht der Fall und die ermittelte Kerngröße aller Präparate lag im Bereich von 2 nm. Zur Bestimmung der Kerngröße scheint das Arbeiten mit cryo-TEM daher Vorteile zu bieten.

3.2. Strukturanalyse

3.2.1. Morphologie des Eisenkerns

3.2.2.1. Mößbauer-Spektroskopie

Bei 293 K zeigen die Eisenkerne von FeD_EU, FeD_USA, FeX und FeIM ein identisches Verhalten (vgl. Abbildung 47). Die chemische Verschiebung beträgt $0,359\text{ mm/s}$ (weitere Parameter siehe Tabelle 16). Ein Abgleich mit der Software deutet auf eine Modifikation von FeOOH hin. Weder Goethit (α -), Akaganeit (β -) noch Lepidokrokit (γ -FeOOH) zeigen bei 273 K magnetisches Verhalten (164). Eine eindeutige Unterscheidung bei Raumtemperatur ist daher alleine auf Grundlage der Spektren nicht möglich.

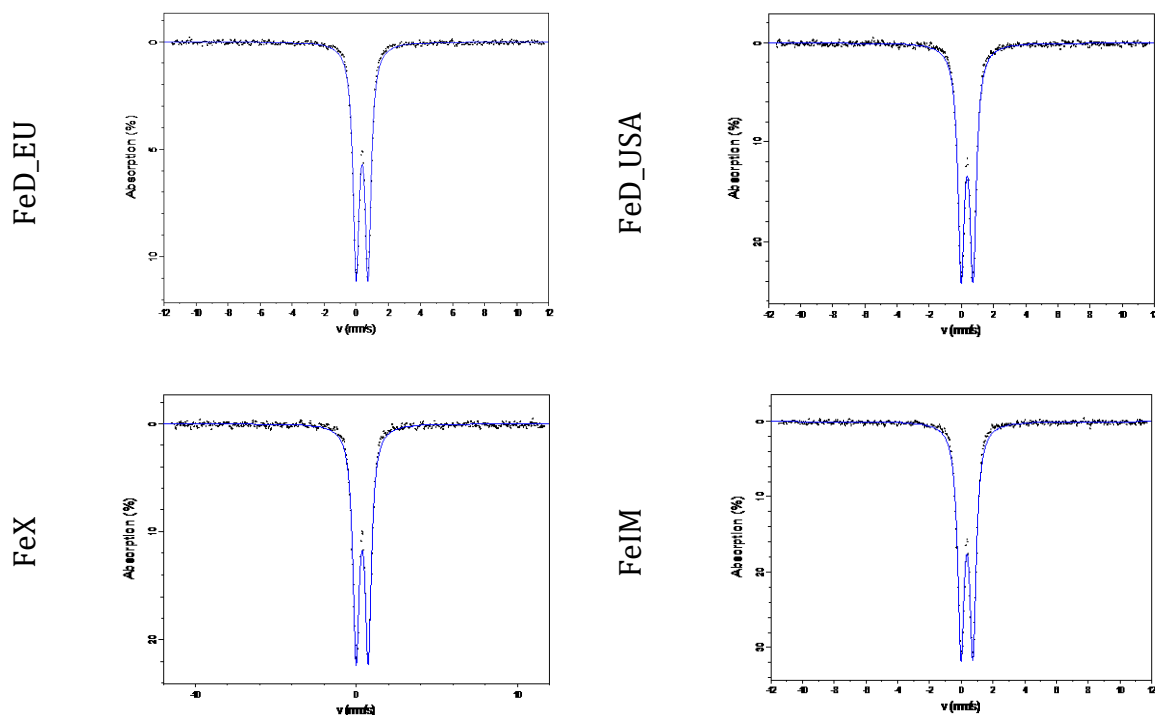


Abbildung 47: Mößbauer-Spektren von FeD_EU, FeD_USA, FeX und FeIM bei 293 K. Alle Präparate enthalten die gleiche Modifikation von FeOOH. Es sind keine Anzeichen für magnetisches Verhalten erkennbar.

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

FeOx zeigt bereits bei Raumtemperatur (273 K) eine magnetische Aufspaltung (vgl. Abbildung 48). Bei 70 K wies das Spektrum die Form eines Sextettes auf. Am ehesten passte das gefittete Spektrum zu Akaganeit. FeG und FeG_G zeigen eine verbreitete Linienweite, welche auf eine amorphe Form hindeutet. Bei 5 K zeigt sowohl FeG als auch FeG_G eine Aufspaltung in ein Sextett. Beide Produkte konnten bei Heliumtemperatur als Lepidocrocite identifiziert werden.

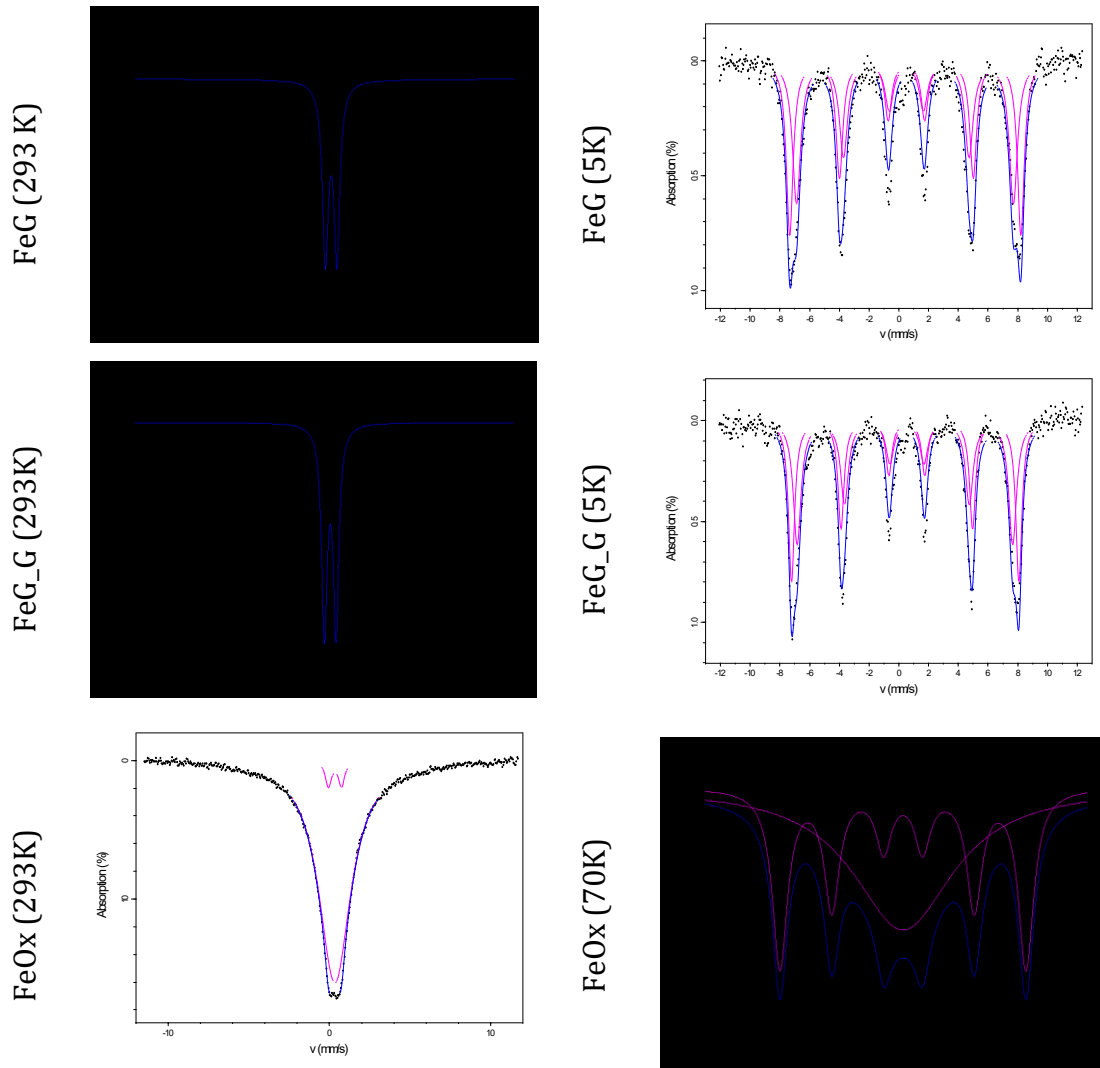


Abbildung 48: Mößbauer-Spektren von FeG, FeG_G und FeOx bei unterschiedlichen Temperaturen. FeG und FeG_G zeigen bei Raumtemperatur noch keine magnetischen Eigenschaften. Bei Helium Temperatur findet eine magnetische Aufspaltung statt. FeOx zeigt sowohl bei 293 K als auch bei 70 K eine magnetische Aufspaltung.

Ergebnisse

Tabelle 16: Detaillierergebnisse Mößbauer-Spektroskopie bei unterschiedlichen Temperaturen

Produkt	Temperatur	Signal	Chemische Verschiebung [mm/s]	Quadruple splitting Δ [mm/s]	Magnetische Feldstärke [kOe]
FeD_EU	293 K	Doublet	0,3592	0,7367	-
FeIM	293 K	Doublet	0,3595	0,7508	-
FeX	293 K	Doublet	0,3594	0,7524	-
FeD_USA	293 K	Doublet	0,3594	0,7382	-
FeOx	293 K	Singlet	0,3316	-	-
		Doublet	0,3333	0,755	-
	70 K	Seite 1	0,421	-	478,1
		Seite 2	0,421	-	478,07
FeG	293 K	Doublet	0,3591	0,7197	
	5 K	Sextett 1	0,455	-	452,3
		Sextett 2	0,469	-	482,1
FeG_G	293 K	Doublet	0,0,3624	0,731	-
	5 K	Sextett 1	0,473	-	449,5
		Sextett 2	0,4808	-	474,1

3.2.1.1. Pulverröntgendiffraktometrie

FeD_EU, FeD_USA, FeX und FeIM

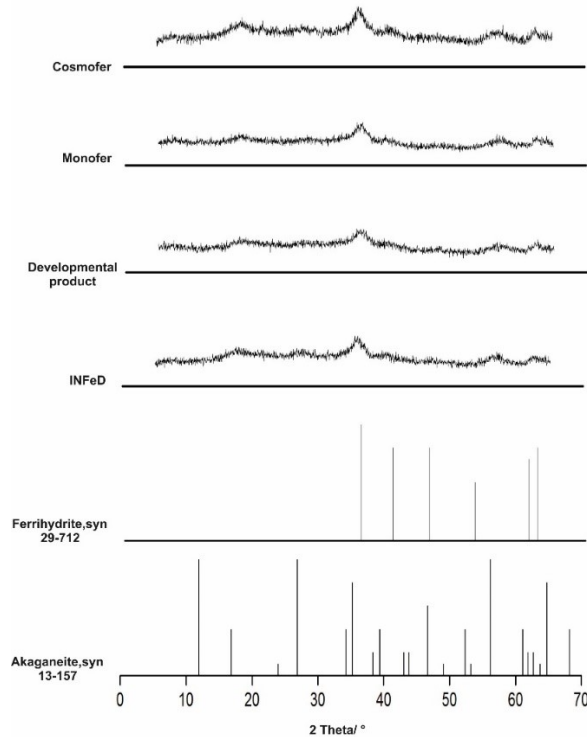


Abbildung 49: Vergleich XRPD-Spektren von FeD_EU, FeIM, FeX und FeD-USA mit den ICDD-Referenzspektren von Ferrihydrat (Nr. 29-712) und Akaganeit (Nr. 13-157).

Die Diffraktogramme von FeD_EU, FeIM, FeX und FeD_USA zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung. Alle Diffraktogramme weisen verbreiterte Peaks auf, was für eine kleine Kristallgröße und/oder eine amorphe Gestalt der Proben spricht. Erkennbare Maxima befinden sich bei allen Präparaten im Bereich von 15, 35, 55 und 65 2-Theta. Diese Maxima zeigen die höchste Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum von Akaganeit, im Bereich 30-65 2-Theta zeigen sich jedoch auch Ähnlichkeiten mit Ferrihydrat. Ferrihydrat zeigt jedoch erst eine Röntgenbeugung ab 35 2-Theta. Die Proben wurden daher als Akaganeit identifiziert.

Ergebnisse

FeOx

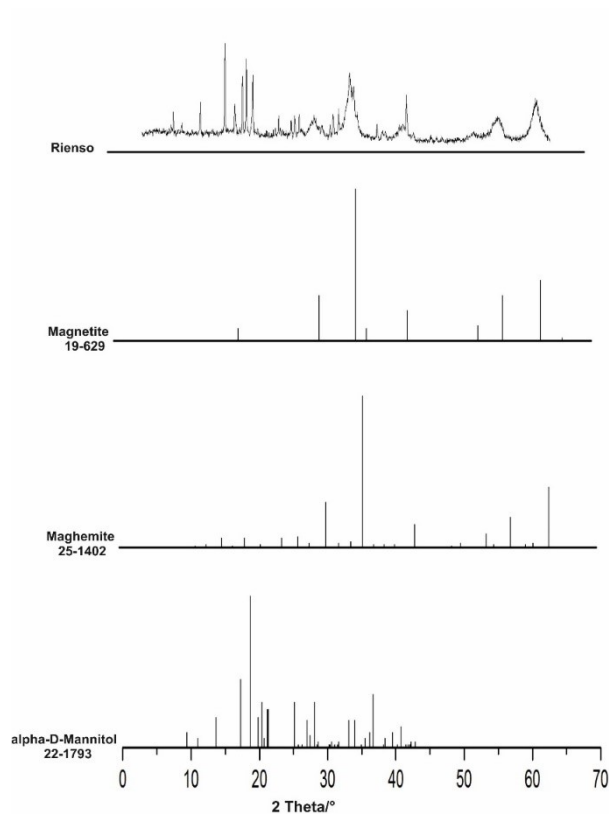


Abbildung 50: XRPD-Spektrum von FeOx im Vergleich zu Referenzspektren von Magnetit (Nr.19-629), Maghemit (ICDD Nr.25-1402) und alpha-Mannitol (ICDD Nr. 22-1793) aus der ICDD Datenbank.

Im Diffraktogramm von FeOx stechen besonders die scharfen Peaks bei 0-30 2-Theta hervor. Diese zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Röntgendiffraktogramm von α -D-Mannitol (vgl. Abbildung 50). Ab ca. 30 2-Theta werden die Peaks zunehmend breiter. Dies ist typisch für Proben mit Kristallgrößen $<100\text{nm}$ und/ oder amorpher Gestalt (siehe auch 2.1.1.2 Röntgenpulverdiffraktometrie). Der Eisenkern von FeOx zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Referenzdiffraktogrammen von Magnetit und Maghemit. Sowohl Magnetit als auch Maghemit haben ihre intensivsten Peaks bei 35, 56 und 62 2-Theta. FeOx zeigt hier ebenfalls Peaks, welche jedoch deutlich breiter sind als die der Referenzen. Kleinere Unterschiede zwischen Magnetit und Maghemit zeigen sich in der Region von 37-60 2-Theta. Hier hat das Diffraktogramm von Magnetit einen zusätzlichen Peak bei 37 2-Theta und einige Signale der beiden Oxide sind minimal verschoben. Auf Grund der verbreiterten Probenpeaks von FeOx ist eine Feindifferenzierung zwischen Magnetit und Maghemit nicht möglich.

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

FeG und FeG_G

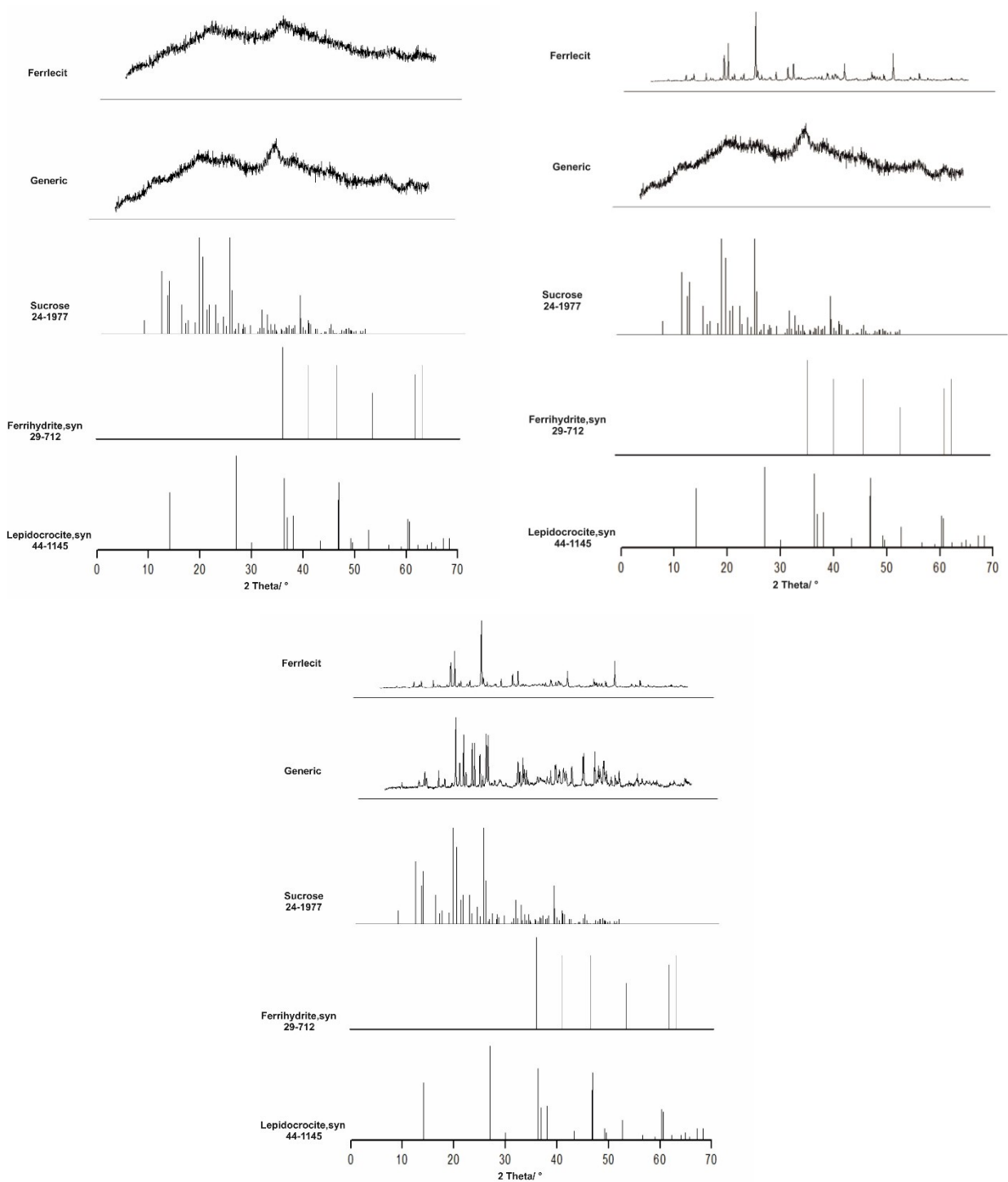


Abbildung 51 Röntgendiffraktogramme von FeG und FeG_G bei unterschiedlicher Trocknungszeit in gepulverten und ungepulverten Zustand. Oben links: 3 Tage Trocknungszeit, ungepulvert. Oben rechts: 7 Tage Trocknungszeit, gepulvert. Unten: 7 Tage Trocknungszeit, ungepulvert.

Ergebnisse

FeG und FeG_G zeigten ein sehr langsames Trocknungsverhalten. Nach drei Tagen wiesen die Proben eine zähflüssige, glasartige Konsistenz auf. Ein Verreiben mit einem Mörser war nicht möglich. Die Diffraktogramme von FeG und FeG_G nach dreitägiger Trocknungszeit zeigen Maxima im Bereich 20 und 35 2-Theta auf. Eine zufriedenstellende Zuordnung zu Referenzen der ICDD-Datenbank war nicht möglich. Es zeigen sich gering-

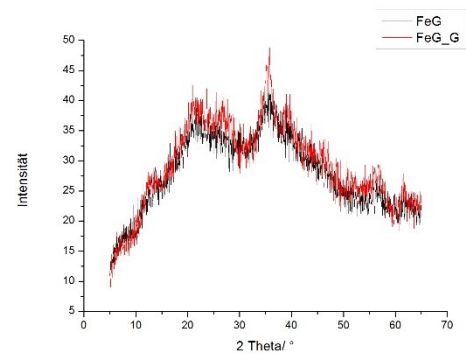


Abbildung 52: Diffraktogramm von FeG und FeG_G nach dreitägiger Trocknung im ungepulverten Zustand.

füchtige Überstimmungen zu den charakteristischen Signalen von Sucrose, Ferrihydrit und Lepidocrocite. Zwischen den Diffraktogrammen von FeG und FeG_G ist nahezu kein Unterschied erkennbar (siehe Abbildung 52). Lediglich bei 35 2-Theta ist die Signalintensität von FeG_G höher. Mögliche Ursache hierfür könnte ein unterschiedlicher Grad der Kristallisation bei den noch nicht vollständig getrockneten Proben sein. Nach sieben Tagen war die Trocknung von FeG und FeG_G vollständig abgeschlossen. Die Diffraktogramme der gepulverten Proben weisen scharfe Peaks mit zwei Maxima bei 19,6 und 24,8 2-Theta auf. Der Abgleich mit den Referenzspektren der ICDD zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit Sucrose (vgl. Abbildung 51, oben rechts). Auf Grund der sehr starken Sucrose-Signale werden mögliche Peaks des Eisenkerns im Bereich von 0-40 2-Theta überlagert. Um die Sucrose-Signale zu dämpfen, wurde zusätzlich eine ungepulverte Probe vermessen. Im Diffraktogramm der ungepulverten Proben zeigen sich Peaks welche bei den gepulverten Proben nicht sichtbar waren (vgl. Abbildung 51). Eine Kombination aller Spektren lässt auf Ferrihydrit (F) oder Lepidocrocite (L) als mögliche Modifikation des Eisenkerns von FeG und FeG_G schließen. Hierfür sprechen die Peaks bei 27(L), 36(L), 40(F) und 46(F, L) 2-Theta, welche sich sowohl bei FeG als auch FeG_G finden.

3.2.1.2. Struktur des Eisenkernes Diskussion

Die Ergebnisse der Mößbauer-Spektroskopie und XRPD allein waren nicht in allen Fällen ausreichend, um eine fundierte Aussage über die Morphologie der Eisenkerne treffen zu können. Daher wurden die Ergebnisse der beiden Methoden kombiniert. Bis auf FeOx konnte auf diese Weise das Oxid des Eisenkerns identifiziert werden. Tabelle 17 fasst die Ergebnisse zusammen. Der Eisenkern von FeD_EU, FeIM, FeX und FeD_USA wurde als Akaganeit identifiziert. Dieses Ergebnis ist kohärent mit bereits veröffentlichten Strukturuntersuchungen von FeD_EU, FeD_USA und FeIM (97, 98). FeOx wurde ursprünglich in den USA als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie entwickelt, bevor auch ein Einsatz zur Eisensupplementierung ins Auge gefasst wurde (165). Die ursprüngliche Indikation spiegelt sich deutlich in den Mößbauer-Spektren wieder. Hier zeigte FeOx ein deutliches magnetisches Verhalten. Trotz zusätzlicher XRPD-Aufnahmen war jedoch keine Unterscheidung zwischen Magnetit und Maghemit möglich. In einer anderen Arbeit konnte FeOx jedoch mittels *Selected area diffraction*, einer mit TEM kombinierten Röntgenbeugungsmethode, als Magnetit identifiziert werden (98). Eine abschließende morphologische Untersuchung des Eisenkerns von FeG und FeG_G war bei Raumtemperatur nicht möglich. Es konnte nicht zwischen Lepidocrocite und Ferrihydrit unterschieden werden. Das Arbeiten bei Temperaturen von 5 K und die damit verbundene Abnahme an möglichen Schwingungen des Kristallgitters ermöglichte die Aufnahme eines Mößbauer-Spektrums welches eindeutig als Lepidocrocite identifiziert werden konnte.

Tabelle 17: Übersicht der morphologischen Ergebnisse

Produkt	Mößbauer	XRPD	Kombiniertes Ergebnis
FeD_EU	293 K: Keine Differenzierung zwischen α -, β -, γ -FeOOH möglich. Bei RT keine magnetischen Eigenschaften vorhanden	Akaganeit	Akaganeit
FeIM		Akaganeit	Akaganeit
FeX		Akaganeit	Akaganeit
FeD_USA		Akaganeit	Akaganeit
FeOx	293 K: kein Ergebnis 70 K: Akaganeit	Magnetit/ Maghemit	Magnetit/ Maghemit
FeG	293 K: Lepidocrocite / Ferrihydrit 5 K:Lepidocrocite	Lepidocrocite/ Ferrihydrit	Lepidocrocite
FeG_G	293 K: Lepidocrocite / Ferrihydrit 5 K: Lepidocrocite	Lepidocrocite/ Ferrihydrit	Lepidocrocite

3.2.2. IR-Spektroskopie

Für eine bessere Auswertbarkeit wurden die untersuchten Präparate in Abhängigkeit ihrer Kohlenhydratkomponenten in zwei Gruppen aufgeteilt. Aussagen über die Modifikationen der Eisenkerne sind auf Grund der intensiven Absorptionsbanden der Kohlenhydrathüllen nicht möglich.

3.2.2.2. Niedermolekulare Dextrane und Derisomaltose

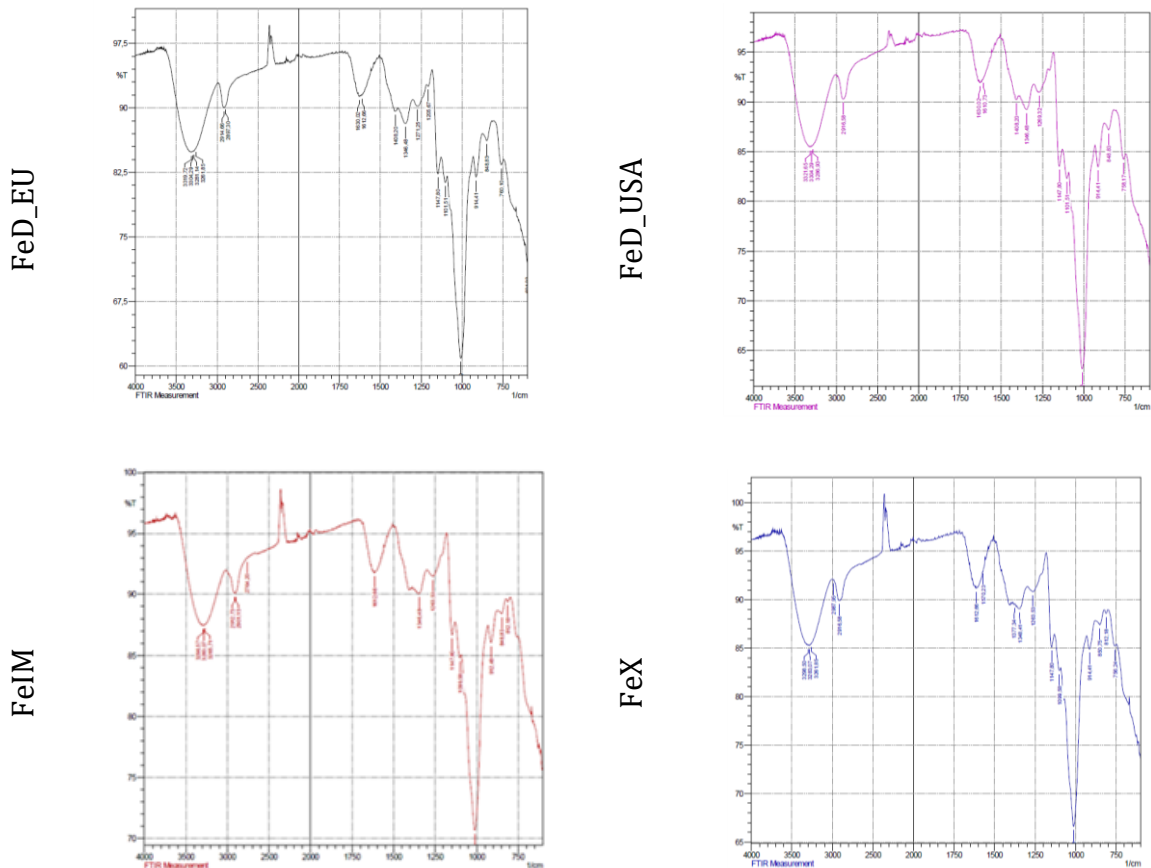


Abbildung 53: FTIR-Spektren von FeD_EU, FeD_USA, FeIM und FeX. Details siehe Text.

FeD_EU und FeD_USA enthalten niedermolekulares Dextran als Kohlenhydratkomponente. FeIM enthält Derisomaltose und bei FeX wurde seitens des Herstellers die Angabe gemacht, dass es sich um ein zu Derisomaltose verwandtes Kohlenhydrat handelt. Gemäß IUPAC-Definition sind Dextrane verzweigt-kettige poly- α -D-Glykoside mikrobieller Herkunft mit vornehmlicher C-1 \rightarrow C-6 Verknüpfung (166). Derisomaltose hingegen ist eine lineare, unverzweigte Verbindung von C-1 \rightarrow C-6-verknüpfter Glucose und somit kein Dextran (97). Durch Glucose als gemeinsames Strukturmerkmal, sind die Spektren von

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

FeD_EU, FeD_USA, FeX und FeIM sehr ähnlich (siehe Abbildung 53). Sie zeigen eine breite Bande bei 3400-3300 cm^{-1} mit einer Transmission von ungefähr 85%, welche auf Valenzschwingungen von OH-Gruppen zurückzuführen sind. Die stark ausgeprägte Bande bei 1000 cm^{-1} ist charakteristisch für C-O Schwingungen alkoholischer Gruppen, die Absorptionsbande bei 2900 cm^{-1} ist ein Hinweis auf sekundäre Alkohole. Im

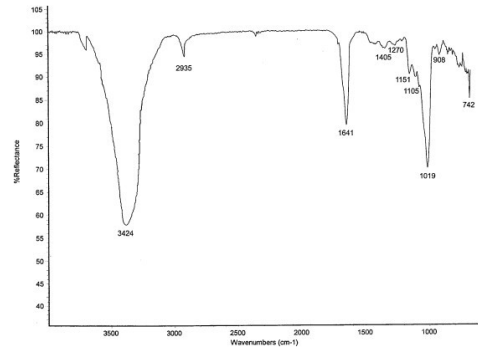


Abbildung 54: FTIR-Spektrum von Dextran. Entnommen aus (168).

Bereich von 950-650 cm^{-1} finden sich Banden, die Aufschluss über die Konformation der Polysaccharide geben. Die Banden zwischen 914-912 cm^{-1} zeigen eine axiale CH-Bindung, die Banden zwischen 850-848 cm^{-1} deuten auf eine äquatoriale CH-Bindung hin (167). Zwischen den Spektren von FeD_EU und FeD_USA sind keine Unterschiede feststellbar. Sie zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem FTIR-Spektrum vom Bakterium *Weissella cibaria* CMGDEX3 synthetisierten Dextran (vgl. Abbildung 54) (168). Die Unterschiede zwischen den Spektren der Dextran-basierten Präparate und den Derisomaltose-basierten Präparaten sind nur marginal. FeX und FeIM zeigen im Spektrum bei 812 cm^{-1} eine Absorptionsbande, die bei FeD-EU und FE_USA im Spektrum nicht vorhanden ist. Diese Bande ist ebenfalls nicht beim FTIR-Spektrum des Dextrans von *W. cibaria* sichtbar.

3.2.2.3. Glukose und Polyglucose-Sorbitol-Carboxymethylether

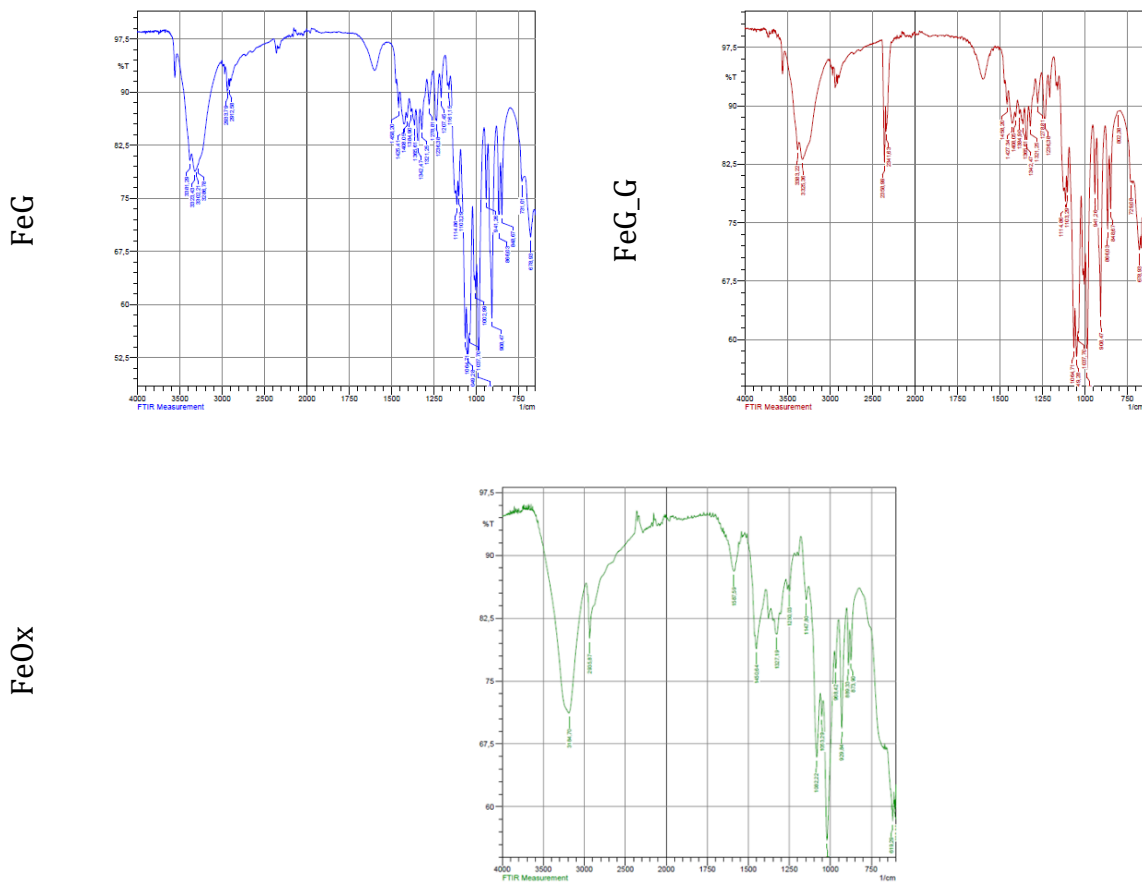


Abbildung 55: FTIR-Spektren von FeG, FeG_G und FeOx. Details siehe Text.

Die Spektren von FeG und FeG_G zeigen keine qualitativen Unterschiede. Der zusätzliche Peak bei 2300 cm^{-1} im Spektrum von FeG_G ist auf ein Signal von CO_2 aus der Messtechnik zurückzuführen.

Das Probenmaterial von FeG_G war nicht mehr ausreichend um eine Wiederholungsmessung durchzuführen. Beim Spektrum von FeG ist das CO_2 -Signal nur geringfügig wahrnehmbar. Die Lage der Absorptionsbanden beider Präparate ist deckungsgleich mit dem FTIR-Spektrum von reiner Glucose (vgl. Abbildung 56).

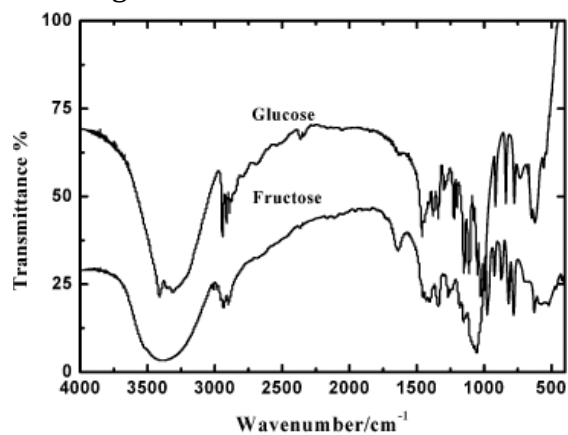


Abbildung 56: FTIR-Spektren von Glucose und Fructose. Entnommen aus (169).

Gemäß der Produktmonographie von Feraheme® (Handelsname in den USA) handelt es sich bei der Kohlenhydratkomponente von FeOx um einen Polyglucose-Sorbitol-Carboxymethylether mit der Summenformel $\text{C}_{400}\text{H}_{638}\text{O}_{339}\text{Na}_{14}$ (170).

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Sorbitol ist eine reduzierte Polyolform von Glucose (vgl. Fischerprojektionen Abbildung 57). Demnach sind im Vergleich zu einem Spektrum von Eisengluconaten nur minimale Unterschiede in der Intensität der Aldehydsignale zu erwarten. Hervorstechend ist eine breite Bande mit einer Transmission von über 75% bei 3104 cm^{-1} . Diese Bande ist charakteristisch für Valenzschwingungen von primären Alkoholen.

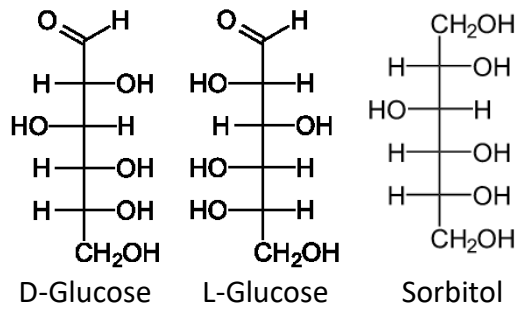


Abbildung 57: Fischer-Projektionen von Glucose und Sorbitol.

3.3. Stabilitätsuntersuchungen

3.3.1. Saure Hydrolyse

FeD_EU, FeD_USA und FeOx zeigen mit einer Halbwertszeit von ca. 30 h eine vergleichbare Stabilität (detaillierte Ergebnisse siehe Tabelle 18 und Abbildung 58). Die ermittelte, abnehmende Reihenfolge der Halbwertszeit ist: FeOx \simeq FeD_USA \simeq FeD_EU \simeq FeIM \gg FeG_G $>$ FeG.

$t_{0,5}$ von FeX wurde nicht ermittelt. Die Halbwertszeiten von FeG und FeG_G sind deutlich kürzer als die der anderen vermessenen Präparate, wobei FeG_G mit $t_{0,5} = 5,64$ h eine 1,46-mal längere Halbwertszeit aufweist als FeG. Die Halbwertszeit des

Tabelle 18: Halbwertszeiten der Eisenkomplexe im salzsauren Milieu

Produkt	$t_{\frac{1}{2}}$ [h]	STABW	f(x)	R ²
FeD_EU	30,12	5,53	$y = -0,0001x^2 - 0,0163x - 0,0146$	0,9992
FeIM	25,49	0,91	$Y = -8E-05x^2 - 0,0215x - 0,0993$	0,9822
FeD_USA	30,59	2,17	$y = -0,0001x^2 - 0,0163x - 0,0133$	0,9995
FeOx	30,72	1,25	$y = -0,0001x^2 - 0,0174x - 0,0283$	0,997
FeG	3,84	0,037	$y = 0,0074x^2 - 0,2018x - 0,0153$	0,9987
FeG_G	5,64	0,14	$y = 0,0035x^2 - 0,1446x - 0,0035$	0,9984

stabilsten Komplexes FeOx ist 8-fach höher als die von FeG. Insgesamt kann die Stabilität von FeOx, FeD_EU und FeD_USA als hoch eingestuft werden. FeIM zeigte mit einer Halbwertszeit von 25,49 h eine leicht geringere Stabilität. FeG und FeG_G sind den instabileren Verbindungen zuzuordnen. Die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte war bei allen Produkten sehr gering, weshalb die Fehlerbalken der Messpunkte in Abbildung 56 teilweise nicht sichtbar sind.

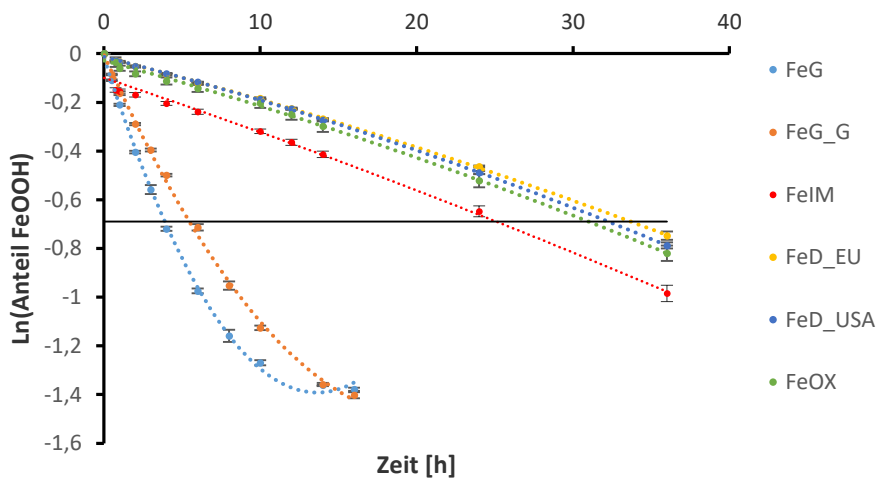


Abbildung 58: Saure Hydrolyse von Eisenoxiden. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen. Der Anteil von Eisenoxid zu Beginn der Messung wurde auf 1 festgelegt. Die Linie bei -0,69 markiert die Halbwertszeit der Produkte.

3.3.2. Ferrozintest

Für alle Komplexe waren die Bestimmtheitsmaße (R^2) der polynomischen Regressionen für die 10 und 45-Minuten-Inkubation größer als 0,9996, bei den Eisengluconaten größer 0,9991. Das Ausmaß der Eisensfreisetzung nach Zugabe von Ferrozin unterschied sich teilweise stark zwischen den Komplexen, was sich in der errechneten Menge von labilem Eisen äußert. Komplexe mit einer höheren Eisensfreisetzung wiesen eine höhere Menge an labilem Eisen auf. Tabelle 19 gibt einen Überblick über den ermittelten Gehalt an labilem Eisen in den einzelnen Komplexen. Für die 200 mg-Dosierung ergab sich die folgende, absteigende Reihenfolge:

$$\text{FeG} \geq \text{FeG_G} \gg \text{FeX} \geq \text{FeD_EU} > \text{FeIM} \geq \text{FeD_USA} \gg \text{FeOx}$$

Tabelle 19: Detaillierergebnisse labiler Eisengehalt der Eisenkomplexe in 200 und 500 mg-Dosen

Eisenkomplex			Gehalt labiles Eisen		%labiles Eisen	
	N	Dosis	C [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	STABW [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	C [$\text{Fe}_{\text{labil}}/\text{Dosis}$]	STABW [%]
FeD_EU	5	200	1,032	0,074	1,547	0,099
	5	500	1,982	0,346	1,189	0,179
FeIM	5	200	0,728	0,104	1,092	0,155
	5	500	1,602	0,358	0,961	0,215
FeX	5	200	1,081	0,168	1,622	0,100
	5	500	2,547	0,167	1,528	0,100
FeD_USA	7	200	0,632	0,114	0,947	0,171
	7	500	1,633	0,271	0,980	0,145
FeOx	6	200	0,395	0,059	0,592	0,088
	6	500	1,077	0,059	0,643	0,072
FeG	6	200	2,274	0,191	3,412	0,287
	6	500	5,100	0,603	3,06	0,361
FeG_G	6	200	2,092	0,251	3,138	0,376
	6	500	4,537	0,395	3,018	0,239

Die Eisengluconate zeigten im Vergleich zu den anderen Präparaten deutlich höhere Mengen an labilem Eisen. Für FeG (2,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und FeG_G (2,274 $\mu\text{g}/\text{mL}$) war der Gehalt mehr als fünfmal größer als bei FeOx (0,395 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Der Unterschied von FeG zu FeX war mit mehr als 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hochsignifikant. Zwischen den Gluconaten selbst zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,256$). In der 200 mg-Dosis wurden Unterschiede zwischen FeD_EU und FeD_USA sichtbar. Obwohl es sich bei FeD_EU und FeD_USA um Produkte mit den gleichen Ausgangssubstanzen handelt, welche in unterschiedlichen Fabriken weiterverarbeitet werden, war der Gehalt an labilem Eisen im europäischen Produkt

Ergebnisse

signifikant höher. FeD_EU lag mit 1,0332 µg/mL auf einem vergleichbaren Wert wie das Entwicklungsprodukt FeX mit 1,081 µg/mL. FeOx schnitt mit nur 0,395 µg/mL labilem Eisen am besten bei den getesteten Komplexen ab. Bei der 500 mg-Dosis zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der niedrigeren Dosis von 200 mg. Lediglich die Reihenfolge von FeD_EU und FeX war vertauscht:

$$\text{FeG} \geq \text{FeG}_G \gg \text{FeX} > \text{FeD}_\text{EU} \geq \text{FeD}_\text{USA} = \text{FeIM} > \text{FeOx}$$

Die Eisengluconate zeigten wieder die mit Abstand höchsten Werte an labilem Eisen ohne untereinander signifikante Unterschiede aufzuweisen ($p = 0,139$). In der 500 mg-Dosis zeigte sich im Gegensatz zur 200 mg-Dosis kein signifikanter Unterschied zwischen den Eisendextranen ($p = 0,346$).

Bedingt durch größere Standardabweichungen (vgl. Tabelle 19) liegt FeD_EU mit 1,982 µg/mL labilem Eisen auf einem vergleichbaren Level wie FeD_USA mit 1,633 µg/mL. Betrachtet man den Anteil von labilem Eisen in Bezug auf die Dosis, so ist auffällig, dass bei den meisten Präparaten der prozentuelle Anteil in der 200 mg-Dosis höher ist als in der 500 mg-Dosis. Lediglich bei FeD_USA und FeOx war diese

Tendenz nicht erkennbar. Es ist denkbar, dass ein stabilisierender Effekt der Moleküle untereinander existiert, der sich bei höheren Konzentrationen bemerkbar macht und einer vorzeitigen Eisenfreisetzung entgegenwirkt.

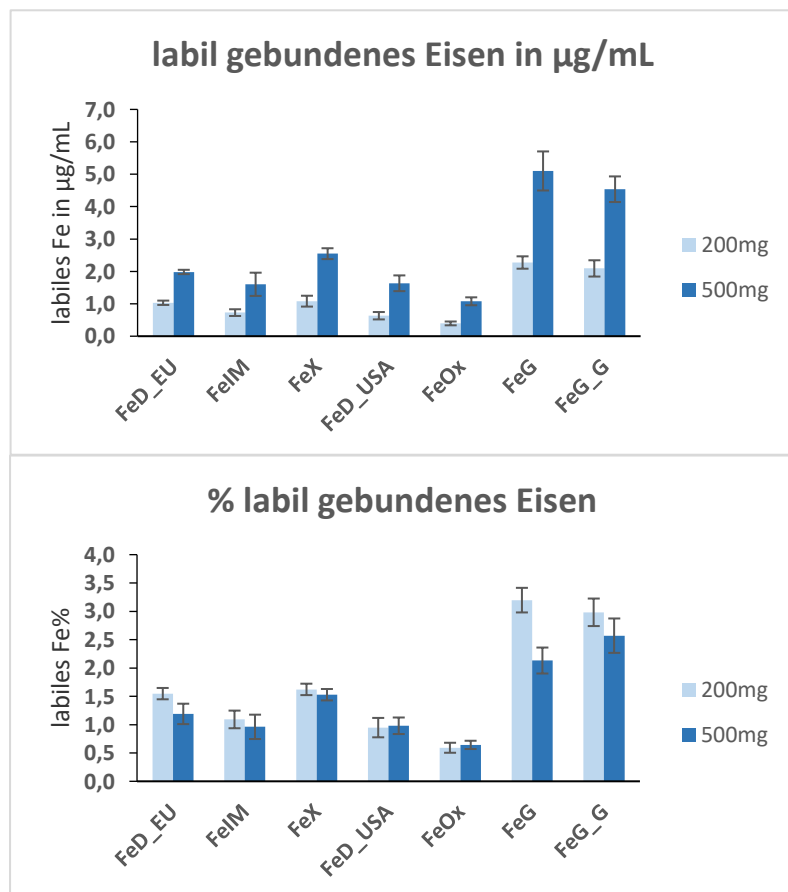


Abbildung 59: Oben: Labil gebundenes Eisen in µg/mL. Unten: Labil gebundenes Eisen in % der Dosis; Hellblauer Balken 200 mg-Dosis, dunkelblauer Balken 500 mg-Dosis.

3.4. CAM Hühnermodell

3.4.1. Überlebensrate

In allen Untersuchungsgruppen war die Überlebensrate mit >87% groß (vgl. Tabelle 20). Zwar lagen die prozentualen Überlebensraten in den Interventionsgruppen teilweise unter denen der Kontrollgruppen, dies ist jedoch wahrscheinlich auf die geringere Gruppengröße der Interventionsgruppen (14-18 Embryonen) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (29-33) zurückzuführen, da Einzelergebnisse prozentuell stärker ins Gewicht fielen. Insgesamt erhöhte die Applikation der Eisenkomplexe nicht die Sterberate. Vergleicht man die Überlebensrate der NaCl- mit der Kontrollgruppe, in der die Eier nur geöffnet und dann wieder verschlossen wurden, wird deutlich, dass die Injektion von NaCl keinen Einfluss auf die Überlebensrate hatte. Bei der 120 h Inkubation überlebten sogar mehr Embryonen nach der Injektion als ohne.

Tabelle 20: Überlebensrate der behandelten Embryonen nach 24 und 120 h

Präparat	24 h			120 h		
	N	N lebendig	Überlebensrate [%]	N	N lebendig	Überlebensrate [%]
FeG	17	16	94,11	18	16	88,88
FeG_G	16	14	87,5	18	16	88,88
FeIM	15	14	93,33	16	15	93,75
FeD_EU	14	13	92,85	16	16	100
NaCl	33	29	87,87	29	27	93,10
Kontrollgruppe	32	31	96,86	32	29	90,62

3.4.2. Gewicht

Embryonalgewicht

Die detaillierten Ergebnisse des Embryonalgewichtes sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Die Gabe von Eisen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Embryonen. Sowohl für die 24 h,

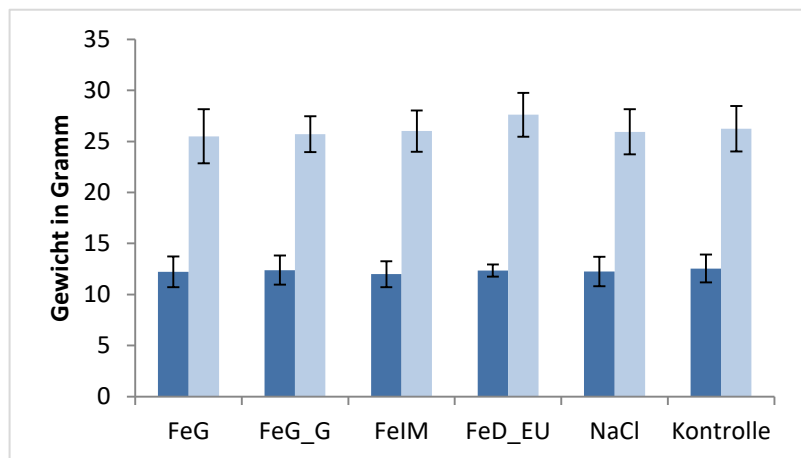


Abbildung 60: Embryonalgewicht der Küken an Tag 15 und Tag 26. Dunkelblauer Balken 24 h-Inkubation (Tag 15), hellblauer Balken 120 h-Inkubation (Tag 19).

Ergebnisse

als auch die 120 h Inkubationszeit, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Gewicht der Interventions- und Kontrollgruppen ($p > 0,2$). Das durchschnittliche Embryonalgewicht erhöhte sich von 12 g (24 h Inkubation, Tag 15 Embryonalentwicklung) auf 26 g (120 h Inkubation, Tag 19 Embryonalentwicklung). Die Injektion der Eisenpräparate hatte daher keine Auswirkung auf die Gewichtsentwicklung.

Tabelle 21: Embryonalgewicht 24 und 120 h nach Inkubationsbeginn

Präparat	24 h			120 h		
	Gewicht [g]	STABW	N	Gewicht [g]	STABW	N
FeG	12,23	1,51	16	25,50	2,66	16
FeG_G	12,39	1,43	14	25,70	1,76	16
FeIM	11,99	1,26	14	26,01	2,02	15
FeD_EU	12,35	0,60	13	27,61	2,149	16
NaCl	12,24	1,44	29	25,94	2,21	27
Kontrollgruppe	12,55	1,36	31	26,24	2,24	29

Einfluss der Eiseninjektion auf das Organgewicht

Die durchschnittlichen Gewichte für Herz und Leber nach 24 h und 120 h Inkubation sind Tabelle 22 zu entnehmen. Bei den Herzen zeigte die Applikation von Eisen sowohl nach 24 h, als auch nach 120 h keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung. 24 h nach Eiseninjektion kam es auch bei der Leber zu keiner signifikanten Gewichtszunahme im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen. Nach 120 h war das Gewicht von FeIM und FeD_EU im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht (FeD_EU: $p < 0,001$, FeIM $p < 0,05$). FeG und FeG_G zeigten keinen Unterschied zur Kontrollgruppe.

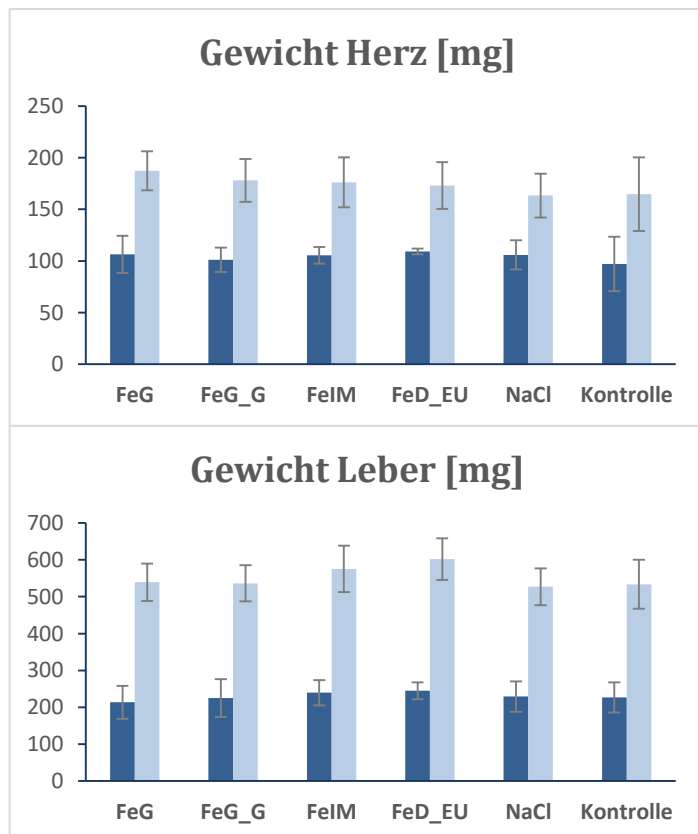


Abbildung 61: Organgewichtsentwicklung nach 24 h (dunkelblauer Balken) und 120 h (hellblauer Balken). Oben: Gewicht Herz. Unten: Gewicht Leber.

Tabelle 22: Organgewichtsentwicklung 24 und 120 h nach Probeninjektion

	Präparat	24 h			120 h		
		Gewicht [mg]	STABW	N	Gewicht [mg]	STABW	N
Herz	FeG	106,49	17,95	16	187,37	18,79	16
	FeG_G	101,06	11,84	14	178,13	20,81	16
	FeIM	105,43	8,05	14	176,17	24,165	15
	FeD_EU	109,21	2,81	13	173,12	22,54	16
	NaCl	105,88	14,06	29	163,35	21,18	27
	Blindgruppe	97,04	26,42	31	164,84	35,64	29
Leber	FeG	213,54	44,61	16	539,09	51,16	16
	FeG_G	225,24	51,18	14	536,41	49,471	16
	FeIM	239,59	34,43	14	575,37	63,18	15
	FeD_EU	244,67	22,93	13	601,929	56,2065	16
	NaCl	229,11	41,20	29	526,91	49,71	27
	Blindgruppe	226,87	40,57	31	533,48	66,33	29

3.4.3. Eisenverteilung im Gewebe

Die detaillierten Ergebnisse der Leber- und Herzeisenkonzentration nach 24 h und 120 h Inkubation sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Kontrollgruppen

Zwischen den Kontrollgruppen zeigte sich sowohl für die 24 h-, als auch die 120 h-Werte kein signifikanter Unterschied. Daher wurden die Kontrollgruppen zur besseren Auswertung der Interventionsgruppen zusammengelegt.

Ergebnisse

Tabelle 23: Eisengehalt in den Organen 24 und 120 h nach Injektion

	Präparate	24 h					120 h				
		Eisen- gehalt in [µg/mL]	x- faches von Kon- trolle (gerundet)	STABW	N	Ge- samt- eisen [µg]	Eisen- gehalt in [µg/mL]	x- faches von Kon- trolle (gerundet)	STABW	N	Ge- samt- eisen [µg]
Leber	FeG	390,37	22,9	67,14	16	83,35	150,34	6,2	49,86	16	81,04
	FeG_G	392,78	23	85,84	14	88,46	146,6	6,1	51,94	16	78,63
	FeIM	899,08	52,7	119,84	14	215,41	404,80	16,8	80,56	15	232,91
	FeD_EU	702,52	41,2	73,87	13	171,88	313,77	13	51,2	16	188,86
	NaCl	15,52	0,9	6,45	29	3,55	21,92	0,9	12,64	27	11,54
	Blind- gruppe	18,14	1,1	10,58	31	4,11	26,56	1,1	13,55	29	14,16
	Kontroll- gruppen, kombiniert	17,05	1	9,19	60	-	24,10	1	13,55	56	-
Herz	FeG	24,26	4,4	7,49	16	2,58	15,76	2,1	3,11	16	2,95
	FeG_G	31,66	5,7	7,49	14	3,20	14,70	1,9	3,172	16	2,62
	FeIM	8,79	1,6	0,97	14	0,93	8,41	1,1	1,23	15	1,48
	FeD_EU	12,54	2,3	2,3	13	1,37	9,76	1,3	1,1	16	1,69
	NaCl	5,55	1	0,89	29	0,59	7,44	1	1,55	27	1,22
	Blind- gruppe	5,55	1	1,37	31	0,54	7,73	1	1,49	29	1,27
	Kontroll- gruppen, kombiniert	5,55	1	1,15	60	-	7,58	1	1,53	56	-

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Leber

Alle untersuchten Eisenpräparate zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöhte Lebereisenkonzentrationen. Nach 24 h wuchsen die Konzentrationen auf das 22,9- (FeG) bis 52,7-fache (FeIM) an, nach 120 h waren sie immer noch um ein 6,1- (FeG_G) bis 16,8-faches (FeIM) erhöht. Folgende, absteigende Reihenfolgen ergaben sich für die Leberkonzentrationen:

24 h: FeIM > FeD_EU >> FeG_G ≈ FeG

120 h: FeIM > FeD_EU > FeG ≥ FeG_G

Ein Vergleich der beiden Inkubationszeiten zeigte eine Reduktion um 55% (FeIM und FeD_EU), 62% (FeG) und 63% (FeG_G) nach 120 h im Vergleich zum 24 h Wert.

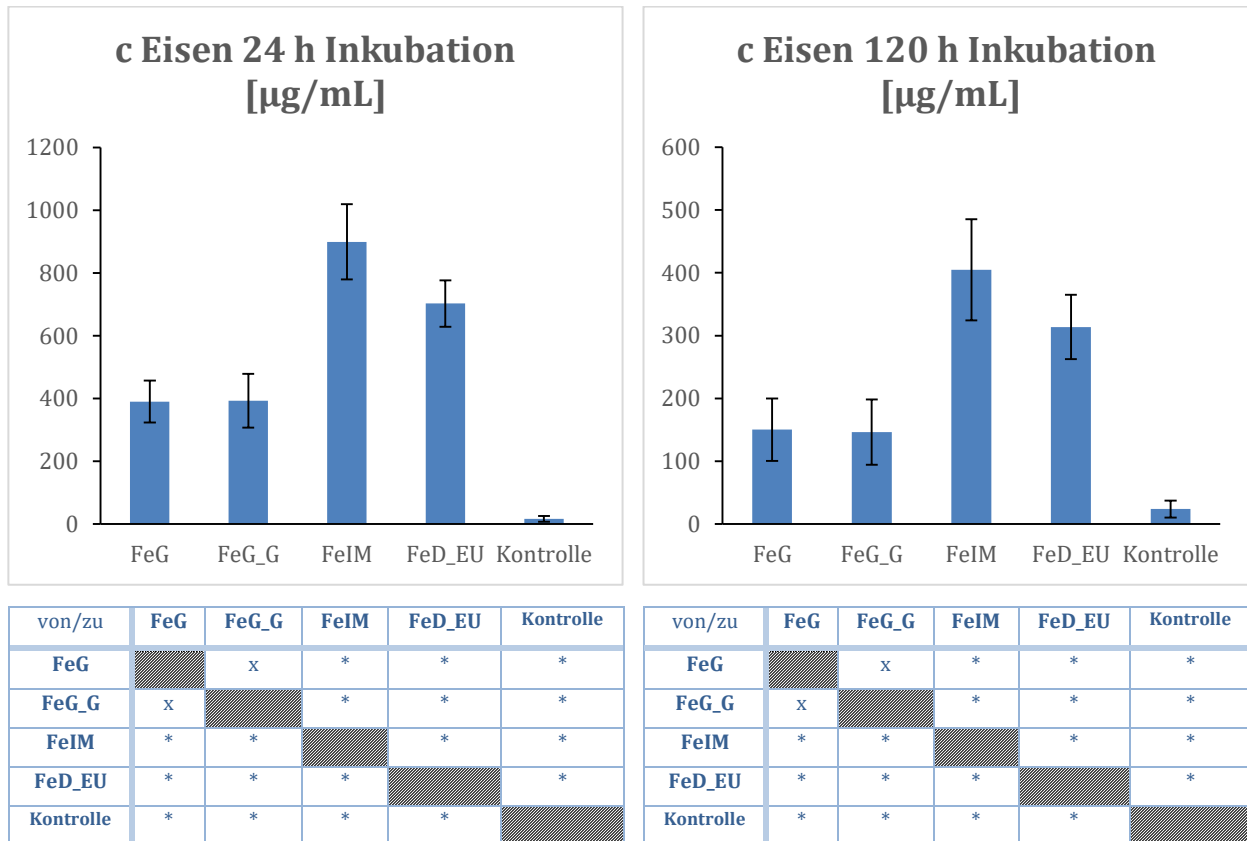


Abbildung 62: Eisenkonzentration in der Leber nach 24 h und 120 h Inkubation. Signifikanzen sind unter den Abbildungen angegeben * = $p < 0,05$, x = $p > 0,05$.

Ergebnisse

Herz

Die untersuchten Präparate zeigten klare Unterschiede bei der gemessenen Eisenkonzentration im Herzgewebe, wenngleich die gemessenen Konzentrationen wesentlich geringer ausfielen als in der Leber. 24 h nach Injektion waren die Eisenwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 1,58- (FeIM) bis 5,36-fache (FeG_G) erhöht, nach 120 h lagen die Werte bei dem 1,1 bis 2-fachen. Für die untersuchten Präparate ergaben sich für die 24 h und 120 h Inkubation folgende abnehmende Reihenfolgen:

24 h: FeG_G > FeG (p = 0,03) >> FeD_EU > FeIM

120 h: FeG ≥ FeG_G > FeD_EU > FeIM

Der Vergleich der Ergebnisse nach 24 h und 120 h zeigt eine Reduktion der Eisenwerte um 22% (FeD_EU), 35% (FeG) und 51% (FeG_G) bei der längeren Inkubationszeit. Bei FeIM konnte keine Reduktion gezeigt werden, was jedoch auf die sehr niedrigen 24 h Werte zurück zu führen ist. Bei der 24 h Inkubation waren die Unterschiede zwischen den Präparaten deutlich stärker ausgeprägt, als bei der 120 h Gruppe.

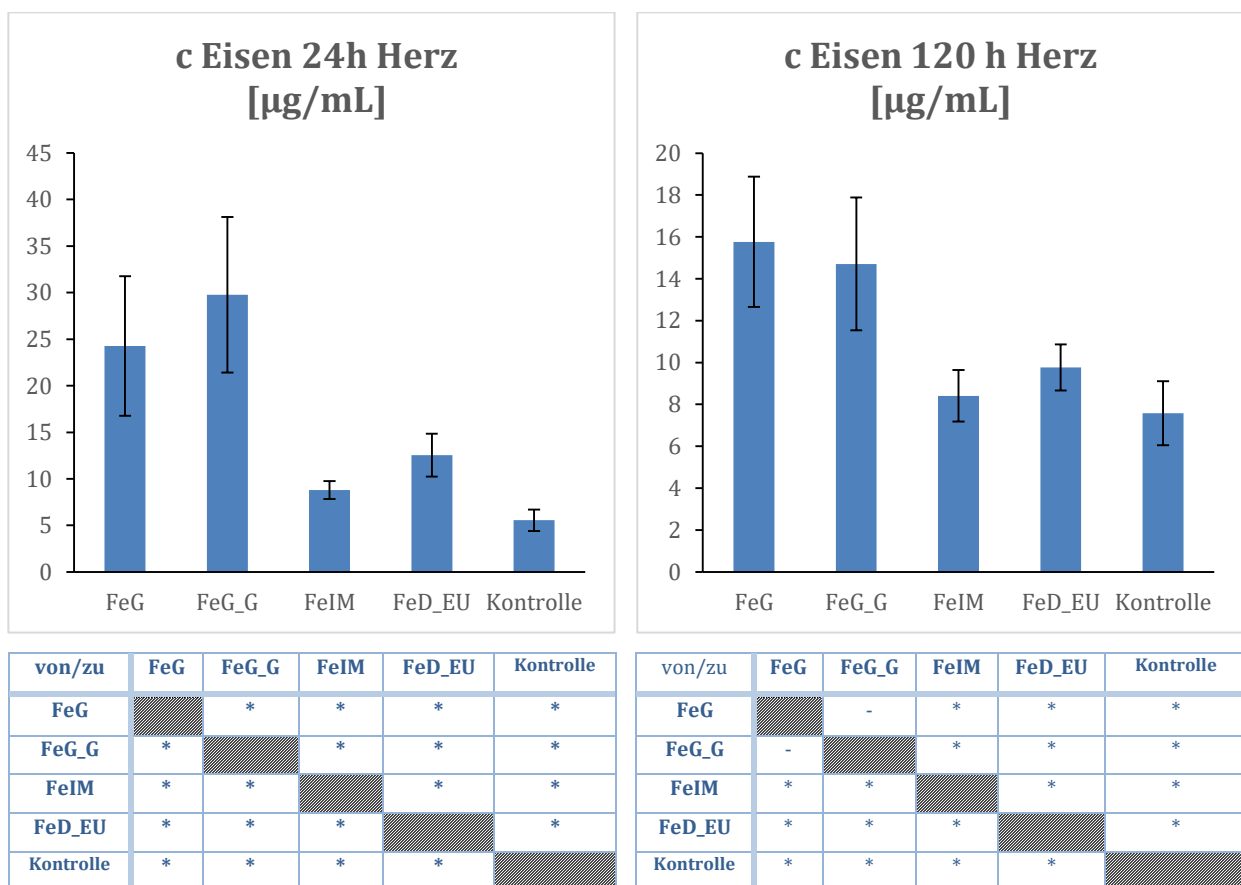


Abbildung 63: Eisenkonzentration im Herzen nach 24 h und 120 h. Signifikanzen sind unter der Abbildungen angegeben * = p < 0,05, x = p > 0,05.

3.4.4. Auswertung CAM Versuche

Eisengehalt im Gewebe

Ein ideales Eisenpräparat ist gekennzeichnet von einer schnellen und vollständigen Aufnahme des Eisenkomplexes durch das RES, einer Zwischenspeicherung des Eisens in der Leber und einer letztlich gesteigerten Erythropoese. Eine Erhöhung der Gewebeeisenkonzentration sollte nur in den mit der Blutbildung assoziierten Organen stattfinden. Die Leber ist somit als pharmakologisches Zielorgan bei der Eisensupplementierung anzusehen, während beispielsweise Herz und Niere zu den toxikologisch relevanten Geweben zählen (65). Alle im *In-ovo*-Modell untersuchten Präparate führten zu einem wünschenswerten Anstieg der Lebereisenkonzentration (siehe Tabelle 15). Bei FeD_EU und FeIM zeigte sich zudem nach 120 h Inkubation im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine signifikante Zunahme des Lebergewichtes. Darüber hinaus zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Präparaten. FeIM und FeD_EU führten zu einer hoch signifikant ($p < 0,00001$) höheren Leberkonzentration als die Eisengluconat-Produkte. Dies deutet auf eine höhere Effektivität in der Eisensupplementierung hin. Auf den ersten Blick scheint dieser Unterschied bei einem Vergleich der durchschnittlichen Eisenkonzentration nach 120 h noch größer auszufallen. Ein reiner Vergleich dieser Werte spiegelt jedoch nicht das Organwachstum im Laufe der embryonalen Entwicklung und die damit verbundenen Verdünnungseffekte im Gewebe wider. Eine bessere Vergleichbarkeit des 24- und 120 h-Wertes ergibt sich durch eine Multiplikation der durchschnittlichen Eisenkonzentration mit dem durchschnittlichen Organgewicht. In Summe entspricht die Menge des insgesamt in der Leber gespeicherten Eisens nach 120 h nahezu dem nach 24 h (siehe Tabelle 15, Gesamteisen). Mit Hilfe des Ferrozin-Nachweises ist es jedoch nicht möglich, die Speicherform des Eisens in der Leber zu ermitteln. Eisen könnte auch in Form des für den Eisenstoffwechsel unbrauchbaren Hämosiderin vorliegen (108). Dennoch ist auch ohne weitere Proteinbestimmung auf Grund der viel höheren Eisenwerte davon auszugehen, dass FeIM und FeD_EU quantitativ mehr verfügbares Eisen bereitstellen als die Eisengluconate. Während erhöhte Eisenkonzentrationen in der Leber einen Surrogat-Parameter für die therapeutische Effektivität der Eisentherapie darstellen, sind erhöhte Eisenkonzentrationen im Herzen als kritisch einzustufen. CKD-Patienten, eine der größten Patientengruppen der parenteralen Eisentherapie, haben ein erhöhtes Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (171, 172). Laut der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie sind

Ergebnisse

ca. 50% aller Todesfälle von Dialysepatienten kardiovaskulär bedingt (173). Es gibt Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Eisenkonzentration im Herzen und dem Auftreten kardiovaskulären Erkrankungen (174). Erhöhte Eisenkonzentrationen im Herzen könnten das bereits bestehende Risiko möglicherweise weiter erhöhen, da insbesondere labiles Eisen im Verdacht steht oxidativen Stress und Arteriosklerose zu fördern (68, 80–82). Alle getesteten Präparate führten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem Anstieg der Eisenkonzentration im Herzen. Bei den Eisengluconaten war dieser Effekt deutlich ausgeprägter als bei FeD_EU und FeIM, bei gleichzeitig niedrigen Eisenkonzentrationen im pharmakologischen Zielgewebe Leber. Damit zeigten FeIM und FeD_EU ein insgesamt deutlich besseres Gewebeverteilungsmuster als FeG und FeG_G.

4. Diskussion

4.1. Zusammenhang thermodynamische Stabilität, Gewebeverteilung und zulässige Gesamtdosis

Alle auf dem Markt befindlichen Präparate zeigen in klinischen Studien eine ähnliche Sicherheit (175), unterscheiden sich aber in der zulässigen Maximaldosis. Ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Stabilität mit den zugelassenen Maximaldosen zeigt, dass die

Produkte mit der geringsten Komplexstabilität (siehe 3.3) auch die geringsten Maximaldosen aufweisen (vgl. Tabelle 24). FeG, welches den höchsten Gehalt an labilem Eisen aller Verbindungen und die geringste Halb-

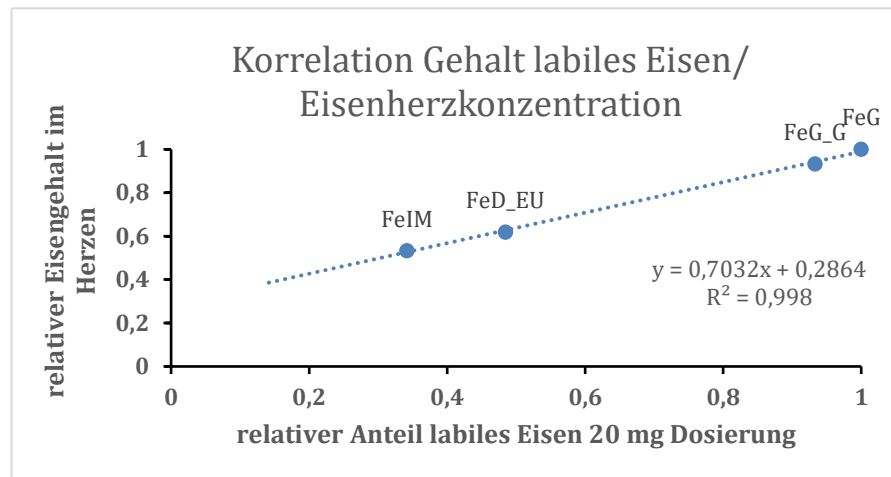


Abbildung 64: Korrelation von relativen Anteil labilem Eisen (200 mg Dosierung) und Eisenherzgehalt im *In-ovo*-Modell (400 µg Dosis). Die jeweils höchste gemessene Konzentration wurde auf 1 festgesetzt und die anderen Messwerte dazu in Bezug gesetzt.

wertszeit im sauren Milieu zeigte, darf mit einer maximalen Dosis von 62,5 mg verabreicht werden (176). Interessanterweise ist die zulässige Maximaldosis mit 125 mg auf dem amerikanischen Markt höher als auf dem europäischen, wenngleich dies immer noch einer verhältnismäßig niedrigen Dosis entspricht. Im Falle der Eisendextrane zeigt sich ein umgekehrtes Bild. In Europa dürfen wesentlich höhere Dosen verabreicht werden als in den USA. Obwohl bei beiden Präparate der Eisenkomplex vom identischen Hersteller produziert wird, ist die Dosis in den USA auf 100 mg begrenzt. In Europa ist es hingegen eine Gesamtdosisinfusion mit 20 mg Fe/kg zulässig (69). Auch die anderen als stabil eingestuften Präparate FeIM, FeCM und FeOx dürfen in wesentlich höheren Dosen gegeben werden als FeG. FeIM kann wie FeD_EU als Gesamtdosisinfusion mit einer Höchstdosis von 20 mg Fe/mL infundiert werden, der pharmazeutische Unternehmer von FeOx erlaubt eine Dosis von 510 mg (69, 170). Die Komplexstabilität, insbesondere aber der Anteil an labilem Eisen, scheint eine limitierende Rolle in der Dosierung zu spielen und mit der Rate an UAW zu korrelieren. Je höher der Anteil labilem Eisens und je unstabiler der

Diskussion

Komplex, desto niedriger die mögliche Dosis. Diese These wird von einer 2001 veröffentlichten Studie von Chandler et. al untermauert (177). Eisensucrose, welches wie FeG zu den instabileren Eisenverbindungen gehört (vgl. Tabelle 24), zeigte eine höhere Rate an UAW, wenn es bei höheren Dosen verabreicht wurde (177). 89 Patienten wurden im Rahmen der Studie mit der in der USA zulässigen Höchstdosis von 200 mg behandelt. Es zeigten sich keine Akutnebenwirkungen. In der nächsten Phase wurde die Dosis auf 500 mg erhöht, welches der Maximaldosis in Europa für Patienten mit Körpergewicht >70 kg entspricht. Diese Phase wurde abgebrochen nachdem 8 von 22 Patienten UAW wie Übelkeit, Schwindel oder Bluthochdruck zeigten. Weitere 189 Patienten wurden in einer finalen Phase mit einer 300 mg-Dosis behandelt. Auch hier zeigten sich wie bei der 200 mg-Dosis keine Akutnebenwirkungen. Es ist daher empfehlenswert, trotz der im EU-Raum gegebenen Möglichkeit höhere Dosen von FeS zu verabreichen, bei einer Dosis von 200 bis 300 mg zu bleiben. Der pharmazeutische Unternehmer selbst rät in seiner deutschsprachigen Fachinformation zu Einmaldosen von 200 mg (72). Betrachtet man die Erkenntnisse von Chandler et al., die Komplexstabilität und die empfohlene Dosis des pharmazeutischen Unternehmers, so zeigt sich auch bei FeS eine Korrelation zwischen (empfohlener) Dosis und Komplexstabilität. Bei instabileren Präparaten ist insbesondere in höheren Dosen mit einer größeren Menge labilem Eisen zu rechnen, welches bei Überschreiten der Transferrin-Bindekapazität zu ungebundenem Eisen führt. Dieses ungebundene Eisen ist für die toxikologischen Effekte von Eisenpräparaten verantwortlich (vgl. 1.3.3). Vergleicht man den Gehalt von labilem Eisen aus den Ferrozin-Versuchen mit den ermittelten Eisenkonzentrationen im Herzen bei den *In-ovo*-Versuchen zeigt sich ein linearer Zusammenhang ($R^2 = 0,998$) (siehe Abbildung 64). Es ist annehmbar, dass labiles Eisen zu einem Anstieg der Eisenkonzentration von nicht-RES-assoziierten Organen führt. Bereits in der Blutbahn freigesetztes Eisen könnte sich somit insbesondere dann in nicht-pharmakologischen Zielorganen akkumulieren, wenn die Bindekapazität von Transferrin überschritten ist.

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

Tabelle 24: Übersicht der von den Herstellern vorgeschriebenen Maximaldosen für Erwachsene im Vergleich zu den Stabilitätsergebnissen der einzelnen Eisenkomplexe

Abkürzung		FeD_EU	FeIM	FeD_USA	FeG	FeG_G	FeOx	FeS	FeCM
Handelsname		Cosmofer®	Monofer®	INFeD®	Ferrlecit®	Sodium Ferric Gluconate Complex	Feraheme® (Rienso®)	Venofer®	Ferinject®
Eisenkomplex		Niedermolekulares Eisen(III)-Dextran	Eisen(III)-Derisomaltose	Nieder-molekulares Eisen(III)-Dextran	Eisen(III)-gluconat	Eisen(III)-gluconat	Eisen (III)-Polyglucose-Sorbitol-Carboxymethylether x (freiwillig zurückgezogen)	Eisen(III)-hydroxid-Sucrose-Komplex	Eisen-carboxymaltose
Zulassung in Deutschland		✓	✓	x	✓	x		✓	✓
Zulässige Maximal-Dosis	Injektion	200 mg	500 mg	100 mg	Max. 62,5 mg US-Markt: 125 mg	125 mg	N/A	200 mg	1000 mg
	Infusion	20 mg/kg Körpergewicht als Gesamtdosisinfusion oder (empfohlen) 2-4*100-200 mg	Bis max. 20 mg Fe/kg	100 mg	Max. 62,5 mg	125 mg	510 mg	Körpergewicht < 70kg: 7 mg Fe/ kg > 70kg: 500 mg	1000 mg
	Vorgeschriebene Infusionsdauer	2-4h; In den ersten 15 min Infusion von insgesamt 25 mg mit strenger Überwachung des Patienten Gesamtdosisinfusion: 4-6 h	Dosen bis 1000 mg: > 15 min Dosen > 1000 mg: > 30 min	Max. 50 mg/min	20-30 min	Injektion: 12,5 mg/min Infusion: 1 h	N/A	Mindestens 3,5 h	100-200 mg: nicht vorgeschrieben >200-500 mg: 6 min >500-1000 mg: 15 min
	Quellen	(69)	(180)	(30)	(71,176)	(178)	(72,170)	(72)	(181)
C labiles Eisen [µg/mL]	200 mg-Dosis	1,032	0,728	0,632	2,274	2,092	0,395	3,293(179)	0,482(179)
	500 mg-Dosis	1,982	1,602	1,633	5,100	4,537	1,077	7,4(179)	0,497 (179)
Halbwertszeit saure Hydrolyse		30,12 h	25,49 h	30,59 h	3,84 h	5,64 h	30,72 h	4,9 h (97)	25,6 h (97)

4.2. Austauschbarkeit von parenteralen Eisenprodukten

Gemäß der Definition von NBCDs (vgl. Kapitel 1.4.2.) müssen kolloidale Eisenpräparate mit unterschiedlichen Kohlenhydraten als eigenständige Arzneimittel angesehen werden. Eine Unterteilung des Komplexes in Wirkstoff (Eisen) und Hilfsstoff(e) (Kohlenhydrathülle) ist nicht möglich. Sowohl der Eisenkern, als auch die stabilisierende Kohlenhydrathülle, nehmen Einfluss auf die pharmakologische Wirkung. Auch der Herstellungsprozess der Eisenkomplexe ist von Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche auf dem Markt verfügbare Eisenkomplexe und ein Entwicklungsprodukt in Anlehnung an das EMA reflection paper zur Entwicklung von Nachfolgeprodukten kolloidaler Eisenpräparate verglichen und bewertet. Im Falle von FeD_EU und FeD_USA wurden zwei Produkte verglichen, deren Edukte in derselben Fabrik gefertigt werden, die Weiterverarbeitung aber auf zwei unterschiedlichen Kontinenten erfolgt. Desweiteren wurden ein Nachfolgeprodukt und sein Originator in die Untersuchungen miteinbezogen (siehe 4.2.1). Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen die Charakteristika, welche NBCDs zugeschrieben werden. Es zeigte sich, dass nicht nur der Kern als vermeintliches active pharmaceutical ingredient (API) einen Einfluss auf die Wirksamkeit hat. So verfügen FeIM und FeD_EU, welche beide einen Eisenkern aus Akaganeit besitzen, über ein abweichendes Gewebeverteilungsmuster im CAM Model (vgl. 3.4.4) und können keinesfalls als bioäquivalent angesehen werden. Die pharmakologische Wirkung von Eisen besteht unter anderem darin, die physiologischen Speicher des Körpers zu füllen und schließlich in einer gesteigerten Erythropoese zu münden. Unterschiede der Lebereisenkonzentrationen sind daher als Indiz für unterschiedliche Wirkpotenzen der Arzneimittel zu sehen. Trotz identischer Dosis und vermeintlich gleichem API sind bei FeIM und FeD_EU therapeutische Unterschiede zu erwarten. Der variable Kohlenhydratanteil der Komplexe ist somit von entscheidender Bedeutung für die Biodistribution im Körper. Der gesamte Komplex aus Eisenkern und Kohlenhydrat ist für die Wirkung verantwortlich. Ein weiteres Charakteristikum, welches NBCDs zu geschrieben wird, ist ein komplizierter, engmaschig zu kontrollierender Herstellungsprozess (105). Auf Grund des komplexen Aufbaus von NBCDs können bereits kleine Abweichungen in der aufwendigen Synthese zu geänderten Produktparametern führen (105). Diese Eigenschaft der Produkte führt dazu, dass ähnlich wie bei Biopharmazeutika gewisse Schwankungen der Qualitätsparameter zwischen einzelnen Chargen und Produktionsstandorten zu erwarten sind. Die kleineren Unterschiede zwischen FeD_EU

und FeD_USA in Größe und Stabilität (vgl. Kapitel 3) sind vermutlich auf diesen Umstand zurück zu führen. Trotz identischem Grundaufbau aus Eisenkern mit stabilisierender Hülle zeigten sich zwischen allen getesteten Komplexen in unterschiedlicher Ausprägung Differenzen in Stabilität, Morphologie, *In-vitro*-Verhalten und Biodistribution (siehe Kapitel 3). Die Austauschbarkeit von Eisenkomplexen mit unterschiedlichen Kohlenhydraten ist somit in Frage zu stellen. Produkte mit unterschiedlicher Hülle sollten trotz gleicher Indikation untereinander keinesfalls als generisch angesehen werden. Dies zeigt sich nicht zuletzt darin, dass sich die potentiellen therapeutischen Risiken der Komplexe (vgl. 1.3.3) und auch ihre einsetzbaren Maximaldosen (vgl. 4.1) teils stark unterschieden. Bei der Auswahl der optimalen Medikation sollten diese beiden Faktoren Beachtung finden.

4.3. Vergleich Nachfolgeprodukt zu Originator

FeG und FeG_G zeigten in vielen Punkten (Morphologie des Eisenkerns, IR-Spektrum, Zeta-Potential, geometrischer Durchmesser und Gewebeverteilung) eine hohe Übereinstimmung (vgl. Tabelle 25). Unterschiede zeigen sich bei der Stabilität der Produkte und im hydrodynamischen Durchmesser. Sowohl bei der sauren Hydrolyse als auch beim labilem Eisen schnitt das Nachfolgeprodukt FeG_G besser ab als FeG. Während sich im geometrischen Durchmesser zwischen FeG und FeG_G keine signifikanten Unterschiede zeigten, fiel der ermittelte hydrodynamische Durchmesser von FeG deutlich größer aus als der von FeG_G. Auf Grundlage der TEM-Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Unterschiede aus der Kohlenhydrathülle des Komplexes resultieren. Bei den Kohlenhydrathüllen beider Präparate konnten mit Hilfe von IR-Spektren keine qualitativen Unterschiede in der Beschaffenheit festgestellt werden. Die unterschiedliche Hüllendicke beider Präparate legt jedoch nahe, dass bei FeG_G die Hülle dichter und andersartig quervernetzt ist als bei FeG. Die Stabilität des Eisenkomplexes ist abhängig von der stabilisierenden Kohlenhydrathülle und der Modifikation des Eisenkernes (vgl. Abschnitt 1.4.3.1). FeG und FeG_G besitzen beide einen gleichgroßen Eisenkern aus Lepidocrocite. Die unterschiedlichen Stabilitäten von FeG und FeG_G sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Hülle zurückzuführen. Die Ergebnisse der *In-ovo*-Versuche zeigen, dass beide Produkte, mit Ausnahme des 24 h-Werts der Herzeisenkonzentration, ein identisches Verteilungsprofil aufweisen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser Unterschied nicht nur auf die Größe der Interventionsgruppen zurückzuführen ist. Im Falle von FeG_G, welches höhere Eisenwerte im Herzen zeigte, wurden nur 14 Embryonen untersucht. Bei FeG waren

Diskussion

es hingegen 16. Bei Gruppen in dieser Größe ist der statistische Effekt eines einzelnen Ergebnisses besonders groß. Es ist daher denkbar, dass bei einer Erhöhung der Gruppengröße keine Unterschiede mehr sichtbar sind. Abschließend lässt sich sagen, dass sich FeG_G zu FeG wie ein Biological zu seinem Biosimilar verhält: Sie sind ähnlich, aber nicht gleich. Es ist empfehlenswert die beiden Produkte in weiterführenden klinischen Studien zu vergleichen, um die Auswirkungen der physikochemischen Unterschiede im Menschen beurteilen zu können.

Tabelle 25: Gegenüberstellung der Ergebnisse von FeG und FeG_G

		FeG	FeG_G	Ergebnis	
DLS (Z-average) [nm]		16,29	10,14	FeG ≠ FeG_G	
Zeta-Potential [mV]		-39,9	-39,4	FeG = FeG_G	
TEM [nm]		3,93 ± 1,08	3,48 ± 0,93	FeG = FeG_G	
Morphologie des Eisenkerns		Lepidocrocite		FeG = FeG_G	
Saure Hydrolyse: HWZ [h]		3,84 ± 0,037	5,64 ± 0,14	FeG ≠ FeG_G	
Labiles Eisen [µg/mL]		200 mg -Dosis	2,274 ± 0,19	2,092 ± 0,251	FeG = FeG_G
		500 mg-Dosis	5,10 ± 0,60	4,537 ± 0,36	FeG ≠ FeG_G
In-ovo- Biodistribution [µg/mL]	Leber	24 h	390,37 ± 67,14	392,78 ± 85,84	FeG = FeG_G
		120 h	150,34 ± 49,86	146,6 ± 51,95	FeG = FeG_G
	Herz	24 h	24,26 ± 7,49	31,66 ± 7,49	FeG ≠ FeG_G p = 0,03
		120 h	15,76 ± 3,11	14,70 ± 3,10	FeG = FeG_G

4.4. Schlussbetrachtung und Fazit

Die Therapie mit parenteralen Eisenprodukten kann insgesamt als sicher angesehen werden (100). Alle auf dem Markt befindlichen Produkte verfügen in ihrer zugelassenen Dosis über eine vergleichbare Rate an Nebenwirkungen (175). Die Unterschiede der einzelnen Präparate äußern sich in ihrer zugelassenen Maximaldosis und ihrem potentiellem Risiko für chronische Nebenwirkungen. Die Auswahl der geeigneten Medikation sollte sich nach der Höhe der kumulativen Dosis, vorliegenden Grunderkrankung und Unverträglichkeiten des Patienten und den daraus resultierenden relevanten Risiken richten. Da sich die parenteralen Eisenkomplexe in physikochemischen und *In-vitro*-Verhalten untereinander stark unterscheiden, ist ein Präparatewechsel bei bestehender guter Verträglichkeit möglichst zu vermeiden. Von einem Präparatewechsel aus Kostengründen, auch auf ein günstigeres Nachfolgeprodukt, ist abzuraten. Die Untersuchungen in dieser Arbeit und weitere physikochemische und nicht-klinische Untersuchungen legen nahe, dass zwischen Eisen-Nachfolgeprodukten und ihren Originatoren Unterschiede bestehen können. Dies unterstreicht die Definition von NBCDs, welche Generika im klassischen Sinne ausschließt und nur mögliche Biosimilars zulässt. Ob und inwieweit sich die bisher gezeigten Unterschiede bei der Therapie äußern, sollte in auf den physikochemischen und nicht-klinischen Untersuchungen aufbauenden klinischen Studien weiter getestet werden. Es ist wünschenswert, dass durch solche weitergehenden klinischen Studien klare Grenzen zur Zulassung neuer Nachfolgeprodukte definiert werden. Bis dahin sollten behandelnde Ärzte Eisenkomplexe und deren Nachfolgeprodukte wie zwei unterschiedliche Produkte behandeln und bestehende Medikationen beibehalten.

5. Literaturverzeichnis

1. Cornell RM, Schwertmann U. The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrence and uses. Weinheim: VCH Verlagsges; 1996.
2. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1820(3):188–202.
3. Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* 1978; 253(6):1930–7.
4. Domenico I de, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(1):72–81.
5. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron Homeostasis. *Annual Review of Physiology* 2007; 69(1):69–85.
6. Deutsche Gesellschaft für Ernährung; Österreichische Gesellschaft für Ernährung; Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung. D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 2. Aufl. Neustadt an der Weinstraße: Neuer Umschau Buchverl.; 2015.
7. Theil EC, Chen H, Miranda C, Janser H, Elsenhans B, Núñez MT et al. Absorption of iron from ferritin is independent of heme iron and ferrous salts in women and rat intestinal segments. *J. Nutr.* 2012; 142(3):478–83.
8. Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol. Rev.* 2013; 93(4):1721–41.
9. Wyllie JC, Kaufman N. An electron microscopic study of heme uptake by rat duodenum. *Lab Invest* 1982; 47(5):471–6.
10. Uzel C, Conrad ME. Absorption of heme iron. *Semin Hematol* 1998; 35(1):27–34.
11. Laftah AH, Latunde-Dada GO, Fakhri S, Hider RC, Simpson RJ, McKie AT. Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). *Br J Nutr* 2009; 101(8):1150–6.
12. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 2006; 127(5):917–28.
13. Andrews NC. When Is a Heme Transporter Not a Heme Transporter?: When It's a Folate Transporter. *Cell Metab.* 2007; 5(1):5–6.
14. Illing AC, Shawki A, Cunningham CL, Mackenzie B. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(36):30485–96.
15. McKie AT. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(Pt 6):1239–41.
16. Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(8):500–10.
17. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1823(9):1434–43.
18. Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1823(9):1426–33.

19. Singh B, Arora S, Agrawal P, Gupta SK. Heparin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta* 2011; 412(11-12):823–30.
20. Hilton KB, Lambert LA. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates. *Gene* 2008; 415(1-2):40–8.
21. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1820(3):403–10.
22. Patel M, Ramavataram, D V S S. Non transferrin bound iron: nature, manifestations and analytical approaches for estimation. *Indian J Clin Biochem* 2012; 27(4):322–32.
23. Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2009; 1790(7):682–93.
24. Aigner E, Feldman A, Datz C. Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. *Nutrients* 2014; 6(9):3587–600.
25. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1): Vitamin and Mineral Nutrition Information System; 2011 [cited 2017 Mar 1]. Available from: URL: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin>.
26. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 2014; 123(5):615–24.
27. Weltgesundheitsorganisation. The global burden of disease: 2004 update. Geneva; 2008.
28. Breymann C, Romer T, Dudenhausen JW. Treatment of Iron Deficiency in Women. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2013; 73(3):256–61.
29. Khan Y, Tisman G. Pica in iron deficiency: a case series. *J Med Case Rep* 2010; 4:86.
30. Auerbach M, Adamson JW. How we diagnose and treat iron deficiency anemia. *Am. J. Hematol.* 2016; 91(1):31–8.
31. Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *British Journal of Haematology* 2013; 161(5):639–48.
32. Kuhlmann U, Alscher DM, editors. *Nephrologie: Pathophysiologie, Klinik, Nierenersatzverfahren*; 252 Tabellen. 5., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008.
33. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S1-Leitlinie: Eisenmangelanämie: AWMF-Register Nr. 025/021; 2016.
34. Souza Aid, Batista Filho M, Bresani CC, Ferreira LOC, Figueiroa JN. Adherence and side effects of three ferrous sulfate treatment regimens on anemic pregnant women in clinical trials. *Cad Saude Publica* 2009; 25(6):1225–33.
35. Saha L, Pandhi P, Gopalan S, Malhotra S, Saha PK. Comparison of efficacy, tolerability, and cost of iron polymaltose complex with ferrous sulphate in the treatment of iron deficiency anemia in pregnant women. *MedGenMed* 2007; 9(1):1.
36. Habib F, Alabdin EH, Alenazy M, Nooh R. Compliance to iron supplementation during pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 2009; 29(6):487–92.

37. Tolkien Z, Stecher L, Mander AP, Pereira DIA, Powell JJ. Ferrous sulfate supplementation causes significant gastrointestinal side-effects in adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2015; 10(2):e0117383.
38. Zimmermann MB, Chassard C, Rohner F, N'goran EK, Nindjin C, Dostal A et al. The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire. *Am J Clin Nutr* 2010; 92(6):1406–15.
39. Kortman GAM, Boleij A, Swinkels DW, Tjalsma H. Iron availability increases the pathogenic potential of *Salmonella typhimurium* and other enteric pathogens at the intestinal epithelial interface. *PLoS ONE* 2012; 7(1):e29968.
40. Lund EK, Wharf SG, Fairweather-Tait SJ, Johnson IT. Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(2):250–5.
41. Dostal A, Chassard C, Hilty FM, Zimmermann MB, Jaeggi T, Rossi S et al. Iron depletion and repletion with ferrous sulfate or electrolytic iron modifies the composition and metabolic activity of the gut microbiota in rats. *J. Nutr.* 2012; 142(2):271–7.
42. Geisser P. Iron therapy and oxidative stress. *Met Based Drugs* 1997; 4(3):137–52.
43. Makrides M, Crowther CA, Gibson RA, Gibson RS, Skeaff CM. Efficacy and tolerability of low-dose iron supplements during pregnancy: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2003; 78(1):145–53.
44. Rote Liste Online [cited 2017 Feb 21]. Available from: URL: <http://www.rote-liste.de/>.
45. Vadhan-Raj S, Strauss W, Ford D, Bernard K, Boccia R, Li J et al. Efficacy and safety of IV ferumoxytol for adults with iron deficiency anemia previously unresponsive to or unable to tolerate oral iron. *Am. J. Hematol.* 2014; 89(1):7–12.
46. Barton JC, Barton EH, Bertoli LF, Gothard CH, Sherrer JS. Intravenous iron dextran therapy in patients with iron deficiency and normal renal function who failed to respond to or did not tolerate oral iron supplementation. *Am J Med* 2000; 109(1):27–32.
47. Esen UI. Iron deficiency anaemia in pregnancy: The role of parenteral iron. *J Obstet Gynaecol* 2016:1–7.
48. Gomollon F, Gisbert JP, Garcia-Erce JA. Intravenous iron in digestive diseases: a clinical (re)view. *Ther Adv Chronic Dis* 2010; 1(2):67–75.
49. Agarwal R. Iron deficiency anemia in chronic kidney disease: Uncertainties and cautions. *Hemodial Int* 2017.
50. Hayat A. Safety issues with intravenous iron products in the management of anemia in chronic kidney disease. *Clin Med Res* 2008; 6(3-4):93–102.
51. Pandey R, Daloul R, Coyne DW. Iron Treatment Strategies in Dialysis-Dependent CKD. *Semin Nephrol* 2016; 36(2):105–11.
52. Wazny LD, Raymond CB. Iron replacement and supplementation in patients with chronic kidney disease. *CANNT J* 2011; 21(4):26.
53. Auerbach M, Ballard H. Intravenous iron in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network (JNCCN)* 2008; 6(6):585–92.
54. Auerbach M. Should intravenous iron be the standard of care in oncology? *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(10):1579–81.

55. Eliadou E, Kini G, Huang J, Champion A, Inns SJ. Intravenous Iron Replacement Improves Quality of Life in Hypoferritinemic Inflammatory Bowel Disease Patients with and without Anemia. *Dig Dis* 2017.
56. Warsch S, Byrnes J. Emerging causes of iron deficiency anemia refractory to oral iron supplementation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2013; 4(3):49–53.
57. Stein J, Stier C, Raab H, Weiner R. Review article: The nutritional and pharmacological consequences of obesity surgery. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40(6):582–609.
58. Chand NK, Subramanya HB, Rao GV. Management of patients who refuse blood transfusion. *Indian J Anaesth* 2014; 58(5):658–64.
59. Anker SD, Colet C. Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *New England Journal of Medicine* 2009.
60. Geisser P, Baer M, Schaub E. Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron preparations. *Arzneimittelforschung* 1992; 42(12):1439–52.
61. Toblli JE, Angerosa M. Optimizing iron delivery in the management of anemia: patient considerations and the role of ferric carboxymaltose. *Drug Des Devel Ther* 2014; 8:2475–91.
62. Auerbach M, Macdougall I. The available intravenous iron formulations: History, efficacy, and toxicology. *Hemodial Int* 2017.
63. London E. The molecular formula and proposed structure of the iron-dextran complex, imferon. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 93(7):1838–46.
64. Kudasheva DS, Lai J, Ulman A, Cowman MK. Structure of carbohydrate-bound polynuclear iron oxyhydroxide nanoparticles in parenteral formulations. *J Inorg Biochem* 2004; 98(11):1757–69.
65. EMA. Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product: EMA/CHMP/SWP/620008/2012; 2015. Available from: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/03/WC500184922.pdf.
66. Chao Y, Karmali PP, Simberg D. Role of carbohydrate receptors in the macrophage uptake of dextran-coated iron oxide nanoparticles. In: *Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Research*: Springer; 2012. p. 115–23.
67. B P Espósito, W Breuer, I Slotki, Z I Cabantchik. Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients. *European journal of clinical investigation* 2002; 32 1(s1):42–9.
68. Esposito BP, Breuer W, Slotki I, Cabantchik ZI. Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients. *European journal of clinical investigation* 2002; 32 Suppl 1:42–9.
69. MEDICE Arzneimittel. CosmoFer 50mg/ml Injektionslösung und Infusionslösung Fachinformation: Zulassungsnummer: 50230.00.00 2014.
70. MEDICE Arzneimittel. Monofer® 100 mg/ml Injektionslösung und Infusionslösung Fachinformation: Zulassungsnummer: 75060.00.00 2015.

Literaturverzeichnis

71. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH. Ferrlecit® 40mg/ Ferrlecit® 62,5mg Fachinformation: Zulassungsnummer 40mg: 6441686.00.00; 60mg: 6385744.00.00 2016 [cited 2017 May 2].
72. Vifor Pharma Deutschland GmbH. Venofer® Fachinformation: Zulassungsnummer: 6462062.00.00 2016.
73. Vifor Pharma Deutschland GmbH. Ferinject Fachinformation: Zulassungsnummer: 66227.00.00; 2017 2017 [cited 2017 May 2].
74. Wellhöner H-H. Pharmakologie und Toxikologie. 7., neu bearb. Aufl. Lindhöft: Harms; 2014.
75. Wang C, Graham DJ, Kane RC, Xie D, Wernecke M, Levenson M et al. Comparative Risk of Anaphylactic Reactions Associated With Intravenous Iron Products. JAMA 2015; 314(19):2062–8.
76. Chertow GM, Mason PD, Vaage-Nilsen O, Ahlme?n J. Update on adverse drug events associated with parenteral iron. Nephrology Dialysis Transplantation 2006; 21(2):378–82.
77. Chertow GM, Mason PD, Vaage-Nilsen O, Ahlmen J. On the relative safety of parenteral iron formulations. Nephrol. Dial. Transplant. 2004; 19(6):1571–5.
78. Rodgers GM, Auerbach M, Cella D, Chertow GM, Coyne DW, Glaspy JA et al. High-molecular weight iron dextran: a wolf in sheep's clothing? J. Am. Soc. Nephrol. 2008; 19(5):833–4.
79. Pai AB, Boyd AV, McQuade CR, Harford A, Norenberg JP, Zager PG. Comparison of oxidative stress markers after intravenous administration of iron dextran, sodium ferric gluconate, and iron sucrose in patients undergoing hemodialysis. Pharmacotherapy 2007; 27(3):343–50.
80. Ganguli A, Kohli HS, Khullar M, Lal Gupta K, Jha V, Sakhuja V. Lipid peroxidation products formation with various intravenous iron preparations in chronic kidney disease. Ren Fail 2009; 31(2):106–10.
81. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, Wasse H. Parenteral iron formulations: a comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury. Am J Kidney Dis 2002; 40(1):90–103.
82. Michelis R, Gery R, Sela S, Shurtz-Swirski R, Grinberg N, Snitkovski T et al. Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 2003; 18(5):924–30.
83. Patel M, Ramavataram, D V S S. Non transferrin bound iron: nature, manifestations and analytical approaches for estimation. Indian J Clin Biochem 2012; 27(4):322–32.
84. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. Am J Med 1991; 91(3):S31-S38.
85. Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. Circulation 2002; 106(17):2212–7.
86. Anand G, Schmid C. Severe hypophosphataemia after intravenous iron administration. BMJ Case Rep 2017; 2017.

87. Bishay RH, Ganda K, Seibel MJ. Long-term iron polymaltose infusions associated with hypophosphataemic osteomalacia: a report of two cases and review of the literature. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2017; 8(1-2):14–9.
88. Zoller H, Schaefer B, Glodny B. Iron-induced hypophosphatemia: an emerging complication. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2017.
89. Prats M, Font R, Garcia C, Cabre C, Jarrod M, Vea AM. Effect of ferric carboxymaltose on serum phosphate and C-terminal FGF23 levels in non-dialysis chronic kidney disease patients: post-hoc analysis of a prospective study. *BMC Nephrol* 2013; 14:167.
90. Macdougall IC. Evolution of iv iron compounds over the last century. *J Ren Care* 2009; 35(s2):8–13.
91. Heath CW, Strauss MB, Castle WB. QUANTITATIVE ASPECTS OF IRON DEFICIENCY IN HYPOCHROMIC ANEMIA: (The Parenteral Administration of Iron). *J Clin Invest* 1932; 11(6):1293–312.
92. GOETSCH AT, MOORE CV, MINNICH V. Observations on the effect of massive doses of iron given intravenously to patients with hypochromic anemia. *J Lab Clin Med* 1946; 31:466.
93. NISSIM JA. Intravenous administration of iron. *Lancet* 1947; 2(6463):49–51.
94. Biggar P, Hahn K-M. Bedeutung der verschiedenen i.v.-Eisengenerationen für den medizinischen Alltag. *MMW - Fortschritte der Medizin* 2013; 155(S2):18–24.
95. Okam MM, Mandell E, Hevelone N, Wentz R, Ross A, Abel GA. Comparative rates of adverse events with different formulations of intravenous iron. *Am. J. Hematol.* 2012; 87(11):E123-E124.
96. Roth S, Langguth P, Spicher K, Enzmann H. Comparative toxicity and cell-tissue distribution study on nanoparticulate iron complexes using avian embryos and HepG2-cells. *Transl Res* 2008; 151(1):36–44.
97. Jahn MR, Andreasen HB, Fütterer S, Nawroth T, Schünemann V, Kolb U et al. A comparative study of the physicochemical properties of iron isomaltoside 1000 (Monofer), a new intravenous iron preparation and its clinical implications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 78:480–91.
98. Fütterer S, Andrusenko I, Kolb U, Hofmeister W, Langguth P. Structural characterization of iron oxide/hydroxide nanoparticles in nine different parenteral drugs for the treatment of iron deficiency anaemia by electron diffraction (ED) and X-ray powder diffraction (XRPD). *J Pharm Biomed Anal* 2013; 86:151–60.
99. Neiser S, Rentsch D, Dippon U, Kappler A, Weidler PG, Göttlicher J et al. Physico-chemical properties of the new generation IV iron preparations ferumoxytol, iron isomaltoside 1000 and ferric carboxymaltose. *Biometals* 2015.
100. EMA. New recommendations to manage risk of allergic reactions with intravenous iron-containing medicines: EMA/579491/2013; 2013 [cited 2017 Feb 22]. Available from: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/IV_iron_31/WC500151308.pdf.

101. EMA. List of medicinal products under additional monitoring: EMA/245297/2013 Rev.41; 2017 [cited 2017 Feb 22]. Available from: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicines_under_additional_monitoring/2013/04/WC500142453.pdf.
102. Europäische Union. DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL: Fassung vom 16.11.2012 [cited 2017 Feb 22]. Available from: URL: http://ec.europa.eu/health//sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf.
103. Borchard G, Fluhmann B, Muhlebach S. Nanoparticle iron medicinal products - Requirements for approval of intended copies of non-biological complex drugs (NBCD) and the importance of clinical comparative studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 64(2):324–8.
104. Crommelin DJA, Vlieger JSB de, Weinstein V, Muhlebach S, Shah VP, Schellekens H. Different pharmaceutical products need similar terminology. *AAPS J* 2014; 16(1):11–4.
105. Crommelin, Daan J A, Shah VP, Klebovich I, McNeil SE, Weinstein V, Flühmann B et al. The similarity question for biologicals and non-biological complex drugs. *Eur J Pharm Sci* 2015; 76:10–7.
106. Spicher K, Brendler-Schwaab S, Schlösser C, Catarinolo M, Fütterer S, Langguth P et al. Differences in tissue distribution of iron from various clinically used intravenous iron complexes in fetal avian heart and liver. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015; 73(1):65–72.
107. Stein J, Dignass A, Chow KU. Clinical case reports raise doubts about the therapeutic equivalence of an iron sucrose similar preparation compared with iron sucrose originator. *Curr Med Res Opin* 2012; 28(2):241–3.
108. Toblli JE, Cao G, Oliveri L, Angerosa M. Differences between original intravenous iron sucrose and iron sucrose similar preparations: Editio Cantor Verlag; 2009.
109. EMA. Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications: EMA/CHMP/SWP/100094/2011; 2011. Available from: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105048.pdf.
110. Meier T, Schropp P, Pater C, Leoni A-L, Van Khov-Tran, Elford P. Physicochemical and toxicological characterization of a new generic iron sucrose preparation. *Arzneimittelforschung* 2011; 61(2):112–9.
111. Funk F, Long GJ, Hautot D, Büchi R, Christl I, Weidler PG. Physical and Chemical Characterization of Therapeutic Iron Containing Materials: A Study of Several Superparamagnetic Drug Formulations with the β -FeOOH or Ferrihydrit Structure. *Hyperfine Interactions* 2001; 136(1):73–95.
112. Balakrishnan VS, Rao M, Kausz AT, Brenner L, Pereira BJG, Frigo TB et al. Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation. *European journal of clinical investigation* 2009; 39(6):489.
113. Barot BS, Parejiya PB, Mehta DM, Shelat PK, Shah GB. Physicochemical and structural characterization of iron-sucrose formulations: a comparative study. *Pharm Dev Technol* 2014; 19(5):513–20.

114. Kudasheva DS, Lai J, Ulman A, Cowman MK. Structure of carbohydrate-bound polynuclear iron oxyhydroxide nanoparticles in parenteral formulations. *J. Inorg. Biochem.* 2004; 98(11):1757–69.
115. Yang Y, Shah RB, Faustino PJ, Raw A, Yu LX, Khan MA. Thermodynamic stability assessment of a colloidal iron drug product: sodium ferric gluconate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99(1):142–53.
116. Easo SL, Mohanan PV. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and in vitro studies. *Carbohydr Polym* 2013; 92(1):726–32.
117. The United States pharmacopeia: The national formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2014.
118. Gupta A, Pratt RD, Crumbliss AL. Ferrous iron content of intravenous iron formulations. *Biomaterials* 2016; 29(3):411–5.
119. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 2008; 5(4):505–15.
120. Cho M, Cho W-S, Choi M, Kim SJ, Han BS, Kim SH et al. The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicol Lett* 2009; 189(3):177–83.
121. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* 2008; 3(5):703–17.
122. Funk F, Long GJ, Hautot D, Büchi R, Christl I, Weidler PG. *Hyperfine Interactions* 2001; 136(1/2):73–95.
123. American Regent. Iron Sucrose Injection Injection USP 2006.
124. Zattoni A, Roda B, Borghi F, Marassi V, Reschiglian P. Flow field-flow fractionation for the analysis of nanoparticles used in drug delivery. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 87:53–61.
125. Baalousha M, Stolpe B, Lead JR. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: a critical review. *J Chromatogr A* 2011; 1218(27):4078–103.
126. Cornell RM, Schwertmann U. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*: Wiley-VCH; 2003.
127. Millan A, Urtizberea A, Natividad E, Luis F, Silva N, Palacio F et al. Akaganeite polymer nanocomposites. *Polymer* 2009; 50(5):1088–94.
128. Bao H, Koch PL. Oxygen isotope fractionation in ferric oxide-water systems: Low temperature synthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1999; 63(5):599–613.
129. Gupta AK, Gupta M. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*: Elsevier; 2005.
130. Maity D, Agrawal DC. *Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media*: Elsevier; 2007.
131. Refait P, Génin J-M. The mechanisms of oxidation of ferrous hydroxychloride β -Fe₂(OH)₃Cl in aqueous solution: The formation of Akaganeite vs goethite. *Corrosion Science* 1997; 39(3):539–53.

132. Paffetti P, Perrone S, Longini M, Ferrari A, Tanganelli D, Marzocchi B et al. Non-protein-bound iron detection in small samples of biological fluids and tissues. *Biological Trace Element Research* 2006; 112(3):221–32.
133. Bonsdorff L von, Lindeberg E, Sahlstedt L, Lehto J, Parkkinen J. Bleomycin-detectable iron assay for non-transferrin-bound iron in hematologic malignancies. *Clin. Chem.* 2002; 48(2):307–14.
134. Takeda Pharmaceutical Company Limited. AMAG Pharmaceuticals and Takeda Announce Mutual Termination of Agreement to License, Develop and Commercialize Ferumoxytol in Ex-U.S. Territories, Including Europe; 2015 [cited 2017 Jun 16]. Available from: URL: <https://www.takeda.com/newsroom/newsreleases/2015/amag-pharmaceuticals-and-takeda-announce-mutual-termination-of-agreement-to-license-develop-and-commercialize-ferumoxytol-in-ex-u.s.-territories-including-europe/>.
135. Borchardt-Ott W, Sowa H. *Kristallographie: Eine Einführung für Naturwissenschaftler*. 8., überarb. und aktualisierte Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2013. (Springer-Lehrbuch).
136. Atkins PW, Trapp CA. *Physikalische Chemie*. 1. Aufl. Weinheim: VCH; 1987.
137. Wikipedia-Autoren. Bravais-Gitter. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 22. Januar 2017, 15:40 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Bravais-Gitter&oldid=161882237> (Abgerufen: 29. Oktober 2017, 12:16 UTC).
138. Pierre Bouguer. *Essai d'optique sur la gradation de la lumière*. Paris; 1729.
139. August Beer. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik Und Chemie* 1852; (86):78–90.
140. Hesse, Manfred, 1935-2011, Meier, Herbert, 1939-, Zeeh, Bernd, 1938-. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie: 102 Tabellen*. 7., überarbeitete Aufl. Stuttgart: Thieme; 2005.
141. Gütlich P, Link R, Trautwein AX. *Mössbauer spectroscopy and transition metal chemistry*. Berlin: Springer; 1978. (Inorganic chemistry concepts; vol 3).
142. Gütlich P. *Physikalische Methoden in der Chemie: Mößbauer-Spektroskopie I*. *Chemie in unserer Zeit* 1970; 4(5):133–44.
143. Mössbauer RL. Kernresonanzfluoreszenz von Gammastrahlung in Ir¹⁹¹. *Z. Physik* 1958; 151(2):124–43.
144. Gross R, Marx A. *Festkörperphysik*. München: Oldenbourg; 2012.
145. Flegler SL, Heckman JW, Klomparens KL. *Elektronenmikroskopie: Grundlagen - Methoden - Anwendungen*. Heidelberg: Spektrum; Akad Verl, 1995.
146. Lange RH, Blödorn J. *Das Elektronenmikroskop: TEM + REM ; Leitfaden für Biologen und Mediziner*. Stuttgart: Thieme; 1981. (Flexible Taschenbücher : Bio).
147. International Organization for Standardization. *Particle size analysis -- Dynamic light scattering (DLS)*. (19.120 Particle size analysis. Sieving).
148. Instruments M. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*; 2016.

149. Derjaguin B, Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science* 1993; 43(1-4):30–59.
150. Marshall CE. "Theory of the stability of lyophobic colloids. The interaction of particles having an electric double layer." E. J. W. Verwey and J. T. G. Overbeek, with the collaboration of K. van Ness. Elsevier, New York-Amsterdam, 1948, 216 pp., \$4.50. *J. Polym. Sci.* 1949; 4(3):413–4.
151. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 2009; 8(7):543–57.
152. Instruments M. Zeta potential: An Introduction in 30 Minutes; 2016.
153. Lagarec K, Rancourt DG. Extended Voigt-based analytic lineshape method for determining N-dimensional correlated hyperfine parameter distributions in Mössbauer spectroscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 1997; 129(2):266–80.
154. Stookey LL. Ferrozin---a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 1970; 42(7):779–81.
155. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (Ferrozin). *Analytical Biochemistry* 1971; 40(2):450–8.
156. Roche/Hitachi. Product information 2010-01, V14; 2010.
157. Gibbs CR. Characterization and application of Ferrozin iron reagent as a ferrous iron indicator. *Analytical Chemistry* 1976; 48(8):1197–201.
158. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* 2014; 17(4):779–804.
159. FánCSI T, Fehér G. Ultrastructural Studies of Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane during Incubation. *Anatom Histol Embryol* 1979; 8(2):151–9.
160. Gilbert SF. *Developmental biology [Medienkombination]*. 7. ed. Sunderland, Mass.: Sinauer; Mass : Sinauer, 2003.
161. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 1992; 195(4):231–72.
162. Rebouche CJ, Wilcox CL, Widness JA. Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 58(3):239–51.
163. Wu Y, Petrochenko P, Chen L, Wong SY, Absar M, Choi S et al. Core size determination and structural characterization of intravenous iron complexes by cryogenic transmission electron microscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 2016; 505(1-2):167–74.
164. Cornell RM, Schwertmann U. *The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences, and uses*. 2nd ed.: Wiley-VCH; 2003.
165. Macdougall IC. Evolution of iv iron compounds over the last century. *J Ren Care* 2009; 35 Suppl 2:8–13.
166. Nič M, Jiráť J, Košata B, Jenkins A, McNaught A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC; 2009.

167. Cakic M, Nikolic G, Ilic L, Stankovic S. Synthesis and FTIR characterization of some dextran sulphates. *CI&CEQ* 2005; 11(2):74–8.
168. Ahmed RZ, Siddiqui K, Arman M, Ahmed N. Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGDEX3. *Carbohydr Polym* 2012; 90(1):441–6.
169. Ibrahim M, Alaam M, El-Haes H, Jalbout AF, Leon Ad. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Eclat. Quím.* 2006; 31(3):15–21.
170. AMAG-Pharmaceuticals Inc. Feraheme ferumoxytol injection - prescription information; 2017 2017 Jul 21.
171. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJL, Mann JF et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: Epidemiology, mechanisms, and prevention. *The Lancet* 2013; 382(9889):339–52.
172. Perazella MA, Khan S. Increased mortality in chronic kidney disease: a call to action. *Am J Med Sci* 2006; 331(3):150–3.
173. Kardiovaskuläre Komplikationen bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung: Mediasklerose, Sekundärer Hyperparathyreoidismus, Entzündung und Anämie; 2017 [cited 2017 Apr 26]. Available from: URL: <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/kardiovaskulaere-komplikationen-bei-chronischer-nierenerkrankung.html>.
174. Kobayashi T, Tadokoro H, Matsumoto K. An autopsy case of secondary iron-overload cardiomyopathy. *Intern Med* 2013; 52(12):1369–73.
175. Auerbach M, Macdougall IC. Safety of intravenous iron formulations: facts and folklore. *Blood Transfus* 2014; 12(3):296–300.
176. sanofi-aventis U.S. LLC, Bridgewater, N. J. US Ferrlecit Prescribing Information; 2011.
177. Chandler G, Harchowal J, Macdougall IC. Intravenous iron sucrose: establishing a safe dose: Elsevier; 2001.
178. Watson Pharma Inc. Sodium ferric gluconate complex in sucrose injection Fachinformation 2011 [cited 2017 Jul 21].
179. Sören Fütterer. Nanoparticulate Iron Complex Drugs for Parenteral Administration - Physicochemical Characterization, Biological Distribution and Pharmacological Safety. Mainz: Johan Gutenberg Universität; 2014.
- 180 MEDICE Arzneimittel. Monofer® 100 mg/ml Injektionslösung und Infusionslösung Fachinformation: Zulassungsnummer: 75060.00.00 2015.
- 181 AMAG-Pharmaceuticals Inc. Feraheme ferumoxytol injection – prescription information; 2017 2017
- 182 Wikipedia-Autoren. Jablonski-Schema. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 27. Januar 2017, 16:39 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Jablonski-Schema&oldid=162050133> (Abgerufen: 29. Oktober 2017, 12:14 UTC)
- 183 Wikipedia-Autoren. Ferrozin. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 29. April 2017, 18:26 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ferrozin&oldid=165026261> (Abgerufen: 29. Oktober 2017)

Charakterisierung parenteraler Eisenkomplexe

184 Pecora R. *Journal of Nanoparticle Research* 2000; 2(2):123–31.

185 Nijman E. *Dynamic light scattering at low concentration and in turbulent flow* [Delft, Techn. Univ., Diss., 2002].

Lebenslauf